

文章编号: 1674-7054(2023)01-0042-08



微生物合成 5-羟基色氨酸的研究进展

翁可欣, 张明亮, 李力

(福建师范大学 生命科学学院, 福州 350117)

摘要: 5-羟基色氨酸 (5-hydroxytryptophan, 5-HTP) 是血清素和褪黑素生物合成的中间代谢物, 可有效治疗多种疾病, 如抑郁症、头痛、肥胖和失眠等。传统生产 5-HTP 的方法是植物提取或化学合成, 然而, 这些方法效率低, 难以大规模生产, 无法满足不断增长的市场需求。随着代谢工程和合成生物学的发展, 利用微生物合成目标产物成为必然趋势。笔者综述了微生物合成 5-HTP 的研究进展, 通过定向进化羟化酶以及引入辅酶因子合成与再生途径, 实现了微生物合成 5-HTP, 再经代谢工程调控, 通过平衡宿主细胞内代谢流提高 5-HTP 生产效率, 为工业微生物有效合成 5-HTP 提供了理论基础和技术支持。

关键词: 5-羟基色氨酸; 生物合成; 四氢生物喋呤; 色氨酸羟化酶

中图分类号: Q 93 **文献标志码:** A

引用格式: 翁可欣, 张明亮, 李力. 微生物合成 5-羟基色氨酸的研究进展 [J]. 热带生物学报, 2023, 14(1): 42-49. DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2023.01.016

5-羟基色氨酸 (5-Hydroxytryptophan, 5-HTP) 是一种色氨酸衍生物, 由色氨酸羟化酶催化, 使色氨酸苯环上 5' 位氢原子被羟基取代^[1]。在哺乳动物体内, 5-HTP 可脱羧转化为 5-羟色胺 (5-Hydroxytryptamine, 5-HT), 也称为血清素, 参与调节情绪、认知、学习、记忆、睡眠和其他生理过程^[2]。5-HT 可进一步转化为褪黑素 (Melatonin, MT), 该激素由松果体释放, 具有调节睡眠的作用^[3-4]。5-HTP 是 5-HT 和 MT 的重要前体, 在抗抑郁、减肥、治疗失眠和头痛等方面有重要作用。但是, 摄入过量的 5-HTP 可能导致血清素综合征, 产生一定的副作用, 例如躁动、神志不清、心动过速、出汗和血压波动等^[5]。

5-HTP 主要来源是从非洲豆科植物加纳 (*Griffonia simplicifolia*) 种子中提取, 但是植物的生长周期长, 并受季节和地域的限制, 产率低, 不适合工业化应用^[6]。化学合成方法的周期长、耗资大, 需在高温高压环境下合成, 易造成环境污染, 且色氨酸区域选择性羟化化较难实现, 同样不适

用于大规模合成^[7-8]。微生物合成具有生产周期短、成本低、产量高和易于大规模生产等优点, 具有巨大的应用前景。笔者着重阐述定向进化提高芳香族氨基酸羟化酶的羟化活性、辅酶因子合成和再生途径的引入和代谢工程优化 5-HTP 合成效率等方面阐述了微生物合成 5-HTP 的进展, 旨在为 5-HTP 的规模化生产研究提供资料。

1 5-HTP 的生物合成途径

在生物体内, 5-HTP 由色氨酸羟化酶 (Tryptophan hydroxylase, TPH) 催化 L-色氨酸 (L-Tryptophan, L-Trp) 和 O₂ 合成, 此过程需要四氢生物喋呤 (Tetrahydrobiopterin, BH₄) 和 Fe²⁺ 作为辅助因子^[9]。TPH 是芳香族氨基酸羟化酶 (Aromatic amino acid hydroxylases, AAH) 家族的一员, 它是单加氧酶, 催化时将 O₂ 中一个氧原子与底物结合, 并将另一个氧原子还原为 H₂O, 还原为 H₂O 所需的 2 个电子由 BH₄ 提供^[10]。在这个过程中, 辅助因子 BH₄ 至关重要。BH₄ 合成从 GTP 开始,

收稿日期: 2022-09-07

修回日期: 2022-10-17

基金项目: 国家重点研发计划合成生物学专项课题 (2021YFA0910501)

第一作者: 翁可欣 (1997-), 女, 福建师范大学生命科学学院 2020 级硕士研究生. E-mail: 1274692797@qq.com

通信作者: 李力 (1975-), 男, 教授, 博士生导师. 研究方向: 微生物天然产物的发现与基因组挖掘. E-mail: lili@fjnu.edu.cn

GTP 被 GTP 环化水解酶 I (GTP Cyclohydrolase I, GCHI) 催化生成 7,8-三磷酸二氢新蝶呤 (7,8-Dihydroneopterin triphosphate, H₂NTP), 再在 6-丙酮四氢蝶呤合成酶 (6-Pyruvoyl Tetrahydropterin Synthase, PTSP) 的作用下生成 6-丙酮-5,6,7,8-四氢蝶呤 (6-Pyruvoyl-5,6,7,8-tetrahydropterin, PTP), 最后由墨蝶呤还原酶 (Sepsipterin Reductase, SPR) 催化, 转化成终产物 BH₄^[11]。在哺乳动物体

内, BH₄ 作为辅酶被消耗后, 会转化成蝶呤-4 α -甲醇胺 (BH₄-4 α -carbinolamine, 4 α -OH-BH₄), 在蝶呤-4 α -甲醇胺脱水酶 (Pterin-4 α -carbinolamine dehydratase, PCD) 的作用下生成醌型双氢蝶呤 (Quinonoid Dihydrobiopterin, qBH₂), 在双氢蝶呤还原酶 (Dihydropteridine Reductase, DHPR) 的催化下再生成 BH₄, 完成 BH₄ 循环(图 1)^[12]。

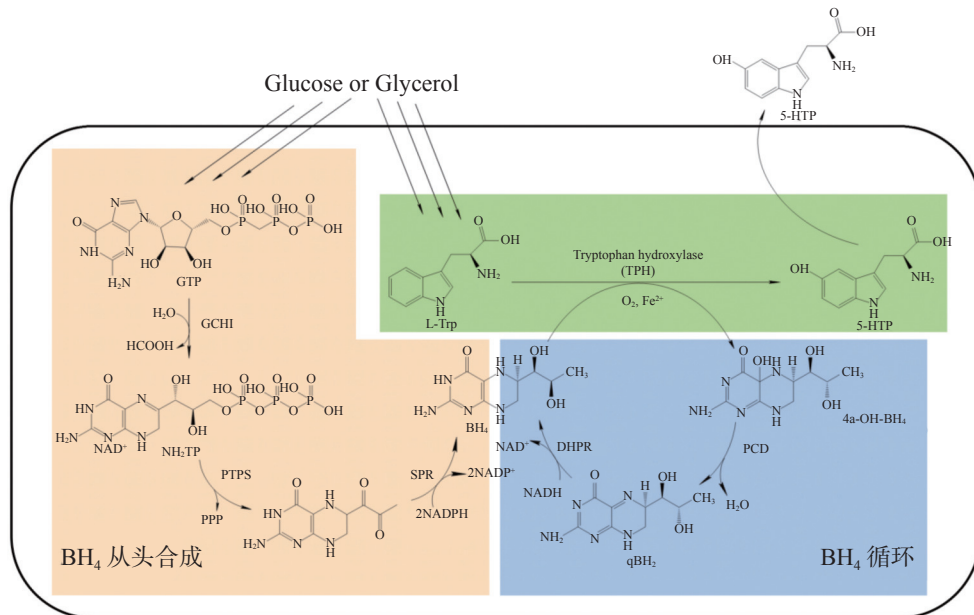


图 1 大肠杆菌内构建 5-HTP 生物合成途径

色氨酸羟化模块(绿)、BH₄ 从头合成模块(橙)和 BH₄ 循环模块(蓝)。TPH: 色氨酸羟化酶; GCHI: GTP 环化水解酶 I; PTSP: 6-丙酮四氢蝶呤合成酶; SPR: 墨蝶呤还原酶; PCD: 蝶呤-4 α -甲醇胺脱水酶; DHPR: 双氢蝶呤还原酶。

2 大肠杆菌异源表达生产 5-HTP

在大肠杆菌内构建 5-HTP 生物合成途径需要 3 个模块, 分别为色氨酸羟化酶模块、BH₄ 从头合成模块和 BH₄ 循环模块(图 2)。

2.1 芳香族氨基酸羟化酶的异源表达 AAAs 是非血红素亚铁和 BH₄ 依赖的单加氧酶, 它们包括色氨酸羟化酶 (Tryptophan hydroxylase, TPH)、苯丙氨酸羟化酶 (Phenylalanine hydroxylase, PAH) 和酪氨酸羟化酶 (Tyrosine hydroxylase, TH)。这 3 种酶都使用 BH₄ 和 O₂ 为辅助因子, 分别催化色氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸转化为 5-HTP、酪氨酸和左旋多巴^[13]。其中, 人类 TPH 有 2 种亚型, 由 2 个不同的基因编码。最早被发现且研究最多的是 TPH1, 主要存在于松果体和肠道系统, 而 TPH2 主要存在于神经细胞^[14]。

Moran 等^[15] 首先在大肠杆菌中表达了野生型兔源色氨酸羟化酶 (TRH) 以及该酶 2 种截短的突

变蛋白, 发现野生型兔源色氨酸羟化酶表达水平较低, 且删除 N 端调节域 101 个氨基酸的突变蛋白主要以包涵体的形式存在, 但同时删除 N 端 101 个氨基酸与 C 端 28 个氨基酸的蛋白质 TRH₁₀₂₋₄₁₆ 表达量为细胞总蛋白的 30%。其结果表明, 兔源 TRH₁₀₂₋₄₁₆ 是一种稳定、高活性的 TRH 形式, 可在大肠杆菌中高水平表达。MCKINNEY 等^[16] 在大肠杆菌中表达了全长的人 TPH, 将其与麦芽糖结合蛋白 (Maltose binding protein, MBP) 结合 (MBP-TPH), 使 TPH 迅速而有效地折叠成天然结构, 促进 TPH 的可溶性表达, 与 6 \times His-TPH 融合蛋白相比, MBP-TPH 比酶活高出 3 倍。WINDAHL 等^[17] 对鸡的色氨酸羟化酶晶体结构进行了研究, 发现与色氨酸结合的疏水性口袋由残基 Tyr236、Thr266、Pro269、His273、Phe314、Phe319 和 Ile367 等组成, 且其中 Fe²⁺ 配位结构是非血红素依赖的配位结构, 与人类 TPH1 的结构相

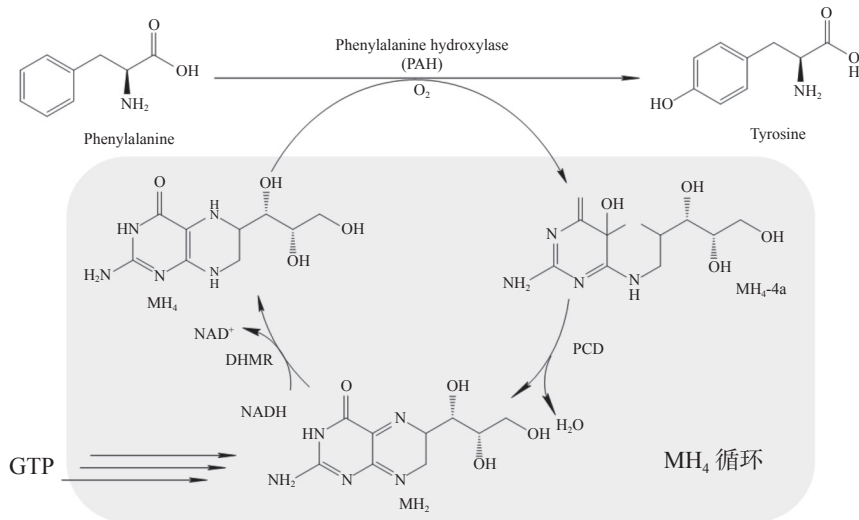


图2 原核生物 PAH 催化途径(灰色部分为 MH_4 循环)

MH_4 : 四氢苏式新蝶呤; PAH: 苯丙氨酸羟化酶; 4α - MH_4 : 4α -羟基四氢蝶呤; PCD: 蝶呤- 4α -甲醇胺脱水酶; MH_2 : 二氢单氢蝶呤; DHMR: 二氢单氢蝶呤还原酶。

比,其整体结构更紧凑,在活性位点周围有两个闭环。

由于真核生物酶的低溶解性、低稳定性以及特定的翻译后修饰,真核生物的 AAAH 难以在大肠杆菌中以可溶的和稳定的形式表达^[16, 18]。虽然使用截短的蛋白或融合蛋白可获得可溶性和有活性的酶,但这类 AAAH 在大肠杆菌中羟化活性仍然较低^[18]。相反,细菌 AAAH 在大肠杆菌内表达更稳定,更有利于提高芳香族氨基酸的羟化活性。KINO 等^[19]利用紫色色杆菌(*Chromobacterium violaceum*)PAH(CviPAH)的晶体结构信息,对 CviPAH 的第 101 位亮氨酸(L101)和第 180 位色氨酸(W180)进行饱和和突变后发现,第 101 位亮氨酸突变为酪氨酸(L101Y)和第 180 位色氨酸突变为苯丙氨酸(W180F)后,*L*-色氨酸羟化活性提高至 5.2 倍。

2.2 辅酶因子供应系统

2.2.1 BH_4 的合成与再生

色氨酸羟化酶催化过程需要 BH_4 作为辅助因子,但大肠杆菌不含内源性 BH_4 ,因而 BH_4 合成与再生途径的构建是色氨酸羟化酶途径的重点。Yamamoto 等^[20]在大肠杆菌内表达 *GCHI*、*PTPS* 和 *SPR* 等 3 个酶基因,在大肠杆菌内成功构建 BH_4 合成途径,并进一步提高 BH_4 产能,最大产率达到约 $4.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。Ryotaro 等^[19, 21]在 2009 年研究的基础上,在大肠杆菌内表达 CviPAH 的突变体(CviPAH-L101Y-W180F),敲除宿主内降解 *L*-Trp 和 5-HTP 的色氨酸酶基因($\Delta tnaA$),并导入 BH_4 辅酶因子的再生系

统(PCD, DHPR)和 $NADH$ 再生系统,促进 5-HTP 的合成。通过添加 BH_4 和 *L*-Trp,并优化反应条件,最终 5-HTP 产率为 $2.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,实现了 BH_4 再生系统的应用,提高了 BH_4 的利用率。但该研究仍需添加 BH_4 和 *L*-Trp 作为底物,并不是微生物合成 5-HTP 的最佳方法。一项专利^[22]在大肠杆菌中表达截短的兔源 TPH1,同时导入 BH_4 的生物合成途径和再生系统,实现了 GTP 从头合成 BH_4 以及再生 BH_4 。该专利在大肠杆菌($\Delta tnaA$)内共表达 6 个酶(TPH1、*GCHI*、*PTPS*、*SPR*、*PCD*、*DHPR*),在不添加 BH_4 以及 *L*-色氨酸的培养基中生产了 $0.9 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (相当于 $198 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的 5-HTP。Wang 等^[23]在大肠杆菌($\Delta tnaA$)内异源表达曼氏血吸虫(*Schistosoma mansoni*)TPH(*SmTPH*)以及 BH_4 从头合成和循环途径,在含有 $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 *L*-Trp 的培养基中发酵 60 h 生成 $0.93 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 5-HTP。

2.2.2 不同辅酶因子— MH_4

真核生物 AAAH 在大肠杆菌中常以包涵体的形式表达,而原核生物 AAAH *L*-色氨酸羟化活性非常低。但据报道,当紫色色杆菌(*Chromobacterium violaceum*)PAH 突变时将提高 *L*-色氨酸羟化活性^[19]。同时有实验表明^[24-25],部分细菌 PAH 可利用四氢苏式新蝶呤(Tetrahydromonapterin, MH_4)代替 BH_4 作为辅酶进行羟化反应, MH_4 参与反应后可转变为 4α -羟基四氢蝶呤(4α -Hydroxytetrahydropterin, 4α - MH_4),再经 PCD 催化为二氢单氢蝶呤(Dihydromonapterin, MH_2), MH_2 可以进一步还原为 MH_4 ,

完成 MH_4 循环。大肠杆菌含有内源性 MH_4 , 但缺少 MH_4 循环系统, MH_4 是大肠杆菌中蝶呤的主要存在形式(图 2)。

Lin 等^[26] 比对 5 个微生物 PAH 后发现, 野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris*)PAH(XcPAH) 对苯丙氨酸和色氨酸的活性较高, 在其预测的晶体结构中, W179 位于活性口袋内, 将其突变可改变 XcPAH 的底物偏好, 结果表明, XcPAH-W179F 突变体色氨酸羟化活性是野生型的 17.4 倍, 同时突变体苯丙氨酸羟化活性降低了约 20%。XcPAH-W179F 可以利用大肠杆菌内源 MH_4 作为辅酶, 因此, 研究人员共表达 XcPAH-W179F、PCD 和 DHMR 成功构建色氨酸羟化途径和 MH_4 循环系统。将该系统转入大肠杆菌内, 同时添加 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 *L*-Trp 作为底物, 在 30°C 培养 16 h 可合成 $1.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 5-HTP, 但不添加 *L*-Trp 时, 仅可生成 $152.9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 5-HTP。由于在大肠杆菌中已实现了 *L*-Trp 的高水平生产(高达 $48.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)^[27], 将该系统导入色氨酸高产菌株并对其进行优化有望获得 5-HTP 高效生产菌株。

Mora-Villalobos 等^[28] 比较了 10 种细菌 AAAH 对色氨酸的亲合性, 发现台湾铜绿假单胞菌(*Cupriavidus taiwanensis*)AAAH(CtAAAH)对色氨酸亲合性较高, 通过与色氨酸偏好的酶进行比较发现 CtAAAH-W192 与 *L*-Trp 的吡啶环的结合有关, 对该位点突变可改变其底物偏好。与野生型相比, 突变体 CtAAAH-W192F 的色氨酸羟化活性提高了 5.5 倍, 苯丙氨酸羟化活性降低了约 10%。将该突变体转入大肠杆菌(ΔtnaA)内, 同时表达 MH_4 循环系统, 在添加 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ *L*-Trp 的培养基中培养 24 h 后, 可合成 $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 5-HTP。

2.2.3 通过代谢工程优化 5-HTP 合成 利用代谢工程平衡细胞代谢网络, 可进一步提高 5-HTP 产量。细胞内 *L*-色氨酸的合成起始于 3-脱氧-D-阿拉伯庚糖酮酸-7-磷酸 (3-Deoxy-D-arabino-heptulosonic acid 7-phosphate, DAHP)。磷酸烯醇式丙酮酸 (Phosphoenolpyruvate, PEP) 与赤藓糖-4-磷酸 (Erythrose-4-phosphate, E4P) 经 *aroH* 基因编码的 DAHP 合成酶 (DAHP synthase) 催化合成 DAHP, 再经分支酸途径合成分支酸 (Chorismate, CHA), CHA 在色氨酸操纵子的催化下合成 *L*-色氨酸(图 3)^[29]。这一过程中, *aroH* 与 *trpE* 基因的表达与蛋白活性都受到色氨酸的反馈

抑制。点突变与启动子替换可以解除色氨酸对 *AroH* 与 *TrpE* 的反馈抑制, 将代谢流向有利于色氨酸合成的方向, 增加色氨酸在宿主细胞内的累积量, 以提高 5-HTP 的合成^[30]。

大肠杆菌 *trpR* 基因编码一种阻遏蛋白 TrpR, 它能够控制色氨酸操纵子的表达, 当有高浓度的 *L*-Trp 存在时, TrpR 可与 *L*-Trp 形成二聚体, 与色氨酸操纵子结合, 阻止转录, *L*-Trp 的生物合成途径停止。当 *L*-Trp 含量低时, TrpR 处于失活状态, 色氨酸操纵子可正常转录^[31]。在大肠杆菌内敲除 *trpR* 基因可实现 *L*-Trp 的累积, 有利于 5-HTP 的合成。

Mora-Villalobos 等^[32] 在 2017 年研究的基础上对 CtAAAH 再次进行优化, 构建了双突变体 CtAAAH-F197L/E219C(CtAAAH-LC), 与单突变体 CtAAAH-W192F 相比, CtAAAH-LC 的 K_m 值更低 ($0.95 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 反应速度更快 ($V_{\max} = 1.9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)。同时, 构建了菌株 TrpD-PI, 该菌株以 LIN 等^[30] 人的色氨酸高产菌株 S028 为出发菌株, 敲除了基因 *trpR*, 并含有人 MH_4 再生系统 (PCD, DHMR)。将 CtAAAH-LC 转入菌株 TrpD-PI 中进行分批补料发酵, 60 h 后, 色氨酸含量达 $(23.4 \pm 1.4) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 5-HTP 产量为 $(962 \pm 58) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

Wang 等^[33] 进一步对 *L*-色氨酸生产模块、色氨酸羟基酶模块和 BH_4 模块进行优化。作者在大肠杆菌内表达人源 TPH, 将 BH_4 的合成与再生系统同时导入大肠杆菌内, 并解除色氨酸对 *TrpE* 和 *AroH* 的反馈抑制 (*aroH*^{fbt} 和 *trpE*^{fbt}), 在未添加 *L*-Trp 和 BH_4 的摇瓶中发酵 116 h, 可合成 $3.97 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 *L*-Trp 和 $314.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 5-HTP。再经代谢工程调控, 对 *L*-色氨酸模块、色氨酸羟基酶模块和 BH_4 模块优化。研究表明, 截短的 TPH 在大肠杆菌中可溶性和稳定性将提高^[34, 35], 将截短的 TPH145 (TPH2 N Δ 145/C Δ 24) 代替 TPH 进行摇瓶发酵, 最终合成 $424.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 5-HTP, 产率提高 34.9%。前期的实验表明, *L*-Trp 在宿主内大量累积却未转化成 5-HTP, 推测合成 *L*-Trp 将消耗大量的营养物质, 不利于 5-HTP 的合成。用低拷贝质粒表达 *aroH*^{fbt} 和 *trpE*^{fbt}, *L*-Trp 产量显著降低 ($207.9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 同时, 5-HTP 的产量增加至 $532.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。再经启动子优化, 降低 BH_4 合成和循环途径过度表达的负担, 最终 5-HTP 和 *L*-色氨酸产量显著增加, 摇瓶发酵分别为 $1.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

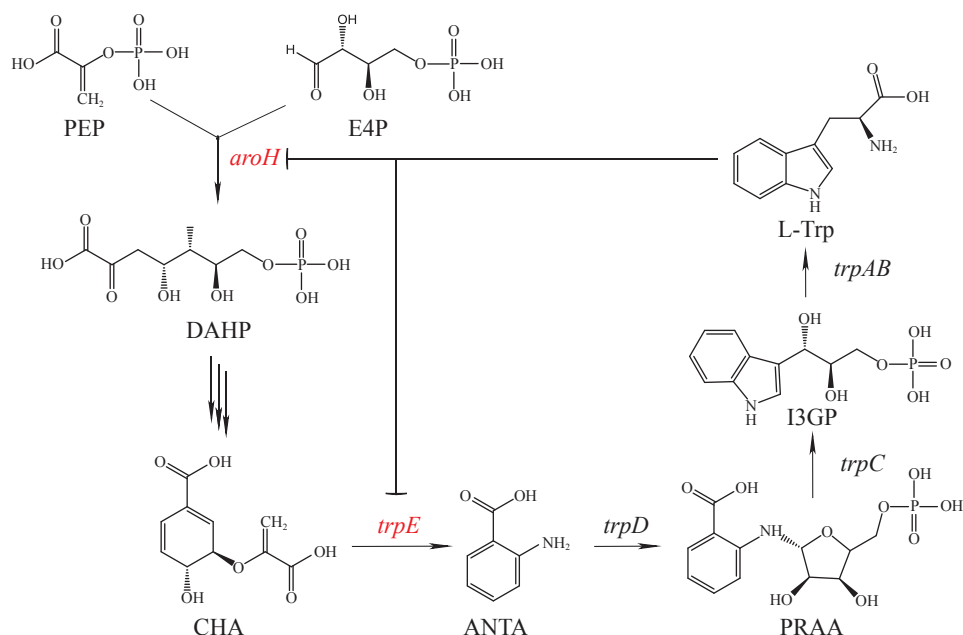


图3 大肠杆菌中L-色氨酸合成途径相关调控

DAHP (3-Deoxy-D-arabino-heptulosonic acid 7-phosphate): 3-脱氧-D-阿拉伯庚糖酮酸-7-磷酸; PEP (Phosphoenolpyruvate): 磷酸烯醇式丙酮酸; E4P (Erythrose-4-phosphate): 赤藓糖-4-磷酸; CHA (Chorismate): 分支酸; ANTA (Anthranilate): 邻氨基苯甲酸; PRAA (Phosphoribosyl anthranilate): 磷酸核糖邻氨基苯甲酸; I3GP (Indole 3-glycerolphosphate): 吲哚-3-甘油磷酸。

在以甘油为碳源的补料分批发酵罐中发酵, 5-HTP 最终产量为 $5.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。由于多质粒表达在发酵后期稳定性较差, 为了增加羟化途径的稳定性, 将 *aroH^{fbr}* 和 *trpE^{fbr}* 整合到大肠杆菌基因组中, 同时降低了色氨酸羟化质粒拷贝数和 *aroH^{fbr}* 启动子的强度, 以重新平衡和优化代谢途径, 最终 5-HTP 摇瓶发酵产量为 $1.61 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 提高了 24.8%, L-Trp 产量为 $0.20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 降低了 88%^[36]。

除了大肠杆菌异源表达生产 5-HTP 外,

Zhang 等^[37] 首次在酿酒酵母 BY4741 内成功合成了 5-HTP, 通过异源表达原核 PAH 或真核色氨酸 3/5-羟化酶, 以 MH_4 或 BH_4 两种辅助因子增强合成 5-HTP。此外, 酿酒酵母中天然基因 *DFR1* 与大肠杆菌中的 *folM* 基因具有相似的功能, 经过基因 *DFR1* 敲除, 证实在酿酒酵母中 *DFR1* 基因通过再生 MH_4 对 5-HTP 的合成起着关键作用, 为利用代谢工程促进酵母生产 5-HTP 奠定了基础 (表 1)。

表 1 微生物异源合成 5-HTP

菌株	羟化酶	辅酶	代谢工程优化	5-HTP产量	参考文献
<i>E. coli</i>	CviPAH-L101Y-W180F	BH_4	$\Delta tnaA$	$550 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	[21]
<i>E. coli</i>	兔源TPH1	BH_4	$\Delta tnaA$	$198 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	[22]
<i>E. coli</i>	SmtPH	BH_4	$\Delta tnaA$	$0.93 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$	[23]
<i>E. coli</i>	XcPAH-W179F	MH_4	$\Delta tnaA$	$1.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$	[26]
<i>E. coli</i>	CtAAAH-W192F	MH_4	$\Delta tnaA$	$550 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	[28]
<i>E. coli</i>	CtAAAH-F197L/E219C	MH_4	色氨酸高产菌株TrpD-PI	$962\pm 58 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	[32]
<i>E. coli</i>	TPH145(TPH2 N Δ 145/C Δ 24)	BH_4	低拷贝质粒表达 <i>aroH^{fbr}</i> 和 <i>trpE^{fbr}</i> BH_4 合成和 循环途径启动子优化	$5.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$	[33]
<i>E. coli</i>	TPH145(TPH2 N Δ 145/C Δ 24)	BH_4	<i>aroH^{fbr}</i> 和 <i>trpE^{fbr}</i> 整合至基因组 低拷贝质粒表达TPH145降低 <i>aroH^{fbr}</i> 启动子强度	$1.61 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$	[36]
<i>S. cerevisiae</i>	原核: XcP4H 真核: T5H或T3H	BH_4 或 MH_4	—	$0.337\pm 0.187 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	[37]

3 展 望

在微生物内合成 5-HTP 需要芳香族氨基酸羟化酶、辅酶因子合成系统和辅酶因子再生系统 3 个模块。前期研究表明对 TPH 进行突变、截短或融合标签可提高该酶在宿主内羟化活性, 将 BH₄ 合成系统和再生系统导入宿主细胞与 TPH 共表达, 可成功构建色氨酸羟化途径^[34-35]。部分细菌 PAH 可利用 MH₄ 代替 BH₄ 作为辅酶进行羟化反应, 提高 PAH 色氨酸羟化活性、表达 MH₄ 循环系统, 亦可构建色氨酸羟化途径^[24-25]。经代谢工程调控增加 *L*-Trp 在宿主内的积累量可进一步提高 5-HTP 的产率。目前, 微生物发酵生产 5-HTP 最高产量为 5.1 g·L⁻¹, 但仍无法大规模商业化生产, 今后的研究重点可集中在以下几个方面: (1) 5-HTP 合成与宿主细胞生长相关, 高强度表达将影响细胞生长, 无法高效合成 5-HTP^[36]。因此, 代谢途径的优化与平衡更为重要, 可集中研究 3 个模块和 *L*-Trp 代谢工程调控中不同表达强度对 5-HTP 合成的影响, 提高 5-HTP 合成率, 降低 *L*-Trp 在宿主细胞内的残留量; (2) 需进一步优化培养基组成以及发酵过程中温度、pH、溶氧等参数对宿主细胞内 *L*-Trp 转化率和 5-HTP 积累量的影响, 确定最优发酵工艺条件; (3) 仍需研究 5-HTP 分离纯化技术, 探索发酵液固液分离和脱色等工艺流程, 结合纳滤膜和微滤膜等新兴技术提高回收率、获得高纯度产品, 实现微生物合成 5-HTP 商业化生产。在生物活性方面, 已有研究表明过量摄入 5-HTP 将产生一定副作用, 仍需深入探索药理毒理机制, 为临床使用 5-HTP 提供数据支持。此外, 酿酒酵母被认为是安全无毒的模式生物^[38], 在酿酒酵母内合成 5-HTP 研究较少, 可通过基因组挖掘进一步研究不同芳香族氨基酸羟化酶在酿酒酵母内的高活性表达以及两种辅酶因子合成与再生途径的构建, 同时需改造酿酒酵母内 *L*-Trp 的代谢通量和协调代谢平衡, 为研究酿酒酵母合成 5-HTP 提供新的技术支持。

参考文献:

- [1] DAS Y T, BAGCHI M, BAGCHI D, et al. Safety of 5-hydroxy-l-tryptophan [J]. *Toxicology Letters*, 2004, 150(1): 111 - 122.
- [2] ŠVOB ŠTRAC D, PIVAC N, MÜCK-ELER D. The sero-

tonergic system and cognitive function [J]. *Translational Neuroscience*, 2016, 7(1): 35 - 49.

- [3] YE T, YIN X, YU L, et al. Metabolic analysis of the melatonin biosynthesis pathway using chemical labeling coupled with liquid chromatography - mass spectrometry [J]. *Journal of Pineal Research*, 2019, 66(1): 12531.
- [4] SAMANTA S. Physiological and pharmacological perspectives of melatonin [J]. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 2020, 128(5): 1346 - 1367.
- [5] MAFFEI M E. 5-hydroxytryptophan (5-HTP): natural occurrence, analysis, biosynthesis, biotechnology, physiology and toxicology [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(1): 181.
- [6] ADDOTEY J N A, ADOSRAKU R K. Pilot production of 5-HTP from the seeds of *Griffonia simplicifolia* [J]. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2016, 5(6): 204 - 221.
- [7] 孙日和. 左旋 5-羟基色氨酸的合成工艺: 200810150448.6[P]. 2008-12-17.
- [8] 胡文辉, 唐星, 兰小兵, 等. 一种左旋 5-羟基色氨酸的制备方法: 201110272240.3[P]. 2012-02-15.
- [9] AURORA MARTINEZ P M K, HAAVIK J. A structural approach into human tryptophan hydroxylase and its implications for the regulation of serotonin biosynthesis [J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2001, 8(9): 1077 - 1091.
- [10] FITZPATRICK, PAUL F. Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1999, 68(1): 355.
- [11] WERNER E R, BLAU N, THÖNY B. Tetrahydrobipterin: biochemistry and pathophysiology [J]. *The Biochemical Journal*, 2011, 438(3): 397 - 414.
- [12] THÖNY B, AUERBACH G, BLAU N. Tetrahydrobipterin biosynthesis, regeneration and functions [J]. *Biochemical Journal*, 2000, 347(1): 1 - 16.
- [13] FITZPATRICK P F. The aromatic amino acid hydroxylases [J]. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 2000, 74(1): 235 - 294.
- [14] KULIKOVA E A, KULIKOV A V. Tryptophan hydroxylase 2 as a therapeutic target for psychiatric disorders: focus on animal models [J]. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 2019, 23(8): 655 - 667.
- [15] MORAN G R, DAUBNER S C, FITZPATRICK P F. Expression and characterization of the catalytic core of tryptophan hydroxylase [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(20): 12259 - 12266.
- [16] MCKINNEY J, KNAPPSKOG P M, PEREIRA J, et al. Expression and purification of human tryptophan hydroxylase from *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* [J]. *Protein Expression & Purification*, 2004, 33(2): 185 - 194.
- [17] WINDAHL M S, PETERSEN C R, CHRISTENSEN H, et al. Crystal structure of tryptophan hydroxylase with bound amino acid substrate [J]. *Biochemistry*, 2008,

- 47(46): 12087 – 12094.
- [18] HIGGINS C A, VERMEER L M, DOORN J A, et al. Expression and purification of recombinant human tyrosine hydroxylase as a fusion protein in *Escherichia coli* [J]. *Protein Expression and Purification*, 2012, 84(2): 219 – 223.
- [19] KINO K, HARA R, NOZAWA A. Enhancement of *L*-tryptophan 5-hydroxylation activity by structure-based modification of *L*-phenylalanine 4-hydroxylase from *Chromobacterium violaceum* [J]. *Journal of Bioscience & Bioengineering*, 2009, 108(3): 184 – 189.
- [20] YAMAMOTO K, KATAOKA E, MIYAMOTO N, et al. Genetic engineering of *Escherichia coli* for production of tetrahydrobiopterin [J]. *Metabolic Engineering*, 2003, 5(4): 246 – 254.
- [21] RYOTARO HARA K K. Enhanced synthesis of 5-hydroxy-*l*-tryptophan through tetrahydropterin regeneration [J]. *AMB Express*, 2013, 3(1): 70.
- [22] KNIGHT E M, ZHU J, FÖRSTER J, et al. Microorganisms for the production of 5-hydroxytryptophan: WO 2013/127914 A1 [P]. 2013-06-09.
- [23] WANG Y, CHEN X, CHEN Q, et al. Construction of cell factory capable of efficiently converting *l*-tryptophan into 5-hydroxytryptamine [J]. *Microbial Cell Factories*, 2022, 21(1): 1 – 9.
- [24] NAKATA H, YAMAUCHI T, FUJISAWA H. Phenylalanine hydroxylase from *Chromobacterium violaceum*. purification and characterization [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1979, 254(6): 1829 – 1833.
- [25] PRIBAT A, BLABY I K, LARA-NUNEZ A, et al. FolX and FolM are essential for tetrahydropterin synthesis in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(2): 475 – 482.
- [26] LIN Y, SUN X, YUAN Q, et al. Engineering bacterial phenylalanine 4-hydroxylase for microbial synthesis of human neurotransmitter precursor 5-hydroxytryptophan [J]. *Acs Synthetic Biology*, 2014, 3(7): 497.
- [27] JIAN W, CHENG L K, WANG J, et al. Genetic engineering of *Escherichia coli* to enhance production of *L*-tryptophan [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(17): 7587 – 7596.
- [28] MORA-VILLALOBOS J-A, ZENG A P. Protein and pathway engineering for the biosynthesis of 5-hydroxytryptophan in *Escherichia coli* [J]. *Engineering in Life Sciences*, 2017, 17(8): 892 – 899.
- [29] IKEDA M. Towards bacterial strains overproducing *L*-tryptophan and other aromatics by metabolic engineering [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 69(1): 615 – 626.
- [30] 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 & Biotechnology*, 2017, 101(2): 559 – 568.
- [31] BOGOSIAN G, SOMERVILLE R L, NISHI K, et al. Transcription of the *trpR* gene of *Escherichia coli*: an autogeneously regulated system studied by direct measurements of mRNA levels *in vivo* [J]. *Molecular & General Genetics*, 1984, 193(2): 244 – 250.
- [32] MORA-VILLALOBOS J-A, ZENG A P. Synthetic pathways and processes for effective production of 5-hydroxytryptophan and serotonin from glucose in *Escherichia coli* [J]. *Journal of Biological Engineering*, 2018, 12(1): 3.
- [33] HAIJIAO W, WENQIAN L, FENG S, et al. Metabolic pathway engineering for high-level production of 5-hydroxytryptophan in *Escherichia coli* [J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 48(1): 279 – 287.
- [34] MURPHY K L, ZHANG X, GAINETDINOV R R, et al. A regulatory domain in the N terminus of tryptophan hydroxylase 2 controls enzyme expression [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(9): 13216 – 13224.
- [35] NIELSEN M S, PETERSEN C R, MUNCH A, et al. A simple two step procedure for purification of the catalytic domain of chicken tryptophan hydroxylase 1 in a form suitable for crystallization [J]. *Protein Expression and Purification*, 2008, 57(2): 116 – 126.
- [36] XU D, FANG M, WANG H, et al. Enhanced production of 5-hydroxytryptophan through the regulation of *L*-tryptophan biosynthetic pathway [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(6): 2481 – 2488.
- [37] ZHANG J, WU C, SHENG J, et al. Molecular basis of 5-hydroxytryptophan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Molecular BioSystems*, 2016, 12(5): 1432 – 1435.
- [38] YAO Z, WANG Q, DAI Z. Recent advances in directed yeast genome evolution [J]. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 2022, 8(6): 635.

Advances in microbial synthesis of 5-hydroxytryptophan

WENG Kexin, ZHANG Mingliang, LI Li

(College of Life Science, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350117, China)

Abstract: 5-Hydroxytryptophan (5-HTP) is an intermediate metabolite in the biosynthetic pathway of serotonin and melatonin, which can effectively treat a variety of diseases, such as depression, headache, obesity and insomnia. Traditional methods to produce 5-HTP are natural extraction or chemical synthesis. However, these methods do not meet the growing needs of market due to inefficiency and inability to mass production. With the development of metabolic engineering and synthetic biology, it is an inevitable trend to use microorganisms to synthesize 5-HTP. A comprehensive review is made of the advances in microbial synthesis of 5-HTP. Microbial synthesis of 5-HTP is achieved through directed evolution of hydroxylase, the construction of coenzyme factor biosynthesis and regeneration pathways, and further metabolic engineering efforts are made to balance metabolic flow in the host cell to increase the production of 5-HTP. This review might provide a technical support for industrial biosynthesis of 5-HTP which is of guiding significance for large-scale industrial production of 5-HTP.

Keywords: 5-Hydroxytryptophan; biosynthesis; tetrahydrobiopterin; tryptophan hydroxylase

(责任编辑: 潘学峰)