

# 基于常压室温等离子体诱变和高通量筛选选育 L-色氨酸高产菌株

叶慧敏<sup>1</sup>, 杜军<sup>2</sup>, 唐玉景<sup>3</sup>, 袁鑫<sup>1</sup>, 张铮<sup>1</sup>, 李璐<sup>3\*</sup>, 冀颐之<sup>1\*</sup>

- 1 北京联合大学 生物化学工程学院 生物质废弃物资源化利用北京市重点实验室, 北京 100023
- 2 北京擎科生物科技股份有限公司研究院, 北京 100000
- 3 清华大学 化工系生物化工研究所 清华大学合成与系统生物学研究中心 工业生物催化教育部重点实验室, 北京 100084

叶慧敏, 杜军, 唐玉景, 袁鑫, 张铮, 李璐, 冀颐之. 基于常压室温等离子体诱变和高通量筛选选育 L-色氨酸高产菌株[J]. 生物工程学报, 2024, 40(9): 3201-3215.

YE Huimin, DU Jun, TANG Yujing, YUAN Xin, ZHANG Zheng, LI Lu, JI Yizhi. Breeding of L-tryptophan high-yield strain by ARTP mutagenesis and high-throughput screening[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(9): 3201-3215.

**摘要:** L-色氨酸是人体中不可或缺的必需氨基酸, 由于其广泛的应用和国内外巨大的需求, L-色氨酸已成为备受关注的研究和产业发展方向。尽管非理性诱变育种策略是一种开发工业菌株的有效手段, 但是如何筛选具有理想表型的菌株依然是一个重大挑战。为了提高筛选 L-色氨酸高产菌株的效率与准确性, 本研究通过常压室温等离子体诱变构建随机突变文库, 并结合深孔板高通量筛选, 基于能够特异性响应 L-色氨酸的拟荧光蛋白传感器从随机突变文库中成功筛选出一株 L-色氨酸高产菌株, 其产量在摇瓶中达到 1.99 g/L, 较出发菌株提高了 41.77%。还通过基因组与转录组的比较组学分析, 进一步对菌株的高产机理进行了解析。本研究基于常压室温等离子体诱变和高通量筛选策略, 成功筛选出 L-色氨酸高产菌株, 为后续进一步选育和开发相关优质的 L-色氨酸生产菌株资源提供了坚实的研究基础。

**关键词:** 拟荧光蛋白传感器; 常压室温等离子体诱变; 高通量筛选; L-色氨酸

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2102101, 2021YFC2102102)

This work was supported by the National Key Research and Development Program (2021YFC2102101, 2021YFC2102102).

\*Corresponding authors. E-mail: JI Yizhi, jiyizhi@buaa.edu.cn; LI Lu, luli1008@mail.tsinghua.edu.cn

Received: 2024-03-01; Accepted: 2024-04-24; Published online: 2024-04-25

# Breeding of L-tryptophan high-yield strain by ARTP mutagenesis and high-throughput screening

YE Huimin<sup>1</sup>, DU Jun<sup>2</sup>, TANG Yujing<sup>3</sup>, YUAN Xin<sup>1</sup>, ZHANG Zheng<sup>1</sup>, LI Lu<sup>3\*</sup>, JI Yizhi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Beijing Key Laboratory of Biomass Waste Resource Utilization, College of Biochemical Engineering, Beijing Union University, Beijing 100023, China

<sup>2</sup> Research Institute, Beijing Tsingke Biotech Co., Ltd., Beijing 100000, China

<sup>3</sup> Key Laboratory for Industrial Biocatalysis, Ministry of Education, Department of Chemical Engineering, Center for Synthetic & Systems Biology, Institute of Biochemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China

**Abstract:** L-tryptophan is an indispensable essential amino acid with a wide range of applications, which leads to a high demand. Accordingly, the production of L-tryptophan becomes a much-anticipated direction in research and industrial development. While irrational mutagenesis is an effective means to breed industrial strains, how to screen the strains with desirable phenotypes is still a major challenge. In order to improve the efficiency and accuracy of screening L-tryptophan high-yield strains, we used atmospheric and room temperature plasma mutagenesis to construct a random mutant library and then combined it with high-throughput screening in deep-well plates. Using a pseudo-fluorescent protein sensor capable of responding specifically to L-tryptophan, we successfully screened out a strain producing L-tryptophan at a high yield from a random mutagenesis library. The fermentation with the strain in shake flasks produced L-tryptophan at a yield of 1.99 g/L, which was 41.77% higher than that of the starting strain. Finally, the mechanism of high yield of the strain was deciphered by comparative genomics and transcriptomics. The above strategies provide a solid research foundation for further selection and development of high quality L-tryptophan producing strains.

**Keywords:** pseudo-fluorescent protein sensor; atmospheric and room temperature plasma; high-throughput screening; L-tryptophan

色氨酸(tryptophan, Trp)又称 $\beta$ -吲哚基丙氨酸,是一种中性芳香族氨基酸,具有3种旋光异构体,分别为L-型(左旋)、D-型(右旋)、DL-型(消旋)。L-色氨酸是人体和动物的8种必需氨基酸之一,被称为第二必需氨基酸,广泛应用于食品、饲料添加剂、医药与营养保健品等。近年来随着国内外对色氨酸产品的重视程度不断加深,截至目前L-色氨酸的市场需求已经超过了28 000 t/年<sup>[1-2]</sup>。由于其巨大的商业需求,许多研究人员一直以来致力于探索模式菌株大肠杆菌生产L-色氨酸的机制。随着分子生物学、基

因工程、代谢工程技术的引入,已有许多策略用于构建L-色氨酸生产菌株,以期通过调控微生物的代谢通路、基因表达以及代谢产物的运输过程,来实现目标产物的高效生产,并且使其能够适应工业生产环境,满足工业生产需求<sup>[3-5]</sup>。传统的“试错式”代谢工程策略主要依靠多轮的“设计-构建-测试”(design-build-test, DBT)循环<sup>[6]</sup>,基于已有的先验知识,通过理性/半理性策略设计和构建具有特定功能的工程化菌株,但是目前测试的通量仍旧受到制约,极大限制了DBT循环的通量,导致周期长和成本高等问题;其

次, 由于微生物代谢网络的复杂性, 很难准确地预测和分析其中的变化, 难以提高微生物基因型与特定表型的研究效率。随着各种组学和生物信息学技术的快速发展, 研究人员越来越注重表型驱动的代谢工程改造策略, 这种表型驱动的改造策略能够更直接地揭示基因型和表型之间的关系, 提供更准确和全面的信息来指导代谢工程改造的设计和优化, 以提高菌株的生产性能<sup>[7]</sup>。

非理性诱变育种是目前微生物育种研究和产业应用的一种常用策略。物理诱变一般包括紫外诱变、激光电离及微波等, 而常压室温等离子体(atmospheric and room temperature plasma, ARTP)诱变技术是近年来应用较多的物理诱变方法, 其作用是根据大气压力射频辉光放电原理, ARTP 产生由氮原子、氧原子、氮原子和氧化氢自由基组成的等离子体射流, 等离子体形成过程中释放的高能量瞬时作用于微生物, 引起微生物细胞的结构改变, 导致遗传变异和突变<sup>[8-9]</sup>。与传统的物理诱变与化学诱变方法相比, ARTP 诱变技术能够在处理过程中保持较低的温度, 并且拥有突变库容高、突变率高等优势, 也不需要使用有毒有害的化学剂<sup>[10-12]</sup>。ARTP 诱变技术已成功应用于细菌、真菌、微藻等 40 多种微生物的突变育种研究<sup>[13]</sup>。尽管非理性诱变技术具有操作简便、适用范围广等优势, 但是如何简便快速地在庞大的突变库中筛选出具有优良表型的目标菌株仍是一个重大挑战。

生物传感器的出现能够将细胞代谢物浓度转化为特定的输出信号, 是在突变文库中进行高通量筛选的一大有力工具。相比于传统的分析方法, 如高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)、气相色谱(gas chromatography, GC)、液相色谱-质谱联用(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)等,

生物传感器具有出色的可重复性、稳定性和高通量分析能力, 适用于大量样品的快速分析, 大大提高了检测速度和效率, 节约了时间与成本。目前较为常用的是基于转录因子或核糖体开关的代谢物传感器, 其原理为生物识别元件响应特定代谢物造成结构变化, 随后调控下游基因的表达, 信号输出元件将其转化为目标输出信号<sup>[14-15]</sup>。而拟荧光蛋白传感器是一种融合了传感单元和报告单元的杂合蛋白, 其中传感单元能够与目标小分子结合并发生构象变化, 进而引起荧光蛋白结构的改变, 最终导致荧光输出的变化<sup>[16]</sup>。与基于转录因子或核糖体开关的生物传感器相比较, 拟荧光蛋白传感器具有以下突出优势:(1) 能够实现对目标分子的实时监测, 捕获生物系统动态变化的信息, 有利于动态过程的研究和分析;(2) 拟荧光蛋白传感器在胞内、胞外均可使用, 具有出色的适应性和灵活性, 和较高的准确性、直观性, 且具有可视化的特点。

本文使用基于荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)的拟荧光蛋白传感器, 将阻遏蛋白 TrpR 作为感受元件, 增强的青色荧光蛋白(enhanced cyan fluorescent protein, eCFP)作为 FRET 的供体, 黄色荧光蛋白变体(a yellow fluorescent protein variant, Venus)作为 FRET 的受体。L-色氨酸与 TrpR 结合会改变 TrpR 二聚体中每个阻遏多肽的 N 和 C 末端相对于彼此的距离和方向, 从而改变荧光团对的 FRET 比率。当 eCFP 被激发时, 能量以非辐射方式传输到 Venus 并由其发射, 通过检测 FRET 信号的强度或比率来确定 L-色氨酸的浓度<sup>[17]</sup>。拟荧光蛋白传感器能够实时测量胞质 L-色氨酸的稳态水平和通量, 且在胞外环境中使用也具有出色的能力, 有研究报道, 对于外泌型产物, 在胞外对产物直接测量以鉴定产量相关靶基因的

准确度远高于胞内测量<sup>[18]</sup>。

因此本研究使用 ARTP 诱变技术构建随机突变文库,随后在深孔板中培养细菌,通过测量拟荧光蛋白传感器的荧光强度来确定胞外 L-色氨酸浓度,从而筛选出改良的 L-色氨酸生产菌株。通过该方法,本研究筛选出了一株高 L-色氨酸生产菌株,通过基因组和转录组的比较组学分析对有助于提高菌株产量的突变位点进行了鉴定,并阐明了其机制,为后续进一步选育和开发相关优质的 L-色氨酸生产菌株资源提供坚实的研究基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 仪器设备

生化培养箱:上海一恒科技有限公司;恒温培养振荡器:上海智城分析仪器制造有限公司;超净工作台:苏州净化设备有限公司;电子天平:北京赛多利斯仪器系统有限公司;电子天平:奥豪斯仪器(上海)有限公司;恒温磁力搅拌器:江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司;紫外可见分光光度计:耶拿分析仪器(北京)有限公司;电热恒温鼓风干燥箱:上海一恒科技有限公司、上海益恒实验仪器有限公司;循环水式多用真空泵:郑州长城科工贸有限公司;多功能台式离心机:德国艾本德股份公司;高效液相色谱仪:安捷伦科技股份有限公司;立式压力蒸汽灭菌锅:南京庚辰科学仪器有限公司;双开门冰箱:青岛海尔生物医疗股份有限公司;ARTP 诱变育种仪:洛阳华清天木生物科技有限公司;雪花制冰机:上海知信实验仪器技术有限公司;多功能酶标仪:赛默飞世尔科技公司;超低温保存箱:上海需振仪器设备有限公司。

#### 1.1.2 试剂

酵母粉、蛋白胨、氯化钠、琼脂粉、葡萄

糖、七水硫酸镁、磷酸二氢钾、硫酸铵、柠檬酸二氢钠、七水硫酸亚铁、VB<sub>1</sub>、磷酸氢二钾、氯化钠、HEPEs、十二水磷酸氢二钠、氯化铵、氯化钙、氢氧化钾、磷酸,以上试剂均为国产分析纯;甲醇为色谱纯。

#### 1.1.3 培养基

保藏培养基(g/L):酵母粉 5.0、蛋白胨 10.0、氯化钠 10.0、琼脂粉 20.0, pH 7.0, 于 121 °C 湿热灭菌 20 min。

M9 培养基(g/L):葡萄糖 10.0、十二水磷酸氢二钠 17.1、磷酸二氢钾 3.0、氯化钠 0.5、氯化铵 1.0、七水硫酸镁 0.246、氯化钙 0.011, 于 121 °C 湿热灭菌 20 min。

种子培养基<sup>[19]</sup>(g/L):葡萄糖 30.0、七水硫酸镁 0.5、磷酸二氢钾 1.5、硫酸铵 10.0、酵母粉 15.0、柠檬酸二氢钠 0.5、七水硫酸亚铁 0.015、VB<sub>1</sub> 0.1, pH 7.0, 于 121 °C 湿热灭菌 20 min。

FM II 培养基<sup>[19]</sup>(g/L):葡萄糖 30.0、七水硫酸镁 0.5、磷酸二氢钾 3.0、磷酸氢二钾 12.0、硫酸铵 4.0、酵母粉 1.0、柠檬酸二氢钠 2.0、七水硫酸亚铁 0.1, pH 7.4, 于 121 °C 湿热灭菌 20 min。

### 1.2 培养方法

#### 1.2.1 菌种活化

本研究所使用的大肠杆菌(*Escherichia coli*) S028 菌株<sup>[19]</sup>经过正式协议授权,并按照标准操作规程进行培养和保藏。从甘油管中取菌在平板划线, 37 °C 过夜培养。挑取单克隆转接至 5 mL (15 mL 离心管) LB 培养基, 37 °C、220 r/min 过夜培养。

#### 1.2.2 种子液培养

种子液接入种子培养基中,使得培养基的初始 OD<sub>600</sub> 达到 0.2, 发酵装液量为 5 mL (50 mL 离心管), 37 °C、220 r/min 培养 5-7 h。

#### 1.2.3 FM II 发酵培养

种子液接入装有 FM II 培养基中,使得培养

基的初始  $OD_{600}$  达到 0.1, 摇瓶发酵装液量为 5 mL (50 mL 三角瓶), 37 °C、220 r/min 培养 24 h。

### 1.3 分析测定方法

#### 1.3.1 菌体浓度 $OD_{600}$ 的测定

将发酵液适当稀释, 分别于紫外可见分光光度计和酶标仪上测 600 nm 处的吸光值 ( $OD_{600}$ ), 读数并记录数值。

#### 1.3.2 拟荧光蛋白传感器的荧光强度测定

使用酶标仪进行测定, 将装有培养了 24 h 的发酵液的发酵板置于离心机中, 离心 10 min, 取上清液使用 HEPES 缓冲液(100 mmol/L HEPES, 100 mmol/L NaCl, pH 7.4)适当稀释后, 加入拟荧光蛋白传感器, 在酶标仪中使用 433 nm 波长激发 eCFP, 分别记录 485 nm 和 528 nm 处的 eCFP 和 Venus 发射量, 通过测量 FRET 比值, 利用 FRET 信号变化的线性部分确定 L-Trp 的浓度<sup>[17]</sup>。

#### 1.3.3 发酵液中色氨酸的产量测定

取 1 mL 发酵液于 1.5 mL 离心管中, 12 000 r/min 离心 10 min 取上清液, 适当稀释后使用高效液相色谱法进行测量 L-色氨酸产量。

高效液相色谱法的流动相 A 为 0.05% 的磷酸溶液, 流动相 B 为色谱纯甲醇。进样量 10  $\mu$ L, 柱温 40 °C, 测量波长 280 nm, 洗脱方法见表 1。

#### 1.3.4 比较组学分析

FASTQ 格式的原始数据(原始读取)首先采用软件 FastQC (v0.10.1)对测序数据质量评估进行分析, 采用软件 Cutadapt (version 1.9.1)对低

质量数据进行过滤, 去除污染及接头序列。将过滤后的高质量测序序列与参考基因组 *E. coli* S028 进行比对分析。基于比对结果, 基因组数据分析使用 Samtools (version 1.1)软件以及 GATK 的 Unified Genotyper 模块进行单核苷酸位点变异(single nucleotide variants, SNV)/插入或缺失突变(insertion and deletion, InDel)的检测, 对参考基因组每个位点进行检测, 检测位点是否存在 SNV 或者 InDel 突变, 并将检测结果保存于变体调用格式文件(variant call format, VCF)中。

基于比对结果, 转录组数据分析使用 Htseq 软件(v0.6.1)计算每个基因的表达水平, 并使用 DESeq2 软件分析实验组与对照组的差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs), 差异基因筛选条件为差异基因表达变化 2 倍以上且  $q$  value ( $fdr, padj$ ) $\leq 0.05$ 。为了进一步了解差异表达基因的功能, 进行了基因本体(gene ontology, GO)功能注释和 KEGG 通路富集分析。

### 1.4 实验方法

#### 1.4.1 ARTP 诱变

菌悬液制备: 挑取单菌落转接至 5 mL LB 培养基中, 37 °C、220 r/min 条件下过夜培养。取 50  $\mu$ L 菌液转接至 5 mL 新鲜 LB 培养基中, 37 °C、220 r/min 培养 3 h 至菌体对数生长期, 以备诱变使用。

ARTP 诱变: 提前将载片进行高压蒸汽灭菌并烘干冷却, 取 20  $\mu$ L 对数期菌悬液均匀涂在 ARTP 专用载片上。打开仪器开关、冷凝水开关和氦气阀门, 并开启紫外灯, 照射 30 min。ARTP 诱变条件设置为: 工作功率 120 W, 气源为 He, 气流量 10 L/min, 照射时间为 0、60、80、100、120、140、160 s。处理后, 将所有样品置于含有 400  $\mu$ L LB 的 2 mL EP 管中。完成诱变后, 关闭阀门, 并将残余氦气排放干净,

表 1 高效液相色谱洗脱方法

Table 1 High performance liquid chromatography elution method

Phase	Time (min)	The concentration of mobile phase B
1	0-3	2%
2	3-30	2%-80%
3	30-40	80%
4	40-50	80%-2%
5	50-60	2%

依次关闭仪器开关、冷凝水。将所有样品振荡洗脱,并稀释至适当浓度,吸取 100  $\mu\text{L}$  涂布在 LB 固体培养基上,于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温过夜培养,以确定致死率,诱变处理时间选择致死率达到 99% 以上的处理时间。按公式(1)计算致死率:

$$\text{致死率(\%)} = \frac{\text{对数组菌落数} - \text{诱变组菌落数}}{\text{对数组菌落数}} \times 100 \quad (1)$$

#### 1.4.2 高通量深孔板初筛

将经过 ARTP 诱变处理的出发菌悬液进行适当稀释,分别涂布到平板上,于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温过夜培养。将平板上长好的单菌落使用无菌牙签挑至 96 深孔板(种子板)中培养(每孔装有 1 mL LB 液体培养基),转移到培养孔中轻轻晃动几次,弃掉牙签,依次反复直至挑选结束,在每个深孔板的 A1、A7 孔位设置阳性对照,盖上三明治盖板后并固定在具有偏心轮锁紧结构的摇床上,37  $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 过夜培养,每个板可以培养 96 个菌落。

使用 8 通道移液器取 50  $\mu\text{L}$  活化好的种子液转移至对应的 48 深孔板(发酵板)中培养(每孔装有 1 mL M9 培养基),37  $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养 24 h,同时种子板存于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱待用;将培养好的发酵板置于离心机中,离心 10 min,取上清液使用 HEPES 缓冲液适当稀释后,加入拟荧光蛋白传感器,使用酶标仪测定发酵稀释液中传感器的荧光强度,读数并记录数值。每个发酵板挑选 L-Trp 产量 Top 6 菌株用于深孔板复筛。

#### 1.4.3 高通量深孔板复筛

从 96 深孔板(种子板)中挑选阳性对照出发菌株以及产量最高的 23 株菌株,使用移液器取 50  $\mu\text{L}$  的种子液转移至对应的 24 深孔板(种子板)中培养(每孔装有 2 mL LB 液体培养基),37  $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 过夜培养,同时种子板存于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱待用。

使用 96 孔透明酶标板,取 10  $\mu\text{L}$  培养好的种子液,再加入 90  $\mu\text{L}$  纯水将其稀释 10 倍,再使用酶标仪测量  $OD_{600}$  值,读数并记录数值。任意从 24 深孔板中均匀选取 5 个孔,取 200  $\mu\text{L}$  培养好的种子液,再加入 1 800  $\mu\text{L}$  纯水将其稀释 10 倍,使用紫外可见分光光度计测量  $OD_{600}$  值,读数并记录数值。通过数据处理,计算出接种量,使得培养基的初始  $OD_{600}$  达到 0.4。

按照对应的接种量,使用移液器取培养好的种子液转移至对应的 48 深孔板(发酵板)中培养(每孔装有 1 mL M9 培养基),每个菌株设置 2 个平行对照,37  $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养 24 h,同时种子板存于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱待用;将培养好的发酵板置于离心机中,离心 10 min,取上清液使用 HEPES 缓冲液适当稀释后,加入拟荧光蛋白传感器,使用酶标仪测定发酵稀释液中传感器的荧光强度,读数并记录数值。发酵板挑选 L-Trp 产量 Top 3 菌株用于摇瓶复筛。从种子板中选取 L-Trp 的 Top 3 菌株进行活化,平板划线并保藏菌株,存于冰箱待用。

#### 1.4.4 摇瓶复筛

将活化好的种子液接入种子培养基中,使得培养基的初始  $OD_{600}$  达到 0.2,离心管装液量为 5 mL (50 mL 离心管),37  $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养 5-7 h。种子液接入装有 FM II 培养基中,使得培养基的初始  $OD_{600}$  达到 0.1,摇瓶发酵装液量为 5 mL (50 mL 三角瓶),37  $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养 24 h。取 1 mL 发酵液于 1.5 mL 离心管中,12 000 r/min 离心 10 min 取上清液,使用高效液相色谱法进行 L-Trp 产量测定。挑选 L-Trp 产量 Top 1 菌株用于下一轮的 ARTP 诱变与深孔板高通量筛选。

#### 1.4.5 遗传稳定性试验

将初筛和复筛相结合获得的高产突变株进行连续 5 代培养,每次传代进行摇瓶发酵验证

菌株生长能力及 L-Trp 产量, 均设置 3 个平行实验, 以验证突变株的遗传稳定性。

#### 1.4.6 过表达菌株的构建及验证

本研究所使用的菌株和质粒见表 2。使用引物设计软件 SnapGene 根据目标序列设计引物, 见表 3。引物合成后, 采用 PCR 扩增对应的目的基因(以 *E. coli* S028 为模板)及载体, 通过琼脂糖凝胶电泳实验结果确定各基因片段大小是否与理论值一致。若一致, 分别将 PCR 片段经胶回收纯化, 使用 Gibson 组装系统将目的片段与载体片段进行组装后即时转化至 Trelief<sup>®</sup>5 $\alpha$  感受态细胞, 涂布在含有相应抗生素的 LB 固体平板上, 37 °C 过夜培养。挑取单克隆菌株至含有相应抗生素的 LB 液体培养基中, 37 °C、220 r/min 过夜培养。提取质粒 DNA 送测序, 对重组质粒进行鉴定验证。若重组质粒经序列测序后与设计一致, 表明目的基因片段与载体片段已被正确连接, 即单基因过表达菌株构建

成功。然后将重组质粒通过化学转化, 转入底盘菌株 *E. coli* S028 感受态细胞中, 在含有相应抗生素的 LB 平板上获得单克隆, 进行摇瓶发酵验证。

## 2 结果与分析

### 2.1 ARTP 致死率曲线

ARTP 处理的致死率和诱变剂量关联性比较好, 随着诱变时间的增加, 致死率也随之上升。为了获得最佳的诱变条件, 按照 1.4.1 中的方法对出发菌进行诱变处理并计算致死率, 结果如图 1 所示, 当辐射时间为 60、80、100、120、140、160 s 时, 致死率分别达到 83.19%、93.47%、98.69%、99.18%、99.79% 和 100.00%。考虑到致死率曲线的变化规律和选育需求, 在诱变后期试验中选择诱变处理时间为 120 s, 以达到 99.00% 左右的致死率, 同时确保获得足够数量的突变株。

表 2 菌株和质粒

Table 2 Strains and plasmids

Strains and plasmids	Description	Sources
<i>E. coli</i> S028	Starting strain	[19]
<i>E. coli</i> C5	<i>E. coli</i> S028 derived strain, mutated, L-tryptophan high-yield strain	This research
<i>E. coli</i> Y1	Containing exogenous plasmid pEX- <i>gadB</i>	This research
<i>E. coli</i> Y2	Containing exogenous plasmid pEX- <i>pxpB</i>	This research
pEX	pSC101 ori; Kan <sup>r</sup> ; Tac promoter	Laboratory storage

The superscript “r” indicates resistance.

表 3 引物及序列

Table 3 Primers and sequences

Enzyme coding genes	Primer names	Primer sequences (5'→3')
<i>gadB</i>	<i>gadB</i> -F	TAAAGAGGAGAAAGGTACCATGGATAAGAAGCAAGTAAC
	<i>gadB</i> -R	TCGAGGGGGGGCCCGGTACCTCAGGTATGTTTAAAGCTGT
<i>pxpB</i>	<i>pxpB</i> -F	TAAAGAGGAGAAAGGTACCGTGCAACGAGCGCGTTGTTAT
	<i>pxpB</i> -R	TCGAGGGGGGGCCCGGTACCTCAGCATACTCCCTCCTTCT
Z	Z-F	GGTACCGGGCCCCCCTCGAG
	Z-R	GGTACCTTTCTCCTCTTTAATGAATTCTGTGT

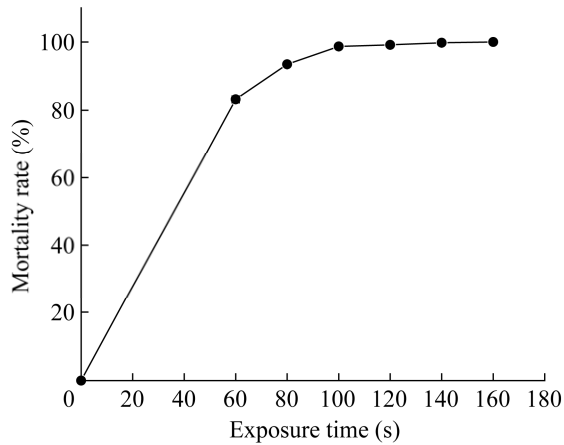


图1 不同 ARTP 诱变处理时间下色氨酸菌株的致死率曲线

Figure 1 The mortality rate of tryptophan strains under different ARTP mutagenesis exposure time.

## 2.2 深孔板高通量筛选

将经过 ARTP 辐射处理的菌悬液涂布于 LB 固体培养基平板上, 37 °C 过夜培养。然后采用 1.4.2 和 1.4.3 中的方法对收集到的单克隆菌株进行深孔板高通量筛选。本研究采用的拟荧光蛋白传感器由两部分组成: (1) TrpR 阻遏蛋白

作为目标分子结合域, 以响应 L-Trp 浓度水平; (2) eCFP 与 Venus 荧光团对, 作为生物传感器表征的报告基因。该传感器通过配体 L-Trp 诱导的 TrpR 构象变化, 改变荧光团对 FRET 的比率来实现 L-Trp 的浓度高效检测, 并且展现出较宽的动态范围(约为 15  $\mu\text{mol/L}$ –1 mmol/L), 其响应倍数约为 1.35 倍<sup>[17]</sup>。以出发菌株作为对照, 在初筛过程中共筛选 192 株菌株。经过初筛后, 选择 L-Trp 产量 Top 23 菌株进行深孔板复筛, 结果显示有 6 株突变株的 L-Trp 产量比对照组高了 20% 以上(图 2)。之后选择 L-Trp 产量 Top 3 菌株进行摇瓶复筛, 结果显示, 产量最高的突变株 *E. coli* C3 的 L-Trp 产量达到 1.88 g/L, 因此将其选为下一轮 ARTP 诱变的出发菌株。将其再次经过 ARTP 辐射处理后, 依然在初筛过程中共筛选 192 株菌株, 在复筛过程中, 得到 7 株突变株的 L-Trp 产量比对照组高了 20% 以上(图 3)。接着将 L-Trp 产量 Top 3 菌株进行摇瓶复筛, 结果显示, 经过 24 h 的发酵培养, 突变株 *E. coli* C5 的 L-Trp 产量达到 1.99 g/L。

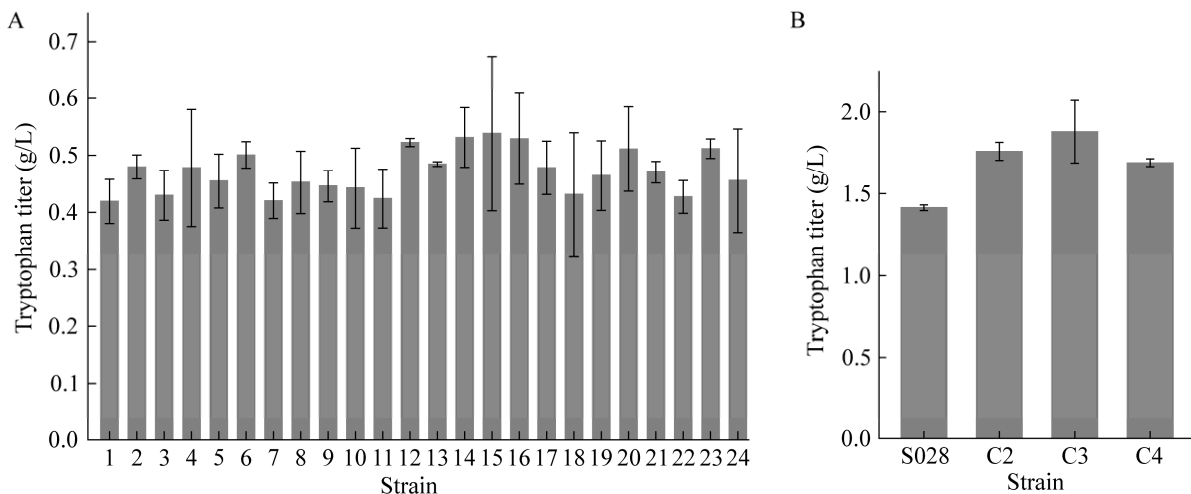


图2 高通量筛选结果 A: 48 深孔板筛选结果. B: 摇瓶复筛结果

Figure 2 High-throughput screening results. A: 48 deep-well plate screening results. B: Shake flask rescreening results.



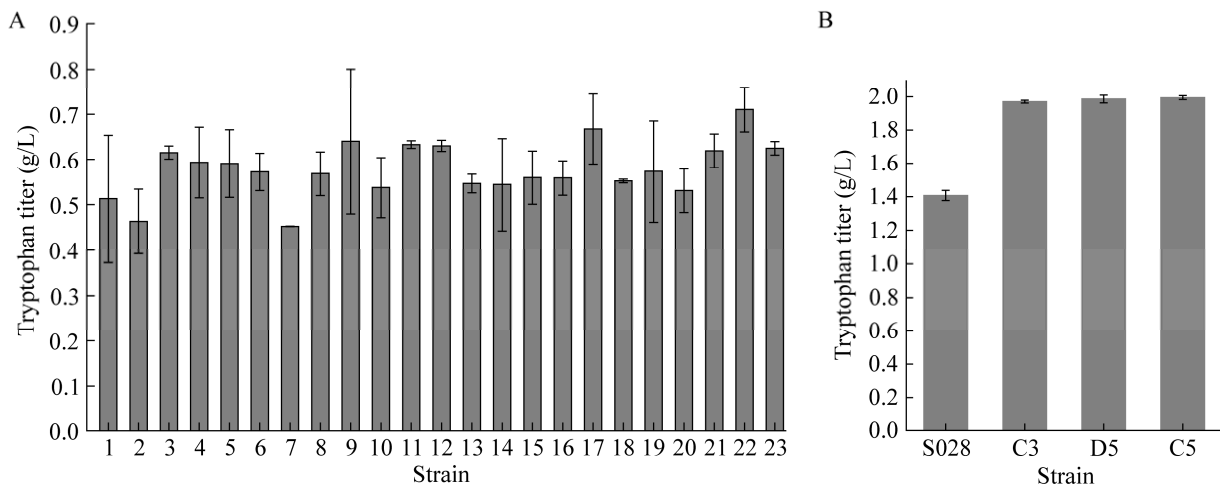


图3 高通量筛选结果 A: 48 深孔板筛选结果. B: 摇瓶复筛结果

Figure 3 High-throughput screening results. A: 48 deep-well plate screening results. B: Shake flask rescreening results.

### 2.3 遗传稳定性试验

将筛选出的突变株连续传代 5 次, 并测定每一代的菌株生长能力和产酸能力, 结果如图 4 所示。*E. coli* C5 经 5 次传代, 每代经 24 h 发酵, 发酵结束时发酵液的  $OD_{600}$  分别为 10.02、10.78、10.52、10.28、10.78、11.39; L-Trp 产量依次为 1.78、1.90、2.12、2.11、2.12、2.07 g/L, 平均值为 2.02 g/L。由此可见, 突变株 *E. coli* C5 在传代过程中菌体生长及 L-Trp 产量均较稳定, 表明其具有良好的遗传稳定性。

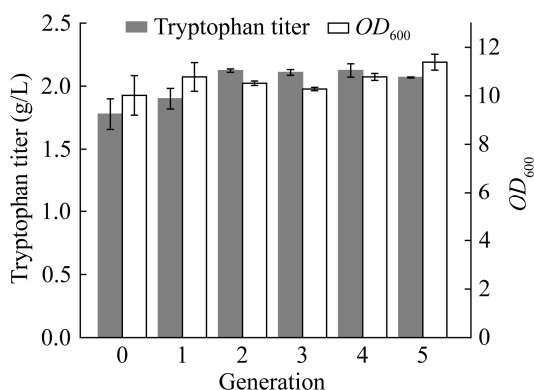


图4 *Escherichia coli* C5 遗传稳定性情况

Figure 4 Genetic stability of *Escherichia coli* C5.

### 2.4 L-色氨酸高产菌株高产机理解析

#### 2.4.1 *Escherichia coli* S028 和 *Escherichia coli* C5 菌株的基因组分析

为了更好地了解菌株 *E. coli* C5 的高产机制, 对 *E. coli* S028 和 *E. coli* C5 的基因组进行分析。在 C5 菌株的同一批次发酵中, 设置 3 次平行实验, 以获得 3 个样本用于测序分析, 以确保数据的可靠性和一致性。以 *E. coli* S028 作为参照, C5 菌株基因组比对上参考基因组的 reads 比例达到 99% 以上, 其具体突变情况见表 4 和表 5。基因组比对分析显示, C5 基因组中共存在 9 个单核苷酸位点变异(SNV)和 13 个插入缺失突变(InDel)。这些突变位于 DNA 结合转录双重调节因子(*ydeO*)、DedA 家族蛋白(*ydjZ*)、假定转运蛋白(*yfcC*)、DNA 结合转录抑制蛋白(*cytR*)基因中。由于多数基因突变位点集中在非

表4 *Escherichia coli* C5 基因突变概况

Table 4 Gene mutation of *Escherichia coli* C5

Samples	SNV	InDel	Total
C5-1	3	5	8
C5-2	3	5	8
C5-3	3	3	6

表5 *Escherichia coli* C5 菌株中 SNV 和 InDel 基因突变概况Table 5 SNV and InDel gene mutations of *Escherichia coli* C5

Gene	Functions	Amino acid change
<i>ydeO</i>	DNA-binding transcriptional dual regulator YdeO	R229K
<i>ydjZ</i>	DedA family protein YdjZ	I17I
<i>yfcC</i>	putative transporter YfcC	G135D
<i>cytR</i>	DNA-binding transcriptional repressor CytR	N177fs, V176fs, A175_V176delinsGISAAAGLX, N177_Y178delinsSAAAGLX

开放阅读框(open reading frame, ORF)区域, 因此需要更多地关注转录组相关信息。

#### 2.4.2 *Escherichia coli* S028 和 *Escherichia coli* C5 之间差异表达基因的 RNA-seq 分析

为了进一步阐明突变株 *E. coli* C5 的高产机制, 我们分析了 *E. coli* S028 和 *E. coli* C5 的转录组, 观察了它们之间的转录变化。转录组分析表明, 突变株 C5 同时导致多个基因表达水平的变化。其中, 在  $P$ -value<0.05 时, 有 169 个基因(63 个上调基因和 106 个下调基因)在突变株 C5 中的表达水平增加了 2 倍以上(图 5)。

获得差异表达基因集后, 通过对该菌株进行 GO、KEGG 数据库进行注释, 以确定基因的功能及具体信息, 结果见图 6 和图 7。GO 功能分析显示, DEGs 富集于 3 个 GO 类别, 共有 30 个功能组, 其中分子功能(molecular function, MF)有 12 个功能亚类, 主要集中在丙酮酸脱氢酶(乙酰转移)活性; 细胞组分(cellular component, CC)有 3 个功能亚类, 主要集中在细胞外膜; 参与的生物过程(biological process, BP)有 15 个功能亚类, 主要集中在细胞对酸性 pH 的应激反应、对有毒物质的应答、糖酵解过程、翻译调控、核糖体生物发生、从丙酮酸生成乙酰辅酶 A 等。以上结果表明多种途径共同参与突变株 C5 生产 L-Trp 的生物学过程。在生物体内, 不同基因相互协调行使其生物学功能, 通过 pathway 显著性富集能确定差异表达基因参与的最主要生化代谢途径和信号转导途径。KEGG 富集结果显示,

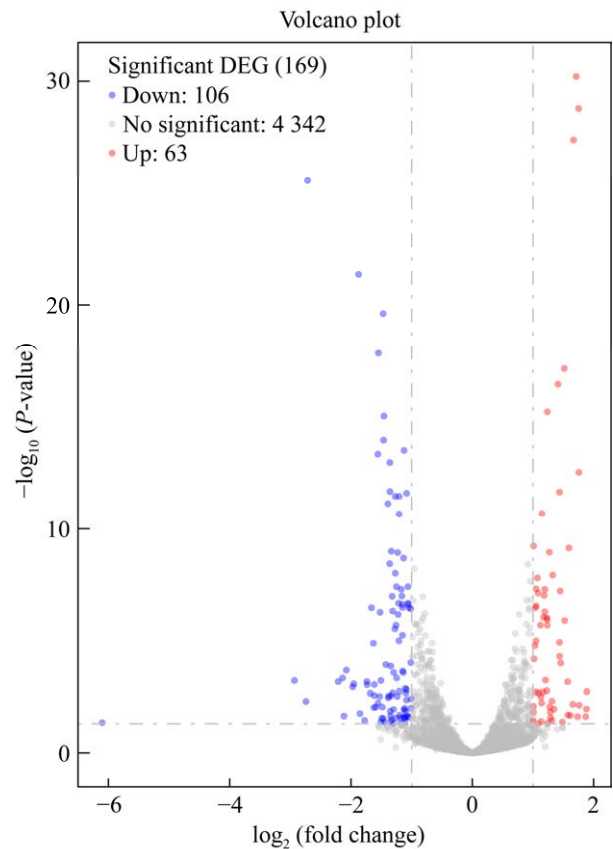


图5 差异基因火山图 显著差异基因红色点表示上调, 蓝色点表示下调; 横坐标代表基因在不同样本中表达倍数变化, 纵坐标代表基因表达量变化差异的统计学显著性

Figure 5 Differential gene volcano map. The red dots of the significantly different genes indicate up-regulation, and the blue dots indicate down-regulation. The abscissa represents the change of gene expression multiples in different samples, and the ordinate represents the statistical significance of the difference in gene expression.

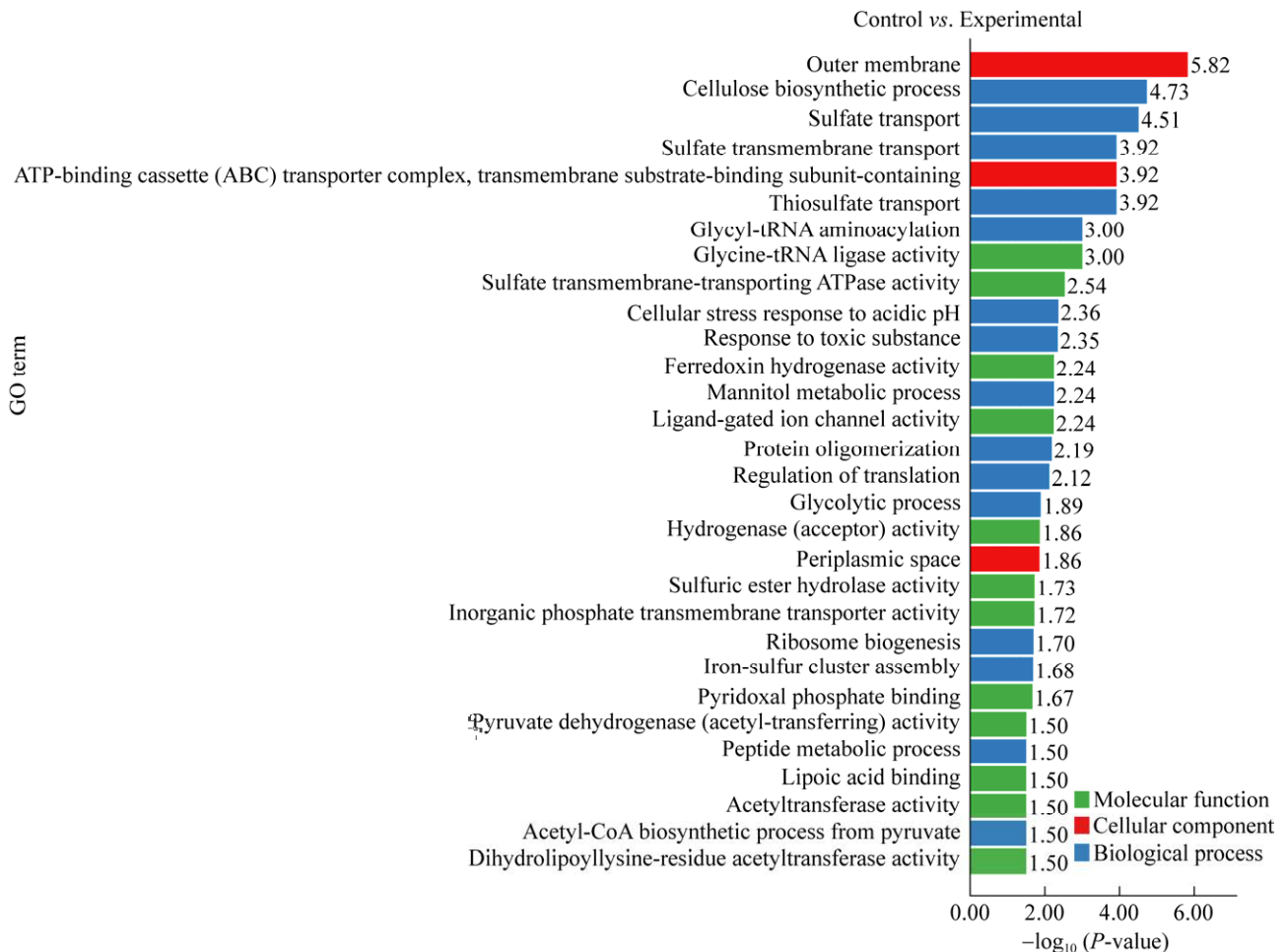


图6 GO 富集  $P$ -value 柱状图 纵坐标为富集的 GO term, 横坐标为该 term 的  $-\log_{10}(P\text{-value})$  值. 值越大, 富集越显著

Figure 6 GO enrichment  $P$ -value histogram. The ordinate is the enriched GO term, and the abscissa is the term  $-\log_{10}(P\text{-value})$  value. The larger the value, the more significant the enrichment.

差异表达基因富集到核糖体、色氨酸代谢途径、丙酮酸代谢途径、氮代谢、柠檬酸循环(TCA 循环)以及与生长和适应环境相关的代谢途径, 如细胞周期、生物膜形成等。信号通路富集表明, 突变株 C5 中的差异表达基因对生产 L-Trp 的影响是由许多通路共同参与的。

进一步分析参与 L-Trp 代谢途径的相关基因, 相比于对照组, 与 KEGG 富集途径相关的部分变化基因如表 6 所示, *gadB*、*pxpB*、*rbfA*、*ompA*、*gltT* 基因转录水平均显著上调。有研究

表明, 在大肠杆菌中存在 GadA (由 *gadA* 基因编码)和 GadB (由 *gadB* 基因编码)两种亚型的谷氨酸脱羧酶, 这两种酶与 *gadC* 编码的 Glu/GABA 反转运体 GadC 共同组成大肠杆菌的耐酸系统, 这一系统有助于维持细胞内外环境的酸碱平衡, 对于细菌在酸性环境中的生存具有重要意义<sup>[20]</sup>。5-氧代脯氨酸被认为是一种对细胞具有毒性的物质, 高浓度的 5-氧代脯氨酸可能引起细胞凋亡或其他不良生理效应。*pxpB* 基因编码 5-氧代脯氨酸酶的一部分, *pxpB* 基因可能参与

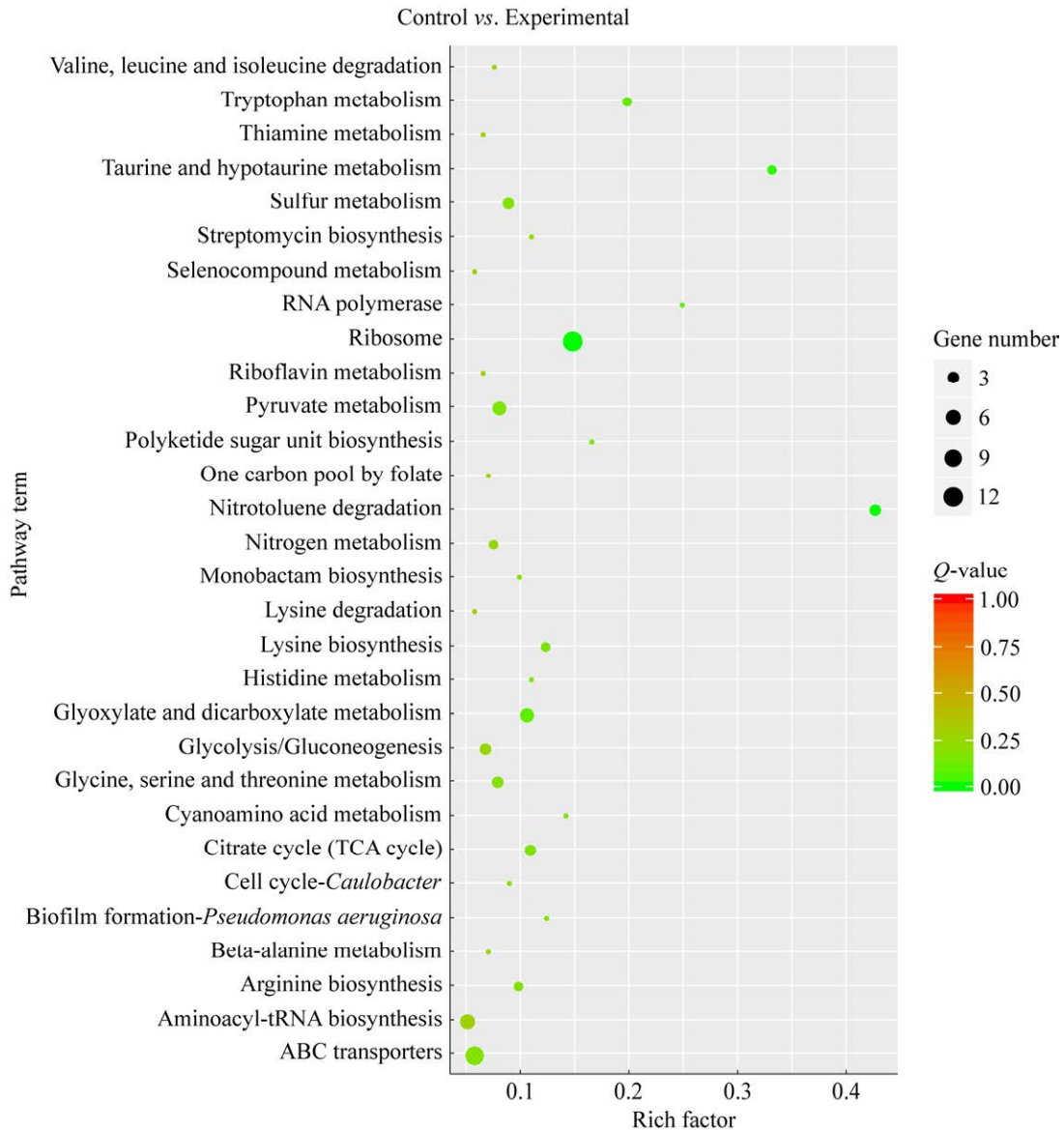


图 7 差异基因 KEGG 富集散点图 纵轴表示 pathway 名称, 横轴表示 rich factor, 点的大小表示此 pathway 中差异表达基因个数多少, 而点的颜色对应于不同的  $Q$ -value 范围

Figure 7 Differential gene KEGG enrichment scatter plot. The vertical axis represents the pathway name, the horizontal axis represents the rich factor, the size of the point represents the number of differentially expressed genes in this pathway, and the color of the point corresponds to different  $Q$ -value ranges.

调控 5-氧代脯氨酸的降解过程, 利用细胞自我保护机制来维持细胞内稳态并支持正常的细胞生长和功能<sup>[21]</sup>。核糖体的生物发生是所有生物体中最基本的过程之一, 核糖体是一个大分子 RNA-蛋白质复合物, 其组装是一个复杂的过

程, 包括 rRNA、30S、50S 蛋白的合成、修饰以及正确地折叠和结合。核糖体的组装和激活由一些特殊因子调控, 例如, *rbfA* 基因编码的核糖体结合因子是 30S 核糖体小亚基成熟的必需因子, 参与其组装和稳定<sup>[22]</sup>。细菌的外膜在

细菌的生长和环境适应中具有重要意义,外膜作为细菌的保护屏障,能够有效阻挡有害物质的侵入,维护细胞结构完整性;同时,外膜还能调节细胞内外渗透压平衡,促进与宿主或其他微生物的相互作用,并根据环境变化调整其结构和组成,帮助细菌适应不同生长条件及环境压力,从而维持细菌的生存和繁殖<sup>[23-24]</sup>。有研究表明,*ompA* 基因编码一种在细菌外膜中广泛存在的 OmpA 蛋白,其富含  $\beta$ -折叠结构,这种结构特征使得 OmpA 蛋白能够与外膜磷脂分子相互作用,促使外膜的稳定性增加,并且在一定程度上增加外膜的厚度,OmpA 蛋白的存在为细菌提供了额外的保护屏障,有助于细菌在多样的环境中生存和繁殖<sup>[25]</sup>。tRNA 在蛋白质合成过程中承担着将氨基酸运送到核糖体以组装蛋白质的重要功能。tRNA-Glu 是一种特定的转运 RNA,转运蛋白的调控对相应氨基酸衍生物的合成也至关重要<sup>[26]</sup>。这些因素将直接或间接地影响微生物对底物的利用效率和产物合成能力。因此可以通过合理的代谢工程,改变 L-Trp 的代谢通量,进一步提高 *E. coli* S028 合成 L-Trp 的能力。

## 2.5 L-Trp 代谢途径中关键基因的过表达

根据转录组分析结果,为了验证差异表达基因对菌株生产 L-Trp 的影响,选择差异表达

表 6 *Escherichia coli* C5 转录组结果中差异表达上调最显著的基因突变概况

Table 6 Gene mutations with the most significant up-regulation of differential expression in the transcriptome results of *Escherichia coli* C5

Genes	Products
<i>gadB</i>	Glutamate decarboxylase B
<i>pxpB</i>	5-oxoprolinase component B
<i>rbfA</i>	30S ribosome binding factor
<i>ompA</i>	Outer membrane protein A
<i>gltT</i>	tRNA-Glu

上调最显著的 *gadB* 和 *pxpB* 基因进行过表达。按照 1.4.6 中的方法,获得过表达 *gadB* 菌株,命名为 *E. coli* Y1;过表达 *pxpB* 基因的菌株,命名为 *E. coli* Y2。进行摇瓶发酵验证,结果如图 8 所示。*E. coli* Y1 菌株 L-Trp 产量达到 1.85 g/L,*E. coli* Y2 菌株 L-Trp 产量达到 1.83 g/L,与出发菌株相比,进行单基因过表达后的菌株 L-Trp 的产量分别提高了 32%和 31%,并且从图 8 中可以看出,经过 24 h 发酵后,*E. coli* S028、*E. coli* Y1、*E. coli* Y2 菌株的终发酵液  $OD_{600}$  分别为 11.68、11.63、11.4,单基因过表达菌株的菌体浓度并没有受到太大影响。有研究表明,*gadB* 基因编码一种酸性物质抗性相关蛋白,其主要功能是参与细菌的酸耐受性系统,通过将外部环境中的酸性物质转化成内源性的酸中和剂,从而帮助细菌维持细胞内 pH 的稳定。通过调节酸碱平衡,并帮助细菌适应酸性环境,这对于细菌在特定的生境中生存和繁殖具有重要的意义;此外,*gadB* 基因也参与产生和调节其他与酸耐受性相关的蛋白和基因表达的过程<sup>[27]</sup>。*pxpB* 基因可能参与调控 5-氧代脯氨酸的降解,帮助

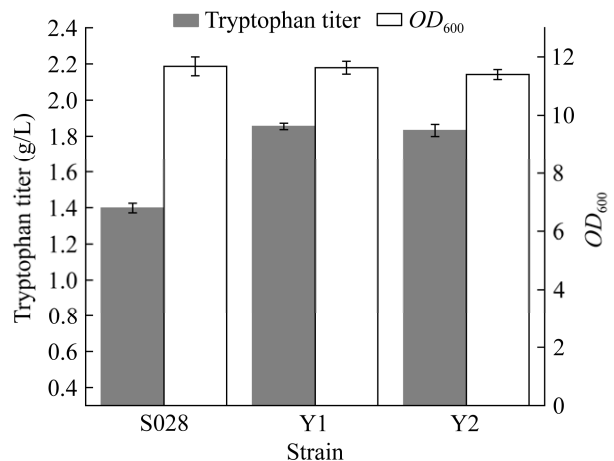


图 8 单基因过表达菌株的摇瓶发酵结果

Figure 8 Shake flask fermentation results of single gene overexpression strains.

细胞维持内稳态,保护自身免受毒性影响,促进正常生长<sup>[21]</sup>。因此,推测在 L-Trp 发酵生产过程中,尤其是处于发酵中后期阶段,当底物浓度不断减少,目标产物逐渐累积,整个发酵环境处于酸性环境, *gadB* 基因通过维持细菌体内 pH 的稳定让细菌能够适应发酵环境,而 *pxpB* 基因在发酵过程中参与有毒副产物的降解,从而维持细菌的正常生长,使得菌株在进入稳定期时依然能够保持良好状态,进而导致高产 L-Trp。

### 3 讨论与结论

L-色氨酸是一种重要的芳香族代谢物,它是许多高价值工业和医药化合物的关键原料。长期以来,微生物被用作细胞工厂以将简单的底物转化为复杂的分子,为有效地从可再生资源中合成可持续的天然产物作出了巨大贡献。目前基于已有的先验知识,通过理性/半理性策略设计和构建具有特定功能的工程化菌株已取得了一系列进展。然而由于 L-色氨酸合成代谢网络的高度复杂性与多样性,要获得具有理想表型的菌株仍然是一个具有挑战性的任务。

本研究以 *E. coli* S028 为出发菌株进行迭代诱变,构建随机突变文库,基于拟荧光蛋白传感器进行深孔板筛选,进一步通过摇瓶复筛获得一株 L-色氨酸高产菌株 *E. coli* C5,结果显示, *E. coli* C5 的 L-色氨酸产量在摇瓶中达到 1.99 g/L,较出发菌株提高了 41.77%,且具有较好的遗传稳定性。结合比较组学分析,发现 DEGs 大部分涉及氨基酸代谢、次级代谢物产物的生物合成、不同环境中的微生物代谢等途径。最后构建了过表达 *gadB* 基因的菌株 *E. coli* Y1 和过表达 *pxpB* 基因的菌株 *E. coli* Y2,通过摇瓶发酵验证后发现 *E. coli* Y1 和 *E. coli* Y2 的 L-色氨酸产量分别达到 1.85 g/L 和 1.83 g/L,较出发菌株分别提高了 32%和 31%。通过不断深入研究

色氨酸合成代谢网络的机制,我们有望开发出具有特定性状的优良生产菌株,为色氨酸在医药、农业和食品工业等领域的应用提供更多可能性。

### REFERENCES

- [1] 沈冠同,刘亚琦,吉南希,张媛媛,王钦宏. 生物发酵法生产 L-色氨酸的研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(3): 621-643.  
SHEN GT, LIU YQ, JI NX, ZHANG YY, WANG QH. Advances in fermentative production of L-tryptophan: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(3): 621-643 (in Chinese).
- [2] 臧珊珊,林涛,郭兴,李芹,张怀东,刘峰. L-色氨酸的系统代谢网络调控研究进展[J]. 生物技术, 2022, 32(1): 99-106, 84.  
ZANG SS, LIN T, GUO X, LI Q, ZHANG HD, LIU F. Research progress on the regulation of L-tryptophan system metabolic network[J]. Biotechnology, 2022, 32(1): 99-106, 84 (in Chinese).
- [3] TANG M, PAN XW, YANG TJ, YOU JJ, ZHU RS, YANG TW, ZHANG X, XU MJ, RAO ZM. Multidimensional engineering of *Escherichia coli* for efficient synthesis of L-tryptophan[J]. Bioresource Technology, 2023, 386: 129475.
- [4] WANG JL, MA WJ, ZHOU JW, WANG XY. Microbial chassis design and engineering for production of amino acids used in food industry[J]. Systems Microbiology and Biomanufacturing, 2023, 3(1): 28-48.
- [5] LIU S, XU JZ, ZHANG WG. Advances and prospects in metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-tryptophan production[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2022, 38(2): 22.
- [6] ROGERS JK, CHURCH GM. Multiplexed engineering in biology[J]. Trends in Biotechnology, 2016, 34(3): 198-206.
- [7] VALDERRAMA-GÓMEZ MÁ, SAVAGEAU MA. Phenotype-centric modeling for rational metabolic engineering[J]. Metabolic Engineering, 2022, 72: 365-375.
- [8] LIU Y, CHEN X, WEI D, XING XH. Breeding a novel chlorophyll-deficient mutant of *Auxenochlorella pyrenoidosa* for high-quality protein production by atmospheric room temperature plasma mutagenesis[J]. Bioresource Technology, 2023, 390: 129907.

- [9] HUANG YT, WANG LY, ZHANG X, SU N, LI HP, ODA Y, XING XH. Quantitative evaluation of DNA damage caused by atmospheric and room-temperature plasma (ARTP) and other mutagenesis methods using a rapid *umu*-microplate test protocol for microbial mutation breeding[J]. Chinese Journal of Chemical Engineering, 2021, 39: 205-210.
- [10] JIANG AL, HU W, LI WJ, LIU L, TIAN XJ, LIU J, WANG SY, LU D, CHEN JH. Enhanced production of L-lactic acid by *Lactobacillus thermophilus* SRZ50 mutant generated by high-linear energy transfer heavy ion mutagenesis[J]. Engineering in Life Sciences, 2018, 18(9): 626-634.
- [11] BAN SD, LIN WT, LUO ZW, LUO JF. Improving hydrogen production of *Chlamydomonas reinhardtii* by reducing chlorophyll content via atmospheric and room temperature plasma[J]. Bioresource Technology, 2019, 275: 425-429.
- [12] OTTENHEIM C, NAWRATH M, WU JC. Microbial mutagenesis by atmospheric and room-temperature plasma (ARTP): the latest development[J]. Bioresources and Bioprocessing, 2018, 5(1): 12.
- [13] ZHANG Q, MIAO RY, FENG RC, YAN JJ, WANG T, GAN Y, ZHAO J, LIN JB, GAN BC. Application of atmospheric and room-temperature plasma (ARTP) to microbial breeding[J]. Current Issues in Molecular Biology, 2023, 45(8): 6466-6484.
- [14] ZHOU GJ, ZHANG FZ. Applications and tuning strategies for transcription factor-based metabolite biosensors[J]. Biosensors, 2023, 13(4): 428.
- [15] WU YF, ZHU LJ, LI ST, CHU HS, WANG XX, XU WT. High content design of riboswitch biosensors: all-around rational module-by-module design[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2023, 220: 114887.
- [16] GREENWALD EC, MEHTA S, ZHANG J. Genetically encoded fluorescent biosensors illuminate the spatiotemporal regulation of signaling networks[J]. Chemical Reviews, 2018, 118(24): 11707-11794.
- [17] KAPER T, LOOGER LL, TAKANAGA H, PLATTEN M, STEINMAN L, FROMMER WB. Nanosensor detection of an immunoregulatory tryptophan influx/kynurenine efflux cycle[J]. PLoS Biology, 2007, 5(10): e257.
- [18] WAGNER JM, LIU LQ, YUAN SF, VENKATARAMAN MV, ABATE AR, ALPER HS. A comparative analysis of single cell and droplet-based FACS for improving production phenotypes: riboflavin overproduction in *Yarrowia lipolytica*[J]. Metabolic Engineering, 2018, 47: 346-356.
- [19] 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.
- [20] HUANG J, FANG H, GAI ZC, MEI JQ, LI JN, HU S, LV CJ, ZHAO WR, MEI LH. *Lactobacillus brevis* CGMCC 1306 glutamate decarboxylase: crystal structure and functional analysis[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2018, 503(3): 1703-1709.
- [21] NIEHAUS TD, ELBADAWI-SIDHU M, de CRÉCY-LAGARD V, FIEHN O, HANSON AD. Discovery of a widespread prokaryotic 5-oxoprolinase that was hiding in plain sight[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2017, 292(39): 16360-16367.
- [22] BIKMULLIN AG, NURULLINA LI, GARAEVA NS, KLOCHKOVA EA, BLOKHIN DS, GOLUBEV AA, VALIDOV SZ, KHUSAINOV IS, USACHEV KS, YUSUPOV MM. *In vitro* reconstitution of the *S. aureus* 30S ribosomal subunit and RbfA factor complex for structural studies[J]. Biochemistry Biokhimiia, 2020, 85(5): 545-552.
- [23] LI C, LU J, YAN XJ, LI CW, LIN LC, XIAO DG, ZHANG CY. The eisosomes contribute to acid tolerance of yeast by maintaining cell membrane integrity[J]. Food Microbiology, 2023, 110: 104157.
- [24] GU HQ, ZHU YY, PENG YF, LIANG XJ, LIU XG, SHAO LZ, XU YY, XU ZH, LIU R, LI J. Physiological mechanism of improved tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to lignin-derived phenolic acids in lignocellulosic ethanol fermentation by short-term adaptation[J]. Biotechnology for Biofuels, 2019, 12: 268.
- [25] WANG X, BERNSTEIN HD. The *Escherichia coli* outer membrane protein OmpA acquires secondary structure prior to its integration into the membrane[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2022, 298(4): 101802.
- [26] AGRAWAL S, KARCHER D, RUF S, BOCK R. The functions of chloroplast glutamyl-tRNA in translation and tetrapyrrole biosynthesis[J]. Plant Physiology, 2020, 183(1): 263-276.
- [27] SAINT MARTIN C, CACCIA N, DARSONVAL M, GREGOIRE M, COMBEAU A, JUBELIN G, DUBOIS-BRISSONNET F, LEROY S, BRIANDET R, DESVAUX M. Spatially localised expression of the glutamate decarboxylase *gadB* in *Escherichia coli* O157:H7 microcolonies in hydrogel matrices[J]. npj Science of Food, 2023, 7: 55.

(本文责编 陈宏宇)