

## 特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2021-002

## 芳香族氨基酸及其衍生物的细胞工厂构建策略

孙薇<sup>1,2</sup>, 丁冬芹<sup>2</sup>, 柏丹阳<sup>2</sup>, 朱亚如<sup>2</sup>, 解晓彤<sup>2,3</sup>, 张大伟<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>天津科技大学生物工程学院, 天津 300457; <sup>2</sup>中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308; <sup>3</sup>大连工业大学生物工程学院, 辽宁 大连 116000)

**摘要:** 芳香族氨基酸及其衍生物由于其特定的生理活性, 已广泛应用于医药、食品、饲料和化工等行业。利用重组微生物发酵生产芳香族氨基酸及其衍生物是满足全球日益增长需求的有效途径。通过将代谢工程策略与合成生物学、系统生物学和生物工程的发展相结合, 在菌株的改造及优化方面取得了显著的进展。然而, 合成芳香族氨基酸及其衍生物的代谢途径长且调控机制复杂, 通过简单的代谢途径改造难以大幅提高产量, 因此, 近年来出现了很多相关的改造方法, 为克服代谢途径中的限速问题提供了很好的借鉴意义。本文回顾和比较了最近在芳香族氨基酸及其衍生物合成方面应用的成熟技术和策略, 包括常用的代谢途径改造策略(如增加前体供给、解除关键酶和阻遏蛋白的反馈抑制和阻遏抑制、改造转运系统、全局调节系统)以及菌株生长与生产产品耦联和菌株构建方法(如基于生物传感器的高通量筛选以及对培养基和培养条件的优化等), 未来相关前沿技术如计算机辅助途径酶改造技术和筛选高产菌株的定向进化技术将助力芳香族氨基酸及其衍生物高产菌株的构建。

**关键词:** 芳香族氨基酸; 前体; 反馈抑制; 菌株构建; 芳香族氨基酸衍生物

**中图分类号:** Q81 **文献标志码:** A

## Strategies of cell factory construction for the production of aromatic amino acids and their derivatives

SUN Wei<sup>1,2</sup>, DING Dongqin<sup>2</sup>, BAI Danyang<sup>2</sup>, ZHU Yaru<sup>2</sup>, XIE Xiaotong<sup>2,3</sup>, ZHANG Dawei<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China; <sup>2</sup>College of Bioengineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300308, China; <sup>3</sup>College of Bioengineering, Dalian University of Technology, Dalian 116000, Liaoning, China)

**Abstract:** Aromatic amino acids (including L-tryptophan, L-phenylalanine and L-tyrosine) and their derivatives have been widely used in medicine, food, feed and chemical industry due to their specific physiological properties. The production of aromatic amino acids and their derivatives by recombinant microbial fermentation is an effective way to meet the increasing global demand. By combining metabolic engineering strategy with the developments of synthetic biology, systems biology

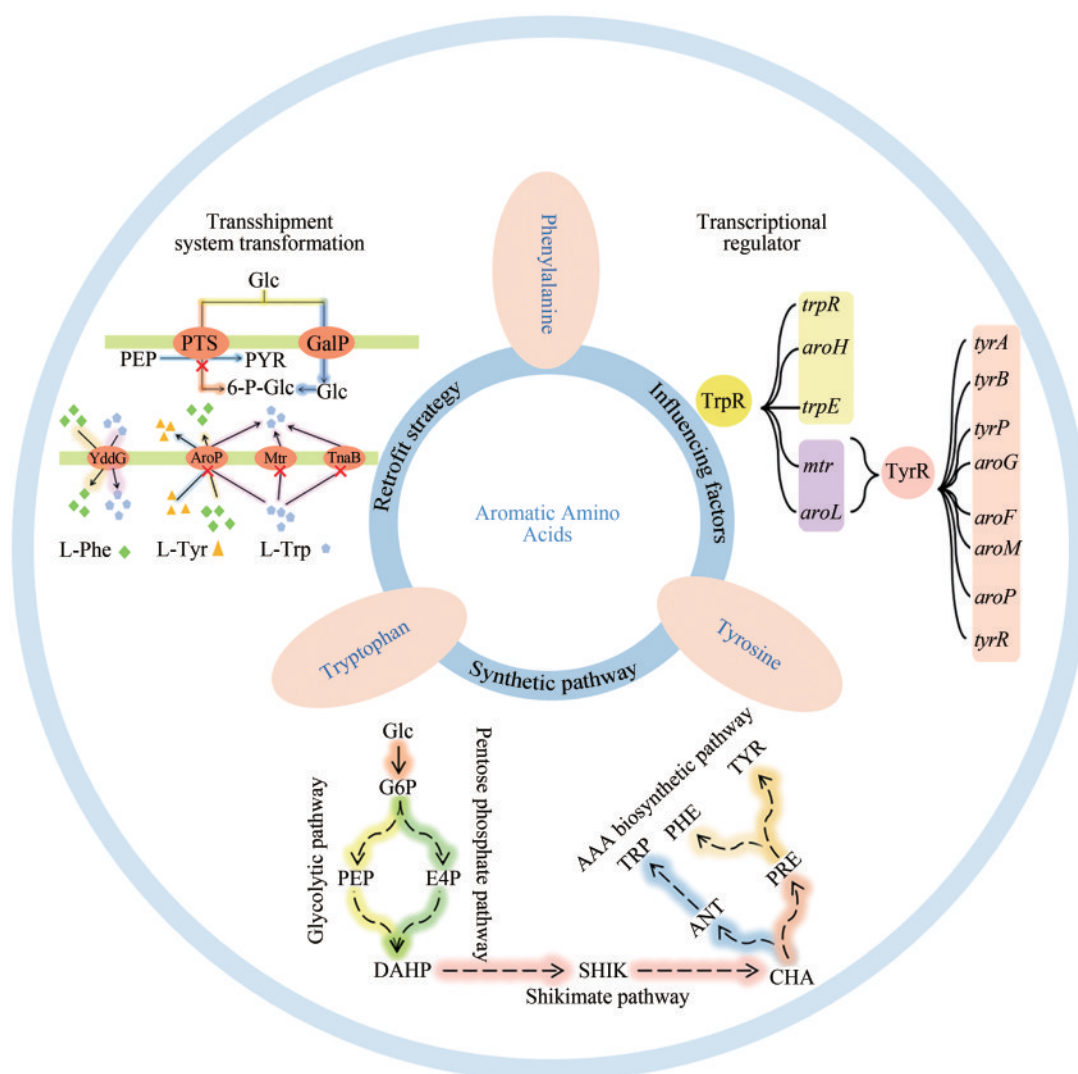
收稿日期: 2021-01-05 修回日期: 2021-04-16

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFA0903700); 天津市杰出青年科学基金(17JJCJC45300); 天津市合成生物技术创新能力提升行动项目(TSBICIP-CXRC-029)

引用本文: 孙薇, 丁冬芹, 柏丹阳, 朱亚如, 解晓彤, 张大伟. 芳香族氨基酸及其衍生物的细胞工厂构建策略[J]. 合成生物学, 2021, 2(6): 982-999

Citation: SUN Wei, DING Dongqin, BAI Danyang, ZHU Yaru, XIE Xiaotong, ZHANG Dawei. Strategies of cell factory construction for the production of aromatic amino acids and their derivatives[J]. Synthetic Biology Journal, 2021, 2(6): 982-999

and bioengineering, remarkable progress has been made in the strains modifications and improvements. However, the metabolic pathways for the synthesis of aromatic amino acids and their derivatives are long and their regulatory mechanisms are complicated, so it is very difficult to significantly improve the yield through simple metabolic pathway-modification. Therefore, many relevant modification methods have emerged in recent years, providing a good reference for overcoming the rate limit problem in the metabolic pathways. In this paper, we review and compare the recent mature technologies and strategies applied in the synthesis of aromatic amino acids and their derivatives, including the commonly used metabolic pathway modification strategies, such as increasing the supply of precursors, removing the feedback inhibition for key enzymes, eliminating the repression of repressor proteins, regulating the transport system and global metabolic network, the coupling of strain's growth and product's production and introducing exogenous related enzymes and so on. Various methods of strain construction are also included, such as the high-throughput screening based on biosensors and optimization of culture medium and culture conditions and so on. Finally, we also discuss the prospect of relevant cutting-edge technologies such as computer design of protein, computer de novo design of enzyme, computer design of metabolic pathway, alphafold algorithm for accurate prediction of protein structure and bifunctional enzyme, and the directed evolution technology for screening high yield strains such as the batch and continuation of the directed evolution.



**Keywords:** aromatic amino acids; precursors; feedback inhibition; strain construction; aromatic amino acid derivatives

芳香族氨基酸是指分子结构式中含有苯环的氨基酸,包括色氨酸(L-Trp)、酪氨酸(L-Tyr)和苯丙氨酸(L-Phe),存在于绝大多数生命体中,也可从食物中获得。此外,芳香族氨基酸的生物学功能对于改善人们生活具有重要的推动作用,目前已被广泛应用于食品、医药、饲料和化工等多个行业。其中,L-Trp具有提高睡眠质量、抗兴奋以及预防胃溃疡和提高免疫力的生理功能<sup>[1]</sup>;L-Tyr常被用作营养补充剂来治疗脊髓炎、结核脑炎和甲状腺机能亢进等疾病<sup>[2]</sup>;L-Phe可用于生产新型甜味剂阿斯巴甜,也是复配氨基酸输液的重要成分之一,还可作为抗癌药物的中间体和良好载体<sup>[3]</sup>。

芳香族氨基酸衍生物是由芳香族氨基酸衍生出的一类具有高附加值的化合物,这些衍生物大多通过化学化工合成或从天然产物直接提取<sup>[4]</sup>。随着合成生物学的发展,人们利用生物合成技术可将芳香族氨基酸直接转变为其衍生物,既保护环境,又避免了天然产物提取困难的问题<sup>[5]</sup>。芳香族氨基酸是其衍生物的重要前体,由此可见,探究芳香族氨基酸生物合成的同时也促进了其衍生物合成的发展,两者在现代市场中都具有较大的商业价值,所以研究其生物合成必不可少。

## 1 芳香族氨基酸的合成途径及生产方法

### 1.1 合成途径

研究表明,芳香族氨基酸合成途径主要分为三大模块:中心碳代谢途径(CCM)、莽草酸

(SHIK)途径和分支酸(CHA)途径,如图1所示。芳香族氨基酸合成途径,以葡萄糖(Glc)为起点,经过CCM途径,相继生成磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)和赤藓糖-4-磷酸(E4P),紧接着二者缩合生成3-脱氧- $\alpha$ -阿拉伯庚酮糖-7-磷酸(DAHP),DAHP经过SHIK途径依次生成SHIK和CHA,最终由CHA分别生成L-Trp、L-Tyr和L-Phe<sup>[6]</sup>。

### 1.2 合成方法

芳香族氨基酸的生产方法有天然蛋白质水解法、化学合成法、转化法(酶转化法和微生物转化法)和微生物发酵法等。每种方法都有各自的优缺点,见表1。目前微生物发酵法是最常用的芳香族氨基酸生产方法,由于芳香族氨基酸合成途径相对较长且复杂,获得工业化高产菌株是微生物发酵法生产芳香族氨基酸的一大瓶颈<sup>[12-13]</sup>。随着现代生物技术的发展,利用代谢工程与合成生物学等相关知识对生产菌株进行改造,是提高芳香族氨基酸产量的一种重要方式。

## 2 芳香族氨基酸生物合成的影响因素及改造策略

### 2.1 芳香族氨基酸生物合成的影响因素

由于合成芳香族氨基酸的代谢途径较长,中间产物繁多且复杂,所以影响芳香族氨基酸合成的因素也多种多样,主要包括基于代谢途径的影响因素,例如前体的供给水平、关键酶受到的反

表1 芳香族氨基酸生产方法的比较

Tab. 1 Comparison of production methods of aromatic amino acids

生产方法	原理	优点	缺点	参考文献
天然蛋白质水解法	利用盐酸使蛋白质发生水解	最初的提取方法	方法原始、产率极低、产物易被破坏	[7]
化学合成法	添加化学试剂,改变碳链结构	快速、高效	工艺复杂、成本高、副产物多	[8]
酶法	利用微生物中的芳香族氨基酸合成酶系	产物转化率高、副产物少、操作简便	筛选强活力酶困难、反应平衡难操控	[9]
微生物转化法	以糖类为碳源,同时添加芳香族氨基酸的前体	耗能少、纯化简便	前体价格昂贵、改造周期较长	[10]
微生物发酵法	以葡萄糖为碳源,利用微生物发酵生产芳香族氨基酸	成本低、环保、工艺流程易控制	获得工业化高产菌株较难	[11]

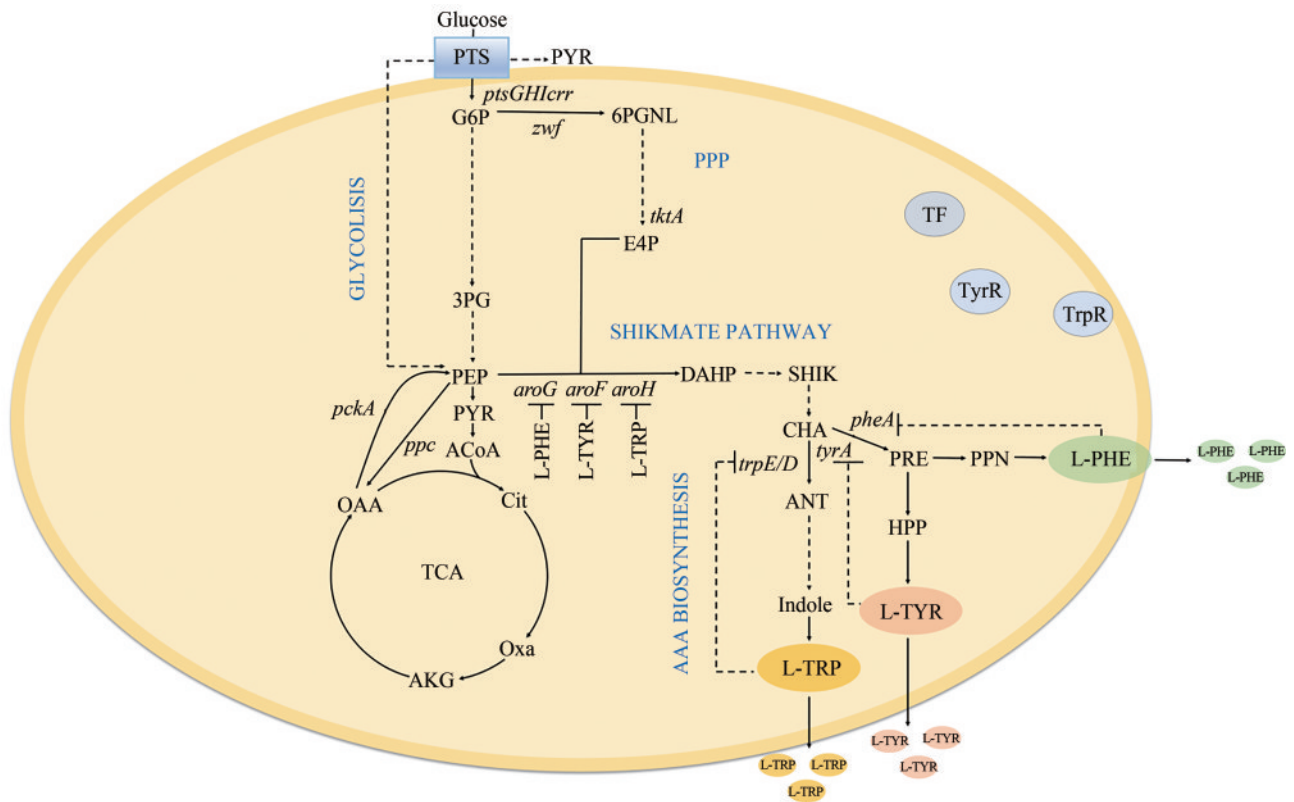


图1 芳香族氨基酸的合成途径

PTS—磷酸转移酶系统；G6P—葡萄糖-6-磷酸；3PG—3-磷酸甘油酸；PYR—丙酮酸；ACoA—乙酰辅酶A；Cit—柠檬酸；Oxa—草酰琥珀酸；AKG— $\alpha$ -酮戊二酸；OAA—草酰乙酸；6PGNL—6-磷酸葡萄糖内脂；ANT—邻氨基苯甲酸；Indole—吲哚；PRE—预苯酸；PPN—苯丙酮酸；HPP—4-羟基苯丙酮酸；*ptsGHlccr*—编码磷酸转移酶基因；*ppc*—编码PEP羧化酶基因；*pckA*—编码PEP羧激酶基因；*tktA*—编码转酮酶基因；*aroG/F/H*—编码DAHP合酶基因；*trpE/D*—编码ANT合酶基因；*tyrA/pheA*—编码CHA变位酶基因

Fig. 1 Synthesis of aromatic amino acids

PTS—phosphotransferase system; G6P—glucose-6-phosphate; 3PG—3-phosphoglyceric acid; PYR—pyruvic acid; ACoA—acetyl coenzyme A; Cit—citrate; Oxa—oxalysuccinic acid; AKG— $\alpha$ -ketoglutarate; OAA—oxaloacetic acid; 6PGNL—glucose 6-phosphate endlipid; ANT—*o*-aminobenzoic acid; PRE—prephenic acid; PPN—phenylpyruvic acid; HPP—4-hydroxyphenylpyruvic acid  
Gene: *ptsGHlccr*—encoding phosphotransferase; *ppc*—encoding PEP carboxylase; *pckA*—encoding PEP carboxykinase; *tktA*—encoding transketolase; *aroG/F/H*—encoding DAHP synthase; *trpE/D*—encoding ANTA synthase; *tyrA/pheA*—encoding CHA mutase

馈抑制、调控蛋白对合成途径的转录调节、转运蛋白的转运效率以及基于菌株个体的改造方法等。基于代谢途径的常见影响因素见表2。

## 2.2 芳香族氨基酸生物合成的改造策略

### 2.2.1 改造中心碳代谢途径,增加前体供给水平

#### (1) 增加PEP供给水平

PEP是芳香族氨基酸合成途径中的重要前体之一,研究表明,流向PEP的碳通量要比流向E4P的碳通量高一个数量级<sup>[31]</sup>。PEP在糖酵解(EMP)途径中是一个多种酶共同竞争的底物,其生成量和消耗量会对SHIK途径的碳通量造成显著影响。

当大肠杆菌以葡萄糖为唯一碳源生长时,负责葡萄糖摄取和磷酸化的PTS系统消耗50%的PEP<sup>[18]</sup>,进而导致进入莽草酸的碳通量降低了一半。在此前提下,以葡萄糖为碳源生成DAHP的最大理论产量为0.43 mol/mol葡萄糖。如果单纯去除PTS系统,细胞内的PEP的积累量会有相对的提高,但葡萄糖的转运速率却随之降低,甚至还会影响细胞的生长状态<sup>[14]</sup>。所以,研究者多采用非PTS系统来降低PEP的消耗。Patnaik等<sup>[32]</sup>以木糖为碳源,发现DAHP的最大理论产量可达到0.71 mol/mol木糖。Carmona等<sup>[33]</sup>与Chen等<sup>[34]</sup>的研究证明了使PTS的胞质成分失活(例如*ptsHIccr*操纵子)已成为取

表2 芳香族氨基酸合成的影响因素

Tab. 2 Factors affecting synthesis of aromatic amino acids

影响因素	详情
前体的供给	PEP, 涉及其生成和消耗的系统 and 酶有: PEP 合酶、PEP 羧激酶 <sup>[14]</sup> 、磷酸转移酶系统 (PTS) <sup>[15]</sup> 、PEP 羧化酶 <sup>[16]</sup> 、丙酮酸羧激酶 <sup>[17]</sup> E4P, 涉及其生成的酶有转酮酶、转醛酶 <sup>[18-19]</sup>
关键酶的反馈抑制	DAHP 合酶、ANT 合酶 <sup>[20]</sup> 、分支酸变位酶/预苯酸脱水酶 (CM-PDT) <sup>[21]</sup>
调控因子 TyrR 和 TrpR 对合成途径的转录调节	TyrR 调控蛋白调节 8 个非连续操纵子的表达 <sup>[22]</sup> TrpR 调控蛋白调节基因 <i>aroH</i> 、 <i>mtr</i> 和色氨酸操纵子 <sup>[23]</sup>
转运系统	分泌系统: 转运基因 <i>tnaB</i> 、 <i>mtr</i> 、 <i>aroP</i> 负责芳香族氨基酸的运输 <sup>[24-25]</sup> 膜蛋白 YddG <sup>[26]</sup> : 参与芳香族氨基酸由胞内向胞外的转运
其他因素	L-Trp 分支途径: 色氨酸酶 ( <i>tnaA</i> ) <sup>[27]</sup> 、磷酸甘油酸脱氢酶 ( <i>serA</i> ) <sup>[28]</sup> L-Tyr 分支途径: SHIK 脱氢酶 ( <i>aroB</i> )、SHIK 激酶 ( <i>aroK</i> ) <sup>[29]</sup> L-Phe 分支途径: 全局调节系统——Csr <sup>[30]</sup>

消 PTS 促进的葡萄糖转运系统的代表策略。但是, PTS 缺陷型菌株的生长能力通常严重受损。为了恢复 PTS 缺陷菌株中的葡萄糖转运, 激活其他潜在的糖转运蛋白或载体, 例如半乳糖通透酶 (GalP) 和葡萄糖激酶 (Glk) 途径, 可以作为一种有前途的策略<sup>[34-35]</sup>。Chen 等<sup>[36]</sup> 提到 GalP/Glk 依赖菌株的最大理论产量经计算为 0.45 g/g, 约为 PTS 依赖菌株的 2 倍, 这为增加 PEP 供给水平提供了一个很好的研究方向。吴涛等<sup>[37]</sup> 利用 Red 同源重组系统构建了一株 PTS 突变菌株 (敲除基因 *ptsHI*、*crr* 和 *glf*, 过表达 *glk*), 在 50 L 发酵罐中进行分批发酵, 对照原菌株 L-Trp 产量提高了 25.9%。

除此之外, 与 PEP 合成和消耗相关的基因主要有 *ppsA* (编码 PEP 合酶)、*pckA*、*ppc*、*pykA* 和 *pykF* (编码丙酮酸激酶)<sup>[16]</sup> (图 2)。研究者多采用敲除或者过表达的基因改造方法来提高 PEP 的积累量。例如, Berry 和 Gosset 等<sup>[38-39]</sup> 通过实验发现, 单独敲除编码丙酮酸激酶的基因 *pykA* 或 *pykF*, 对 DAHP 的产量不会造成任何的影响, 但如果同时敲除两个基因 (*pykA* 和 *pykF*), DAHP 的产量会增加到原来的 3 倍。近年来有学者结合前人的改造方法, 同时替换相应基因的启动子, 如 Du 等<sup>[40]</sup> 选择 TRP1 为出发菌株, 先是敲除基因 *tnaA* 和 *mtr*, 阻止 L-Trp 的降解和运输, 其次分别把  $P_{trpE}$ 、 $P_{trpA}$  整合至 *trpE* 和 *tyrR* 的基因座中, 提高了色氨酸操纵子活性并减轻了 TyrR 蛋白对 ANT 合酶的反馈抑制, 接着过表达基因 *pps*、*pck* 和 *citT*, 增加了 PEP 供应和增强了柠檬酸的运输, 最后使用基因大片段整合方法使  $P_{acnB}$  启动串联基因 *acnBA* 和

*icd* 的转录, 以增强 TCA 循环, 并在 5 L 生物反应器中发酵 36 h, L-Trp 的浓度达到 49 g/L。

#### (2) 增加 E4P 的供给水平

E4P 是芳香族氨基酸合成途径中另一个重要前体<sup>[41]</sup>, 其是在磷酸戊糖途径 (PPP) 中由转酮酶和转醛酶催化生成。转醛酶是由基因 *talB* 编码, 转酮酶是由基因 *tktA* 和 *tktB* 编码, 其中只有 *tktA* 对 E4P 的生成起主要的调节作用<sup>[19]</sup>。此外, 通过弱化 EMP 途径, 可以增强 PPP 途径的碳通量, 这也是一种提高 E4P 积累量的有效策略。

Tyagi 等<sup>[42]</sup> 通过在缺失 *aroB* 基因的大肠杆菌菌株中过表达 *tktA* 基因, 发现 DAHP 的积累量有一定的提高, 之后又同时过表达 *aroG<sup>br</sup>* 和 *tktA* 基因, 发现从葡萄糖到芳香族氨基酸的碳通量额外增加两倍; 除此之外, Mascarenhas 等<sup>[43]</sup> 通过敲除编码磷酸葡糖异构酶基因 *pgi*, 发现 EMP 途径被阻断, 进而造成碳通量转移到 PPP 途径中, 最终导致 L-Trp 在发酵罐中的产量提高了 2 倍, 但是此种方法降低了菌株的生长率。Liu 等<sup>[18]</sup> 与 Guo 等<sup>[44]</sup> 通过在酵母中引入异源磷酸酮醇酶实现了前体 E4P 通量的提高, 进而增强芳香族氨基酸的生产, 大肠杆菌中也可尝试此方法进行。

#### 2.2.2 解除关键酶的反馈抑制作用和消除 TrpR、TyrR 蛋白的阻遏作用

为了提高芳香族氨基酸的产量, 解除终端产物对关键酶的反馈抑制作用也是十分有效的方法。在芳香族氨基酸合成途径中, 最关键的酶是 DAHP 合酶、ANT 合酶以及 CM-PDT。大多研究者都是通过诱变育种随机筛选突变菌株或分析关键酶的

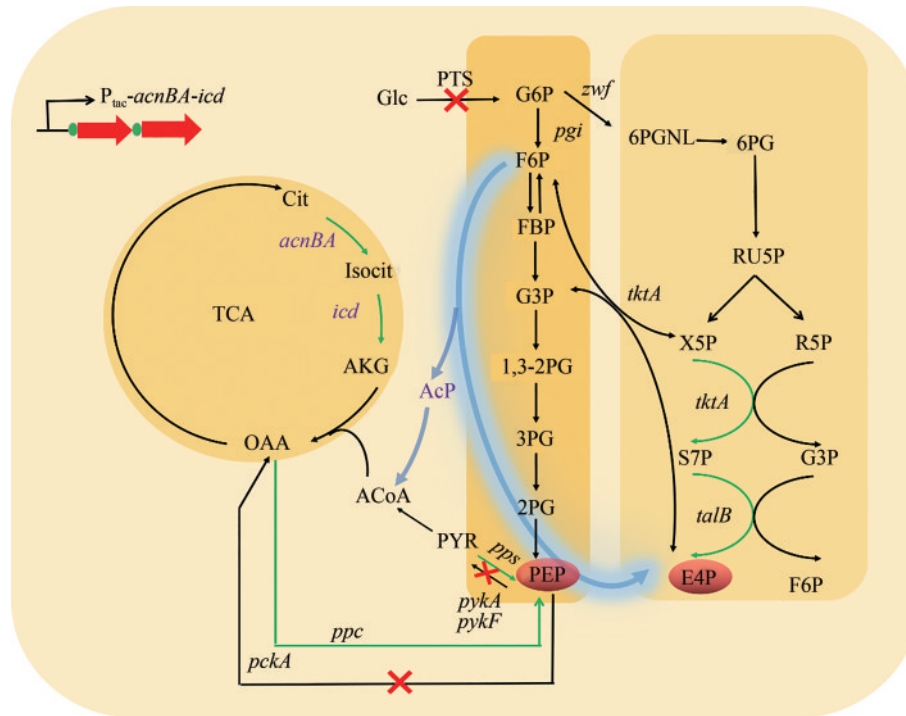


图2 PEP和E4P合成途径的改造

(“绿色箭头”表示过表达,“红色叉号”表示敲除)

F6P—果糖-6-磷酸;FBP—果糖1,6-二磷酸;G3P—甘油醛-3-磷酸;1,3-2PG—1,3-二磷酸甘油酸;3PG—3-磷酸甘油酸;2PG—2-磷酸甘油酸;Isocit—异柠檬酸;AKG— $\alpha$ -酮戊二酸;6PG—6-磷酸葡萄糖酸;RU5P—核酮糖-5-磷酸;X5P—木酮糖-5-磷酸;R5P—核酮糖-5-磷酸;S7P—景天庚酮糖-7-磷酸;G3P—甘油醛-3-磷酸;*acnBA*—编码乌头酸酶基因;*icd*—编码异柠檬酸脱氢酶基因;*zwf*—编码葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因

Fig. 2 Modification of synthesis route of PEP and E4P

("Green arrow" indicates overexpression, "red cross" indicates knockout)

F6P—fructose-6-phosphate;FBP—fructose 1,6-diphosphate;G3P—glyceraldehyde-3-phosphate;1,3-2PG—1,3-diphosphoglyceride;3PG—3-phosphoglyceric acid;2PG—2-phosphoglyceric acid;Isocit—Isocitric acid;AKG— $\alpha$ -ketoglutarate;6PG—6-phosphogluconic acid;RU5P—ketose-5-phosphate;

X5P—xylulose-5-phosphate;R5P—ketose-5-phosphate;S7P—sedum heptanulose-7-phosphate;G3P—glyceraldehyde-3-phosphate

Gene: *acnBA*—encoding aconitase; *icd*—encoding isocitrate dehydrogenase; *zwf*—encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase

蛋白三维结构对其进行定点突变,从而达到解除终端产物对其反馈抑制的目的<sup>[45]</sup>。如表3所示,Dodge等<sup>[55]</sup>将含有色氨酸操纵子的组成型质粒(*trpE<sup>br</sup>*、*trpD<sup>br</sup>*)转化到缺失*trpR*和*tnaA*基因的宿主菌中,经过27h的发酵罐发酵,L-Trp的产量达到6.2g/L,之后,在该菌株的基础上,对其进行多次诱变育种,L-Trp的产量达到30g/L,为了继续提高L-Trp的产量,又在发酵中期添加了一定量的表面活性剂L61,最终L-Trp的产量达到54.5g/L,这是现在为止报道的大肠杆菌产L-Trp的最高产量。刘双平等<sup>[56]</sup>先通过灭活*ccr*基因减少了PEP的损耗,其次通过设置基因开关控制*phe<sup>br</sup>*、*aroG15*、*ydiB*、*aroK*和*tyrB*的表达,以增加前体的供应,接着使用含有*tyrA*突变体的大肠杆菌菌株来减少碳的转移,最后通过过表达*yddG*基因促

进L-Phe的外排,在发酵罐中进行发酵,L-Phe的积累量可达到47g/L,此产量是在没有优化发酵条件的情况下的最高产量。Fernstrom等<sup>[57]</sup>利用DNA重组技术,构建了一株含有基因*trpE<sup>br</sup>*、*aroFBL*和*serA<sup>br</sup>*的大肠杆菌生产菌株,同时敲除基因*sdaB*、*tnaA*、*trpL*和*tnaA*,并将多拷贝质粒pF112-*aroFBL*-kan转化至菌体中,在15L全自动搅拌釜式生物反应器中发酵,L-Trp浓度可达12.5g/L。Zeng等<sup>[36]</sup>通过纯理性改造,将解除反馈抑制的*serA*基因插到DAHP合酶的基因座中,通过分批补料方式在发酵罐中进行发酵,L-Trp的产量可达34~40g/L,而对于纯理性改造L-Trp,其产量和生产力几乎是以往研究的两倍。

消除阻遏蛋白的阻遏作用也是提高芳香族氨基酸产量的常用方法(图3),古鹏飞<sup>[58]</sup>通过敲除

表3 芳香族氨基酸合成途径中抗反馈抑制的关键酶

Tab. 3 Key enzymes in aromatic amino acid synthesis against feedback inhibition

菌种	关键酶	编码基因	终端产物反馈抑制	定点突变	参考文献
大肠杆菌	DAHP 合酶	<i>aroF</i> (占比19%)	L-Tyr	Pro148Leu	[14, 16]
				Gln152Ile	[16, 46]
				Asn8Lys(N末端)	[14, 16]
		<i>aroG</i> (占比80%)	L-Phe	Leu76Val	[16]
				Pro150Leu	[16, 47]
				Asp146Asn	[16, 47]
					[16]
	ANT 合酶	<i>trpE</i>	L-Trp	Ser40Phe	[48-49]
				Met1293Thr	[49-50]
	CM-PDT	<i>pheA</i>	L-Phe	Glu39Lys	[51]
Gly309Cys				[52]	
<i>tyrA</i>				L-Tyr	缺失305~386位基因
				Ala354Val, Met53Ile	[51, 53]
				Gla534Val, Phe357Leu, Tyr263His	[54]

*trpR*、*tnaA*，既解除了 TrpR 蛋白的阻遏作用，又降低了 L-Trp 胞内的降解，最终提高了 L-Trp 的产量。在此基础上他使用 *5CPTacs* 启动子取代了色氨酸操纵子野生型启动子，进一步增强启动子强度，接着采取一步法敲除了色氨酸衰减子，消除了其衰减作用，最后通过摇瓶发酵，L-Trp 的产量可达 10.15 g/L。Muñoz 等 [59] 在 PTS-大肠杆菌生产菌株中敲除了 *tyrR* 基因，不仅提高了前体 PEP 的积累量，还解除了 TyrR 蛋白的反馈阻遏，经过进一步发酵，L-Tyr 的产量相比原菌株提高了 1.9 倍。Kim 等 [60] 在大肠杆菌菌株中通过敲除编码 TyrP 通透酶

的 *tyrP* 基因，并过表达 *aroG<sup>ubr</sup>*、*aroL* 和 *tyrC* 基因，在发酵罐中进行发酵，L-Tyr 的产量可达 43.1 g/L。刘丽娜等 [47] 通过敲除 *fruR* 基因，使阻遏蛋白 FruR 失活，提高了大肠杆菌 FB-04 中 L-Trp 的产量。通过敲除关键酶以及限速酶，既解除了其对芳香族氨基酸合成途径的反馈抑制，也增强了合成途径的碳通量，是提高芳香族氨基酸产量的常用改造策略，同时，敲除 TrpR 和 TyrR 这两个阻遏蛋白，消除了其对芳香族氨基酸合成途径的阻遏作用，根据以上改造策略，生物合成芳香族氨基酸的研究取得了一定的进展，见表 4。

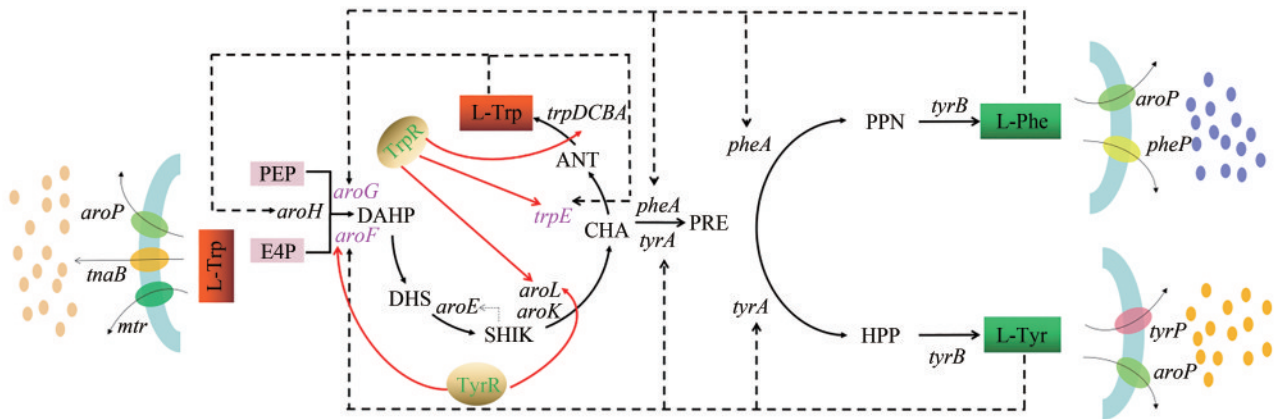


图3 关键酶的反馈抑制和调控蛋白的阻遏作用

(“虚线”表示反馈抑制，“红色实线箭头”表示阻遏作用)

Fig. 3 Feedback inhibition of key enzymes and repression of regulatory proteins

(“Dotted line” indicates feedback inhibition, “red solid line arrow” indicates inhibition)

表4 芳香族氨基酸及其衍生物生产概况

Tab. 4 General profile of production of aromatic amino acids and their derivatives

芳香族氨基酸及其衍生物	宿主细胞/生产菌株	改造策略	发酵方式	产量/(g/L)	参考文献
L-Phe	<i>E.coli</i> W3110 突变菌株	<i>pheA</i> <sup>Thr326Pro</sup> 、 <i>aroF</i> 、 <i>galp</i> 、 <i>glk</i> 、 <i>aroD</i> 、 <i>tyrR</i> <sup>T495I</sup> 、 <i>ΔptsH</i>	分批补料	72.9	[61]
S/R-扁桃酸	<i>E.coli</i>	引入 <i>A. orientalis</i> 的 <i>HamS</i> 、 <i>ΔtyrA</i> 和共表达 <i>S. coelicolor</i> 的 <i>hmo</i> 、 <i>Rhodotorula graminis</i> 的 <i>dmd</i>	摇瓶发酵	0.74/0.68	[62]
苯乳酸	<i>E.coli</i> (L-Phe 高产菌株)	<i>ldhA</i> 、来自 <i>Wickerhamia fluorescens</i> 的 <i>pprA</i>	分批发酵	29	[63]
肉桂酸/醛	<i>E.coli</i>	<i>pal/pal</i> 、 <i>ccl</i> 、 <i>ccr</i>	摇瓶发酵	0.287/0.075	[64]
肉桂醇	<i>S.cerevisiae</i>	<i>pal2</i> 、 <i>acar</i> 、 <i>entD</i> 、 <i>Adh6</i>	摇瓶发酵	0.0278	[65]
苯乙烯	<i>E.coli</i>	<i>pal2</i> 、 <i>fdc1</i>	摇瓶发酵	0.26	[66]
L-Trp	<i>E.coli</i> W3110	多次随机诱变	分批补料	54.5	[55]
生长素	<i>E.coli</i>	<i>aspC</i> 、 <i>ipdC</i> 、 <i>iad1</i>	催化转化	3	[67]
紫色杆菌素	<i>C.glutamicum</i>	<i>vioA</i> 、 <i>vioB</i> 、 <i>vioC</i> 、 <i>vioD</i> 、 <i>vioE</i>	分批补料	5.436	[68]
脱氧紫色杆菌素	<i>E.coli</i>	<i>vioA</i> 、 <i>vioB</i> 、 <i>vioC</i> 、 <i>vioE</i>	摇瓶发酵	0.3241	[69]
血清素	<i>E.coli</i>	T-5H、共表达来自 <i>Catharanthus roseus</i> 的 TDC	催化转化	24	[70]
靛红、靛蓝	<i>E.coli</i>	<i>tnaA</i> 、引入来自 <i>Methylophaga aminisulfidivorans</i> 的 <i>fmo</i>	催化转化	5/0.92	[71]
L-Tyr	<i>E.coli</i> MG1655 衍生菌株	<i>tyrA</i> 、 <i>ΔpheA</i> 、 <i>ΔpheL</i>	分批补料	55	[50]
丹参素	<i>E.coli</i>	<i>d-ldh</i> <sup>Y52A</sup> 、 <i>hpaBC</i>	分批补料	7.1	[72]
对羟基肉桂酸	<i>Yeast</i>	TAL、用 SET3p、CDC24p 和 ALD5p 替换 PFK1、PFK2 和 PYK1 天然启动子	分批补料	12.5	[18]
4-羟基苯乙烯	<i>E.coli</i>	<i>pal</i> 、 <i>pdc</i>	分批补料	0.4	[73]
L-多巴	<i>E.coli</i>	引入来自 <i>Zymomonas mobilis</i> 的 <i>tyrC</i> 、 <i>hpaBC</i>	分批补料	1.51	[59]

### 2.2.3 改造转运系统

转运系统关系到终端产物向胞外分泌的程度，相关的在转运基因有 *mtr*、*tnaB* 和 *aroP*，其中 *aroP* 可运输 L-Phe、L-Trp 和 L-Tyr，而 *mtr* 和 *tnaB* 只对 L-Trp 的转运起作用<sup>[74-75]</sup>，有报道显示 YddG 蛋白也参与了芳香族氨基酸的运输<sup>[76]</sup>。目前为止，对转运系统改造的报道有很多，研究者大多采用基因敲除或者使相关酶失活的方法来阻止芳香族氨基酸向胞内的转运，如 Yanofsky 等<sup>[24]</sup> 研究了在大

肠杆菌中 3 个转运基因 *mtr*、*tnaB*、*aroP* 的失活对 L-Trp 产量的影响，首次得到当大肠杆菌在酸水解酪蛋白的培养基中培养时，敲除基因 *tnaB* 对 L-Trp 的产量影响最大，接着是 *mtr*，而敲除 *aroP* 对 L-Trp 的产量几乎没有任何影响的重要结论，但当培养基中没有 L-Phe 和 L-Tyr 存在时，*aroP* 的失活就会对 L-Trp 的吸收产生重要影响的重要结论。赵志军<sup>[13]</sup> 通过敲除 *mtr* 转运基因，使得 L-Trp 的产量得到相应提高。古鹏飞<sup>[58]</sup> 对 *mtr*、*tnaB* 和 *aroP* 基

因进行全敲除,发现对L-Trp的积累有明显的促进作用,并在摇瓶发酵中L-Trp产量可达2.79 g/L。Liu等<sup>[56]</sup>通过分别在大肠杆菌L-Trp生产菌株和L-Phe生产菌株中过表达*yddG*基因,发现L-Trp和L-Phe的积累量都有明显的提高。

#### 2.2.4 全局代谢网络

人们在大肠杆菌中发现了一个独特的全局调节系统——Csr,它能够通过全局代谢网络来调节CCM途径的碳通量,而这种调节主要是通过一种小RNA结合蛋白CsrA来实现的。CsrA蛋白能正向调节丙酮酸激酶,负向调节PEP羧激酶和PEP合酶,且这3种酶都与前体PEP的合成密切相关,直接影响芳香族氨基酸的产量,除此之外,破坏*csrA*基因能够增强糖异生和糖原生物合成酶的活性,并减弱EMP途径等<sup>[30]</sup>。其中,以L-Phe为典型代表,Tatarko等<sup>[77]</sup>通过在大肠杆菌菌株中敲除*csrA*基因,并过量表达*tklA*基因,最终对比原菌株发现L-Phe的产量提高了3.4倍。Yakandawala等<sup>[78]</sup>分别检测了*csrA*和*csrD*突变以及过表达*csrB*基因对大肠杆菌L-Phe生产菌株的影响,结果表明,过表达*csrB*基因导致的L-Phe产量明显高于*csrA*和*csrD*突变。

#### 2.2.5 菌株生长与产品生产偶联

微生物合成是一种很有前景的方法,可以持续生产工业上重要的产品,大幅度地提高了产品产量。然而,代谢负担和各种基因操作往往会给菌株带来生产性能限制表型,这是现在生物制造的主要挑战之一<sup>[79]</sup>。为了解决这个问题,一个优越的策略是将产品合成与细胞生长耦合起来,这使得细胞生存必须生产产品,两者相互依存,缺一不可<sup>[80]</sup>。Wang等<sup>[81]</sup>在工程大肠杆菌中创建了一种丙酮酸驱动的代谢方案,用于生长耦合产品生产,从而证明其在促进邻氨基苯甲酸酯及其衍生物生产方面的应用,并促进了两种邻氨基甲酸酯衍生的高价值产品的生产,包括L-Trp,这为提高L-Trp产量提供了很好的借鉴意义。

### 2.3 芳香族氨基酸高产菌株筛选方法

#### 2.3.1 基于生物传感器的高通量筛选

生物传感器可感知自然界中的众多信息,比

如环境变化、危险信号等,此功能在人类发展史上已经得到应用,比如人们会利用狗的嗅觉来帮助查案等。现代生物传感器应用了类似的原理,它可响应并感知被检测对象,并按照一定的规律将感知信号转换成与之对应的易于观察的输出信号,已广泛应用于生物技术和合成生物学中<sup>[82-83]</sup>。体内生物传感器作为传感器的一种类型,能够实时感知并响应体内的目标小分子,对代谢工程和代谢网络调控有重要作用。近些年,生物传感器已广泛应用于菌株筛选方面,面对采用各式各样基因手段改造出的菌株,生物传感器可以对改造效果进行高通量且快速的评价,并从中确定出优质菌种<sup>[84]</sup>。比如,在芳香族氨基酸菌株改造方面,Fang等<sup>[85]</sup>通过建立L-Trp生物传感器,该传感器调控由L-Trp诱导的*tnaCAB*操纵子的转录,还可响应代谢途径中产生的L-Trp,为了增强L-Trp代谢途径,引入了InterSPPS策略(以顺序推拉的方式平衡L-Trp代谢途径上游和下游的碳通量),并结合流式筛选技术,筛选到了大肠杆菌性能优质的菌株B8,从而达到提高色氨酸产量的目的。Zhang等<sup>[86-87]</sup>开发了一种基于转录调控因子TyrR的L-Phe生物传感器,该装置能够特异地感知胞内的L-Phe,并将L-Phe浓度转化为易于观察的黄色荧光,该荧光信号可利用多功能酶标仪或流式分析仪进行快速测定,从而实现了对发酵过程中L-Phe的浓度进行实时监测;利用此元件,他们成功从一个核糖核苷酸结合位点库和一个菌株随机突变库中筛选出了L-Phe高产表型,达到了提高L-Phe产量的目的。Chen等<sup>[88]</sup>则将CRISPR/Cas9促进的靶基因工程与生长耦联和传感器引导的体内筛选(CGSS)整合在一起,该方法已成功用于工程化一种关键酶——DAHP合酶AroG。二者结合可以更快地得到芳香族氨基酸的高产菌株。

#### 2.3.2 优化培养基和培养条件

培养基是微生物赖以生长繁殖的环境,主要包括碳源、氮源、无机盐以及维生素、水等,见表5。研究者多采用优化培养基的各组分的方法,使菌种的生长状态达到最佳,进而达到提高芳香族氨基酸产量的目的。

张婷婷<sup>[93]</sup>分别检测了6种不同碳源对菌体生长的影响,结果显示,当以葡萄糖为唯一碳源时,

表5 培养基中各组分的优化

Tab. 5 The components optimization in the medium

影响组分	作用	不同种类	参考文献
碳源	提供能量和碳链骨架	葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖、淀粉	[89]
氮源	合成氨基酸、蛋白质和含氮代谢物	酵母粉、牛肉膏、蛋白胨、酵母膏、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	[90-91]
无机盐	调节pH,维持渗透压	$\text{MgSO}_4$ 、 $\text{MgCl}_2$ 、 $\text{CaCO}_3$ 、 $\text{KCl}$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$	[92]

且当葡萄糖的初始浓度为30 g/L时, L-Trp产量可达到最大值。在此基础上, 她还检测了多种氮源对菌体生长和色氨酸发酵的影响, 发现以酵母粉为有机氮源, 以 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 为无机氮源时, 菌体的生长量和色氨酸的产量达到最大。娄秀平<sup>[92]</sup>采用单因素实验和正交实验设计, 探究了不同浓度的盐离子对大肠杆菌L-Trp生产菌株的影响, 结果表明, 6 g/L的 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 和2 g/L的 $\text{MgSO}_4$ 为最佳组合。

流加式(fed-batch)培养已经成为一种生产芳香族氨基酸的流行方法, 并且还被广泛应用于发酵工程中<sup>[94]</sup>。在芳香族氨基酸生物合成途径中, 底物的抑制作用、终端产物的反馈抑制以及阻遏蛋白的阻遏效应都无法避免, 但是采用流加式培养, 在一定程度上能够减缓这些不利于芳香族氨基酸生产的负面反应。同时, 流加式培养能够更好地控制反应过程中溶氧, 既解决了因一次性投放葡萄糖造成的细胞耗氧过多的问题, 还能使菌种始终保持正常的生理状态。Jing等<sup>[95]</sup>通过构建新型动态控制策略, 该策略将优化的ANT进料纳入溶解氧(DO-stat)葡萄糖进料框架, 实现了大规模生产过程中报道的最高的葡萄糖至L-Trp产量(0.244 g/g), 接近最大理论产量0.277 g/g。除此之外, 接种量、培养温度、培养基的初始pH以及补料方式等对生产芳香族氨基酸的生产也具有重要的影响。

### 3 芳香族氨基酸衍生物的生物合成

#### 3.1 L-苯丙氨酸衍生物的生物合成

L-Phe分支途径中的苯丙酮酸和L-Phe在相应酶的催化下可衍生为不同化合物, 如扁桃酸、D-苯甘氨酸、D-苯丙氨酸、苯乳酸、苯乙烯、肉桂酸、肉桂醛、肉桂醇等, 这些衍生物都具有其独特的应用价值。

扁桃酸主要应用于制药行业, 是药物合成的重要前体<sup>[96]</sup>。扁桃酸的合成主要是由4-羟基扁桃酸合酶(由*hamS*编码)催化苯丙酮酸完成[图4(a)]。Sun等<sup>[62]</sup>构建了以葡萄糖为碳源的大肠杆菌菌株, 为了提高扁桃酸的生成量, 引入了来自*A. orientalis*的HamS, 同时还敲除了竞争途径基因*tyrA*, 经过发酵, S-扁桃酸的产量可达0.74 g/L。接着他又在该菌株的基础上, 共表达了来自*S. coelicolor*对羟基扁桃酸氧化酶(由*hmo*编码)和来自*Rhodotorula graminis*对羟基扁桃酸脱氢酶(由*dmd*编码), 得到了0.68 g/L的R-扁桃酸。

苯乳酸在一定程度上能够抑制使食品发生腐败变质的细菌和使人类患病的致病菌的生长, 所以其在食品和制药行业中有很大的发展潜力<sup>[97]</sup>。在乳酸脱氢酶(由*ldhA*编码)的催化作用下, 苯丙酮酸可生成苯乳酸[图4(b)]。Fujita等<sup>[63]</sup>在高产L-Phe大肠杆菌菌株中表达来自*Wickerhamia fluorescens*的苯丙酮酸还原酶(由*pprA*编码), 结合发酵条件的优化, 最终D-苯乳酸的产量可达29 g/L。

#### 3.2 L-色氨酸衍生物的生物合成

L-色氨酸在相关酶催化作用下可衍生成多种具有独特功能的芳香性化合物, 如生长素(吲哚-3-乙酸)、紫色杆菌素、脱氧紫色杆菌素<sup>[85]</sup>、靛红、靛蓝和血清素等。相比于L-Phe和L-Tyr, L-Trp分支途径中前体较多, 所以, 提高L-色氨酸衍生物产量是现阶段人们应该关注的焦点。

血清素, 又叫5-羟色胺, 在动物中可作为神经递质, 具有丰富的药用价值<sup>[98]</sup>, 其还可以在相应酶催化下生成具有商业价值的褪黑素<sup>[57]</sup>。在动物中, L-色氨酸先后由色氨酸5-羟化酶(TPH)和色氨酸脱羧酶(TDC)催化生成血清素[图4(c)]。而在植物中, L-色氨酸先后由TDC和色胺5-羟化

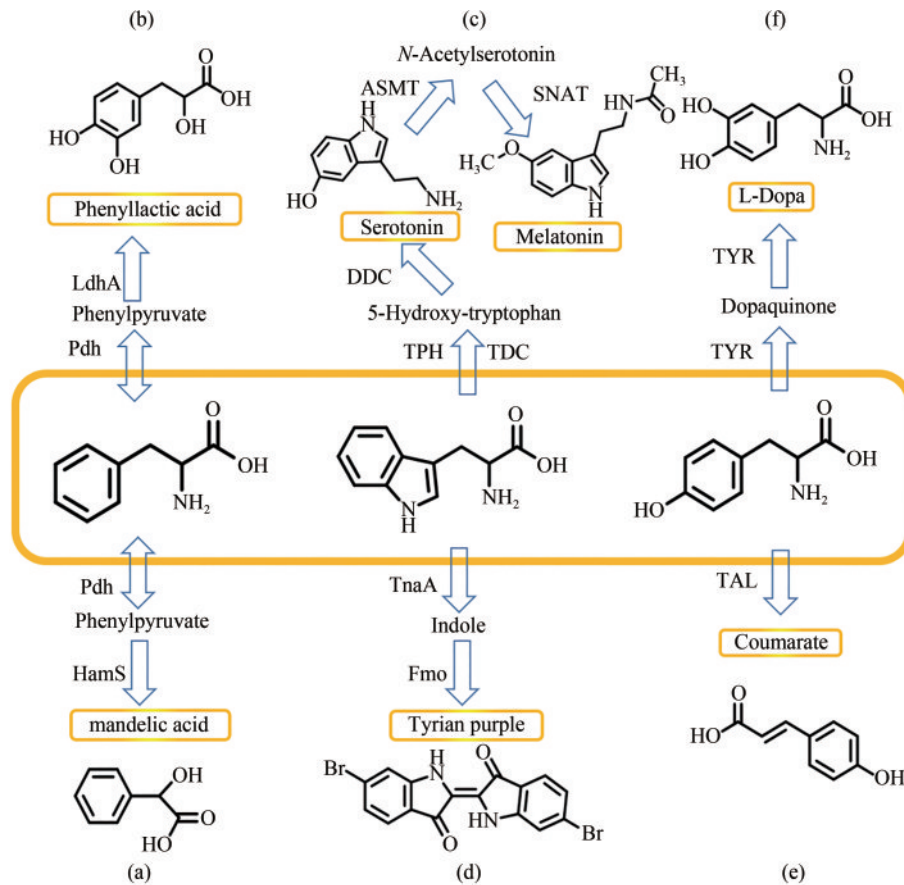


图4 几种芳香氨基酸衍生物的具体合成途径

Pdh—苯丙氨酸脱氢酶；HamS—4-羟基扁桃酸合酶；LdhA—乳酸脱氢酶；TPH—色氨酸5-羟化酶；TDC—色氨酸脱羧酶；DDC—芳香族L-氨基酸脱羧酶；ASMT—乙酰羟色胺O-甲基转移酶；SNAT—芳烷基胺N-乙酰基转移酶；TnaA—色氨酸酶；Fmo—黄素单加氧酶；TAL—苯丙氨酸解氨酶；TYR—酪氨酸酶

Fig. 4 Full synthetic routes of several aromatic amino acid derivatives

Pdh—phenylalanine dehydrogenase; HamS—4-hydroxymandelate synthase; LdhA—lactate dehydrogenase; TPH—tryptophan 5-hydroxylase; TDC—tryptophan decarboxylase; DDC—aromatic L-amino acid decarboxylase; ASMT—acetyl hydroxytryptamine O-methyltransferase; SNAT—arylalkylamine N-acetyltransferase; TnaA—tryptophan enzyme; Fmo—flavin monooxygenase; TAL—phenylalanine ammonia lyase; TYR—tyrosinase

酶 (T-5H) 催化生成血清素<sup>[99]</sup>。Park等<sup>[70]</sup>构建了一种重组大肠杆菌菌株，即去除T-5H的N末端，将优化后的T-5H和谷胱甘肽硫转移酶 (GST) 标签进行融合后共表达，并过表达来自 *Catharanthus roseus* 的TDC，结果表明，该菌株可生产24 mg/L的血清素。

靛红和靛蓝被广泛应用在食品、医药和化妆品等行业中，靛红被用于治疗白血病、癌症和阿尔兹海默症等疾病，靛蓝可被用作天然着色剂<sup>[100]</sup>。以L-色氨酸为起始物，先后经过色氨酸酶、单加氧酶或双加氧酶的催化，可生成互为同分异构体的靛蓝和靛红 [图4(d)]。韩晓红等<sup>[71]</sup>

在能够产2 g/L的L-色氨酸的大肠杆菌菌株中，引入来自 *Methylophaga aminisulfidivorans* 的黄素单加氧酶 (由 *fmo* 编码)，经过分批培养，得到了920 mg/L的靛蓝和5.0 mg/L的靛红。接着，在该菌株的基础上，加入0.36 g/L半胱氨酸，由于半胱氨酸能够影响Fmo的区域选择性，进而增强了靛红前体2-羟基吲哚的合成，最后通过发酵，靛红产量可达223.6 mg/L<sup>[101]</sup>。

### 3.3 L-酪氨酸衍生物的生物合成

以L-酪氨酸和4-羟基苯丙酮酸为前体能够衍生出多种具有重要商业价值的芳香性化合物，如

4-羟基苯乳酸、4-羟基苯乙酸、4-羟基苯乙醇、4-羟基苯乙烯、4-羟基苯甲酸、L-多巴、对羟基肉桂酸、咖啡酸、丹参素和黑色素等。

对羟基肉桂酸，又叫对羟基香豆酸，被广泛应用于食品、化工和医药等领域。在苯丙氨酸解氨酶（TAL）的催化下，L-酪氨酸可转化为对羟基肉桂酸 [图4(e)]<sup>[102]</sup>。Yu等<sup>[18]</sup>构建了一个酵母菌株，通过引入一个基于磷酸转酮酶的途径，并替换EMP和芳香族氨基酸合成途径中几个重要基因的启动子，如用SET3p、CDC24p和ALD5p替换PFK1、PFK2和PYK1天然启动子，经过发酵，对羟基肉桂酸的产量可达12.5 g/L。

L-多巴是一种重要的生物活性物质，还是生成儿茶酚和黑色素等的重要中间产物，多被用来治疗帕金森症 [图4(f)]<sup>[103]</sup>。Muñoz等<sup>[59]</sup>通过在大肠杆菌中引入来自*Zymomonas mobilis*的环己二烯脱氢酶（由*tyrC*编码），并同时过表达*tktA*、*aroF<sup>br</sup>*、*tyrA*和*tyrC*基因，得到了大肠杆菌高产L-酪氨酸菌株，又通过过表达*hpaBC*基因（编码4-羟基苯乙酸3-羟化酶），实现L-酪氨酸向L-多巴胺的转化，经过发酵，L-多巴产量可达1.51 g/L。

## 4 结论与展望

随着社会的快速发展，芳香族氨基酸及其衍生物已经广泛应用于食品、化工、饲料、化妆品和医药等行业，极大提高了人民的生活水平。近年来，现代生物技术、生物信息学、合成生物学以及代谢工程等在提高芳香族氨基酸及其衍生物产量方面也做出了巨大贡献。本文主要从增加前体供给水平、解除关键酶的反馈抑制、消除阻遏蛋白的阻遏作用、敲除或者过表达相应酶基因、菌株生长与生产产品偶联、基于生物传感的高通量筛选、优化培养基和培养条件以及引入外源相关酶等方面总结了提高芳香族氨基酸及其衍生物产量的常用方法，为芳香族氨基酸及其衍生物的进一步发展提供了一定的理论依据。但是，由于各种改造策略涉及的反应机制和代谢途径较为广泛，所以其面临的问题也是多种多样。前体供给中，PEP与E4P供给平衡是一个有待解决的难点，最大程度降低消耗PEP相关酶的活性、在不影响

菌株生长情况下去除PTS系统以及增加流向PPP途径的碳通量是提高PEP和E4P供给的一个很好的解决策略；芳香族氨基酸转运系统，则是对其向胞内运输的研究较为全面，向胞外运输的研究却少之甚少，因此更高效的外排芳香族氨基酸也是有待解决的问题，而通过转录组分析挖掘转运蛋白可以有效解决这一问题；高产菌株获取困难，则是因为缺乏快速有效的筛选方式，通过构建特异性的生物传感器并结合液滴微流控以及流式细胞仪可以得到很好的解决。

在过去的十几年里，芳香族氨基酸及其衍生物的生物合成技术已经逐渐趋于成熟，但是大幅度提高芳香族氨基酸产率仍然是研究的热点。对于L-Trp，其生产途径较长，导致其前体增多，因此，就算是现在一些商业化L-Trp生产菌株的产率也很难满足市场的需求；对于L-Tyr，其相关生产技术尚不成熟，导致L-Tyr还没有真正实现工业化生产；对于L-Phe，由于其途径的复杂程度较高，另外，乙酸等副产物积累和糖酸转化率低的问题，都间接影响着L-Phe的产率。对于芳香族氨基酸衍生物，芳香族氨基酸是其主要的前体，提高芳香族氨基酸的产量直接影响着其衍生物的产量。此外，引入外来菌种相关酶的活性低也是影响芳香族氨基酸衍生物产量的一个重要因素。随着一些新技术在合成生物学领域的广泛应用，实现大幅度提高芳香族氨基酸及其衍生物产量的目标指日可待。近年来，有学者结合蛋白质组学和生物信息学的相关理论，采用计算机蛋白设计软件分析酶、改造酶等方法来解除芳香族氨基酸途径中关键酶的反馈抑制<sup>[104]</sup>。此外，双功能酶的概念逐渐深入人心，它极大地提高了酶的催化效率，部分学者通过对大肠杆菌高产菌株的转录组进行研究，发现SHIK途径中相关酶（比如脱氢奎尼酸合酶、莽草酸脱氢酶）的代谢通量都比较低，严重降低了芳香族氨基酸的产率，Lee等<sup>[105]</sup>通过在大肠杆菌中引入一种来自木本植物的双功能酶脱氢奎宁酸脱水酶-莽草酸脱氢酶（DHQ-SDH）来提高SHIK代谢通量，从而达到提高芳香族氨基酸的产量的目的。近年来，随着计算机技术的迅速发展，以计算机为辅助工具改造酶的方法也层出不穷，比如AlphaFold算法精准预测蛋白结构的功能为酶

改造提供了一个很好的平台,其改造酶的方法有助于解决合成途径中关键酶反馈抑制的问题,有望应用到芳香族氨基酸的改造生产中。代谢工程的发展让人们意识到其对芳香族氨基酸工业化生产的重要性,并且计算机从头设计酶为其提供了一定的技术支撑<sup>[106]</sup>,为设计新途径提供了一种很好的方法,如Yang等<sup>[107]</sup>利用C<sub>1</sub>化合物生产化学品,通过对代谢反应进行计算机分析,并进行动力学评估,构建出了一个新的C<sub>1</sub>同化途径,最终获得了88%的碳产率。在芳香族氨基酸合成途径中,PEP和E4P合成DAHP的这步反应,主要前体PEP在生成的同时,也会被消耗一部分,可以仿照上述方法构建一个新途径来提高PEP的供给,从而达到提高DAHP的产量的目的。另外,利用计算机设计分析代谢途径和体外反应也是一种新潮的技术。在芳香族氨基酸菌株构建方面,理性改造虽然是芳香族氨基酸高产菌株构建的研究热点,但非理性筛选是高产菌株构建的主流方式,例如定向进化,d'Oelsnitz和Ellington<sup>[108]</sup>发现连续性定向性进化可以将所有操作无缝集成到一个完整的进化周期中,在精确控制培养参数的同时,还可以在线检测和监控相关参数细胞生长或生产力。至于突变菌株的产生,则可以通过易错PCR和位点饱和诱变等方式在目的基因上进行体外随机诱变。此外,Bryson等<sup>[109]</sup>与Song等<sup>[110]</sup>构建了体内全基因组诱变的方法。Song等<sup>[110]</sup>使用DNA聚合酶-复制子系统(OrthoRep)构建了一种简化的加速定向进化的生物工程学方法。Badran等<sup>[111]</sup>则使用质粒突变体进行定向进化,可以分别在目的基因上和目的基因外发生突变,这对解决需要同时调节多个基因的多种靶标的问题有很大意义。随着基因靶向技术(例如CRISPR/Cas9技术)的出现,已开发出在特定基因座进行基因工程改造的更精确的技术,例如Jakočiūnas等<sup>[112]</sup>开发了CasPER, Halperin等<sup>[113]</sup>则开发了EvolvR。这些前沿技术有望能应用于芳香族氨基酸的生产,为提高其产量和改变其合成途径提供借鉴意义。以L-Trp合成为例,利用计算机分析设计新的高效合成途径以减少碳损失;对合成途径中的关键酶进行定向改造,提高其催化效率;通过新型的多基因碱基编辑技术大幅缩短菌株构建周期,即可在

短期内获得转化率与产量显著提高的菌株。虽然只是一种设想,但在目前的技术条件下,具有很高的可行性。期待在不久的将来,随着人们对五大组学研究的不断深入,同时结合生物信息学、结构生物学和合成生物学等的相关理论,可以真正实现芳香族氨基酸及其衍生物高产菌株的快速构建。

## 参 考 文 献

- [1] 鄢芳清,韩亚昆,李娟,等.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 F Q, HAN K, LI J, et al. Metabolic engineering of aromatic amino acids in *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2017, 15(5): 32-39,85.
- [2] 于金龙.大肠杆菌芳香族氨基酸生物合成途径的代谢调控研究[D].北京:中国人民解放军军事医学科学院,2008.  
YU J L. Metabolic regulation of aromatic amino acid biosynthesis pathway in *Escherichia coli* [D]. Beijing: Chinese Academy of Military Sciences, 2008.
- [3] 吴凤礼,彭彦峰,徐毅诚,等.代谢工程改造微生物生产芳香族化合物的研究进展[J].生物加工过程,2017,15(5):9-23.  
WU F L, PENG Y F, XU Y C, et al. Advances in microbial metabolic engineering for producing aromatic chemicals[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2017, 15(5): 9-23.
- [4] ZHANG R H, LI C Y, WANG J, et al. Microbial production of small medicinal molecules and biologics: From nature to synthetic pathways[J]. Biotechnology Advances, 2018, 36(8): 2219-2231.
- [5] 李飞飞,赵广荣.大肠杆菌代谢工程生产芳香族化合物研究进展[J].食品与发酵工业,2014,40(6):128-134.  
LI F F, ZHAO G R. Advances in metabolic engineering of *Escherichia coli* for producing aromatic compounds[J]. Food and Fermentation Industries, 2014, 40(6):128-134.
- [6] PITTARD J, YANG J. Biosynthesis of the aromatic amino acids[J]. EcoSal Plus, 2008, 3(1): 285-356.
- [7] JOO J C, OH Y H, YU J H, et al. Production of 5-aminovaleic acid in recombinant *Corynebacterium glutamicum* strains from a *Miscanthus hydrolysate* solution prepared by a newly developed *Miscanthus hydrolysis* process[J]. Bioresource Technology, 2017, 245(Pt B): 1692-1700.
- [8] WILLKE T. Methionine production—a critical review[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(24): 9893-9914.
- [9] GRÖGER H. Biocatalytic concepts for synthesizing amine bulk chemicals: recent approaches towards linear and cyclic aliphatic primary amines and  $\omega$ -substituted derivatives thereof[J].

- Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(1): 83-95.
- [10] WENDISCH V F. Metabolic engineering advances and prospects for amino acid production[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 58(1): 17-34.
- [11] WENDISCH V F. Microbial production of amino acids and derived chemicals: synthetic biology approaches to strain development[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2014, 30(3): 51-58.
- [12] 申晓林, 袁其朋. 生物合成芳香族氨基酸及其衍生物的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2017, 33(1): 24-34.  
SHEN X L, YUAN Q P. Research advance on biosynthesis of aromatic amino acids and their derivatives[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2017, 33(1): 24-34.
- [13] 赵志军. L-色氨酸生产菌株的构建及代谢调控研究[D]. 无锡: 江南大学, 2011.  
ZHAO Z J. Construction and metabolic regulation of L-tryptophan producing strain[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2011.
- [14] BONGAERTS J, KRÄMER M, MÜLLER U, et al. Metabolic engineering for microbial production of aromatic amino acids and derived compounds[J]. *Metabolic Engineering*, 2001, 3(4): 289-300.
- [15] 王健, 陈宁. 基于途径分析及代谢流量分析的L-色氨酸发酵条件优化[J]. *云南大学学报(自然科学版)*, 2004, 26(S2): 68-73.  
WANG J, CHEN N. Optimization of L-tryptophan fermentation conditions based on pathway analysis and metabolic flux analysis[J]. *Journal of Yunnan University (Natural Science Edition)*, 2004, 26(S2): 68-73.
- [16] FLORES S, GOSSET G, FLORES N, et al. Analysis of carbon metabolism in *Escherichia coli* strains with an inactive phosphotransferase system by <sup>13</sup>C labeling and NMR spectroscopy[J]. *Metabolic Engineering*, 2002, 4(2): 124-137.
- [17] 汪多仁. L-苯丙氨酸生产与应用[J]. *发酵科技通讯*, 2011, 40(1): 29-36.  
WANG D R. Production and application of L-phenylalanine[J]. *Fermentation Technology Communication*, 2011, 40(1): 29-36.
- [18] LIU Q L, YU T, LI X W, et al. Rewiring carbon metabolism in yeast for high level production of aromatic chemicals[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 4976.
- [19] PONCE E, MARTÍNEZ A, BOLÍVAR F, et al. Stimulation of glucose catabolism through the pentose pathway by the absence of the two pyruvate kinase isoenzymes in *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1998, 58(2/3): 292-295.
- [20] SPRAGGON G, KIM C, NGUYEN-HUU X, et al. The structures of anthranilate synthase of *Serratia marcescens* crystallized in the presence of (i) its substrates, chorismate and glutamine, and a product, glutamate, and (ii) its end-product inhibitor, L-tryptophan[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(11): 6021-6026.
- [21] BRAUS G H. Aromatic amino acid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a model system for the regulation of a eukaryotic biosynthetic pathway[J]. *Microbiological Reviews*, 1991, 55(3): 349-370.
- [22] WALLACE B J, PITTARD J. Regulator gene controlling enzymes concerned in tyrosine biosynthesis in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1969, 97(3): 1234-1241.
- [23] SINGLETON C K, ROEDER W D, BOGOSIAN G, et al. DNA sequence of the *E. coli trpR* gene and prediction of the amino acid sequence of Trp repressor[J]. *Nucleic Acids Research*, 1980, 8(7): 51-60.
- [24] YANOFSKY C, HORN V, GOLLNICK P. Physiological studies of tryptophan transport and tryptophanase operon induction in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(19): 6009-6017.
- [25] IKEDA M, KATSUMATA R. Tryptophan production by transport mutants of *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1995, 59(8): 1600-1602.
- [26] DOROSHENKO V, AIRICH L, VITUSHKINA M, et al. YddG from *Escherichia coli* promotes export of aromatic amino acids[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2007, 275(2): 312-318.
- [27] AIBA S, TSUNEKAWA H, IMANAKA T. New approach to tryptophan production by *Escherichia coli*: genetic manipulation of composite plasmids *in vitro*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1982, 43(2): 289-297.
- [28] SHI S, CHEN T, ZHANG Z, et al. Transcriptome analysis guided metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for riboflavin production[J]. *Metabolic Engineering*, 2009, 11(4/5): 243-252.
- [29] LÜTKE-EVERSLOH T, STEPHANOPOULOS G. Combinatorial pathway analysis for improved L-tyrosine production in *Escherichia coli*: identification of enzymatic bottlenecks by systematic gene overexpression[J]. *Metabolic Engineering*, 2008, 10(2): 69-77.
- [30] OH J S, PARK H H, PARK T H. Temperature management strategy for efficient gene expression in a thermally inducible *Escherichia coli*/bacteriophage system[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2008, 13(4): 470-475.
- [31] SUÁSTEGUI M, GUO W H, FENG X Y, et al. Investigating strain dependency in the production of aromatic compounds in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2016, 113(12): 2676-2685.

- [32] PATNAIK R, SPITZER R G, LIAO J C. Pathway engineering for production of aromatics in *Escherichia coli*: confirmation of stoichiometric analysis by independent modulation of AroG, TktA, and Pps activities[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1995, 46(4): 361-370.
- [33] CARMONA S B, MORENO F, BOLÍVAR F, et al. Inactivation of the PTS as a strategy to engineer the production of aromatic metabolites in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Molecular Microbiology & Biotechnology*, 2015, 25(2/3): 195-208.
- [34] CHEN Y Y, LIU Y F, DING D Q, et al. 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.
- [35] CARMONA S B, FLORES N, MARTÍNEZ-ROMERO E, et al. Evolution of an *Escherichia coli* PTS-strain: a study of reproducibility and dynamics of an adaptive evolutive process[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(21): 9309-9325.
- [36] CHEN L, ZENG A P. 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.
- [37] 吴涛, 赵津津, 毛贤军. 大肠杆菌磷酸烯醇丙酮酸-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 J J, MAO X J. Effect of PTS modifications on L-tryptophan production in *Escherichia coli*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2017, 33(11): 1877-1882.
- [38] GOSSET G, YONG-XIAO J, BERRY A. A direct comparison of approaches for increasing carbon flow to aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Industrial Microbiology*, 1996, 17(1): 47-52.
- [39] BERRY A. Improving production of aromatic compounds in *Escherichia coli* by metabolic engineering[J]. *Trends in Biotechnology*, 1996, 14(7): 250-256.
- [40] DU L H, ZHANG Z, XU Q Y, et al. Central metabolic pathway modification to improve L-tryptophan production in *Escherichia coli*[J]. *Bioengineered*, 2019, 10(1): 59-70.
- [41] 吴永庆, 江培翊, 范长胜, 等. 大肠杆菌 *ppsA*, *pckA* 基因的克隆与串联表达[J]. *复旦学报(自然科学版)*, 2002, 41(1): 31-35.
- WU Y Q, JIANG P X, FAN C S, et al. Cloning and co-expression of *ppsA* and *pckA* genes in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Fudan University (Natural Sciences)*, 2002, 41(1): 31-35.
- [42] TYAGI N, SAINI D, GULERIA R, et al. Designing an *Escherichia coli* strain for phenylalanine overproduction by metabolic engineering[J]. *Molecular Biotechnology*, 2017, 59(4/5): 168-178.
- [43] MASCARENHAS D, ASHWORTH D J, CHEN C S. Deletion of *pgi* alters tryptophan biosynthesis in a genetically engineered strain of *Escherichia coli*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57(10): 2995-2999.
- [44] GUO W, HUANG Q L, FENG Y H, et al. Rewiring central carbon metabolism for tyrosol and salidroside production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020, 117(8): 2410-2419.
- [45] TRENCHARD I J, SMOLKE C D. Engineering strategies for the fermentative production of plant alkaloids in yeast[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 30: 96-104.
- [46] JOSSEK R, BONGAERTS J, SPRENGER G A. Characterization of a new feedback-resistant 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase AroF of *Escherichia coli*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 202(1): 145-148.
- [47] LIU L N, DUAN X G, WU J. Modulating the direction of carbon flow in *Escherichia coli* to improve L-tryptophan production by inactivating the global regulator FruR[J]. *Journal of Biotechnology*, 2016, 231(4): 138-141.
- [48] 李剑欣, 郭长江, 刘云, 等. 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 J X, GUO C J, LIU Y, et al. The clone and expression of the anthranilate synthetase coding gene in *Escherichia coli*[J]. *Letters in Biotechnology*, 2007, 18(2): 183-185.
- [49] IKEDA M. Towards bacterial strains overproducing L-tryptophan and other aromatics by metabolic engineering[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 69(6): 615-626.
- [50] LÜTKE-EVERSLOH T, STEPHANOPOULOS G. L-tyrosine production by deregulated strains of *Escherichia coli*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 75(1): 103-110.
- [51] LIU Y J, LI P P, ZHAO K X, et al. *Corynebacterium glutamicum* contains 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthases that display novel biochemical features[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(17): 5497-5503.
- [52] RODRIGUEZ A, CHEN Y, KHOOMRUNG S, et al. Comparison of the metabolic response to over-production of *p*-coumaric acid in two yeast strains[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 44: 265-272.
- [53] SCHENCK C A, MAEDA H A. Tyrosine biosynthesis, metabolism, and catabolism in plants[J]. *Phytochemistry*, 2018, 149: 82-102.
- [54] LÜTKE-EVERSLOH T, STEPHANOPOULOS G. Feedback

- inhibition of chorismate mutase/prephenate dehydrogenase (TyrA) of *Escherichia coli*: generation and characterization of tyrosine-insensitive mutants[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(11): 7224-7228.
- [55] DODGE T C, GERSTNER J M. Optimization of the glucose feed rate profile for the production of tryptophan from recombinant *E. coli*[J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2002, 77(11): 45-123.
- [56] LIU S P, LIU R X, XIAO M R, et al. A systems level engineered *E. coli* capable of efficiently producing L-phenylalanine[J]. Process Biochemistry, 2014, 49(5): 751-757
- [57] FERNSTROM J D. A perspective on the safety of supplemental tryptophan based on its metabolic fates[J]. The Journal of Nutrition, 2016, 146(12): 2601S-2608S.
- [58] 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, 2013.
- GU P F. Production of L-tryptophan by recombinant *Escherichia coli*[D]. Jinan: Shandong University, 2013.
- [59] MUÑOZ A J, HERNÁNDEZ-CHÁVEZ G, DE ANDA R, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for improving 1-3, 4-dihydroxyphenylalanine (L-Dopa) synthesis from glucose[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2011, 38(11): 1845-1852.
- [60] KIM B, BINKLEY R, KIM H U, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the enhanced production of L-tyrosine[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2018, 115(10): 2554-2564.
- [61] LIU Y F, XU Y R, DING D Q, et al. Genetic engineering of *Escherichia coli* to improve L-phenylalanine production[J]. BMC Biotechnology, 2018, 18(1): 5.
- [62] SUN Z T, NING Y Y, LIU L X, et al. Metabolic engineering of the L-phenylalanine pathway in *Escherichia coli* for the production of *S*- or *R*-mandelic acid[J]. Microbial Cell Factories, 2011, 10(1): 71.
- [63] FUJITA T, NGUYEN H D, ITO T, et al. Microbial monomers custom-synthesized to build true bio-derived aromatic polymers[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(20): 8887-8894.
- [64] BANG H B, LEE Y H, KIM S C, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of cinnamaldehyde[J]. Microbial Cell Factories, 2016, 15(1): 16.
- [65] GOTTARDI M, KNUDSEN J D, PRADO L, et al. *De novo* biosynthesis of trans-cinnamic acid derivatives in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(12): 4883-4893.
- [66] MCKENNA R, NIELSEN D R. Styrene biosynthesis from glucose by engineered *E. coli*[J]. Metabolic Engineering, 2011, 13(5): 544-554.
- [67] ROMASI E F, LEE J. Development of indole-3-acetic acid-producing *Escherichia coli* by functional expression of IpdC, AspC, and Iad1[J]. Journal of microbiology and biotechnology, 2013, 23(12): 26-36.
- [68] SUN H, ZHAO D, XIONG B, et al. Engineering *Corynebacterium glutamicum* for violacein hyper production[J]. Microbial Cell Factories, 2016, 15(1): 148.
- [69] RODRIGUES A L, TRACHTMANN N, BECKER J, et al. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of the antitumor drugs violacein and deoxyviolacein[J]. Metabolic Engineering, 2013, 20: 29-41.
- [70] PARK S, KANG K, LEE S W, et al. 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.
- [71] 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 X H, WANG W, XIAO X G. Microbial biosynthesis and biotransformation of indigo and indigo-like pigments[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2008, 24(6): 921-926.
- [72] YAO Y F, WANG C S, QIAO J, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of salvianic acid A via an artificial biosynthetic pathway[J]. Metabolic Engineering, 2013, 19: 79-87.
- [73] QI W W, VANNELLI T, BREINIG S, et al. Functional expression of prokaryotic and eukaryotic genes in *Escherichia coli* for conversion of glucose to *p*-hydroxystyrene[J]. Metabolic Engineering, 2007, 9(3): 268-276.
- [74] NIU H, LI R R, LIANG Q F, et al. Metabolic engineering for improving L-tryptophan production in *Escherichia coli*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2019, 46(1): 55-65.
- [75] PÉREZ-GARCÍA F, WENDISCH V F. Transport and metabolic engineering of the cell factory *Corynebacterium glutamicum*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2018, 365(16): fny166.
- [76] GU P F, YANG F, LI F F, et al. Knocking out analysis of tryptophan permeases in *Escherichia coli* for improving L-tryptophan production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(15): 6677-6683.
- [77] 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.

- [78] YAKANDAWALA N, ROMEO T, FRIESEN A D, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* to enhance phenylalanine production[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 78(2): 283-291.
- [79] TSOI R, WU F L, ZHANG C, et al. Metabolic division of labor in microbial systems[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(10): 2526-2531.
- [80] DINH C V, PRATHER K L J. Development of an autonomous and bifunctional quorum-sensing circuit for metabolic flux control in engineered *Escherichia coli*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(51): 25562-25568.
- [81] WANG J, ZHANG R H, ZHANG Y, et al. Developing a pyruvate-driven metabolic scenario for growth-coupled microbial production[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 55(6): 191-200.
- [82] YOUNGER A K, DALVIE N C, ROTTINGHAUS A G, et al. Engineering modular biosensors to confer metabolite-responsive regulation of transcription[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2017, 6(2): 311-325.
- [83] RAMAN S, ROGERS J K, TAYLOR N D, et al. Evolution-guided optimization of biosynthetic pathways[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(50): 17803-17808.
- [84] SHI S B, ANG E L, ZHAO H M. *In vivo* biosensors: mechanisms, development, and applications[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2018, 45(7): 491-516.
- [85] FANG M Y, WANG T M, ZHANG C, et al. Intermediate-sensor assisted push-pull strategy and its application in heterologous deoxyviolacein production in *Escherichia coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2016, 33: 41-51.
- [86] LIU Y F, ZHUANG Y Y, DING D Q, et al. Biosensor-based evolution and elucidation of a biosynthetic pathway in *Escherichia coli*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2017, 6(5): 837-848.
- [87] DING D Q, LI J L, BAI D Y, et al. Biosensor-based monitoring of the central metabolic pathway metabolites[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2020, 167: 112456.
- [88] CHEN M, CHEN L, ZENG A P. CRISPR/Cas9-facilitated engineering with growth-coupled and sensor-guided *in vivo* screening of enzyme variants for a more efficient chorismate pathway in *E. coli*[J]. *Metabolic Engineering Communications*, 2019, 9(2): e00094.
- [89] 陈胜杰. L-色氨酸生产菌构建及发酵条件优化[D]. 天津: 天津科技大学, 2016.
- CHRN S J. Construction of L-tryptophan producing strain and optimization of fermentation conditions[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2016.
- [90] 黄静, 史建明, 霍文婷, 等. 氮源对 L-色氨酸发酵的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2011, 37(5): 21-25.
- HUANG J, SHI J M, HUO W T, et al. The effects of nitrogen sources on the fermentation of L-tryptophan[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2011, 37(5): 21-25.
- [91] 杨梦晨. L-色氨酸新型清液发酵工艺研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2018.
- YANG M C. Study on fermentation and fermentation technology of L-tryptophan[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2018.
- [92] 娄秀平. *Escherichia coli* JN8 发酵产 L-色氨酸的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2014.
- LOU X P. Production of L-tryptophan by *Escherichia coli* JN8[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2014.
- [93] 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, 2017.
- ZHANG T T. Determination of L-tryptophan grade in microbial production and optimization of fermentation process[D]. Kaifeng: Henan University, 2017.
- [94] PAREKH S, VINCI V A, STROBEL R J. Improvement of microbial strains and fermentation processes[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2000, 54(3): 287-301.
- [95] JING K J, TANG Y W, YAO C Y, et al. Overproduction of L-tryptophan via simultaneous feed of glucose and anthranilic acid from recombinant *Escherichia coli* W3110: kinetic modeling and process scale-up[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2018, 115(2): 371-381.
- [96] REIFENRATH M, BOLES E. Engineering of hydroxymandelate synthases and the aromatic amino acid pathway enables *de novo* biosynthesis of mandelic and 4-hydroxymandelic acid with *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 45(2): 246-254.
- [97] CAO M F, GAO M R, SUÁSTEGUI M, et al. Building microbial factories for the production of aromatic amino acid pathway derivatives: from commodity chemicals to plant-sourced natural products[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 58: 94-132.
- [98] FUJIWARA R, NODA S, TANAKA T, et al. Muconic acid production using gene-level fusion proteins in *Escherichia coli*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(11): 2698-2705.
- [99] RAMAKRISHNA A, GIRIDHAR P, RAVISHANKAR G A. Phytoserotonin: a review[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2011, 6(6): 80-92.
- [100] DU J, YANG D, LUO Z W, et al. Metabolic engineering of *Esch-*

- erichia coli* for the production of indirubin from glucose[J]. Journal of Biotechnology, 2018, 267: 19-28.
- [101] HAN G H, GIM G H, KIM W, et al. Enhanced indirubin production in recombinant *Escherichia coli* harboring a flavin-containing monooxygenase gene by cysteine supplementation[J]. Journal of Biotechnology, 2012, 164(2): 179-187.
- [102] RODRIGUEZ A, KILDEGAARD K R, LI M, et al. Establishment of a yeast platform strain for production of *p*-coumaric acid through metabolic engineering of aromatic amino acid biosynthesis[J]. Metabolic Engineering, 2015, 31: 181-188.
- [103] WEI T, CHENG B Y, LIU J Z. Genome engineering *Escherichia coli* for L-Dopa overproduction from glucose[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 30080.
- [104] VALLIERE M A, KORMAN T P, WOODALL N B, et al. A cell-free platform for the prenylation of natural products and application to cannabinoid production[J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 565.
- [105] LEE M Y, HUNG W P, TSAI S H. Improvement of shikimic acid production in *Escherichia coli* with growth phase-dependent regulation in the biosynthetic pathway from glycerol[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2017, 33(2): 1-8.
- [106] SILVA D A, YU S, ULGE U Y, et al. *De novo* design of potent and selective mimics of IL-2 and IL-15[J]. Nature, 2019, 565(7738): 186-191.
- [107] YANG X, YUAN Q Q, LUO H, et al. Systematic design and *in vitro* validation of novel one-carbon assimilation pathways[J]. Metabolic Engineering, 2019, 56(1): 142-153.
- [108] D'OELSCHNITZ S, ELLINGTON A. Continuous directed evolution for strain and protein engineering[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2018, 53: 158-163.
- [109] BRYSON D I, FAN C, GUO L T, et al. Continuous directed evolution of aminoacyl-tRNA synthetases[J]. Nature Chemical Biology, 2017, 13(12): 1253-1260.
- [110] SONG L, ZENG A P. Engineering 'cell robots' for parallel and highly sensitive screening of biomolecules under *in vivo* conditions[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 15-45.
- [111] BADRAN A H, LIU D R. Development of potent *in vivo* mutagenesis plasmids with broad mutational spectra[J]. Nature Communications, 2015, 6: 8425.
- [112] JAKOČIŪNAS T, PEDERSEN L E, LIS A V, et al. CasPER, a method for directed evolution in genomic contexts using mutagenesis and CRISPR/Cas9[J]. Metabolic Engineering, 2018, 48(2): 88-96.
- [113] HALPERIN S O, TOU C J, WONG E B, et al. CRISPR-guided DNA polymerases enable diversification of all nucleotides in a tunable window[J]. Nature, 2018, 560(7717): 248-252.



**通讯作者:** 张大伟(1978—),男,博士,研究员。主要研究方向为采用分子遗传、合成生物技术、生物传感技术等,合成维生素、氨基酸及高附加值化合物;建立蛋白表达平台,实现蛋白质胞内表达或分泌表达,并开发新型表达系统。  
E-mail: zhang\_dw@tib.cas.cn



**第一作者:** 孙薇(1998—),女,硕士研究生。研究方向为氨基酸代谢。  
E-mail: sunw@tib.cas.cn