2026, 66(10): 4920-4936
CSTR: 32112.14.j.AMS.20260208
DOI: 10.13343/j.cnki.wsxb.20260208

微生物学报
Acta Microbiologica Sinica
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

Research Article 研究报告

L-组氨酸大肠杆菌细胞工厂构建与发酵优化

陈照阳[1]，刘佳[2]，董欣[1]，胡贵鹏[1]，周怡雯[1]，吴静[1,2*]

1 江南大学 生命科学与健康工程学院，江苏 无锡
2 江南大学 生物工程学院，工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡

陈照阳, 刘佳, 董欣, 胡贵鹏, 周怡雯, 吴静. L-组氨酸大肠杆菌细胞工厂构建与发酵优化[J]. 微生物学报, 2026, 66(10): 4920-4936.

CHEN Zhaoyang, LIU Jia, DONG Xin, HU Guipeng, ZHOU Yiwen, WU Jing. Construction and fermentation optimization of an *Escherichia coli* cell factory for L-histidine production[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2026, 66(10): 4920-4936.

摘　要：【目的】L-组氨酸是一种含咪唑环结构的高附加值氨基酸，广泛应用于医药、食品和添加剂行业。然而，微生物发酵法生产L-组氨酸面临主合成路径碳通量低、前体供应不足和副产物积累等问题。【方法】以大肠杆菌(*Escherichia coli*)为底盘菌株，采用理性代谢工程系统优化大肠杆菌的L-组氨酸合成能力。【结果】通过解除组氨酸操纵子转录衰减、引入高效三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)磷酸核糖转移酶突变体和在质粒水平过表达L-组氨酸合成路径基因，提高了L-组氨酸的代谢通量；通过重构磷酸戊糖途径增加L-组氨酸前体5-磷酸核糖焦磷酸(5-phosphoribosyl pyrophosphate, PRPP)的供应；进一步通过阻断甲酸和乙酸代谢途径减少了碳代谢流的损耗。随后研究了不同的氮源对L-组氨酸发酵的影响，并系统性优化了发酵温度、pH和溶解氧参数，5 L发酵罐中L-组氨酸的产量、转化率和生产强度分别达到34.84 g/L、0.13 g/g和0.73 g/(L·h)。此外，通过关键基因表达和胞内代谢物分析发现，工艺优化有利于增强主合成路径表达、改善能量与氧化还原状态并提高氨供体供给。【结论】本研究为微生物高效生产L-组氨酸提供了可行的代谢工程策略与工艺基础。

关键词：L-组氨酸；大肠杆菌；代谢工程；副产物；发酵优化

资助项目：国家自然科学基金重点项目(22538006)
This work was supported by the Key Program of the National Natural Science Foundation of China (22538006).
*Corresponding author. E-mail: wujing@jiangnan.edu.cn
Received: 2026-03-11; Accepted: 2026-04-09; Published online: 2026-05-07

Construction and fermentation optimization of an *Escherichia coli* cell factory for L-histidine production

CHEN Zhaoyang[1], LIU Jia[2], DONG Xin[1], HU Guipeng[1], ZHOU Yiwen[1], WU Jing[1,2*]

1 School of Life Sciences and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu, China
2 School of Biotechnology and Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu, China

Abstract: [Objective] L-histidine is a high-value, imidazole-containing amino acid with broad applications in the pharmaceutical, food, and additive industries. The fermentative production of L-histidine remains constrained by the low carbon flux through the core biosynthetic route, limited precursor availability, and by-product accumulation. **[Methods]** With *Escherichia coli* as the chassis, L-histidine biosynthesis was systematically improved through rational metabolic engineering. **[Results]** The flux toward L-histidine was enhanced by elimination of transcriptional attenuation of the histidine operon, introduction of an efficient adenosine triphosphate (ATP) phosphoribosyltransferase mutant, and plasmid-based overexpression of key pathway genes. The pentose phosphate pathway was reconstructed to increase the precursor 5-phosphoribosyl pyrophosphate (PRPP) supply. In parallel, carbon loss was reduced by blocking formate- and acetate-forming pathways. Nitrogen sources were subsequently evaluated, and fermentation parameters, including temperature, pH, and dissolved oxygen, were systematically optimized. Under the optimized conditions, the L-histidine titer, yield, and productivity reached 34.84 g/L, 0.13 g/g, and 0.73 g/(L·h), respectively. In addition, the analysis of key gene expression and intracellular metabolites suggested that process optimization was conducive to enhancing the expression of the main synthetic pathway, improving energy and redox states, and increasing the ammonia donor supply. **[Conclusion]** The results establish an effective metabolic engineering strategy and a process basis for efficient microbial production of L-histidine.

Keywords: L-histidine; *Escherichia coli*; metabolic engineering; by-product; fermentation optimization

L-组氨酸是一种重要的半必需氨基酸，广泛应用在医药、食品和添加剂等领域[1]。L-组氨酸的功能性衍生物如肌肽和麦角硫因在抗氧化方面发挥重要作用[2]。传统上应用化学合成和蛋白水解法生产 L-组氨酸面临环境安全和可持续发展的挑战[3]。为了满足不断增长的市场需求，开发高效、可持续的微生物发酵法生产 L-组氨酸已成为工业界与学术界的共同目标。

大肠杆菌(*Escherichia coli*)和谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)是生产 L-组氨酸的主要底盘微生物。L-组氨酸的生物合成路径在 *E. coli* 和 *C. glutamicum* 中高度保守，都是以 5-磷酸核糖焦磷酸(5-phosphoribosyl pyrophosphate, PRPP)和三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)

为前体，经过 10 步酶催化反应生成[4]，具有以下共同特征。(1) ATP 磷酸核糖转移酶(HisG；由 *hisG* 编码)作为 L-组氨酸合成途径的第一个酶，受到 L-组氨酸的严格反馈抑制[5-6]。研究人员通过引入限速酶突变体解除反馈抑制，例如在野生型 *E. coli* MG1655 中将 *Ec*HisG 突变为 *Ec*HisG^{E271K}[7]和在野生型 *C. glutamicum* ATCC 13032 中将 *Cg*HisG 突变为 *Cg*HisG$^{T235P\text{-}Y56M}$[8]，分别使 L-组氨酸产量达到 0.2 g/L 和 0.83 g/L。(2)前体 PRPP 经磷酸戊糖途径(pentose phosphate pathway, PPP)生成，胞内浓度较低[9]。已有研究报道过表达 *zwf* 和 *gnd* 强化 PPP 代谢通量，使 L-组氨酸产量相较于对照提高了 1.33 倍，进一步过表达 *prs* 使 L-组氨酸产量相较于对照提高了 1.44 倍。(3)路径存在高氧化还原和能量需求，合成 1 mol 组氨酸需要 2 mol NAD^+和 9.4 mol ATP[10]。通过引入枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) NADH 依赖型谷氨酸脱氢酶 *rocG* 强化 NAD^+再生，使 L-组氨酸产量提升 23.4%，达到 10.1 g/L[11]。此外，敲除黄素还原酶编码基因 *frd1* 和 *frd2* 降低活性氧水平，使胞内 ATP 水平提高了 24%，L-组氨酸产量提高了 1.51 g/L[8]。(4)同时依赖 L-谷氨酸[12]和 L-谷氨酰胺[13]作为氨供体。通过在 *E. coli* 中过表达 *EcgdhA* 和 *EcglnA* 提高氨供体可用性，使 L-组氨酸产量提升了 12.47%[14]。(5)与嘌呤从头合成路径存在串扰，嘌呤合成与 L-组氨酸合成竞争 ATP[9]。*purF* 的敲除可以阻断嘌呤从头合成途径，同时也因核苷酸合成受限造成生长抑制，培养基中额外添加 10 mg/L 硫胺素缓解细胞生长抑制后使 L-组氨酸产量提升 12.33%[11]。(6) *E. coli* 和 *C. glutamicum* 中的 L-组氨酸特异性输出蛋白尚未报道，但是有研究表明在 *E. coli* 中表达 *C. glutamicum* 来源的 L-赖氨酸外排蛋白 *Cg*LysE[11]和 *E. coli* 来源的碱性氨基酸外排蛋白 *Ec*ArgO[14]使 L-组氨酸产量分别提升了 16.83%和 9.41%。L-组氨酸的生物合成路径在 *E. coli* 和 *C. glutamicum* 中的差异则主要体现在：在 *C. glutamicum* 中 L-组氨酸合成相关基因并非排列于单一长操纵子，而是分散在多个转录单元，包括 *hisN*、*hisEG* 和 *hisHAFI*，具有更复杂的多内部启动子调控和 RNA 层面调控特征；而在 *E. coli* 中合成路径基因以经典 L-组氨酸操纵子(*his operon*)的形式组织存在，基因排列顺序为 *hisLGDCBHAFI*，具有操纵子整体调控、路径集中改造和多位点工程操作方面的优势。总之，通过定向的代谢工程策略有效提升了工程菌株的 L-组氨酸生产性能，但由于合成路径碳代谢通量不足、副产物积累和发酵过程优化的欠缺限制了 L-组氨酸细胞工厂的进一步发展。

本研究以 *E. coli* BL21 为出发菌株，系统构建高效生产组氨酸的工程菌株，结合培养基氮源和发酵过程控制优化实现 L-组氨酸的高效合成。首先重构和优化 L-组氨酸主合成路径提高 L-组氨酸的代谢通量，其次重构和优化磷酸戊糖途径增加 L-组氨酸前体 PRPP 的供应，进一步通过阻断甲酸和乙酸代谢途径减少碳代谢流的损耗，最后研究不同的氮源对 L-组氨酸发酵的影响，系统性优化发酵温度、pH 和溶解氧参数，并通过关键基因表达与胞内代谢物分析探究工艺优化促进 L-组氨酸积累的内在机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

实验采用 *E. coli* BL21 作为 L-组氨酸生产的底盘菌株和基因克隆模板，选用 *E. coli* DH5α 作为质粒构建的宿主。本研究使用的菌株和质粒见表 1，引物信息见表 2。

表1 本研究所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Characteristics	Source
pCas9	epA101 (Ts) *Kan*^{R}, P_{cas}-cas9 P_{araB}-RedlacIq, P_{trc}-sgRNA-pMB1	Lab storage
pTargetF	ColE1, *SD*^{R}, $P_{BJ23119}$-sgRNA	Lab storage
pCDR	CloDF13 ori, *Sm*^{R}, $P_{BJ23119}$, T7 terminator	Lab storage
pCDR-His	CloDF13 ori, *Sm*^{R}, $P_{BJ23119}$, T7 terminator, *hisDCBHAFI*	This study
DH5α	*E. coli* DH5α (for the preparation of chemically competent cells)	Lab storage
WT	*E. coli* BL21	Lab storage
E. coli H01	*E. coli* BL21, Δ*hisL*	This study
E. coli H02	*E. coli* H01, Δ*ilvG*::$P_{BJ23119}$-B0034-*CghisG*^{N215I}	This study
E. coli H03	*E. coli* H01, Δ*ilvG*::$P_{BJ23119}$-B0034-*CghisG*$^{G233H, T235Q}$	This study
E. coli H04	*E. coli* H01, Δ*ilvG*::$P_{BJ23119}$-B0034-*CghisG*$^{N215K, L231A, T235A}$	This study
E. coli H05	*E. coli* H01, Δ*ilvG*::$P_{BJ23119}$-B0034-*CghisG*$^{S143F, Δ209-281}$	This study
E. coli H06	*E. coli* H01, Δ*ilvG*::$P_{BJ23119}$-B0034-*EchisG*^{E271K}	This study
E. coli H07	*E. coli* H03, Δ*rph*::$P_{BJ23119}$-B0034-*CghisG*$^{G233H, T235Q}$	This study
E. coli H08	*E. coli* H07, Δ*rpnD*::$P_{BJ23119}$-B0034-*CghisG*$^{G233H, T235Q}$	This study
E. coli H09	*E. coli* H08, Δ*fryA*::$P_{BJ23119}$-B0034-*CghisG*$^{G233H, T235Q}$	This study
E. coli H10	*E. coli* H08, harboring pCDR-His	This study
E. coli H11	*E. coli* H10, Δ*purR*	This study
E. coli H12	*E. coli* H11, Δ*yeeP*::$P_{BJ23119}$-B0034-*Ecprs*	This study
E. coli H13	*E. coli* H11, Δ*yeeP*::$P_{BJ23119}$-B0034-*Cgprs*	This study
E. coli H14	*E. coli* H11, Δ*yeeP*::$P_{BJ23119}$-B0034-*Smprs*	This study
E. coli H15	*E. coli* H14, Δ*lafU*::$P_{BJ23119}$-B0034-*Smprs*	This study
E. coli H16	*E. coli* H15, Δ*yjiP*::$P_{BJ23119}$-B0034-*Smprs*	This study
E. coli H17	*E. coli* H16, Δ*yghX*::$P_{BJ23119}$-B0034-*Smprs*	This study
E. coli H18	*E. coli* H16, Δ*yghX*::$P_{BJ23119}$-B0034-*Cggnd*^{fbr}	This study
E. coli H19	*E. coli* H18, Δ*yeeL*::$P_{BJ23119}$-B0034-*zwf*	This study
E. coli H20	*E. coli* H19, Δ*edd*	This study
E. coli H21	*E. coli* H19, Δ*pflB-focA*	This study
E. coli H22	*E. coli* H19, Δ*pta*	This study
E. coli H23	*E. coli* H19, Δ*ackA*	This study
E. coli H24	*E. coli* H19, Δ*pflB-focA*, Δ*pta*	This study
E. coli H25	*E. coli* H19, Δ*pflB-focA*, Δ*pta*, Δ*tdcD-tdcE*	This study

表2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primer names	Primer sequences (5′→3′)
UH-ΔhisL-F	CAGCCTCGCGCTGAAAGT
UH-ΔhisL-R	CCTAGGACTGAGCTAGCTGTCAAAAAAGTCTCTGTGAATGTTTATTCAACTGA
DH-ΔhisL-F	CCTAGGTATAATGCTAGCAAAGAGGAGAAATACTAGATGACAGACAACTCTCG
DH-ΔhisL-R	ATCGCATCCGCCAGTCC
UH-ilvG-F	TTTGTGCAAGTGAAGTTGAGTTGTTCT
UH-ilvG-R	CTAGGACTGAGCTAGCTGTCAAAGTTAGTTCCCCGTCCTGAATCTTGAGAAA
CghisG-F	CAGTCCTAGGTATAATGCTAGCAAAGAGGAGAAATACTAGATGTTGAAAATCGCTGTCCC
CghisG-R	CTAGATGCGGGCGATGCGGAT
EchisG-F	GTATAATGCTAGCAAAGAGGAGAAATACTAGATGACAGACAACACTCGTTTAC
EchisG-R	TCACTCCATCATCTTCTCAATCGGC

(待续)

(续表2)

Primer names	Primer sequences (5′→3′)
DH-ilvG-F	CGCATCGCCCGCATCTAGTGCAACATCAGGTCAATGTATCGG
DH-ilvG-R	GCTCATCAATGCTCTGCGAAACC
hisDCBHAFI-F	GAGAAAGAATTCATGAGCTTTAACACAATCATTGACTGGA
hisDCBHAFI-R	CAATTGAGATCTTCACTGATGCCGTTTACGCA
UH-ΔpurR-F	GAAAGCATGACAGCAATCACAAAAAAATGA
UH-ΔpurR-R	ATACTCCATTTCACTCCAGACCCTAACTTC
DH-ΔpurR-F	AATGGAGTATCGTCAACAAACGTGAAGAACC
DH-ΔpurR-R	CCGCTGGCGTTGATGGATGG
UH-yeep-F	CCTCCCGTGTTTTAATTCTCATTGATGGTCA
UH-yeep-R	TACCTAGGACTGAGCTAGCTGTCAAAAACAGCACCTGCTGATGTCC
Ecprs-F	GCTCAGTCCTAGGTATAATGCTAGCAAAGAGGAGAAATACTAGGTGCCTGATATGAAGCTTTTTGCT GGTAAC
Ecprs-R	TTAGTGTTCGAACATGGCAGAGATCG
Cgprs-F	CAGTCCTAGGTATAATGCTAGCAAAGAGGAGAAATACTAGATGACTGCTCACTGGAAACAAAACC
Cgprs-R	CGACAGGTTTAGGCCTCGCCCTCGAA
Smprs-F	AGTCCTAGGTATAATGCTAGCAAAGAGGAGAAATACTAGATGCCTGATATGAAGCTTTTTGCTG
Smprs-R	CACGACAGGTTTAATGCTCGAACATCGCAGAGATC
DH-yeep-F	TGTTCGAACACTAAACCTGTCGTGACTGATGCCC
DH-yeep-R	CGGGTGCACAACGATGTCAG
UH-yghX-F	GCCAGCCTTGGTAGAGATAATCAG
UH-yghX-R	ATTATACCTAGGACTGAGCTAGCTGTCAACGTTGCACTCCTCAGTTGGTGTT
Cggnd-F	ATAATGCTAGCAAAGAGGAGAAATACTAGATGCCGCGTTTAACCGCC
Cggnd-R	TTAAGCTTCAACCTCGGAGCGG
DH-yghX-F	TTGAAGCTTAATAGGTTTATCTCTTACGGGATTACGTCTTAAA
DH-yghX-R	TGGTTATCGATATCATGATACTGCGGC
UH-yeeL-F	GAGCGTTCCCATCGCCG
UH-yeeL-R	ACCTAGGACTGAGCTAGCTGTCAAACCTAACCTCGCCTCCCTACTG
zwf-F	TAGGTATAATGCTAGCAAAGAGGAGAAATACTAGATGGCGGTAACGCAAACAGC
zwf-R	TTACTCAAACTCATTCCAGGAACGACCATCA
DH-yeeL-F	CCTGGAATGAGTTTGAGTAAGACAGTACTTATGCATAGTAATGCCGATCT
DH-yeeL-R	TACACGCTCCCCAGAGCAAACT
UH-Δedd-F	CAAGCTGGATCTGAGCTATTCAGAAACC
UH-Δedd-R	TCGTCAAAGGCTCCTGAAATTGAGTTG
DH-Δedd-F	CCTTTGACGACAAATTTGTAATCAGGCGAGAGAAA
DH-Δedd-R	CGGACCTGGGAGAACGGA
UH-ΔpflB-focA-F	GTAGATAGCGATCTGCACGCGT
UH-ΔpflB-focA-R	AATCTAAACTAACTCTCTCTTTATTAAGTCGGCGA
DH-ΔpflB-focA-F	AGTTAGTTTAGATTTGACTGAAATCGTACAGTAAAAAGCG
DH-ΔpflB-focA-R	ACAGGTATGAATGCCTTCTTTTTTGCA
UH-Δpta-F	GGCATGAGCGTTGACGCA
UH-Δpta-R	ACGAGAGGTTTATCCTCTTTCGTTACCGCC
DH-Δpta-F	ATAAACCTCTCGTCATCATCCGCAGCT
DH-Δpta-R	GATCCTGAGGTTAACCCTTCAAACG
UH-ΔackA-F	GATCGGCGGCATAAAACGGA
UH-ΔackA-R	GTGAAAGGAAGTACCTATAATTGATACGTGGCTAAAAA
DH-ΔackA-F	ACTTCCTTTCACACCGCCAGCTCAG
DH-ΔackA-R	AGTGCCCTGAGACATAACGAAGAC
UH-ΔtdcD-tdcE-F	CAAAGCGCAGAATATTCCAGTGCT
UH-ΔtdcD-tdcE-R	CCGGCGCTCTTTTCTCATCCTGAGTTACGGATTAAAACA
DH-ΔtdcD-tdcE-F	AAAAGAGCGCCGGAGGATGTATGAAAAAGATT
DH-ΔtdcD-tdcE-R	TTGAAAATATCGAATGCACTAATCATATCCACAC

1.1.2 主要试剂和仪器

限制性内切酶、Prime Star Max 高保真酶、T4 DNA 连接酶、DNA marker，宝生物工程(大连)有限公司；一步同源重组酶、细菌 DNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、产物纯化试剂盒，南京诺唯赞生物科技有限公司；RNA 提取试剂盒，天根生化科技(北京)有限公司；NAD^+/NADH 检测试剂盒(WST-8 法)、增强型 ATP 检测试剂盒，上海碧云天生物技术股份有限公司；Glu/Gln 检测试剂盒(WST 法)，武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司；硫酸卡那霉素、氨苄青霉素、链霉素、阿拉伯糖、异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)，生工生物工程(上海)股份有限公司；甲酸、乙酸，Sigma-Aldrich 公司；L-组氨酸标准品，上海阿拉丁生化科技股份有限公司；基因由苏州金唯智生物科技有限公司合成；其他试剂购自国药集团化学试剂有限公司。

高速离心机、电转仪，Eppendorf 公司；PCR 仪、凝胶成像仪、电泳仪，Bio-Rad 公司；紫外可见分光光度计，SHIMADZU 公司；恒温培养箱，上海跃进医疗器械有限公司；M-100 生物传感器，深圳西尔曼科技有限公司；高效液相色谱仪，赛默飞世尔科技(中国)有限公司；高效液相色谱柱，安捷伦科技有限公司；TJ-Intelli-Ferm 平行生物反应器，迪必尔生物工程有限公司。

1.1.3 培养基

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

固体活化培养基(g/L)：蛋白胨 10.0，酵母提取物 5.0，NaCl 10.0，牛肉膏 10，琼脂粉 20。

种子培养基(g/L)：葡萄糖 40.0，酵母粉 5.0，KH_2PO_4 3.0，$(NH_4)_2SO_4$ 5.0，$MgSO_4·7H_2O$ 1.5，$FeSO_4·7H_2O$ 20.0 mg/L，$MnSO_4·H_2O$ 20.0 mg/L，$ZnSO_4·7H_2O$ 4.0 mg/L，$CoCl_2·6H_2O$ 4.0 mg/L，VB_1 2.0 mg/L，VB_5 2.0 mg/L，VB_7 2.0 mg/L，链霉素 50.0 mg/L。氨水调节 pH 至 7.0。

发酵培养基(g/L)：葡萄糖 20.0，酵母粉 7.0，玉米浆干粉 21.0，KH_2PO_4 7.0，$(NH_4)_2SO_4$ 7.0，$MgSO_4·7H_2O$ 3.0，$FeSO_4·7H_2O$ 20.0 mg/L，$MnSO_4·H_2O$ 20.0 mg/L，$ZnSO_4·7H_2O$ 4.0 mg/L，$CoCl_2·6H_2O$ 4.0 mg/L，VB_1 2.0 mg/L，VB_5 2.0 mg/L，VB_7 2.0 mg/L，链霉素 50.0 mg/L。氨水调节 pH 至 6.7。

1.2 基因编辑

本研究参考文献[15]，采用 CRISPR-Cas9 技术进行基因编辑。所用引物序列见表 2，以 *E. coli* H01 构建过程为例，以实验室保藏的 *E. coli* BL21 WT 基因组为模板，用引物对 UH-ΔhisL-F/UH-ΔhisL-R 和 DH-ΔhisL-F/DH-ΔhisL-R 扩增 *hisL* 的上下游 500 bp 同源臂。PCR 反应体系(50 μL)：Prime Star Max 25 μL，上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL，DNA 模板 1 μL，ddH_2O 22 μL。PCR 反应条件：98 ℃预变性 3 min；98 ℃变性 10 s，55 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 30 s，共 34 个循环；72 ℃终延伸 10 min；以扩增出的 *hisL* 上下游同源臂回收产物为模板，用 UH-ΔhisL-F/DH-ΔhisL-R 引物对扩增 *hisL* 敲除盒。通过制备 *E. coli* BL21 WT (携带 pCas9)电转感受态，将片段 *hisL* 敲除盒与质粒 pTarget-hisL 按照 2:1 的比例添加并电击转化导入菌株，30 ℃培养 24 h 并对长出的单菌落进行验证。验证成功后，通过在培养基中添加 IPTG (0.1 mmol/L)去除 pTarget 质粒，42 ℃下培养 12 h 去除 pCas9 质粒。其余整合菌株的构建方法与此相同。

1.3 重组质粒构建

采用 Gibson 组装技术进行质粒构建。利用设计的引物对(表 2) hisDCBHAFI-F 和 hisDCBHAFI-R 从 *E. coli* BL21 基因组扩增 *hisDCBHAFI* 片段。PCR 反应体系(50 μL)：Prime Star Max 25 μL，上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL，DNA 模板 1 μL，ddH_2O 22 μL。PCR 反应条件：98 ℃预变性 3 min；98 ℃变性 10 s，

55 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 3 min，共 32 个循环；72 ℃终延伸 10 min。将 *hisDCBHAFI* 片段连接到线性化载体 pCDR 上得到质粒 pCDR-His。

1.4 菌体培养

1.4.1 种子培养

用接种环将甘油保菌管中的菌液划线至活化平板，置于 32 ℃恒温培养箱中培养 24 h。之后，用 5 mL 生理盐水充分冲洗平板上的菌落，控制冲洗所得菌液的 OD_{660} 在 3.0−4.0 之间。取 1 mL 冲洗所得菌液接种至装有 30 mL LB 液体培养基的 100 mL 摇瓶中，置于旋转式摇床中培养，34 ℃、220 r/min 培养 4−5 h。当 OD_{660} 达到 4.0−5.0 时完成菌株的一级种子培养。

1.4.2 摇瓶发酵

将 5 mL 一级种子液接种至装有 43 mL 发酵培养基的 500 mL 挡板瓶中，加入 2 mL 质量分数为 50% 的 D-无水葡萄糖溶液，最终体积为 50 mL。将待测菌株置于旋转式摇床中 34 ℃、220 r/min 培养 18 h。发酵过程中通过添加 NH_4OH 将 pH 维持在约 7.0。以苯酚红为指示剂，当发酵液呈红色且不再变化时视为糖分不足，补加 1 mL 质量分数为 50% 的葡萄糖溶液。

1.4.3 5 L 发酵罐补料分批发酵

将一级种子按照 2.5% 的接种量接种至装液量 2 L 的 5 L 种子罐进行二级种子培养。培养过程中通过添加 NH_4OH 将 pH 维持在 7.0，温度恒定控制在 34 ℃。为保持 30%−40% 的溶解氧水平，空气流量设定为 2−4 L/min，罐压控制在 0.02−0.05 MPa，搅拌转速从 300 r/min 逐步提高至 600 r/min。初始葡萄糖浓度控制在 40 g/L。培养时间 8−10 h。当 OD_{660} 达到 20−25 时，二级种子培养完成。

将二级种子按照 15% 的接种量接种至装液量 2 L 的 5 L 发酵罐中。发酵过程中通过添加 NH_4OH 将 pH 维持在 6.7，温度恒定控制在 34 ℃。为保持 35% 的溶解氧水平，空气流量设定为 2−4 L/min，罐压控制在 0.02−0.05 MPa，搅拌转速从 300 r/min 逐步提高至 800 r/min。初始葡萄糖浓度控制在 20 g/L。当葡萄糖浓度低于 1 g/L 时开始补料，通过流加 720 g/L 的葡萄糖溶液维持葡萄糖浓度在 0.5−3.0 g/L。必要时可添加适量的消泡剂以消除泡沫。

1.5 发酵参数测定

取适量发酵液进行适当稀释，紫外分光光度计在波长 660 nm 条件下测定吸光度，用 OD_{660} 表示。

取适量发酵液进行适当稀释，12 000 r/min 离心 2 min，取上清使用 M-100 生物传感器分析仪进行葡萄糖测定。

1.6 产物的测定

采用高效液相色谱法，以邻苯二甲醛(ortho-phthalaldehyde, OPA)进行柱前衍生，使用 ZORBAX Eclipse AAA 分析柱(4.6 mm×150 mm，5 μm 进行梯度洗脱：0 min 为 92% 流动相 A+8% 流动相 B；27.5 min 为 40% 流动相 A+60% 流动相 B；31.5 min 为 0 流动相 A+100% 流动相 B；34.0 min 为 0 流动相 A+100% 流动相 B；35.5 min 为 92% 流动相 A+8% 流动相 B。设定进样体积 12 μL，在柱温 40℃，流速 1.0 mL/min，波长 UV 338 nm 条件下检测。

流动相 A：3.01 g 无水乙酸钠，5 mL 四氢呋喃，200 μL 三乙胺，超纯水定容至 1 000 mL，乙酸调整 pH 至 7.2；流动相 B：3.01 g 无水乙酸钠，400 mL 乙腈，400 mL 甲醇，超纯水定容至 1 000 mL，乙酸调整 pH 至 7.2。

1.7 有机酸的测定

使用 Aminex HPX-87H 色谱柱(7.8 mm×300 mm)在 55 °C 条件下进行分析，以 5 mmol/L 硫酸溶液为流动相，设定进样体积 10 μL，在柱温 52 ℃，流速 0.6 mL/min，波长 UV 210 nm 条件下检测。

1.8 RT-qPCR 分析

所有样品经 4 ℃、10 000 r/min 离心 5 min

收集细胞。用无菌 PBS 缓冲液对收集的细胞洗涤 2 次后，将样品进行液氮速冻。使用 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA。再以 cDNA 聚合酶进行反转录以合成互补 cDNA。在实时荧光定量 PCR 仪上进行实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应 (real-time reverse transcription quantitative PCR, RT-qPCR)。PCR 反应体系(20 μL)：TB Green Premix *Ex Taq* 10 μL，上、下游引物(10 μmol/L)各 2.5 μL，cDNA 模板 1 μL，ddH_2O 4 μL。PCR 反应条件：95 ℃ 10 min；95 ℃ 15 s，55 ℃ 20 s，72 ℃ 30 s，共 39 个循环。所有样品均制备 3 个平行样品进行检测。基因表达数据以 16S rRNA 基因作为内参基因进行了标准化。所有样品均设置 3 个重复，以保证结果的重复性。

1.9 胞内代谢物检测

胞内代谢物浓度分别采用 NAD^+/NADH 检测试剂盒(WST-8 法)、增强型 ATP 检测试剂盒和 Glu/Gln 检测试剂盒(WST 法)按照相应的说明书进行测定，4 °C、10 000 r/min 离心 5 min 收集菌体，随后用无菌 PBS 缓冲液洗涤 2 次，使用配套提取缓冲液提取相应的代谢物用于后续分析。

1.9.1 NAD^+/NADH 检测

使用 NAD^+/NADH 检测试剂盒(WST-8 法)对胞内 NAD^+/NADH 含量进行检测。乙醇在乙醇脱氢酶作用下被氧化为乙醛，同时 NAD^+被还原为 NADH。在 1-甲氧基-5-甲基吩嗪甲基硫酸盐(1-mPMS)存在条件下 NADH 可将 WST-8 还原生成甲臜产物，该产物在约 450 nm 处具有最大吸收峰；生成的甲臜量与样品中 NAD^+和 NADH 的总含量成正比。对于 NADH 的特异性定量，将样品于 60 °C 孵育 30 min 以选择性分解 NAD^+，随后采用比色法测定剩余的 NADH 含量。NAD^+含量则通过总 NAD^+/NADH 含量减去 NADH 含量计算得到。

1.9.2 ATP 检测

使用增强型 ATP 检测试剂盒对胞内 ATP 含量进行检测。ATP 含量采用基于荧光素酶的生物发光法进行测定，其中萤火虫荧光素酶催化荧光素发生 ATP 依赖性反应。在底物饱和条件下，于线性检测范围内发光强度与 ATP 浓度成正比。

1.9.3 L-谷氨酸/L-谷氨酰胺检测

L-谷氨酸的测定基于酶促反应使 NAD^+还原为 NADH，随后 NADH 将 WST-8 还原生成甲臜产物，该产物在 450 nm 处具有最大吸收峰。L-谷氨酸含量根据该波长下的吸光度进行计算。谷氨酰胺的测定则通过酶促转化生成 γ-谷氨酰羟肟酸，在酸性条件下其与铁离子形成稳定复合物，并在 540 nm 处呈现特征吸收峰。通过分光光度法测定 540 nm 处的吸光度，以进行定量分析。

1.10 转化率和生产强度计算

转化率和生产强度计算如公式(1)、(2)所示。

$$\text{转化率(g/g)}=\frac{L-\text{组氨酸总产量(g)}}{\text{葡萄糖总消耗量(g)}} \quad (1)$$

$$\text{生产强度[g/(L·h)]}=\frac{L-\text{组氨酸浓度(g/L)}}{\text{发酵时间(h)}} \quad (2)$$

2 结果与分析

2.1 优化合成路径提高 L-组氨酸生产强度

在 *E. coli* 中 L-组氨酸生物合成操纵子 *hisLGDCBHAFI* 表达受到前导肽 HisL (*hisL* 编码)的调控(图 1A)，随着胞内 L-组氨酸浓度升高 HisL 抑制操纵子基因转录[16]。为解除操纵子的转录衰减和 HisG 受到的反馈抑制，在菌株 *E. coli* BL21 中删除 *hisL*，构建菌株 *E. coli* H01，通过摇瓶发酵积累 0.11 g/L 的 L-组氨酸(图 1B)。同时 RT-qPCR 分析结果表明，敲除 *hisL* 后，除 *hisL* 外的组氨酸操纵子基因的表达量上调了 2−5 倍不等(图 1C)。

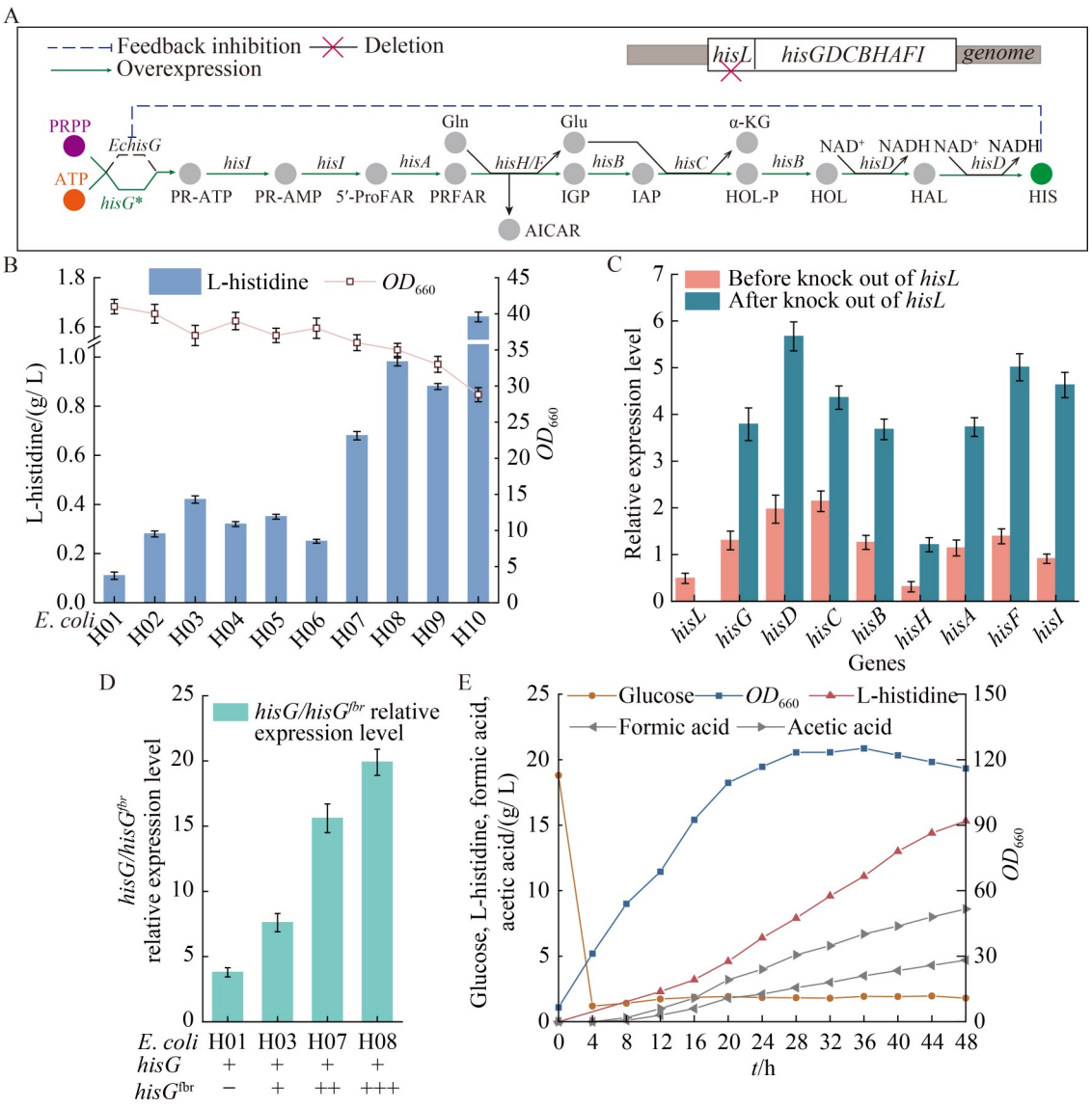


图1　L-组氨酸合成路径重构与优化

Figure 1　Reconstruction and optimization of the L-histidine biosynthetic pathway. A: Schematic of the L-histidine biosynthetic pathway in *Escherichia coli*. PRPP: 5-Phospho-alpha-D-ribose-1-diphosphate; ATP: Adenosine-5′-triphosphate; PR-ATP: Phosphoribosyl-ATP; PR-AMP: Phosphoribosyl-AMP; 5′-ProFAR: 1- (5-phosphoribosyl) -5- [(5-phosphoribosylamino) methylideneamino] imidazole-4-carboxamide; PRFAR: 5- [(5-phospho-1-deoxyribulos-1-ylamino) methylideneamino]-1-(5-phosphoribosyl) imidazole-4-carboxamide; IGP: D-erythro-imidazole-glycerol phosphate; IAP: Imidazole-acetol phosphate; HOL-P: L-histidinol phosphate; HOL: L-histidinol; HAL: L-histidinal; HIS: L-histidine; AICAR: 5-amino-1-(5-phospho-D-ribosyl) imidazole-4-carboxamide; Gln: L-glutamine; Glu: L-glutamate; α-KG: α-ketoglutarate; NAD^+: Oxidized nicotinamide adenine dinucleotide; NADH: Reduced nicotinamide adenine dinucleotide. B: Effects of pathway engineering on cell growth and L-histidine production. C: Effects of *hisL* deletion on the expression of histidine operon genes; D: *hisG*/*hisG*^{fbr} relative expression level; E: Fermentation curve of strain *E. coli* H10 in a 5 L fermenter.

基于文献报道筛选 *C. glutamicum* 来源(*Cg*HisG^{N215I}、*Cg*HisG$^{G233H/T235Q}$、*Cg*HisG$^{N215K/L231A/T235A}$ 和 *Cg*HisG$^{S143F/\Delta209-281}$)[17-19]和 *E. coli* 来源(*Ec*HisG^{E271K})的抗反馈抑制突变体[7]，将各突变体基因在启动子 $P_{BJ23119}$ 的控制下整合在菌株 *E. coli* H01 的 *ilvG* 位点，分别构建工程菌株 *E. coli* H02 至 *E. coli* H06。上述菌株摇瓶发酵 L-组氨酸的产量分别为 0.28、0.42、0.32、0.35、0.25 g/L (图 1B)。因此选定 *Cg*HisG$^{G233H/T235Q}$ 作为本研究最优突变体。随后依次在菌株 *E. coli* H03 的 *rph*、*rpnD* 和 *fryA* 位点多拷贝整合 *Cg*HisG$^{G233H/T235Q}$ 突变体基因，构建工程菌株 *E. coli* H07、*E. coli* H08 和 *E. coli* H09。摇瓶发酵结果显示，L-组氨酸产量分别为 0.68、0.98 和 0.88 g/L (图 1B)。菌株 *E. coli* H03、*E. coli* H07 和 *E. coli* H08 中 *hisG*/*hisG*^{fbr} 的表达量相较于 *E. coli* H01 分别上调了 1.01、3.12、5.25 倍(图 1D)。

为进一步强化 L-组氨酸生物合成的代谢通量，将其余合成路径基因 *hisDCBHAFI* 连接到 pCDR 质粒，并导入 *E. coli* H08 中，构建 *E. coli* H10，其摇瓶发酵产量为 1.64 g/L，提高了 67.35%，但菌体量降低了 17.71% (图 1B)。在 5 L 发酵罐中发酵 48 h，*E. coli* H10 的 L-组氨酸产量、转化率和生产强度为 15.32 g/L、0.05 g/g 和 0.32 g/(L·h)，主要副产物包括甲酸 4.7 g/L 和乙酸 8.6 g/L (图 1E)。上述结果表明，强化 L-组氨酸主合成路径能有效提升菌体的生产能力。

2.2 强化前体供给提高 L-组氨酸产量

PRPP 作为 L-组氨酸生物合成前体，由核糖-5-磷酸(ribose-5-phosphate, R5P)经磷酸核糖焦磷酸合酶(PrsA；由 *prsA* 编码)催化生成，PrsA 受到全局调控因子 PurR (由 *purR* 编码)的转录抑制(图 2A)[20]。为了提高 PRPP 的合成效率，首先在菌株 *E. coli* H10 基因组上敲除 *purR* 基因，构建菌株 *E. coli* H11。摇瓶发酵结果显示，*E. coli* H11 的 L-组氨酸产量为 1.71 g/L，较菌株 *E. coli* H10 提高了 7.00% (图 2B)。筛选来自 *E. coli*、*C. glutamicum* 和粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)的 *prsA* 基因，在 $P_{BJ23119}$ 启动子控制下整合到菌株 *E. coli* H11 的 *yeeP* 基因位点，分别构建菌株 *E. coli* H12、*E. coli* H13 和 *E. coli* H14，摇瓶发酵上述菌株的 L-组氨酸产量分别为 1.83、1.88、1.98 g/L (图 2B)，最优菌株 *E. coli* H14 较 *E. coli* H11 的 L-组氨酸产量提高了 15.79%。随后依次在菌株 *E. coli* H14 的 *lafU*、*yjiP* 和 *yghX* 位点多拷贝整合 *SmprsA*，构建工程菌株 *E. coli* H15、*E. coli* H16 和 *E. coli* H17，上述菌株摇瓶发酵的 L-组氨酸产量分别为 2.15、2.37、2.25 g/L (图 2B)。最优菌株 *E. coli* H16 较 *E. coli* H14 的 L-组氨酸产量提高了 19.69%。PPP 充足的代谢通量可以保证途径中代谢物的高效合成，因此，在菌株 *E. coli* H16 的 *yghX* 位点整合 *C. glutamicum* 来源不受 PRPP 变构抑制的 *Cggnd*^{fbr} 基因(编码 Gnd^{S361F})[21]，菌株 *E. coli* H18 产量提高至 2.53 g/L (图 2B)，提高了 6.75%。继续在菌株 *E. coli* H18 的 *yeeL* 位点整合 *zwf* 基因，菌株 *E. coli* H19 的 L-组氨酸产量为 2.71 g/L (图 2B)，提高了 7.11%。然而，当在菌株 *E. coli* H19 中敲除 *edd* 基因以阻断 Entner-Doudoroff 途径时，菌株 *E. coli* H20 的 L-组氨酸产量下降至 2.55 g/L (图 2B)，较 *E. coli* H19 产量降低了 5.90%。在 5 L 发酵罐中，*E. coli* H19 的 L-组氨酸产量、转化率和生产强度为 23.58 g/L、0.08 g/g 和 0.49 g/(L·h) (图 2C)，较 *E. coli* H10 分别提高了 53.92%、60.00% 和 53.13%。副产物甲酸和乙酸的积累量分别降低了 8.51% 和 9.30%。上述结果表明，通过增加 L-组氨酸生物合成前体 PRPP 的供给有效促进了 L-组氨酸的生产。

2.3 阻断副产物代谢路径强化 L-组氨酸生产

尽管通过强化 PPP 关键基因增加了其碳代谢通量和 L-组氨酸前体供应，但是发酵过程中仍会产生 4.3 g/L 甲酸和 7.8 g/L 乙酸(图 2C)，这

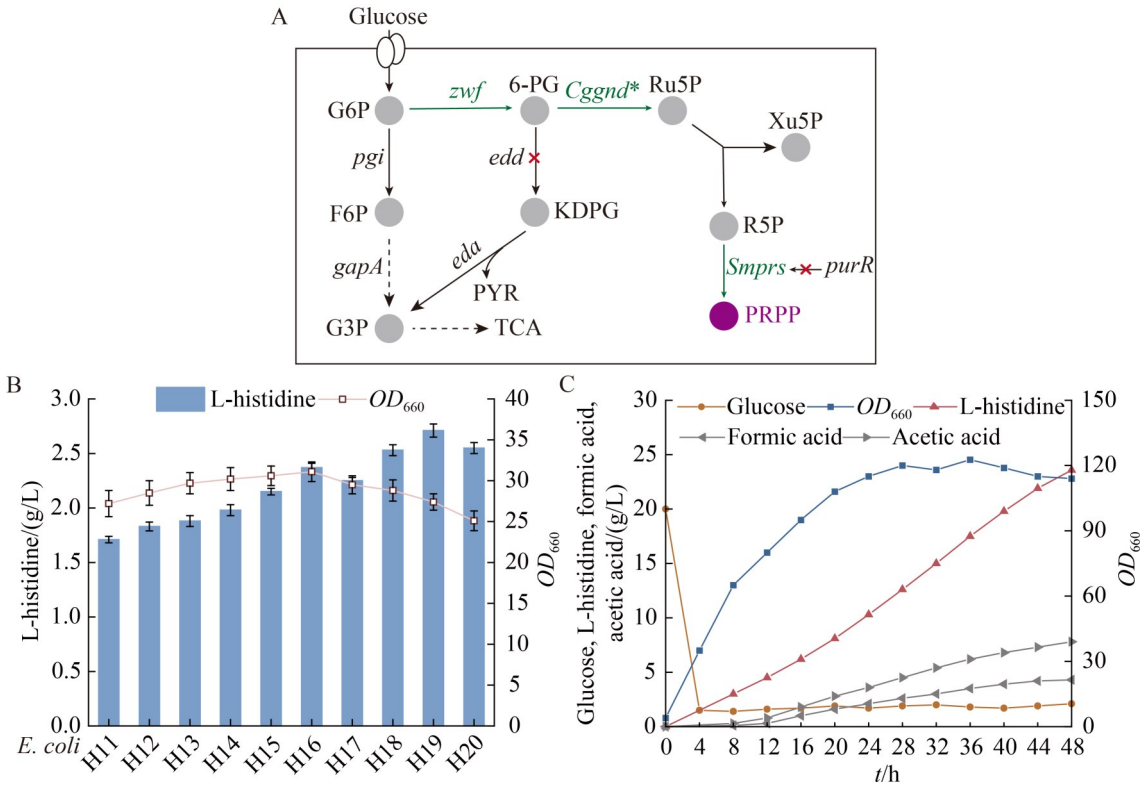


图2　前体强化菌株构建与评估

Figure 2　Construction and evaluation of precursor-enhanced strains. A: Schematic of the PRPP biosynthetic pathway in *Escherichia coli* (G6P: Glucose-6-phosphate; 6-PG: Gluconate-6-phosphate; Ru5P: Ribulose-5-phosphate; R5P: Ribose-5-phosphate; Xu5P: Xylulose-5-phosphate; F6P: Fructose-6-phosphate; G3P: Glyceraldehyde-3-phosphate; KDPG: 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconate; PYR: Pyruvate); B: Effects of pentose phosphate pathway engineering on cell growth and L-histidine production; C: Fermentation curve of strain *E. coli* H19 in a 5 L fermenter.

不仅降低了 L-组氨酸实际产率，还会对菌体的生长和蛋白表达造成不利影响[22]。为了减少碳代谢流的损耗，选择阻断冗余代谢支路以提高 L-组氨酸得率(图 3A)。在菌株 *E. coli* H19 中分别敲除了丙酮酸甲酸裂解酶-甲酸转运蛋白基因 *pflB-focA*、磷酸转乙酰酶基因 *pta* 和乙酸激酶基因 *ackA*[23-24]，构建了菌株 *E. coli* H21、*E. coli* H22 和 *E. coli* H23。在摇瓶条件下单独敲除 *pflB-focA* 和 *pta* 后，工程菌的 L-组氨酸产量分别提高了 5.54% 和 7.75%；单独敲除 *ackA* 基因的菌株 L-组氨酸产量降低了 9.23%，可能是因为敲除乙酸激酶后菌株生长受到影响，导致 L-组氨酸产量降低；组合敲除 *pflB-focA* 和 *pta* 的菌株 *E. coli* H24 的 L-组氨酸产量提高了 15.87%，副产物甲酸未检测出，乙酸积累量为 0.8 g/L。为进一步减少乙酸的积累，敲除乙酸代谢途径相关基因丙酸激酶基因 *tdcD* 和 α-酮丁酸甲酸酯裂解酶基因 *tdcE*[25]，构建菌株 *E. coli* H25，在摇瓶条件下 L-组氨酸产量提高至 3.27 g/L，较 *E. coli* H19 提高了 20.66%，乙酸未检测出(图 3B)。在 5 L 发酵罐中，*E. coli* H25 的产量、转化率和生产强度分别达到 26.92 g/L、0.10 g/g 和 0.56 g/(L·h) (图 3C)，较 *E. coli* H19 分别提高了 14.16%、25.00% 和 14.29%。副产物甲酸和乙酸

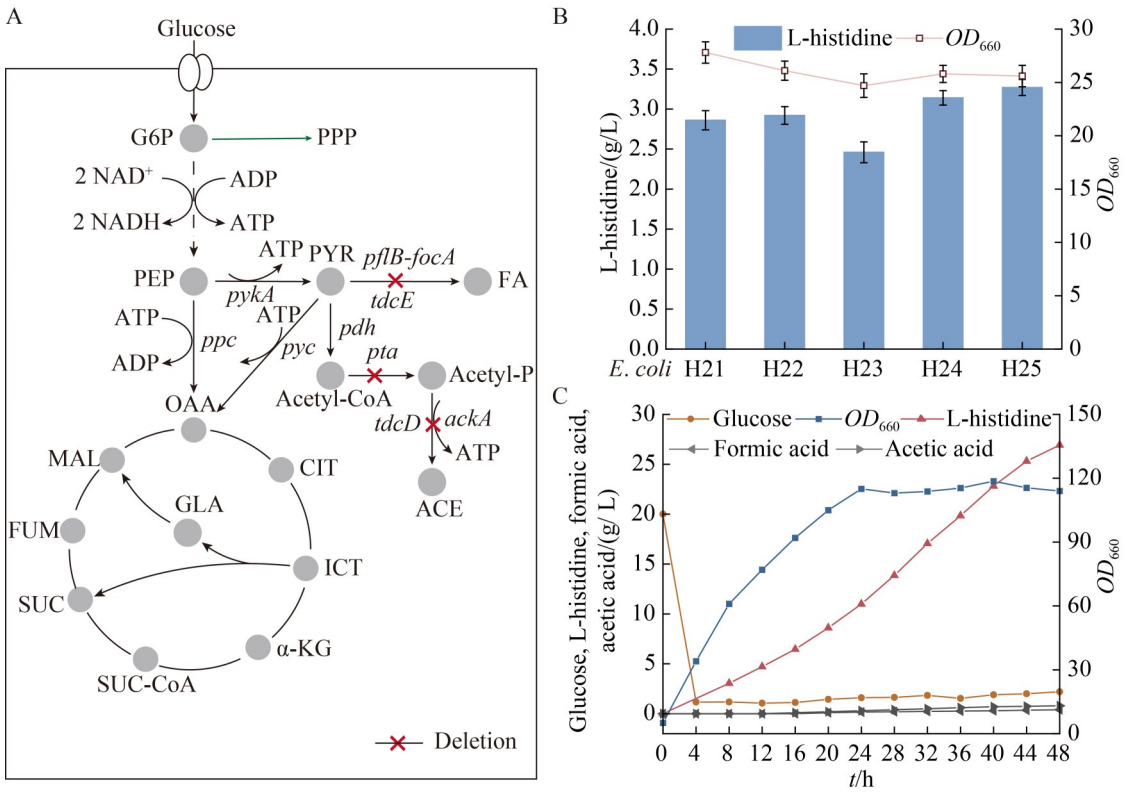


图3 副产物路径阻断菌株构建与评估

Figure 3 Construction and evaluation of by-product pathway-blocked strains. A: Schematic representation of by-product metabolic pathways (PEP: Phosphoenolpyruvate; OAA: Oxaloacetate; CIT: Citrate; ICT: Isocitrate; α-KG: α-Ketoglutarate; SUC-CoA: Succinate-CoA; SUC: Succinate; FUM: Fumarate; MAL: Malate; GLA: Glyoxylate; FA: Formic acid; Acetyl-P: Acetyl phosphate; ACE: Acetate); B: Effects of by-product pathway disruption on cell growth and L-histidine production; C: Fermentation curve of strain *E. coli* H25 in a 5 L fermenter.

分别积累了 0.4 g/L 和 0.8 g/L，较 *E. coli* H19 分别下降了 90.69% 和 89.74%。上述结果表明，阻断冗余代谢路径不仅是对已有代谢工程改造的补充，而且是提高 L-组氨酸碳原子利用效率和发酵稳定性的关键策略。

2.4 系统发酵工艺优化强化 L-组氨酸合成

L-组氨酸分子中碳氮比为 2:1，其氮元素质量占比高达 27.1%，在常见的 20 种蛋白质氨基酸中仅次于精氨酸(32.2%)，属于高氮含量氨基酸。其分子中的 3 个氮原子分别来自 ATP、L-谷氨酸和 L-谷氨酰胺，因此氮源供给不仅影响细胞生长，也直接关系到核苷酸合成、氨供体供给及 L-组氨酸的合成效率[26]。为进一步提高菌株 *E. coli* H25 的 L-组氨酸生产潜力，首先在摇瓶水平对无机氮源的种类及含量进行考察。硫酸铵和氯化铵各设置 3、5、7、9 g/L 4 个梯度(图 4A)，添加 7 g/L 的硫酸铵时 L-组氨酸产量最高，为 3.41 g/L，相较于优化前提高 4.28%。进一步对有机氮源添加量进行了优化，在添加 7 g/L 酵母粉的基础上，额外设置 7、14、21、28 g/L 玉米浆干粉的添加梯度(图 4B)，将添加量从 7 g/L 提高到 21 g/L 时有利于 L-组氨酸的生产，即有机氮源添加 7 g/L 酵母粉和 21 g/L 玉

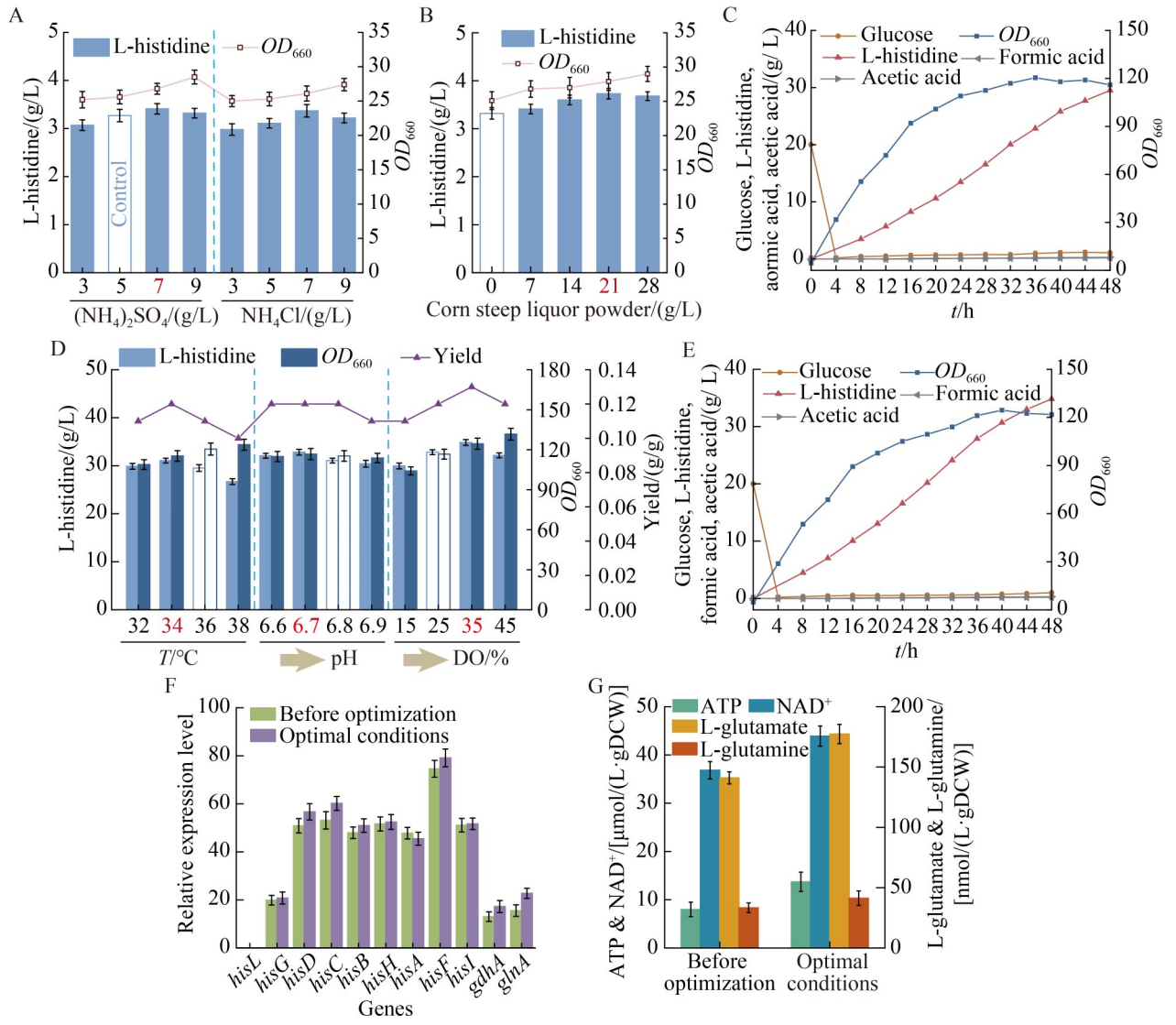


图4　菌株*Escherichia coli* H25的发酵工艺优化

Figure 4　Fermentation process optimization of strain *Escherichia coli* H25. A: Optimization of the inorganic nitrogen source; B: Optimization of the supplementation of organic nitrogen sources; C: Fermentation curve of strain *E. coli* H25 after nitrogen source optimization in a 5 L fermenter; D: Single-factor optimization of fermentation parameters in a 5 L fermenter; E: Fermentation curve of strain *E. coli* H25 under the optimized fermentation conditions in a 5 L fermenter; F: The impact of process optimization on key gene expression; G: The impact of process optimization on the content of key intracellular metabolites.

米浆干粉时 L-组氨酸产量最高，为 3.73 g/L，较优化前提高 9.38%。然而当玉米浆干粉添加量提高至 28 g/L 时，菌体量提高了 3.94%，L-组氨酸产量并未提升。在 5 L 发酵罐中对最优氮源比例进行验证，L-组氨酸产量、转化率和生产强度分别提升到 29.52 g/L、0.11 g/g 和 0.62 g/(L·h) (图 4C)，较优化前分别提高了 9.80%、10.00% 和 10.71%。这表明通过对无机氮源(速效氮源)和有机氮源(迟效氮源)的优化有利于平衡细胞生长与 L-组氨酸合成的速率。

在 5 L 发酵罐水平依次对发酵温度、pH 和溶氧水平进行优化。具体结果如图 4D 所示，最适宜 L-组氨酸发酵生产的温度、pH 和溶氧分别为 34 ℃、6.7 和 35%，在最优条件下，L-组氨酸产量、转化率和生产强度分别提高到 34.84 g/L、0.13 g/g 和 0.73 g/(L·h) (图 4E)，相较于优化前分别提高了 18.02%、18.18% 和 17.74%，菌株 *E. coli* H25 在发酵过程中仅积累了少量副产物，包括 0.2 g/L 甲酸和 0.3 g/L 乙酸。通过 RT-qPCR 发现，发酵终点时基因 *hisGDCBHFI*、*gdhA* 和 *glnA* 的相对表达量上升 1.09%−46.21%，其中表达量提高最明显的是 *gdhA* (32.34%)和 *glnA* (46.21%) (图 4F)。同时检测到 L-组氨酸合成所需的 ATP、NAD^+、L-谷氨酸和 L-谷氨酰胺的胞内浓度在条件优化后分别增加了 71.59%、19.19%、25.77% 和 24.00% (图 4G)。*hisGDCBHFI* 操纵子的表达增强提升了 L-组氨酸主合成路径的通量，*gdhA* 与 *glnA* 的上调表达提升了 L-谷氨酸和 L-谷氨酰胺的供给能力，为 L-组氨酸合成提供了充足的氮前体；同时，ATP 含量的显著增加保障了合成路径中多个 ATP 依赖步骤的能量需求，而 NAD^+水平的提升则有助于维持细胞内的氧化还原平衡，为高效代谢提供了适宜的辅因子环境。发酵条件的优化通过同时增强路径表达、改善前体供给、强化能量与辅因子状态驱动了 L-组氨酸的高效积累。

3 讨论与结论

本研究以 *E. coli* BL21 为底盘菌株，通过筛选 L-组氨酸合成途径的限速酶突变体、优化合成途径的表达水平、强化前体供应成功构建了生产 L-组氨酸的 *E. coli* 底盘菌株。接着，通过阻断副产物途径，提高了碳流向 L-组氨酸的分配效率；通过系统性优化培养基组成和发酵过程控制，提升菌株发酵水平；最优菌株 *E. coli* H25 在 5 L 发酵罐中 L-组氨酸产量、转化率和生产强度分别达到 34.84 g/L、0.13 g/g 和 0.73 g/(L·h)。最后通过关键基因表达和胞内代谢物分析，从转录和代谢层面对工艺优化的作用机制进行了初步解释。

E. coli 中氨基酸生物合成普遍存在转录水平调控[27]和末端产物反馈抑制机制[28]，转录水平调控又包括转录衰减[29]和转录因子调控[30]。通过对代谢瓶颈的理性改造可以有效地提升氨基酸的生产效率，例如在 *E. coli* 色氨酸细胞工厂中删除 L-色氨酸操纵子衰减子 TrpL[31]，在 *C. glutamicum* 精氨酸细胞工厂中失活转录调控因子 ArgR[32]以及在 *C. glutamicum* 甲硫氨酸细胞工厂中引入抗反馈抑制的 $LysC^{T311I}$ 和 Hom^{G377E}[33]，都使相应产物产量获得提升。本研究中对 L-组氨酸的合成路径和前体供应路径中的转录水平抑制和产物反馈抑制进行系统性改造。通过删除组氨酸操纵子衰减序列 *hisL* 和多拷贝整合 *C. glutamicum* 来源抗 L-组氨酸反馈抑制的 $CgHisG^{G233H/T235Q}$ 强化主合成路径代谢通量；其次，敲除转录调控因子 PurR 引入 *S. marcescens* 来源磷酸核糖焦磷酸合酶 SmPrs、*C. glutamicum* 来源葡萄糖酸-6-磷酸脱氢酶 $CgGnd^{S361F}$ 和过表达 6-磷酸葡萄糖脱氢酶 Zwf 以增加前体 PRPP 的可用性。

副产物积累是限制氨基酸细胞工厂碳原子利用效率和发酵稳定性的另一关键因素[22]。在本研究中尽管通过重构 L-组氨酸主合成模块和磷酸戊糖途径显著提高了目标产物合成能力，但前体强化菌株在 5 L 发酵过程中仍观察到较高水平的甲酸和乙酸积累。这一结果说明仅提升主路径通量和 PRPP 供应并不足以实现碳流的最优分配，过量碳流仍可经由副产物支路消耗，从而降低了 L-组氨酸的实际转化率。基于此，本研究对与甲酸和乙酸生成相关的关键节点进行了系统改造，通过敲除 *pflB-focA*、*pta*、*tdcD* 和 *tdcE* 使甲酸和乙酸的积累量分别降低至 0.4 g/L 和 0.8 g/L，并提高了 L-组氨酸产量、转化率和生产强度。该结果表明，副产物通路阻断在本质上提高了碳源向目标产物的有效分配比例，

同时减轻了有机酸副产物对菌体生理状态的不利影响，从而为 L-组氨酸持续合成创造了更有利的胞内代谢环境。进一步结合氮源与发酵参数优化后甲酸和乙酸降低至 0.2 g/L 和 0.3 g/L，说明代谢工程改造与发酵过程调控在弱化副产物形成方面具有协同效应。

当前菌株的产量和转化率仍有继续提升的空间，后续研究可以从以下方面继续开展。(1)强化底物摄取与中心碳代谢分配。本研究已通过重构磷酸戊糖途径提高了前体 PRPP 的供应，后续可针对葡萄糖摄取系统及其上游调控网络进行优化，如增强 PTS 系统或替代性葡萄糖转运与磷酸化模块的效率[34]，并结合对糖酵解与 PPP 分流节点的精细调控[35-36]提高更多碳流向 R5P 和 PRPP 的转化比例，从而进一步提升 L-组氨酸主合成路径的底物碳通量。(2)协同强化氮原子供给与胞内氮代谢网络[37]。L-组氨酸是高氮含量氨基酸，其生物合成过程依赖 ATP、L-谷氨酰胺和 L-谷氨酸提供氮原子，仅优化外源氮源组成仍可能不足以完全满足高强度发酵条件下的氮供体需求。后续可从胞内氨同化与转氨反应网络出发[26,38]，进一步优化谷氨酸与谷氨酰胺循环，例如增强谷氨酸脱氢酶、谷氨酰胺合酶及相关转氨酶体系的协同表达，并优化氮源吸收和同化过程，提高胞内有效氮供体库的稳定性。(3)结合多组学分析挖掘新的关键靶点[39-41]。本研究已经通过理性代谢工程实现了 L-组氨酸合成能力的显著提升，但影响 L-组氨酸积累的代谢限制因素可能涉及更广泛的调控层面。后续可结合转录组学、代谢组学和 ^{13}C 代谢流分析等手段对不同发酵阶段工程菌株的碳流、能量状态、氧化还原水平进行系统解析，有望进一步推动工程菌株向更高产率和更高稳定性的方向发展。

作者贡献声明

陈照阳：研究构思和设计、实验操作、论文撰写；刘佳：研究设计、论文指导与修改；董欣：协助实验操作；胡贵鹏：实验指导、实验过程监督；周怡雯：提供技术支持；吴静：数据核查、参与论文讨论、提供资金支持。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

[1] Thalacker-Mercer AE, Gheller ME. Benefits and adverse effects of histidine supplementation[J]. The Journal of Nutrition, 2020, 150: 2588S-2592S.
[2] Cordell GA, Lamahewage SNS. Ergothioneine, ovothiol A, and selenoneine: histidine-derived, biologically significant, trace global alkaloids[J]. Molecules, 2022, 27(9): 2673.
[3] Larionov VA, Stoletova NV, Maleev VI. Advances in asymmetric amino acid synthesis enabled by radical chemistry[J]. Advanced Synthesis & Catalysis, 2020, 362(20): 4325-4367.
[4] Alifano P, Fani R, Liò P, Lazcano A, Bazzicalupo M, Carlomagno MS, Bruni CB. Histidine biosynthetic pathway and genes: structure, regulation, and evolution[J]. Microbiological Reviews, 1996, 60(1): 44-69.
[5] Alphey MS, Fisher G, Ge Y, Gould ER, Machado TFG, Liu HT, Florence GJ, Naismith JH, da Silva RG. Catalytic and anticatalytic snapshots of a short-form ATP phosphoribosyltransferase[J]. ACS Catalysis, 2018, 8(6): 5601-5610.
[6] Pedreño S, Pisco JP, Larrouy-Maumus G, Kelly G, de Carvalho LPS. Mechanism of feedback allosteric inhibition of ATP phosphoribosyltransferase[J]. Biochemistry, 2012, 51(40): 8027-8038.
[7] Doroshenko VG, Lobanov AO, Fedorina EA. The directed modification of *Escherichia coli* MG1655 to obtain histidine-producing mutants[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2013, 49(2): 130-135.
[8] Chai M, Xu XH, Liu YF, Li JH, Du GC, Lv XQ, Liu L. Combinatorial protein engineering and metabolic engineering for efficient synthesis of L-histidine in *Corynebacterium glutamicum*[J]. ACS Synthetic Biology, 2023, 12(4): 1275-1286.
[9] Hove-Jensen B, Andersen KR, Kilstrup M, Martinussen J, Switzer RL, Willemoës M. Phosphoribosyl diphosphate (PRPP): biosynthesis, enzymology, utilization, and metabolic significance[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2017, 81: e00040-16.
[10] Cheng YS, Zhou YJ, Yang L, Zhang CL, Xu QY, Xie XX, Chen N. Modification of histidine biosynthesis pathway genes and the impact on production of L-histidine in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Biotechnology Letters, 2013, 35(5): 735-741.
[11] Wu HY, Tian DG, Fan XG, Fan WM, Zhang Y, Jiang S, Wen CH, Ma Q, Chen N, Xie XX. Highly efficient production of L-histidine from glucose by metabolically

engineered *Escherichia coli*[J]. ACS Synthetic Biology, 2020, 9(7): 1813-1822.
[12] Marienhagen J, Sandalova T, Sahm H, Eggeling L, Schneider G. Insights into the structural basis of substrate recognition by histidinol-phosphate aminotransferase from *Corynebacterium glutamicum*[J]. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography, 2008, 64(6): 675-685.
[13] Smulski DR, Huang LL, McCluskey MP, Reeve MJG, Vollmer AC, van Dyk TK, LaRossa RA. Combined, functional genomic-biochemical approach to intermediary metabolism: interaction of acivicin, a glutamine amidotransferase inhibitor, with *Escherichia coli* K-12[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(11): 3353-3364.
[14] Yang FY, Liao YX, Zhao ZQ, Cai MM, You JJ, Qiao ZN, Xu MJ, Rao ZM. Development of *Escherichia coli* by combining channel engineering and energy engineering for the production of L-histidine[J]. Chemical Engineering Journal, 2025, 520: 165521.
[15] Li YF, Lin ZQ, Huang C, Zhang Y, Wang ZW, Tang YJ, Chen T, Zhao XM. Metabolic engineering of *Escherichia coli* using CRISPR-Cas9 mediated genome editing[J]. Metabolic Engineering, 2015, 31: 13-21.
[16] Yao Y, Sun HW, Wurihan, Gegeheng, Gezi, Skarstad K, Fan LF, Morigen. A DnaA-dependent riboswitch for transcription attenuation of the *his* operon[J]. mLife, 2023, 2(2): 126-140.
[17] Kulis-Horn RK, Persicke M, Kalinowski J. *Corynebacterium glutamicum* ATP-phosphoribosyl transferases suitable for L-histidine production-strategies for the elimination of feedback inhibition[J]. Journal of Biotechnology, 2015, 206: 26-37.
[18] Schendzielorz G, Dippong M, Grünberger A, Kohlheyer D, Yoshida A, Binder S, Nishiyama C, Nishiyama M, Bott M, Eggeling L. Taking control over control: use of product sensing in single cells to remove flux control at key enzymes in biosynthesis pathways[J]. ACS Synthetic Biology, 2014, 3(1): 21-29.
[19] Zhang Y, Shang XL, Deng AH, Chai X, Lai SJ, Zhang GQ, Wen TY. Genetic and biochemical characterization of *Corynebacterium glutamicum* ATP phosphoribosyltransferase and its three mutants resistant to feedback inhibition by histidine[J]. Biochimie, 2012, 94(3): 829-838.
[20] He B, Choi KY, Zalkin H. Regulation of *Escherichia coli glnB*, *prsA*, and *speA* by the purine repressor[J]. Journal of Bacteriology, 1993, 175(11): 3598-3606.
[21] Ohnishi J, Katahira R, Mitsuhashi S, Kakita S, Ikeda M. A novel gnd mutation leading to increased L-lysine production in *Corynebacterium glutamicum*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 242(2): 265-274.
[22] Gecse G, Labunskaite R, Pedersen M, Kilstrup M, Johanson T. Minimizing acetate formation from overflow metabolism in *Escherichia coli*: comparison of genetic engineering strategies to improve robustness toward sugar gradients in large-scale fermentation processes[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2024, 12: 1339054.
[23] Jantama K, Zhang XL, Moore JC, Shanmugam KT, Svoronos SA, Ingram LO. Eliminating side products and increasing succinate yields in engineered strains of *Escherichia coli* C[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2008, 101(5): 881-893.
[24] 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.
[25] Zhao CG, Cheng LK, Wang J, Shen ZQ, Chen N. Impact of deletion of the genes encoding acetate kinase on production of L-tryptophan by *Escherichia coli*[J]. Annals of Microbiology, 2016, 66(1): 261-269.
[26] Zhang JJ, Fang H, Du GQ, Zhang DW. Metabolic regulation and engineering strategies of carbon and nitrogen metabolism in *Escherichia coli*[J]. ACS Synthetic Biology, 2025, 14(5): 1367-1380.
[27] Daran-Lapujade P, Rossell S, van Gulik WM, Luttik MAH, de Groot MJL, Slijper M, Heck AJR, Daran JM, de Winde JH, Westerhoff HV, Pronk JT, Bakker BM. The fluxes through glycolytic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* are predominantly regulated at posttranscriptional levels[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(40): 15753-15758.
[28] Sander T, Farke N, Diehl C, Kuntz M, Glatter T, Link H. Allosteric feedback inhibition enables robust amino acid biosynthesis in *E. coli* by enforcing enzyme overabundance[J]. Cell Systems, 2019, 8(1): 66-75.e8.
[29] Vitreshchak AG, Gel'fand MS. Computer analysis of control signals in bacterial genomes. attenuators of operons of aromatic amino acids metabolism[J]. Molecular Biology, 2000, 34(4): 461-467.
[30] Cho BK, Federowicz S, Park YS, Zengler K, Palsson BØ. Deciphering the transcriptional regulatory logic of amino acid metabolism[J]. Nature Chemical Biology, 2012, 8(1): 65-71.
[31] 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.
[32] Xu MJ, Rao ZM, Yang J, Xia HF, Dou WF, Jin J, Xu ZH. Heterologous and homologous expression of the arginine biosynthetic *arg*C − H cluster from *Corynebacterium crenatum* for improvement of L-arginine production[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2012, 39(3): 495-502.
[33] Qin TY, Hu XQ, Hu JY, Wang XY. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* strain ATCC13032 to producel-methionine[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2015, 62(4): 563-573.
[34] Aboulwafa M, Zhang ZG, Saier MH Jr. Protein-protein interactions in the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*: influence of the overexpression of diverse transporter-encoding genes on the activities of PTS sugar uptake systems[J]. Microbial Physiology, 2020, 30(1/2/3/4/5/6): 36-49.

[35] Kobayashi S, Kawaguchi H, Shirai T, Ninomiya K, Takahashi K, Kondo A, Tsuge Y. Automatic redirection of carbon flux between glycolysis and pentose phosphate pathway using an oxygen-responsive metabolic switch in *Corynebacterium glutamicum*[J]. ACS Synthetic Biology, 2020, 9(4): 814-826.

[36] Li Y, Xian H, Xu Y, Zhu Y, Sun ZJ, Wang Q, Qi QS. Fine tuning the glycolytic flux ratio of EP-bifido pathway for mevalonate production by enhancing glucose-6-phosphate dehydrogenase (Zwf) and CRISPRi suppressing 6-phosphofructose kinase (PfkA) in *Escherichia coli*[J]. Microbial Cell Factories, 2021, 20: 32.

[37] 卢培利, 杨涵, 丁阿强, 李朝洋, 全林. 碳源与氮源限制下细菌代谢调节研究进展[J]. 微生物学报, 2023, 63(3): 946-962.
Lu PL, Yang H, Ding AQ, Li CY, Quan L. Metabolic regulation of bacteria with limited carbon and nitrogen sources[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(3): 946-962 (in Chinese).

[38] Burkovski A. I do it my way: regulation of ammonium uptake and ammonium assimilation in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Archives of Microbiology, 2003, 179(2): 83-88.

[39] Amer B, Baidoo EEK. Omics-driven biotechnology for industrial applications[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2021, 9: 613307.

[40] Kim M, Park BG, Kim J, Kim JY, Kim BG. Exploiting transcriptomic data for metabolic engineering: toward a systematic strain design[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2018, 54: 26-32.

[41] 赵燕妮, 余瑞, 刘欢, 王永波. 功能代谢组学技术在微生物研究中的应用[J]. 微生物学报, 2023, 63(8): 3009-3025.
Zhao YN, Yu R, Liu H, Wang YB. Application of functional metabolomics in microbiological studies[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(8): 3009-3025 (in Chinese).