DOI:10.12441/spyswjs.20260529003 [文章编号] 1673-1689(2026)07-0091-12

高效合成 indigoidine 的大肠杆菌 Nissle 1917 代谢工程改造

李泽宇[1] 肖俊松[1] 张佳丽[1] 倪大伟[1,2] 沐万孟[1,2*]

(1. 江南大学食品学院,江苏 无锡 214122; 2. 江南大学食品科学与资源挖掘全国重点实验室,江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】构建一株高产生物色素 indigoidine 的菌株,为其在食品着色剂等领域的应用提供菌种资源。**【方法】**以大肠杆菌(*Escherichia coli*,*E. coli*)Nissle 1917 为出发菌株,首先消除菌株中的隐蔽质粒 pMUT-1 与 pMUT-2,随后对 indigoidine 合成酶及 4'-磷酸泛酸转移酶进行组合筛选及基因组整合,并通过强化途径基因表达、优化分批补料发酵等策略,提升菌株的 indigoidine 合成能力。**【结果】**成功构建高产菌株 EcN26,在 1 L 发酵罐中分批补料发酵 46.00 h,indigoidine 产量达 3.63 g/L,生产强度为 0.079 g/(L·h)。**【结论】**该研究成功获得 indigoidine 高产菌株,为该生物色素的工业化生产及应用提供了技术方案与理论依据。

关键词:indigoidine; 代谢工程; 大肠杆菌 Nissle 1917; 补料发酵

Metabolic Engineering of *Escherichia coli* Nissle 1917 for Efficient Synthesis of Indigoidine

LI Zeyu[1] *XIAO Junsong*[1] *ZHANG Jiali*[1] *NI Dawei*[1,2] *MU Wanmeng*[1,2*]

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. State Key Laboratory of Food Science and Resources, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: [**Objective**] This study aimed to construct a strain with a high yield of the bio-pigment indigoidine, thus providing strain resources for application in fields such as food colorants. [**Method**] *Escherichia coli* (*E. coli*) Nissle 1917 was used as the parent strain. Metabolic engineering strategies included removing the cryptic plasmids pMUT-1 and pMUT-2, screening for a combination of key enzymes (indigoidine synthase and 4'-phosphopantetheinyl transferase) followed by genomic integration, enhancing the expression of pathway genes, and conducting fed-batch fermentation. Through these approaches, the indigoidine production capability of the engineered strain was systematically improved. [**Result**] The final high-yield strain, EcN26, was used for fed-batch fermented in a 1 L fermenter for 46.00 h, achieving an indigoidine titer of 3.63 g/L and the productivity of 0.079 g/(L·h). [**Conclusion**] This study provides a technical scheme and a theoretical basis for the industrial production and application of indigoidine.

Keywords: indigoidine; metabolic engineering; *Escherichia coli* Nissle 1917; fed-batch fermentation

食品着色剂不仅能够丰富食品外观色泽,还可显著影响消费者的选择行为[1-2]。目前,我国批准使用的蓝色食品着色剂包括靛蓝及其铝色淀、亮蓝及其铝色淀、藻蓝、栀子蓝。其中,靛蓝与亮蓝属于人工化学合成着色剂,藻蓝与栀子蓝为植物提取着色剂,这 2 类着色剂在应用性能与安全性

基金项目:食品科学与资源挖掘全国重点实验室研究项目(SKLF-ZZA-202501)。

通信作者:沐万孟(1981—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事食品酶工程与功能食品配料的生物制造。E-mail: wmmu@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2026-05-29 **修回日期:**2026-06-16

上各有优劣。近期，美国食品药品监督管理局（Food and Drug Administration，FDA）撤销了人工合成色素红色3号的使用许可，进一步推动了人工合成色素的替代进程[3-5]。而植物色素普遍存在生产效率低、难以满足市场需求的问题。因此，利用微生物发酵生产色素（即生物色素），已成为替代人工合成色素与植物色素的有效途径[6-7]。随着合成生物学技术的不断革新与代谢工程研究的推进，微生物细胞工厂的构建日趋成熟，为生物色素的工业化生产提供了技术支撑[8]。

Indigoidine是一种来源于微生物的天然蓝色色素，在食品、纺织、医药和园艺花卉等领域具有广阔的应用前景[9-13]。其合成通路以两分子谷氨酰胺为底物，在非核糖体多肽合成酶（non-ribosomal peptide synthetase，NRPS）的催化下，经氧化与缩合反应生成一分子产物[14-16]。目前，在利用微生物细胞工厂生产 indigoidine 的报道中，涉及的宿主包括 *Corynebacterium glutamicum*[17]、*Escherichia coli*[18]、*Saccharomyces cerevisiae*[19]、*Pseudomonas putida*[20]和 *Streptomyces lividans* TK24[21]等。其中，以大肠杆菌为宿主的报道相对较少。Yu等[22]在大肠杆菌BAP1中筛选并过表达关键酶基因 *Sc-indC* 和 *Sc-indB*，indigoidine产量达3.93 g/L；Xu等[18]通过在大肠杆菌BAP1中补充前体物质谷氨酰胺，将indigoidine产量提升至8.81 g/L；Li等[23]以大肠杆菌BL21（DE3）为底盘生物，通过优化关键酶模块、前体供应模块和形态工程模块，在5 L发酵罐中实现了26.71 g/L的indigoidine产量，证实了大肠杆菌高效合成indigoidine的潜力。但现有研究采用的大肠杆菌宿主普遍存在内毒素风险，极大限制了indigoidine在食品领域的应用。相比之下，大肠杆菌Nissle 1917（EcN）遗传背景清晰、编辑工具完备，不产生任何肠毒素或细胞毒素，且其安全性已得到临床验证，是构建食品级微生物细胞工厂的理想底盘菌株[24-26]。基于此，本研究以EcN为出发菌株，构建可高效生产indigoidine的细胞工厂底盘。

为实现indigoidine的高效合成，作者首先消除了内源性隐蔽质粒pMUT-1和pMUT-2，便于后续质粒转化；随后对异源基因表达模块进行组合筛选，将最佳模块整合至基因组，并过表达途径基因以强化前体供应，成功构建了完整的indigoidine合成通路；最后通过优化分批补料发酵工艺，进一步提升了indigoidine产量，为其工业化生产奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒

大肠杆菌JM109和EcN分别用于构建表达质粒载体和发酵生产菌株。本研究使用的菌株见表1，重组质粒见表2，引物见表3。

1.1.2 试剂

PrimeSTAR® Max DNA高保真酶、QuickCut™限制性内切酶 *Dpn* I、DNA Marker：TaKaRa（大连）有限公司；ClonExpress Ultra一步克隆试剂盒C115、快速 *Taq* 酶、质粒抽提试剂盒、DNA凝胶回收试剂盒、PCR产物纯化试剂盒、细菌基因组提取试剂盒：南京诺唯赞生物科技股份有限公司；氨苄青霉素、硫酸卡那霉素、阿拉伯糖、异丙基-*β*-*D*-硫代半乳糖苷（IPTG）：生工生物工程（上海）股份有限公司；indigoidine标准品：江苏华澄生物科技有限公司；二甲基亚砜（DMSO）：上海阿拉丁生化科技股份有限公司；PCR引物：苏州安升达生物科技有限公司合成；其他试剂：国药集团化学试剂有限公司。

1.1.3 培养基

大肠杆菌种子培养基为LB培养基，indigoidine发酵培养基为R/2培养基。

LB培养基：氯化钠10 g/L、蛋白胨10 g/L、酵母提取物5 g/L，固体培养基在LB培养基的基础上添加琼脂粉15 g/L。

R/2培养基：甘油20 g/L、酵母提取物3 g/L、硫酸铵2 g/L、磷酸氢二铵2 g/L、磷酸二氢钾6.75 g/L、无水柠檬酸0.85 g/L、七水硫酸镁0.7 g/L、金属离子溶液5 mL/L。金属离子溶液组成为：盐酸5 mol/L、七水硫酸亚铁10 g/L、七水硫酸锌2.25 g/L、五水硫酸铜1 g/L、五水硫酸锰0.5 g/L、十水硼酸钠0.23 g/L、无水氯化钙1.51 g/L、七钼酸铵0.1 g/L。

1.2 仪器与设备

PCR仪：Mastercycler X50型，德国Eppendorf公司；电转仪：Eporator型，德国Eppendorf公司；低温高速离心机：5420型，德国Eppendorf公司；核酸电泳仪：HE-120型，上海天能生命科学有限公司；全自动凝胶成像仪：Tanon 1600型，上海天能生命科学有限公司；恒温培养箱：HDPN-II型，上海跃进

表 1 本研究使用的菌株

Table 1 Strains used in this study

菌株	描述	来源
E. coli JM109	Wild-type *E. coli* strain	实验室保藏
E. coli Nissle 1917	Wild-type *E. coli* strain	实验室保藏
EcN01	*E. coli* Nissle 1917 with △pMUT-1	本研究构建
EcN02	EcN01 with △pMUT-2	本研究构建
EcN03	EcN02 harboring pTac-*bpsA-sfp1*	本研究构建
EcN04	EcN02 harboring pTac-*bpsA-sfp2*	本研究构建
EcN05	EcN02 harboring pTac-*bpsA-sfp3*	本研究构建
EcN06	EcN02 harboring pTac-*bpsA-svp*	本研究构建
EcN07	EcN02 harboring pTac-*bpsA-pptA*	本研究构建
EcN08	EcN02 harboring pTac-*Sc-indC-sfp1*	本研究构建
EcN09	EcN02 harboring pTac-*Sc-indC-sfp2*	本研究构建
EcN10	EcN02 harboring pTac-*Sc-indC-sfp3*	本研究构建
EcN11	EcN02 harboring pTac-*Sc-indC-svp*	本研究构建
EcN12	EcN02 harboring pTac-*Sc-indC-pptA*	本研究构建
EcN13	EcN02 harboring pTac-*Ec-indC-sfp1*	本研究构建
EcN14	EcN02 harboring pTac-*Ec-indC-sfp2*	本研究构建
EcN15	EcN02 harboring pTac-*Ec-indC-sfp3*	本研究构建
EcN16	EcN02 harboring pTac-*Ec-indC-svp*	本研究构建
EcN17	EcN02 harboring pTac-*Ec-indC-pptA*	本研究构建
EcN18	EcN02 with △*manX*::P_{tac}-*bpsA-sfp2*	本研究构建
EcN19	EcN18 harboring pCO-*glnA*	本研究构建
EcN20	EcN18 harboring pCO-$glnA^{Y405F}$	本研究构建
EcN21	EcN18 harboring pCO-$glnA^{Y405F}$-*gdh*	本研究构建
EcN22	EcN18 harboring pCO-$glnA^{Y405F}$-*odhI-gdh*	本研究构建
EcN23	EcN18 harboring pCO-$glnA^{Y405F}$-$odhI^{T14A}$-*gdh*	本研究构建
EcN24	EcN18 harboring pCO-$glnA^{Y405F}$-$odhI^{T15A}$-*gdh*	本研究构建
EcN25	EcN18 harboring pCO-$glnA^{Y405F}$-$odhI^{T14A/T15A}$-*gdh*	本研究构建
EcN26	EcN18 harboring pCO-$glnA^{Y405F}$-$odhI^{T15A}$-*gdh-pyk*	本研究构建

医疗器械有限公司；紫外-可见分光光度计：UV1900PC 型，上海菁华科技仪器有限公司；恒温水浴锅：HH-6A 型，常州润华电器有限公司；恒温摇床：ZQLY 型，上海知楚仪器有限公司；1 L 发酵罐：MCGS 型，弗卡恩（上海）生物科技有限公司；高效液相色谱仪（HPLC）：1260 型，安捷伦科技（中国）有限公司。

1.3 方法

1.3.1 重组质粒的构建

所有重组质粒均采用常规分子生物学基因克隆操作和无缝克隆技术构建，其中同源重组法是利用目的基因片段和质粒表达载体之间具有相同的序列进行连接重组的方法。编码 indigoidine 合成酶的 *bpsA*、*Sc-indC*、*Ec-indC* 基因分别来源于 *Streptomyces lavendulae* subsp. *lavendulae*、*Streptomyces chromofuscus* ATCC 49982、*Erwinia chrysanthemi*；编码 4'-磷酸泛酸转移酶的 *sfp1*、*sfp2*、*sfp3*、*svp*、*pptA* 基因分别来源于 *Bacillus subtilis*、*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168、*Bacillus spizizenii*、*Streptomyces verticillus* ATCC 15003、*Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032。上述基因均由苏州安升达生物科技有限公司进行密码子优化与基因合成，并克隆至作者所在课题组保藏的 pTac 质粒载体上。通过引物构建不同重组质粒，重组质粒的 Sanger 测序工作由苏州安升达生物科技有限公司完成。

以 EcN 基因组为模板，分别采用引物对 glnA-F/R 和 V-glnA-F/R 扩增 *glnA* 基因片段和质粒载体 pCO

表 2 本研究使用的重组质粒

Table 2 Plasmids used in this study

质粒	描述	来源
pEcCpf1	rep101 P_{cas}-FnCpf1 P_{araB}-Red P_{rhaB}-crRNA-pMB1 rhaS rhaR sacB，Kan^R	实验室保藏
pcrEG	PMB1 aadA J23119-N23 insert P_{veg}-sfGFP，Spc^R	实验室保藏
pTac	pTrc99a derivative，Tac promoter，Amp^R，pBR322 ori	实验室保藏
pCOLA-1	Two T7 promoters，ColA ori，Kan^R，high copy number	实验室保藏
pcrEG-MUT-1	pcrEG derivative，pMUT-1 plasmid	本研究构建
pcrEG-MUT-2	pcrEG derivative，pMUT-1 plasmid	本研究构建
pcrEG-*manX*	pcrEG derivative，*manX* gene	本研究构建
pTac-*bpsA-sfp1*	pTac derivative，*bpsA* and *sfp1* genes	本研究构建
pTac-*bpsA-sfp2*	pTac derivative，*bpsA* and *sfp2* genes	本研究构建
pTac-*bpsA-sfp3*	pTac derivative，*bpsA* and *sfp3* genes	本研究构建
pTac-*bpsA-svp*	pTac derivative，*bpsA* and *svp* genes	本研究构建
pTac-*bpsA-pptA*	pTac derivative，*bpsA* and *pptA* genes	本研究构建
pTac-*Sc-indC-sfp1*	pTac derivative，*Sc-indC* and *sfp1* genes	本研究构建
pTac-*Sc-indC-sfp2*	pTac derivative，*Sc-indC* and *sfp2* genes	本研究构建
pTac-*Sc-indC-sfp3*	pTac derivative，*Sc-indC* and *sfp3* genes	本研究构建
pTac-*Sc-indC-svp*	pTac derivative，*Sc-indC* and *svp* genes	本研究构建
pTac-*Sc-indC-pptA*	pTac derivative，*Sc-indC* and *pptA* genes	本研究构建
pTac-*Ec-indC-sfp1*	pTac derivative，*Ec-indC* and *sfp1* genes	本研究构建
pTac-*Ec-indC-sfp2*	pTac derivative，*Ec-indC* and *sfp2* genes	本研究构建
pTac-*Ec-indC-sfp3*	pTac derivative，*Ec-indC* and *sfp3* genes	本研究构建
pTac-*Ec-indC-svp*	pTac derivative，*Ec-indC* and *svp* genes	本研究构建
pTac-*Ec-indC-pptA*	pTac derivative，*Ec-indC* and *pptA* genes	本研究构建
pCO-*glnA*	pCOLA-1 derivative，*glnA* gene	本研究构建
pCO-$glnA^{Y405F}$	pCOLA-1 derivative，$glnA^{Y405F}$ gene	本研究构建
pCO-$glnA^{Y405F}$-*gdh*	pCOLA-1 derivative，$glnA^{Y405F}$ and *gdh* genes	本研究构建
pCO-$glnA^{Y405F}$-*odhI-gdh*	pCOLA-1 derivative，$glnA^{Y405F}$，*gdh*，and *odhI* genes	本研究构建
pCO-$glnA^{Y405F}$-$odhI^{T14A}$-*gdh*	pCOLA-1 derivative，$glnA^{Y405F}$，*gdh*，and $odhI^{T14A}$ genes	本研究构建
pCO-$glnA^{Y405F}$-$odhI^{T15A}$-*gdh*	pCOLA-1 derivative，$glnA^{Y405F}$，*gdh*，and $odhI^{T15A}$ genes	本研究构建
pCO-$glnA^{Y405F}$-$odhI^{T14A/T15A}$-*gdh*	pCOLA-1 derivative，$glnA^{Y405F}$，*gdh*，and $odhI^{T14A/T15A}$ genes	本研究构建
pCO-$glnA^{Y405F}$-$odhI^{T15A}$-*gdh-pyk*	pCOLA-1 derivative，$glnA^{Y405F}$，*gdh*，$odhI^{T15A}$，and *pyk* genes	本研究构建

表 3 本研究使用的引物

Table 3 Primers used in this study

引物名称	引物序列（5′—3′）
HP-pMUT1-N23-1F	GTAGATAAGATCATTGATAGCTCTCTGAAAATTTCTACTGTTGTAGATCGTCTCTGAACT
HP-pMUT1-N23-1R	CAGTAGAAATTTTCAGAGAGCTATCAATGATCTTATCTACAACAGTAGAAATTATTTAAAGTTCT
HP-pMUT2-N23-1F	GTAGATTCTCACACGGCAGCGGAAGAGGAAATTTCTACTGTTGTAGATCGTCTCTGAACT
HP-pMUT2-N23-1R	CAGTAGAAATTTCCTCTTCCGCTGCCGTGTGAGAATCTACAACAGTAGAAATTATTTAAAGTTCT
manX-N23-F	GTAGATTACTGCCAGCGCCACCAGTTCATAATTTCTACTGTTGTAGATCGTCTCTGAACT
manX-N23-R	CAGTAGAAATTATGAACTGGTGGCGCTGGCAGTAATCTACAACAGTAGAAATTATTTAAAGTTCT
manX-UP-F	CGAGAACAACAAGCGTGAGTAGCCCCGCCC
manX-UP-R	TTATACGAGCCGATGATTAATTGTCAACAGCTCATTTCAGAATATTTGCCAGAACCGTTATGATGTCGTTGCT ACCTCCTTTATTATCG
tac-bpsa-Sfp2-F	TTAATCATCGGCTCGTATAATGGTGATCAGACCTTTGTTTAACTTTAAAGGAGGTGATAAAAATGACTCTACA AGAGACATCAGTATTAG
tac-bpsa-Sfp2-R	CCCAAGGGGTTATGCTAGTTATTGCTCAGCGGTGGCAGCAGCCTAGGTTAATTACAACAGTTCCTCGTAGCT CACCATGGTGATGTCCTC

续表

引物名称	引物序列（5′—3′）
0704-manX-DH-F	CTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAACCCGTATTGTGTTGATTATCACTCAGTTTTCACAC
0704-manX-DH-R	CAACGATGACGGCCGGAATAGCCACACGCATTGC
sfp1-F	GTGAGTAAAAGGAGATATACCATGAAAATATATGGAGTATACATGGATAGGCC
V-bpsA-R	GGTATATCTCCTTTTACTCACCCAGCAGATAG
sfp1-R	ATGCCTGCAGGTCGACTTACAGCAACTCCTCGTAGGTCTTC
V-pTac-F	GTCGACCTGCAGGCATGCAAG
sfp2-F	ATTACTAAAAGGAGATATACCATGAAAATTTATGGAATATACATGGATAGGCCACTC
sfp2-R	ATGCCTGCAGGTCGACTTACAACAGTTCCTCGTAGCTCACCAT
sfp3-F	GTGAGTAAAAGGAGATATACCATGAAAATTTATGGAATATACATGG
sfp3-R	ATGCCTGCAGGTCGACTTATAACAG
svp-F	GTGAGTAAAAGGAGATATACCATGATAGCGGCACTATTAC
svp-R	ATGCCTGCAGGTCGACTTACGGTACTGCGGTACG
pptA-F	GTGAGTAAAAGGAGATATACCATGCTGGATGAGTCTTTGTTTCCAAATTC
pptA-R	ATGCCTGCAGGTCGACTCAAGTCACTGCAGTCGCAGC
V-Sc-indC-R	GGTATATCTCCTTTTAGTAATTCGGTGTCTTACGAAGCAGT
V-EC-indC-R	GGTATATCTCCTTTTAGCCCACCAAGCTCG
pCO-1-glnA-F	TGTTTAACTTTAATAAGGAGATATACCGTGGCGTTTGAAACCCCGGAAGAAATTGTCAAG
V-pCO-1-R	GGTATATCTCCTTATTAAAGTTAAACAAAATTATTTCTACAGGGG
glnA-R	GCCGGCCGATATCCAATTGAGATCTGCTTAGCAGTCGAAGTACAATTCGAATTCCTGCGGG
V-pCO-2-F	TAAGCAGATCTCAATTGGATATCGGCCGGCCACGCGATCGCTGAC
glnA-Y405F-F	ACAAGGACCTCTTTGAACTACCACCAGAGGAAGCTGCATCC
glnA-Y405F-R	TGGTGGTAGTTCAAAGAGGTCCTTGTCCACTGGAGCGTGTG
SD-odhI-F	GCTAAAAGGAGATATACCATGAGCGACAACAACGGCACCCCGG
pCO-1-glnA-SD-R	TGTTGTCGCTCATGGTATATCTCCTTTTAGCAGTCGAAGTACAATTCGAATTCCTGC
SD-odhI-R	CGCCGAGCTCGAATTCGGATCCTTACTCAGCAGGGCCTGCGAGGAAAACCAGGC
V-pCO-1-F	TAAGGATCCGAATTCGAGCTCGGC
V-pCO-2-R	CATATGTATATCTCCTTCTTATACTTAACTAATATACTAAGATGGG
pCO-2-gdh-F	AGTATAAGAAGGAGATATACATATGACAGTTGATGAGCAGGTCTCTAAC
pCO-2-gdh-R	GCCGATATCCAATTGAGATCTGCTTAGATGACGCCCTGTGCCAGCATC
V-pCO-2-F	TAAGCAGATCTCAATTGGATATCGGCCGGCCACGCGATCGCTGAC
pyk-F	GCGTCATCTAAAAGGAGATATACCATGGGCGTGGATAGACGAACT
V-gdh-R	GGTATATCTCCTTTTAGATGACGCCCTGTGCC
pyk-R	CCAAAACAGCCAAGCTTGCATGTTAGAGCTTTGCAATCCTTGTGTCGTC
V-gdh-F	CATGCAAGCTTGGCTGTTTTGGC

片段。经DNA凝胶回收试剂盒获得目标片段后，使用一步克隆试剂盒进行片段组装，连接产物转化至大肠杆菌JM109，经单菌落筛选与质粒测序验证，获得重组质粒pCO-*glnA*。其他由两片段构建的重组质粒采用相同的方法构建。

以质粒pCO-*glnA*为模板，采用引物对HP-glnA-Y405F-F/R扩增线性片段，以实现点突变或片段替换，加入QuickCut™限制性内切酶*Dpn* I消除残留的模板质粒pCO-*glnA*，将产物转化至大肠杆菌JM109，经单菌落筛选与质粒测序验证，获得重组质粒pCO-$glnA^{Y405F}$。其他点突变或片段替换的重组质粒采用相同的方法构建。

1.3.2 基因整合

采用CRISPR-Cpf1基因编辑工具对EcN菌株进行遗传改造。将构建的重组编辑质粒电转化至底盘菌株，涂布于相应抗性平板后筛选单克隆菌株，获得系列基因编辑菌株，具体操作流程参照文献[24，27]的方法。

1.3.3 菌株摇瓶发酵

发酵种子培养：从新鲜平板上挑取单克隆菌落，接种至LB液体培养基中，于37 ℃、200 r/min培养12~15 h。摇瓶发酵培养：以体积分数2%将发酵种子培养液转接至含25 mL发酵培养基的250 mL摇瓶中，于37 ℃、200 r/min条件下培养。当菌体OD_{600}达到0.6~0.8时，加入终浓度为0.1 mmol/L的IPTG进行诱导，于30 ℃、200 r/min条件下培养48 h。

1.3.4 菌株分批补料发酵

将质粒pCO-*glnA*^{Y405F}-*odhI*^{T15A}-*gdh-pyk*导入EcN18菌株中，获得发酵试验菌株EcN26。挑取EcN26单菌落接种至LB培养基进行一级种子培养。随后以体积分数2%转接至含50 mL R/2培养基的摇瓶中进行二级种子培养。将二级种子培养液接种至装有0.5 L R/2培养基的1 L生物反应器中，于37 ℃恒温培养。当菌体OD_{600}达到11~15时，向反应器中加入终浓度为0.1 mmol/L的IPTG，同时将培养温度梯度降至30 ℃，以促进indigoidine的生物合成。发酵过程中通过流加体积分数50%的氨水使体系pH稳定在6.8。当发酵液中甘油质量浓度低于5 g/L时，启动补料程序，通过蠕动泵间歇流加补料液（600 g/L甘油、20 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$和40 g/L $(NH_4)_2SO_4$），持续补充碳源。

1.3.5 生物量测定

由于indigoidine在610 nm具有强烈的紫外可见吸收峰[16]，会对菌体生物量检测产生干扰，因此作者选取800 nm测定细胞吸光度以表征菌体生物量。检测时将发酵液稀释至适量浓度，采用紫外-可见分光光度计测定吸光度。

1.3.6 indigoidine及甘油测定

取适量样品于12 000 *g*离心5 min，收集500 μL的indigoidine发酵样本，弃去上清液，收集底部沉淀。使用无水甲醇洗涤沉淀2次，以去除残留杂质，随后加入适量DMSO溶解indigoidine，剧烈振荡使其完全溶解。将样品稀释至适宜质量浓度后，经0.22 μm滤膜过滤至液相小瓶中，待测。采用配备600 nm紫外检测器的HPLC测定indigoidine产量[23]。HPLC检测条件：采用安捷伦ZORBAX Eclipse Plus C18色谱柱（250 mm×4.6 mm×5 μm），流量1.0 mL/min，柱温35 ℃，流动相A为超纯水，流动相B为无水甲醇。梯度洗脱程序为：0~9 min，流动相A体积分数由80%降至50%；9~13 min，流动相A体积分数由50%升至80%；13~18 min，流动相A体积分数为80%。甘油质量浓度采用文献[28]中的HPLC法测定[28]。

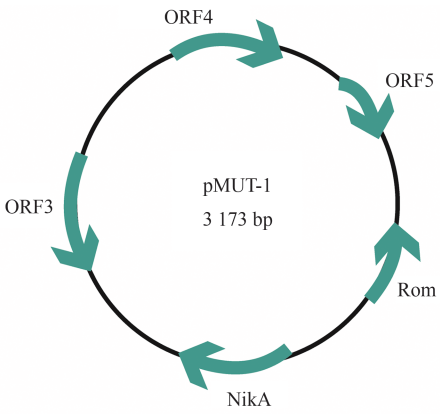
2 结果与讨论

2.1 EcN菌株中隐蔽质粒的消除

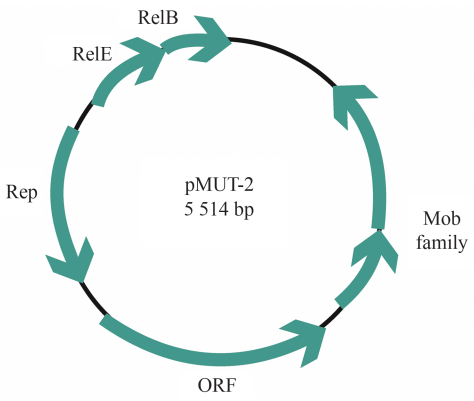
已有研究证实，EcN菌株基因组中含有2个隐蔽质粒pMUT-1（3 173 bp）和pMUT-2（5 514 bp），见图1（a）~（b）。这2个质粒可在宿主菌中稳定遗传，与宿主菌竞争资源，造成代谢负担，进而抑制异源基因的表达。消除这2个隐蔽质粒可显著提升异源质粒载体的拷贝数，从而有效提升异源基因的表达[29-30]。基于此，本研究构建了一株无隐蔽质粒的EcN菌株，为indigoidine的高效合成提供了优良宿主。作者基于CRISPR-Cpf1基因编辑系统，设计靶向2个隐蔽质粒的sgRNA质粒，以实现质粒的精准消除。分别构建编辑质粒pTargetT-MUT1和pTargetT-MUT2，将pTargetT-MUT1转化至原始底盘菌株EcN中，获得消除pMUT-1的菌株EcN01；再将质粒pTargetT-MUT2转化至EcN01中，获得消除pMUT-1与pMUT-2的菌株EcN02。将上述改造后的菌株扩大培养并提取质粒，开展核酸电泳验证，见图1（c）。重组菌株EcN01中仅检测出5 514 bp的pMUT-2特征条带，证明隐蔽质粒pMUT-1已成功消除；重组菌株EcN02中无明显条带，证明pMUT-1和pMUT-2均被成功消除。为明确消除隐蔽质粒对菌株生长性能的影响，测定了野生型EcN、重组菌株EcN01、重组菌株EcN02的生长曲线，见图1（d）。结果表明，消除隐蔽质粒后，各重组菌株的生长与野生型菌株相比无明显差异，为后续引入异源质粒表达系统奠定了基础。

2.2 indigoidine合成路径构建及基因组整合

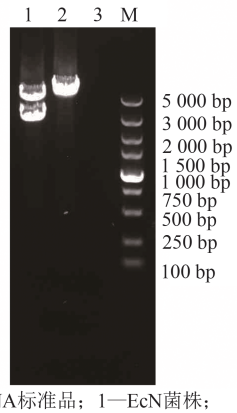
为构建indigoidine高产菌株，作者设计并构建了一条以甘油为碳源生产indigoidine的合成路径，该路径的关键催化模块为indigoidine合成酶及其相应的激活辅酶，见图2。NRPS从无活性形式转变为活性形式时，需要经过4'-磷酸泛酸转移酶的激活，该催化过程是将辅酶A上的磷酰泛酸基团转移至NRPS的T结构域保守丝氨酸残基上[14]。由于indigoidine合成酶是一种典型的NRPS，筛选NRPS与辅酶的最优组合是提升indigoidine合成效率的关键。



(a) pMUT-1质粒示意图

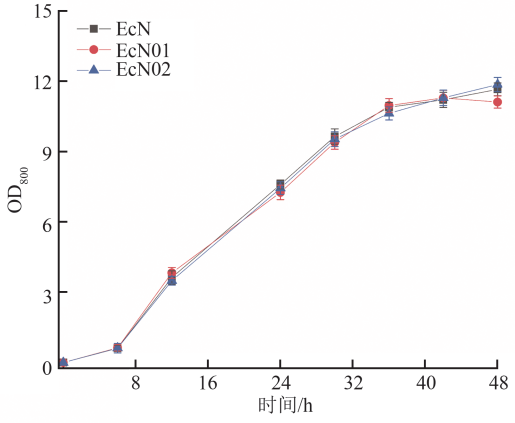


(b) pMUT-2质粒示意图



M—DNA标准品；1—EcN菌株；
2—EcN01菌株(消除隐蔽质粒pMUT-1)；
3—EcN02菌株(消除隐蔽质粒pMUT-1 和pMUT-2)。

(c) 隐蔽质粒消除的PCR验证



(d) 不同菌株的生长曲线

图 1　EcN 菌株中隐蔽质粒消除及验证

Fig. 1　Removal and verification of cryptic plasmids in EcN strain

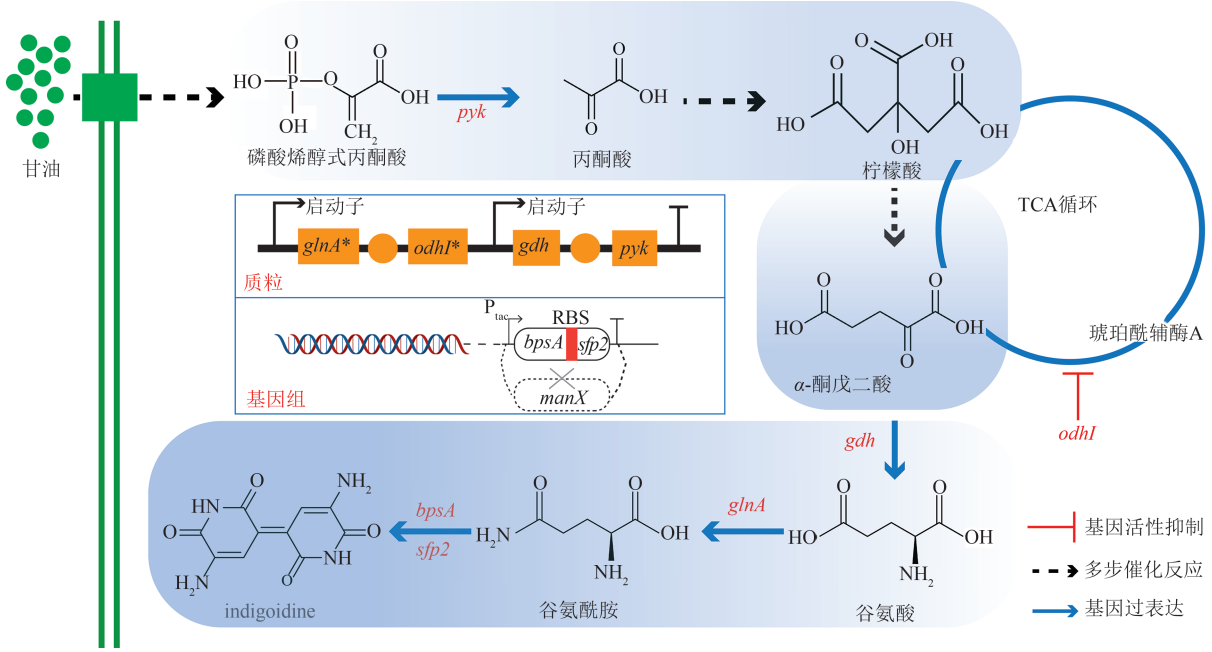


图 2　EcN 菌株中 indigoidine 合成路径

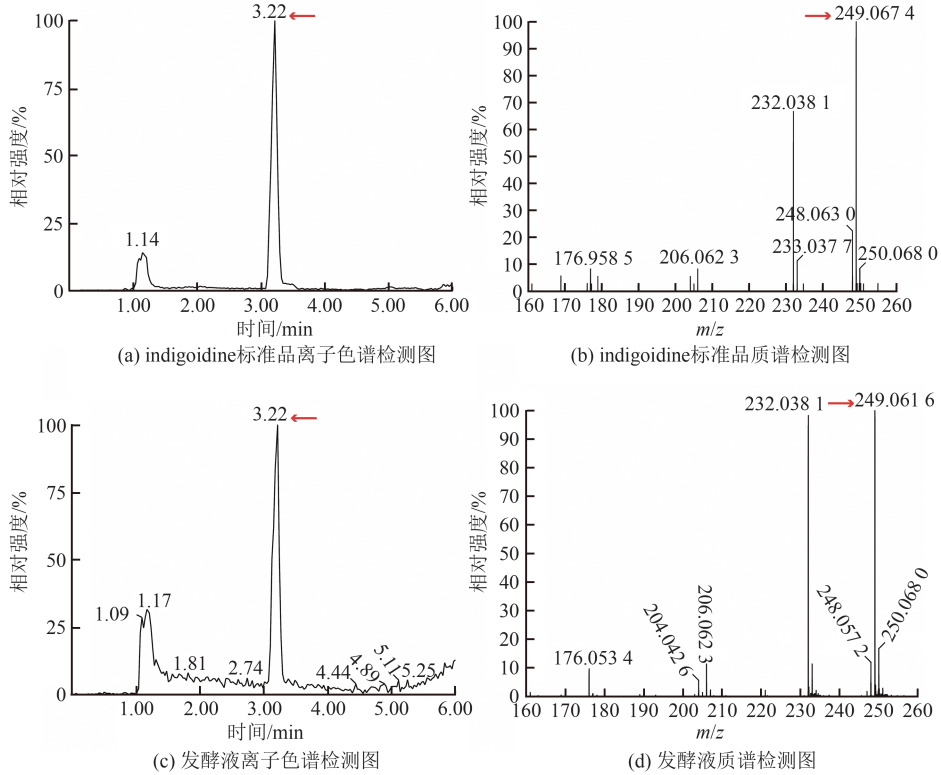
Fig. 2　Indigoidine synthetic pathway in EcN strain

基于文献报道，作者选取了3种不同微生物来源的indigoidine合成酶（BpsA来源于*Streptomyces lavendulae* subsp. *lavendulae*，Sc-indC来源于*Streptomyces chromofuscus* ATCC 49982，Ec-indC来源于*Erwinia chrysanthemi*）和5种不同微生物来源的4’-磷酸泛酸转移酶（sfp1来源于*Bacillus subtilis*，sfp2来源于*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168，sfp3来源于*Bacillus spizizenii*，svp来源于*Streptomyces verticillus* ATCC 15003，pptA来源于*Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032）。通过构建15组重组质粒，完成酶组合筛选，旨在获得高效合成indigoidine的最优酶组合。将上述重组质粒分别转化至菌株EcN02中，在R/2培养基中扩大培养并发酵，测定各菌株的indigoidine合成能力。HPLC检测结果显示，所有改造菌株的发酵液中均出现与indigoidine标准品保留时间一致的特征吸收峰。

进一步通过液相色谱-质谱联用仪（LC-MS）对发酵液产物进行结构鉴定，质谱结果见图3。样品中质荷比（*m*/*z*）为249.067 4的质子化分子离子[M+H]$^+$对应indigoidine质子化形式，其分子式为$C_{10}H_9N_4O_4$，与已报道的indigoidine质谱数据完全一致[20,23]。关键酶组合筛选结果显示，携带重组质粒pTac-*bpsA*-RBS-*sfp2*的菌株EcN04 indigoidine产量最高，为1.08 g/L，见图4。已有研究表明，不同微生物来源的indigoidine合成酶的蛋白质表达水平存在差异，该差异是造成不同菌株indrgoidine产量存在差异的重要原因[23,31]。此外，由于EcN缺乏4’-磷酸泛酸转移酶，无法激活indigoidine合成酶，因此进行酶组合筛选可有效提高indigoidine产量。为了减轻异源重组质粒系统带来的代谢负担，作者将筛选得到的最佳异源酶表达系统的编码基因表达框整合至EcN基因组中。利用CRISPR-Cpf1基因编辑技术，将*bpsA*-RBS-*sfp2*表达框置于tac启动子中，并整合至*manX*位点，获得重组菌株EcN18。将EcN18与含有相应质粒的重组菌株EcN04进行摇瓶发酵培养，见图5。结果表明，菌株EcN18的indigoidine产量为1.05 g/L，与带质粒的菌株EcN04无显著差异，可有效减轻异源重组质粒系统带来的代谢负担。

2.3　indigoidine前体合成途径基因的组合优化

Indigoidine的关键前体物质为谷氨酰胺。EcN菌株以甘油为碳源，通过TCA循环生成α-酮戊二



(a) indigoidine标准品离子色谱检测图　(b) indigoidine标准品质谱检测图

(c) 发酵液离子色谱检测图　(d) 发酵液质谱检测图

图3　indigoidine的检测与鉴定

Fig. 3　Detection and identification of indigoidine

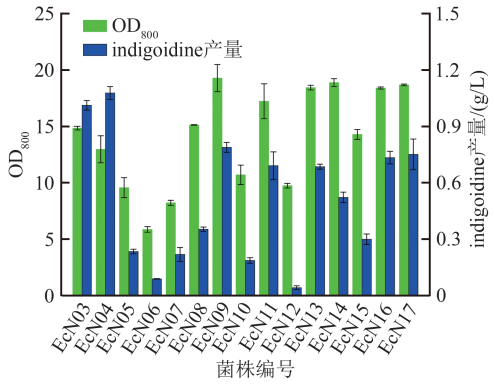


图 4　关键酶模块组合筛选

Fig. 4　Key enzyme module combination screening

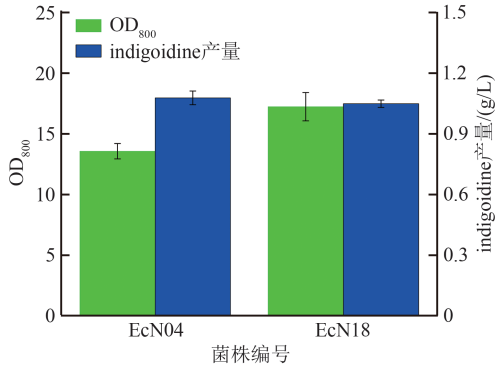


图 5　关键酶模块的基因组整合验证

Fig. 5　Verification of genomic integration of key enzyme module genes

酸（α-KG），再将其转化为谷氨酸，最终得到谷氨酰胺。在该合成路径中，提升 indigoidine 产量的靶点涉及多种催化酶，包括：谷氨酰胺合成酶（GlnA，负责催化谷氨酸转化为谷氨酰胺）、谷氨酸脱氢酶（Gdh，负责催化 α-KG 转化为谷氨酸）、氧戊二酸脱氢酶抑制蛋白（OdhI，负责调控 α-酮戊二酸脱氢酶活性）、丙酮酸激酶（Pyk，负责催化磷酸烯醇式丙酮酸转化为丙酮酸）。其中 α-KG 既是分解代谢枢纽，也是合成代谢靶点。若 α-酮戊二酸脱氢酶（ODH）活性过高，α-KG 会被大量氧化脱羧生成琥珀酰辅酶 A，进入 TCA 循环用于氧化供能；只有当 ODH 活性被适度抑制时，α-KG 才能有效流向谷氨酸和谷氨酰胺合成通路。OdhI 可抑制 α-KG 转化为琥珀酰辅酶 A。具体而言，OdhI 是一种非催化型的调控蛋白，当其处于去磷酸化状态时，能够结合 ODH 的 E1o 亚基并抑制其催化活性，减少 α-KG 向琥珀酰辅酶 A 的转化。该蛋白质共有 3 种突变体：$OdhI^{T14A}$、$OdhI^{T15A}$ 和 $OdhI^{T14A/T15A}$。T14A/T15A 位点突变通过将苏氨酸（Thr）替换为丙氨酸（Ala），致使该蛋白质无法发生磷酸化，而 OdhI 在激活状态（即抑制下游转化状态）下可促进碳通量流向谷氨酸合成路径[32-33]。此外，GlnA 的活性存在负反馈抑制，突变体 $GlnA^{Y405F}$ 可以解除该抑制，促进谷氨酰胺的合成[34]。

基于此，作者构建了携带各种突变体的重组质粒，对基因元件进行模块化组合，并验证其对 indigoidine 产量的提升效果。将上述重组质粒转化至 EcN18 中，获得不同重组菌株，并进行摇瓶发酵，见图 6。结果表明，过表达上述途径酶及相关突变体可有效提升 indigoidine 产量。在 EcN18 菌株中分别过表达途径基因 *glnA* 及其突变体 $glnA^{Y405F}$，indigoidine 产量分别可达 1.24、1.48 g/L，这表明 Y405F 位点突变能够增强谷氨酰胺合成酶 GlnA 的催化活性，进而提高 indigoidine 产量。在 OdhI 及其突变体的相关测试中，T15A 位点突变对 indigoidine 产量的提升效果最显著，而双突变位点并未进一步提高 indigoidine 产量。最终构建的重组菌株 EcN26 的 indigoidine 产量达 1.85 g/L，相较于对照菌株 EcN18 提升了 76.19%。上述结果表明，通过酶突变体的精细化设计与模块化组装，从 α-KG 节点的分配开关、谷氨酰胺合成的反馈抑制以及中心代谢通量拉动这 3 个维度开展协同优化，可强化前体物质供应，促进 indigoidine 合成。

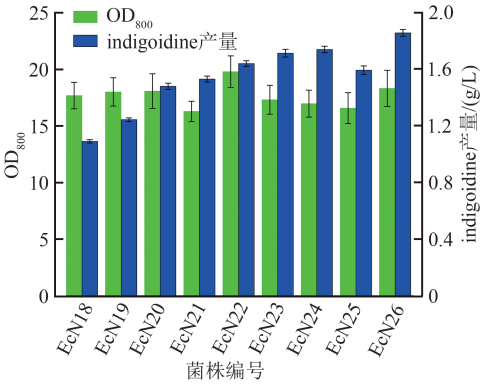


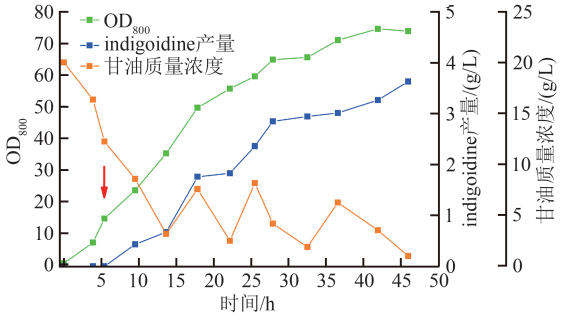
图 6　途径基因组合过表达验证

Fig. 6　Verification through overexpression of pathway gene combinations

2.4　1 L 发酵罐分批补料发酵结果

为验证最终菌株 EcN26 的发酵生产性能，作者将重组质粒 pCO-$glnA^{Y405F}$-$OdhI^{T15A}$-*gdh-pyk* 转化至菌株 EcN18，挑取单菌落进行二级活化后，在 1 L

发酵罐中开展分批补料试验，测试 EcN26 菌株的 indigoidine 合成能力。菌株培养 5.50 h 后 OD_{800} 达 14.6，此时向培养基中添加终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG，同时采用梯度降温方式将发酵温度降至 30 ℃。发酵 13.65 h 后，培养基内甘油质量浓度降至 5 g/L 以下，随即间歇性补加 5 mL 含有 600 g/L 甘油的补料液，将发酵体系中甘油质量浓度维持在 0~10 g/L。如图 7 所示，indigoidine 随甘油的持续消耗不断积累。培养 36.50 h 后，菌体 OD_{800} 超过 70，并稳定维持在 70~80。经过 46.00 h 的分批补料培养，indigoidine 产量达 3.63 g/L，生产强度为 0.079 g/(L·h)。基于本研究结果，后续提升 indigoidine 产量的研究，应从以下 5 个方向开展针对性研究。



(a) 1 L发酵罐分批补料结果

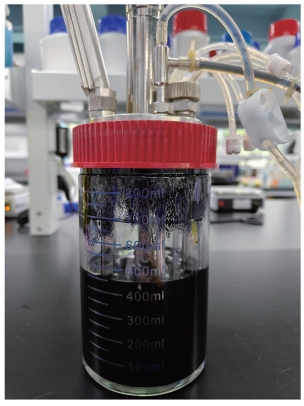

(b) 1 L发酵罐示意图

图 7　发酵罐分批补料验证

Fig. 7　Verification through fed-batch fermentation in a bioreactor

1）拓展碳源利用范围：目前 indigoidine 的生物合成主要依赖葡萄糖、甘油等传统粮食型碳源，开发非粮替代底物是提升 indigoidine 工业化生产潜力的重要方向。圆红冬孢酵母（*Rhodosporidium toruloides*）、海洋弧菌（*Vibrio natriegens*）等非模式微生物可利用高粱木质纤维素水解物、甲酸盐合成 indigoidine，产量分别可达 2.9、29.0 g/L[35-36]。同时，模式微生物利用一碳底物（如甲醇、甲酸盐）的能力持续得到突破，人工改造的大肠杆菌甲基营养型菌株在甲醇中的倍增时间仅为 3.5 h，性能与天然甲基营养型菌株相当。此外，通过适应性实验室进化提升菌株底物耐受性与利用能力以及耦合电化学转化实现 CO_2 固定，均是极具应用前景的研究方向[37]。

2）强化关键辅因子辅酶 A（CoA）的再生能力：辅酶 A 是驱动 indigoidine 合成酶从无活性的脱辅基状态转变为活性全酶形式所必需的底物与激活剂。已有研究表明，向培养基中添加大豆水解物补充 CoA 的前体泛酸，可使菌株 indigoidine 产量提高 3.4 倍，达 1.5 g/L[38]。由于泛酸由丙酮酸合成，研究者可通过代谢工程手段强化菌株内源代谢合成途径以实现泛酸自给自足，无需外源添加，是降低成本的可行策略。

3）开展 indigoidine 的分子修饰：indigoidine 是高附加值蓝色色素，利用分子修饰技术可进一步拓宽其应用范围。通过一锅法催化体系，用卤化酶对 indigo 进行卤化修饰，成功制备 6,6’-二溴靛蓝等衍生物，该合成酶修饰策略同样可应用于 indigoidine 的改造[39]。鉴于 indigoidine 以谷氨酰胺为前体，通过改造前体底物或对产物进行特异性酶修饰，有望创制具有不同特性的新型色素分子。

4）构建无抗生素筛选标记的稳定表达系统：构建稳定且无需抗生素维持的表达体系，是实现目标基因高效、规模化表达的前提。目前该类表达系统已成功应用于大肠杆菌、盐单胞菌等多种微生物，且已广泛用于生物燃料和化学品的生产[40-41]。将该技术应用于 indigoidine 的合成体系，可提高其工业化生产的可行性。

5）基于系统工程提高细胞内色素的积累：透射电子显微镜和扫描电子显微镜观察结果表明，indigoidine 可在大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌等生产菌株的细胞膜表面富集[11,23]。通过靶向细胞分裂、细

胞骨架形成及细胞壁水解相关基因来重塑细菌形态，有望增大细胞比表面积，为色素积累提供更多空间，进而提高 indigoidine 的终产量。

3 结论

以安全性较高的大肠杆菌 Nissle 1917 为出发菌株，通过基因编辑与代谢工程改造构建获得高产 indigoidine 的工程菌株 EcN26，为 indigoidine 的分离纯化与产品应用奠定了基础。作者通过系统代谢工程优化该菌株的代谢网络，显著提升了 indigoidine 的合成能力。所采用的关键改造策略包括：消除隐蔽质粒 pMUT-1 和 pMUT-2、将 indigoidine 合成酶 BpsA 和磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶 Sfp2 整合至大肠杆菌 Nissle 1917 基因组，促使多基因协同强化前体谷氨酰胺的供给。最终获得的工程菌株 EcN26 在 1 L 发酵罐中可生产 3.63 g/L 的 indigoidine。本研究整合了代谢工程、合成生物学和发酵工艺优化等多维技术体系，为 indigoidine 的生物制造提供了可行方案，同时也为开发新型食品着色剂、构建可持续且具备市场竞争力的天然色素替代策略提供了重要支撑。

参考文献

[1] Singh T，Pandey V K，Dash K K，et al. Natural bio-colorant and pigments：sources and applications in food processing[J]. Journal of Agriculture and Food Research，2023，12：100628.

[2] Prabowo C P S，Eun H，Yang D，et al. Production of natural colorants by metabolically engineered microorganisms [J]. Trends in Chemistry，2022，4(7)：608-626.

[3] Borzelleca J F，Capen C C，Hallagan J B. Lifetime toxicity/carcinogenicity study of FD&C Red No.3 (erythrosine) in rats [J]. Food and Chemical Toxicology，1987，25(10)：723-733.

[4] Borzelleca J F，Hallagan J B. Multigeneration study of FD&C Red No.3 (erythrosine) in Sprague-Dawley rats[J]. Food and Chemical Toxicology，1990，28(12)：813-819.

[5] Borzelleca J F，Hallagan J B. Lifetime toxicity/carcinogenicity study of FD & C Red No.3 (erythrosine) in mice[J]. Food and Chemical Toxicology，1987，25(10)：735-737.

[6] Tang Q，Li Z B，Chen N X，et al. Natural pigments derived from plants and microorganisms：classification，biosynthesis，and applications[J]. Plant Biotechnology Journal，2025，23(2)：592-614

[7] Thomsen P T，Nielsen S R，Borodina I. Recent advances in engineering microorganisms for the production of natural food colorants[J]. Current Opinion in Chemical Biology，2024，81：102477.

[8] Peng B Y，Jahanian A，Collier T R，et al. Synthetic biology for sustainable food colourant production：innovations and opportunities[J]. Food Chemistry，2026，503：147749.

[9] Li Z Y，Lu R，Zhang J L，et al. Recent advances on natural pigment indigoidine：occurrence，biosynthetic approaches，and applications [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry，2025，73(30)：18545-18560.

[10] Zhao X M，Leng X，Luo Y Z. Biosynthesis of indigoidine in microorganisms：strategies and applications [J]. ACS Synthetic Biology，2026，15(2)：387-399.

[11] Ghiffary M R，Prabowo C P S，Sharma K，et al. High-level production of the natural blue pigment indigoidine from metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* for sustainable fabric dyes [J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering，2021，9(19)：6613-6622.

[12] Nanjaraj U A N，Hu Y L，Li P W，et al. Cloning and expression of a nonribosomal peptide synthetase to generate blue rose[J]. ACS Synthetic Biology，2019，8(8)：1698-1704.

[13] Yumusak C，Prochazkova A J，Apaydin D H，et al. Indigoidine-biosynthesized organic semiconductor [J]. Dyes and Pigments，2019，171：107768.

[14] Takahashi H，Kumagai T，Kitani K，et al. Cloning and characterization of a *Streptomyces* single module type non-ribosomal peptide synthetase catalyzing a blue pigment synthesis[J]. Journal of Biological Chemistry，2007，282(12)：9073-9081.

[15] Pang B，Chen Y，Gan F，et al. Investigation of indigoidine synthetase reveals a conserved active-site base residue of nonribosomal peptide synthetase oxidases[J]. Journal of the American Chemical Society，2020，142(25)：10931-10935.

[16] 袁天慧，李晗，张怡婷，等. 重组靛蓝色素合成酶快速定量检测 *L*-谷氨酰胺[J]. 食品与生物技术学报，2025，44(4)：163-172.
Yuan T H，Li H，Zhang Y T，et al. Rapid quantitation of *L*-glutamine based on recombined blue pigment synthetase A[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2025，44(4)：163-172.(in Chinese)

[17] Cho J S，Yang D，Prabowo C P S，et al. Targeted and high-throughput gene knockdown in diverse bacteria using synthetic sRNAs [J]. Nature Communications，2023，14：2359.

[18] Xu F C，Gage D，Zhan J X. Efficient production of indigoidine in *Escherichia coli*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology，2015，42(8)：1149-1155.

[19] Wehrs M，Prahl J P，Moon J，et al. Production efficiency of the bacterial non-ribosomal peptide indigoidine relies on the respiratory metabolic state in *S. cerevisiae* [J].

Microbial Cell Factories，2018，17(1)：193.
[20] Eng T，Banerjee D，Menasalvas J，et al. Maximizing microbial bioproduction from sustainable carbon sources using iterative systems engineering[J]. Cell Reports，2023，42(9)：113087.
[21] Zhao M，Zhang X S，Xiong L B，et al. Establishment of an efficient expression and regulation system in *Streptomyces* for economical and high-level production of the natural blue pigment indigoidine[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry，2024，72(1)：483-492.
[22] Yu D Y，Xu F C，Valiente J，et al. An indigoidine biosynthetic gene cluster from *Streptomyces chromofuscus* ATCC 49982 contains an unusual IndB homologue[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology，2013，40(1)：159-168.
[23] Li Z Y，Lu R，Hu H，et al. Pathway optimization and membrane engineering for highly efficient production of indigoidine in engineered *Escherichia coli* [J]. Bioresource Technology，2026，440：133415.
[24] Dong M M，Song L，Xu J Q，et al. Improved cryptic plasmids in probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 for antibiotic-free pathway engineering [J]. Applied Microbiology and Biotechnology，2023，107(16)：5257-5267.
[25] Xu J Q，Yu D，Zhou G Q，et al. Endogenous plasmid engineering of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 for the antibiotic-free indigo production [J]. Dyes and Pigments，2026，246：113314.
[26] Gelfat I. Engineering *E. coli* Nissle 1917 to advance and facilitate its use in biomedical applications [D]. Cambridge：Harvard University，2021：2.
[27] Hu H，Li Z Y，Chen R L，et al. Enhancement of indigo production by a metabolically engineered *Escherichia coli* MG1655 using membrane engineering and two-stage cultivation [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry，2025，73(16)：9782-9792.
[28] Zhu Y Y，Wan L，Meng J W，et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for lacto-*N*-triose II production with high productivity[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry，2021，69(12)：3702-3711.
[29] Zainuddin H S，Bai Y F，Mansell T J. CRISPR-based curing and analysis of metabolic burden of cryptic plasmids in *Escherichia coli* Nissle 1917 [J]. Engineering in Life Sciences，2019，19(6)：478-485.
[30] Lan Y J，Tan S I，Cheng S Y，et al. Development of *Escherichia coli* Nissle 1917 derivative by CRISPR/Cas9 and application for gamma-aminobutyric acid（GABA）production in antibiotic-free system [J]. Biochemical Engineering Journal，2021，168：107952.
[31] Zhang J L，Li Z Y，Lu R，et al. Combinatorial PPTase screening and systematic metabolic engineering for high-level indigoidine production in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Food Bioscience，2026，78：108591.
[32] Ko Y J，You S K，Kim M，et al. Enhanced production of 5-aminolevulinic acid *via* flux redistribution of TCA cycle toward l-glutamate in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering，2019，24(6)：915-923.
[33] Niebisch A，Kabus A，Schultz C，et al. Corynebacterial protein kinase G controls 2-oxoglutarate dehydrogenase activity *via* the phosphorylation status of the OdhI protein [J]. Journal of Biological Chemistry，2006，281(18)：12300-12307.
[34] Tian Z X，Li Q S，Buck M，et al. The CRP-cAMP complex and downregulation of the glnAp2 promoter provides a novel regulatory linkage between carbon metabolism and nitrogen assimilation in *Escherichia coli* [J]. Molecular Microbiology，2001，41(4)：911-924.
[35] Wehrs M，Gladden J M，Liu Y Z，et al. Sustainable bioproduction of the blue pigment indigoidine：expanding the range of heterologous products in *R. toruloides* to include non-ribosomal peptides[J]. Green Chemistry，2019，21(12)：3394-3406.
[36] Tian J Z，Deng W，Zhang Z W，et al. Discovery and remodeling of *Vibrio natriegens* as a microbial platform for efficient formic acid biorefinery [J]. Nature Communications，2023，14：7758.
[37] Liu C X，Zhao J K，Tang H T，et al. Upcycling surplus acetone into long-chain chemicals using a tandem electro-biosystem [J]. Nature Sustainability，2025，8(7)：806-817.
[38] Chen Z Q，Liu W Q，Zhang S Y，et al. Harnessing soybean okara for enhanced microbial production of indigoidine[J]. Bioresource Technology，2025，434：132808.
[39] Li F F，Chen Q，Deng H X，et al. One-pot selective biosynthesis of Tyrian purple in *Escherichia coli*[J]. Metabolic Engineering，2024，81：100-109.
[40] Meng J W，Zhu Y Y，Lu Z，et al. Dual antibiotic-free plasmid systems enable high-efficiency l-fucose biosynthesis [J]. ACS Synthetic Biology，2025，14(4)：1316-1322.
[41] Ji M K，Yang F，Zhang Z N，et al. Production of polyhydroxyalkanoate from acetate by metabolically engineered *Halomonas bluephagenesis*[J]. Chemical Engineering Journal，2025，524：168915.