

• 工业生物技术 •

# 代谢改造重组谷氨酸棒杆菌 C4 途径高效合成 5-氨基乙酰丙酸

王丽君, 闫思翰, 杨套伟, 徐美娟, 张显, 邵明龙, 李华钟, 饶志明

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 214122

王丽君, 闫思翰, 杨套伟, 等. 代谢改造重组谷氨酸棒杆菌 C4 途径高效合成 5-氨基乙酰丙酸. 生物工程学报, 2021, 37(12): 4314-4328.

Wang LJ, Yan SH, Yang TW, et al. Engineering the C4 pathway of *Corynebacterium glutamicum* for efficient production of 5-aminolevulinic acid. Chin J Biotech, 2021, 37(12): 4314-4328.

**摘要:** 5-氨基乙酰丙酸 (5-aminolevulinic acid, 5-ALA) 在医药和农业等领域有着广泛作用, 目前主要采用大肠杆菌或谷氨酸棒杆菌以微生物发酵法合成。为了进一步提高谷氨酸棒杆菌合成 5-ALA 的能力, 对其 C4 代谢途径进行了系统代谢改造。首先分别在谷氨酸棒杆菌中异源表达荚膜红杆菌和沼泽红假单胞菌的 5-氨基乙酰丙酸合成酶 ALAS, 选择酶活相对较高的沼泽红假单胞菌的 *RphemA* 基因作为关键合成酶基因, 并筛选到能显著增强 *RphemA* 的酶活性的核糖体结合位点 RBS5。重组菌株 ALAS 的比酶活可达 (221.87±3.10) U/mg, 且 5-ALA 产量提高了 14.3%; 随后通过敲除  $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶抑制蛋白基因 (*odhI*) 和琥珀酸脱氢酶基因 (*sdhA*), 促进了前体琥珀酰 CoA 向 5-ALA 途径的流动; 通过 sRNA 抑制 *hemB* 表达减少了 5-ALA 的降解; 并且过表达半胱氨酸/O-乙酰丝氨酸转运蛋白 *eamA* 提高了 5-ALA 的输出效率; 使用重组菌株 *C. glutamicum* 13032/ $\Delta odhI/\Delta sdhA$ -sRNA*hemB*-RBS5*RphemA*-*eamA* 摇瓶发酵, 5-ALA 最高产量达 11.90 g/L, 较出发菌株提高了 57%。最后, 在 5 L 发酵罐中进行补料分批发酵, 48 h 内 5-ALA 的产量达 25.05 g/L, 为目前以葡萄糖为碳源发酵的最高产量。本研究构建了高产 5-ALA 重组谷氨酸棒杆菌, 具有良好的工业应用前景。

**关键词:** 谷氨酸棒杆菌, 5-氨基乙酰丙酸, 代谢改造, C4 途径

**Received:** January 18, 2021; **Accepted:** March 8, 2021

**Supported by:** National Key Research and Development Program of China (No. 2018YFA0900300), National Natural Science Foundation of China (No. 31770058), Ningxia Hui Autonomous Region Key Research and Development Program, China (No. 2019BCH01002), National Light Industry Technology and Engineering First-Class Subject Independent Project, China (No. LITE2018-06).

**Corresponding authors:** Huazhong Li. E-mail: hzhli@jiangnan.edu.cn

Zhiming Rao. Tel: +86-510-85916881; E-mail: raozm@jiangnan.edu.cn

国家重点研发计划项目 (No. 2018YFA0900300), 国家自然科学基金 (No. 31770058), 宁夏回族自治区重点研发计划 (No. 2019BCH01002), 国家轻工技术与工程一流学科自主课题 (No. LITE2018-06) 资助。

# Engineering the C4 pathway of *Corynebacterium glutamicum* for efficient production of 5-aminolevulinic acid

Lijun Wang, Sihan Yan, Taowei Yang, Meijuan Xu, Xian Zhang, Minglong Shao, Huazhong Li, and Zhiming Rao

Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

**Abstract:** 5-aminolevulinic acid (5-ALA) plays an important role in the fields of medicine and agriculture. 5-ALA can be produced by engineered *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum*. We systematically engineered the C4 metabolic pathway of *C. glutamicum* to further improve its ability to produce 5-ALA. Firstly, the *hemA* gene encoding 5-ALA synthase (ALAS) from *Rhodobacter capsulatus* and *Rhodospseudomonas palustris* were heterologously expressed in *C. glutamicum*, respectively. The *RphemA* gene of *R. palustris* which showed relatively high enzyme activity was selected. Screening of the optimal ribosome binding site sequence RBS5 significantly increased the activity of RphemA. The ALAS activity of the recombinant strain reached (221.87±3.10) U/mg and 5-ALA production increased by 14.3%. Subsequently, knocking out genes encoding  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase inhibitor protein (*odhI*) and succinate dehydrogenase (*sdhA*) increased the flux of succinyl CoA towards the production of 5-ALA. Moreover, inhibiting the expression of *hemB* by means of sRNA reduced the degradation of 5-ALA, while overexpressing the cysteine/O-acetylserine transporter *eamA* increased the output efficiency of intracellular 5-ALA. Shake flask fermentation using the engineered strain *C. glutamicum* 13032/ $\Delta odhI/\Delta sdhA$ -sRNA*hemB*-RBS5*RphemA*-*eamA* resulted in a yield of 11.90 g/L, which was 57% higher than that of the original strain. Fed-batch fermentation using the engineered strain in a 5 L fermenter produced 25.05 g/L of 5-ALA within 48 h, which is the highest reported-to-date yield of 5-ALA from glucose.

**Keywords:** *Corynebacterium glutamicum*, 5-aminolevulinic acid, metabolic engineering, C4 pathway

5-氨基乙酰丙酸 (5-aminolevulinic acid, 5-ALA) 是四氢吡咯化合物如血红素、叶绿素和维生素 B12 等的共同前体<sup>[1]</sup>, 在医药和农业等方面有着非常重要的作用。在医药行业, 5-ALA 主要被应用于肿瘤定位和多种癌症的光动力诊断治疗等<sup>[2]</sup>。在农业领域, 它被用作一种可生物降解的除草剂、杀虫剂或对作物、动物和人类无毒的生长调节剂<sup>[3]</sup>。针对合成方式而言, 化学合成法存在试剂贵、毒性高、产率低和反应条件苛刻的弊端, 所以环保高效的微生物发酵法逐渐成为主流的生产方式<sup>[4]</sup>。

据报道 5-ALA 有 C4 途径和 C5 途径两种生物合成方式 (图 1), 其中 C4 途径存在于酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*<sup>[5]</sup> 等菌株中, 主要是以 5-磷酸吡哆醛为辅因子, 由甘氨酸和琥珀酰 CoA 通过 5-氨基乙酰丙酸合酶 (ALAS) 缩合形成 5-ALA。5-ALA 生物合成途径目前已在大肠杆菌

*Escherichia coli*<sup>[6]</sup>、谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum*<sup>[7]</sup> 和天蓝色链霉菌 *Streptomyces coelicolor*<sup>[8]</sup> 等模式菌株中成功构建。另一条 C5 途径则存在于 *E. coli* 等菌株中, 主要通过谷氨酰 tRNA 合成酶 GluRS (由 *gltX* 编码), NADPH 依赖的谷氨酰-tRNA-还原酶 HemA (由 *HemA* 编码) 和谷氨酸-1-半醛氨基转移酶 HemL (由 *HemL* 编码) 3 种酶, 以谷氨酸为底物经过 3 步反应生成 5-ALA<sup>[9]</sup>, 但此途径会受终产物血红素的反馈抑制作用<sup>[10]</sup>。Kang 等通过同时表达亚利桑那沙门菌 *Salmonella arizonae* 来源的 *HemA*、*E. coli* 来源的 *HemL* 和 ALA 胞外运输蛋白基因 *rhtA* 构建重组 *E. coli* 工程菌, 可积累 4.13 g/L 的 5-ALA<sup>[11]</sup>。但是, 由于 C5 途径包含以 ATP 和 NADPH 作为辅因子的复杂酶反应, 且依赖于 tRNA-Glu 合成酶, 与能量代谢、氧化还原状态和蛋白质合成的复杂关系使菌株改良变得困难。而 C4 途径只需在 *E. coli*

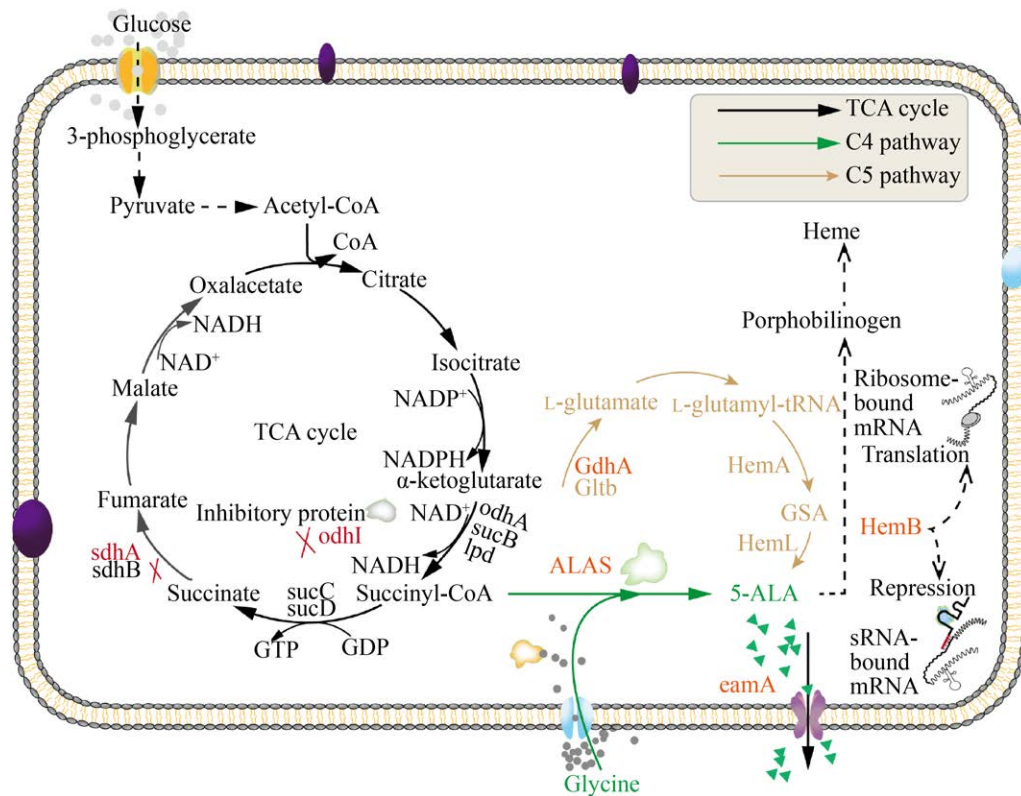


图1 代谢工程化谷氨酸棒杆菌从葡萄糖中生物合成 5-ALA 的示意图

Fig. 1 Schematic illustration of the biosynthesis of 5-ALA by metabolically engineered *C. glutamicum* from glucose.

中过表达 ALAS 即可合成 5-ALA, 易于进一步优化改造, 得到了更多的关注和研究<sup>[12-13]</sup>。*C. glutamicum* 作为 GRAS 菌株是生产 5-ALA 的理想宿主, Yang 等<sup>[7]</sup>构建了利用 C4 途径合成 5-ALA 的重组 *C. glutamicum*, 运用分批补料发酵和两阶段发酵策略优化 5-ALA 的合成, 产量达 14.7 g/L, 生产率 0.92 g/(L·h), 为迄今为止报道的 *C. glutamicum* 以葡萄糖为碳源合成 5-ALA 的最高产率。Chen 等<sup>[14]</sup>则进一步使用酶水解的木薯蔗渣代替葡萄糖作为碳源使碳源成本降低了 90.1%, 5-ALA 产量增加到了 18.5 g/L。另外, 弱化 5-ALA 下游代谢路径, 减少胆色素原 (Porphobilinogen, PBG) 产生的策略可解决 5-ALA 在发酵后期易被消耗合成血红素<sup>[15-16]</sup>的问题, 可进一步促进 5-ALA 的积累。

本研究系统地改造 *C. glutamicum* ATCC13032

来高效合成 5-ALA, 将荚膜红杆菌 *Rhodobacter capsulatus* 和沼泽红假单胞菌 *Rhodospseudomonas palustris* 来源的 ALAS 基因 *hemA* 在 *C. glutamicum* ATCC13032 中分别进行异源表达, 选取酶活相对较高的 *RphemA* 作为关键合成酶; 敲除 TCA 循环中关键基因促进 5-ALA 途径通量, 通过 sRNA<sup>[17]</sup> 抑制调控 5-ALA 降解途径的第一个关键酶 5-ALA 脱水酶 (ALAD, 由 *hemB* 编码) 的表达, 并过表达 5-ALA 转运蛋白 *eamA* 进一步提高 5-ALA 的产量。本研究为 *C. glutamicum* 5-ALA 高产菌株的工业应用奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 主要试剂

琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、小量质粒提

取试剂盒均购于上海捷瑞生物工程有限公司；同源重组酶克隆试剂盒 (ClonExpress II One Step Cloning Kit) 购自南京诺维赞生物科技有限公司；*EcoR* I 和 *Hind* III 等限制性内切酶购自 TaKaRa 公司。另外硫酸卡那霉素 (Kan) 和氯霉素 (Chl) 等抗生素、溶菌酶、异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 及核酸染料等试剂均购自上海生工生物工程股份有限公司；脑心肉汤培养基 (Brain Heart Infusion Broth) 购自青岛海博生物技术有限公司；玉米浆购自阿拉丁公司，葡萄糖、甘氨酸、冰醋酸、高氯酸和乙酰丙酮等分析纯试剂购自国药集团化学试剂有限公司。

### 1.1.2 菌株、质粒和培养基

野生型 *C. glutamicum* ATCC13032、大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3) 和质粒 pXMJ19、pK18mobsacB (pK18) 均为实验室保藏。本研究中构建的菌株命

名见表 1，质粒说明见表 2。

LB 培养基 (g/L): 酵母粉 5, 蛋白胨 10, NaCl 10 (固体培养基加入 1.5%–2.0% 的琼脂粉)。

脑心肉汤 (BHI) 培养基: 称取成品粉末 38.5 g, 搅拌溶解于 1 000 mL 蒸馏水中 (固体培养基加入 1.5%–2.0% 的琼脂粉)。

*C. glutamicum* 感受态培养基: 每 100 mL BHI 培养基中加入 3 g 甘氨酸以及 100  $\mu$ L 吐温-80 混匀。

*C. glutamicum* 摇瓶发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 140,  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  1.0,  $MgSO_4$  0.6, 玉米浆 5,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.002,  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$  0.002, 尿素 7.0 (pH 7.0)。

*C. glutamicum* 5 L 发酵罐培养基 (g/L): 葡萄糖 125,  $(NH_4)_2SO_4$  20,  $KH_2PO_4$  2.0,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5, 玉米浆 50,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.02,  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$  0.02, 尿素 1.0 (pH 6.5)。

表 1 文中所用菌株

Table 1 Strains used in this study

Strains	Abbreviation	Illustration
<i>C. glutamicum</i> /pXMJ19	CA0	Harboring with plasmid of pXMJ19
<i>C. glutamicum</i> /pXMJ19- <i>RchemA</i>	CA1	Harboring with plasmid of pXMJ19- <i>RchemA</i>
<i>C. glutamicum</i> /pXMJ19- <i>RphemA</i>	CA2	Harboring with plasmid of pXMJ19- <i>RphemA</i>
<i>C. glutamicum</i> /pXMJ19-RBS2 <i>RphemA</i>	CA3	Harboring with plasmid of pXMJ19-RBS2 <i>RphemA</i>
<i>C. glutamicum</i> /pXMJ19-RBS3 <i>RphemA</i>	CA4	Harboring with plasmid of pXMJ19-RBS3 <i>RphemA</i>
<i>C. glutamicum</i> /pXMJ19-RBS5 <i>RphemA</i>	CA5	Harboring with plasmid of pXMJ19-RBS5 <i>RphemA</i>
<i>C. glutamicum</i> /pXMJ19-RBS8 <i>RphemA</i>	CA6	Harboring with plasmid of pXMJ19-RBS8 <i>RphemA</i>
<i>C. glutamicum</i> - $\Delta$ <i>odhI</i>	C7	Knocking out <i>odhI</i>
<i>C. glutamicum</i> - $\Delta$ <i>gdhA</i>	C8	Knocking out <i>gdhA</i>
<i>C. glutamicum</i> - $\Delta$ <i>sdhA</i>	C9	Knocking out <i>sdhA</i>
<i>C. glutamicum</i> - $\Delta$ <i>odhI</i> $\Delta$ <i>gdhA</i>	C10	Knocking out <i>odhI</i> and <i>gdhA</i>
<i>C. glutamicum</i> - $\Delta$ <i>odhI</i> $\Delta$ <i>sdhA</i>	C11	Knocking out <i>odhI</i> and <i>sdhA</i>
<i>C. glutamicum</i> - $\Delta$ <i>odhI</i> -pXMJ19- <i>RphemA</i>	CA7	Harboring with plasmid of pXMJ19- <i>RphemA</i> in C7
<i>C. glutamicum</i> - $\Delta$ <i>gdhA</i> -pXMJ19- <i>RphemA</i>	CA8	Harboring with plasmid of pXMJ19- <i>RphemA</i> in C8
<i>C. glutamicum</i> - $\Delta$ <i>sdhA</i> -pXMJ19- <i>RphemA</i>	CA9	Harboring with plasmid of pXMJ19- <i>RphemA</i> in C9
<i>C. glutamicum</i> - $\Delta$ <i>odhI</i> $\Delta$ <i>gdhA</i> -pXMJ19- <i>RphemA</i>	CA10	Harboring with plasmid of pXMJ19- <i>RphemA</i> in C10
<i>C. glutamicum</i> - $\Delta$ <i>odhI</i> $\Delta$ <i>sdhA</i> -pXMJ19- <i>RphemA</i>	CA11	Harboring with plasmid of pXMJ19- <i>RphemA</i> in C11
<i>C. glutamicum</i> /pXMJ19- <i>RphemA</i> - <i>eamA</i>	CA12	Harboring with plasmid of pXMJ19- <i>RphemA</i> - <i>eamA</i>
<i>C. glutamicum</i> /pXMJ19- <i>hemB</i>	CA13	Harboring with plasmid of pXMJ19- <i>hemB</i>
<i>C. glutamicum</i> /pXMJ19-sRNA <i>hemB</i> -RBS5 <i>RphemA</i>	CA15	Harboring with plasmid of pXMJ19-sRNA <i>hemB</i> -RBS5 <i>RphemA</i>
<i>C. glutamicum</i> - $\Delta$ <i>odhI</i> $\Delta$ <i>sdhA</i> -sRNA <i>hemB</i> -RBS5 <i>RphemA</i> - <i>eamA</i>	CA16	Harboring with plasmid of pXMJ19-sRNA <i>hemB</i> -RBS5 <i>RphemA</i> - <i>eamA</i> in C11

表 2 文中所用质粒

Table 2 Plasmids used in this study

Plasmids	Illustration
pXMJ19	Expression plasmid; Ptac promoter
pK18mobsacB (pK18)	Integration plasmid of <i>C. glutamicum</i>
pXMJ19- <i>RchemA</i>	Express the gene of <i>RchemA</i>
pXMJ19- <i>RphemA</i>	Express the gene of <i>RphemA</i>
pXMJ19-RBS2 <i>RphemA</i>	RBS2 replace the RBS sequence of pXMJ19- <i>RphemA</i>
pXMJ19-RBS3 <i>RphemA</i>	RBS3 replace the RBS sequence of pXMJ19- <i>RphemA</i>
pXMJ19-RBS5 <i>RphemA</i>	RBS5 replace the RBS sequence of pXMJ19- <i>RphemA</i>
pXMJ19-RBS8 <i>RphemA</i>	RBS8 replace the RBS sequence of pXMJ19- <i>RphemA</i>
pK18- $\Delta$ <i>odhI</i>	Knock out the gene of <i>odhI</i>
pK18- $\Delta$ <i>gdhA</i>	Knock out the gene of <i>gdhA</i>
pK18- $\Delta$ <i>sdhA</i>	Knock out the gene of <i>sdhA</i>
pXMJ19- <i>RphemA-eamA</i>	Tandem expression the gene of <i>eamA</i> on plasmid of pXMJ19- <i>RphemA</i>
pXMJ19- <i>hfq</i>	Express the gene of <i>hfq</i>
p0	Synthetic plasmid containing micc sequence and T7 terminator
pXMJ19-sRNA <i>hemB</i> -RBS5 <i>RphemA</i>	Inhibit the recombinant plasmid of pXMJ19-RBS5 <i>RphemA</i> with sRNA
pXMJ19- <i>hemB</i>	Express the gene of <i>hemB</i>
pXMJ19-sRNA <i>hemB</i> -RBS5 <i>RphemA-eamA</i>	Tandem expression the gene of <i>eamA</i> on plasmid of pXMJ19-sRNA <i>hemB</i> -RBS5 <i>RphemA</i>

### 1.1.3 PCR 引物设计

本研究中 PCR 扩增所用引物由苏州金唯智生物公司合成，序列见表 3。

## 1.2 方法

### 1.2.1 不同来源 ALAS 重组菌株的构建及表达

将 *R. capsulatus* 来源的基因 *RchemA* (GenBank: KU687108.1) 序列和 *R. palustris* 来源的基因 *RphemA* (GenBank: AY489 557.1) 序列由苏州金唯智生物有限公司进行合成。以合成含有目的基因的重组质粒为模板，分别使用引物 *RchemA*-F、*RchemA*-R 和 *RphemA*-F、*RphemA*-R，通过 PCR 扩增获得目的基因片段，与经过 *Hind* III 和 *EcoR* I 双酶切载体 pXMJ19 后的线性化产物进行同源重组连接，并转化 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞。从转化平板挑取形态大小均一的单菌落作为模板进行菌落 PCR 验证，并将验证呈阳性的转化子在 LB 培养基 (Chl 终浓度为 15  $\mu$ g/mL) 中培养 12 h 后，使用小量质粒提取试剂盒提取质粒 pXMJ19-*RchemA*、

pXMJ19-*RphemA* 送至苏州金唯智生物科技有限公司测序。测序成功后将质粒分别以电穿孔法转化 *C. glutamicum* ATCC13032 感受态细胞，并验证筛选正确的阳性转化子，送苏州金唯智生物科技有限公司测序验证。

将验证正确的菌株在 BHI 固体平板上分别划线活化并挑取单菌落接入含有 Chl (15  $\mu$ g/mL) 抗性的 10 mL BHI 培养基中，30  $^{\circ}$ C、180 r/min 振荡培养 18 h 后以 1% 的接种量转接入 50 mL BHI 培养基中继续培养 4–5 h，待  $OD_{600}$  达到 0.6–0.8 时加入 0.5 mmol/L IPTG，16  $^{\circ}$ C、180 r/min 继续培养 12 h 后，于 4  $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 20 min。菌体收集后用 100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5) 洗涤 2 次，加入终浓度 10 mg/mL 的溶菌酶冰上静置 2 h 后进行超声波破碎 (工作 2 s，间隔 5 s，破碎 30–40 min)。将破碎液于 4  $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 30 min，取上清液即为 ALAS 粗酶液，之后进行酶活力测定及分析。



### 1.2.2 *C. glutamicum* 基因缺失突变株的构建

*C. glutamicum* 基因敲除采用敲除质粒 pK18mobsacB<sup>[18]</sup>。以 *C. glutamicum* ATCC13032 基因组为模板, 分别利用 *odhI-1/odhI-2* 和 *odhI-3/odhI-4* 引物扩增完整的 *odhI* 基因及其上下游部分片段(含启动子序列)的 *odhI1* 和 *odhI2* 基因片段。然后以 *odhI1* 和 *odhI2* 基因片段为模板, 利用 *odhI-1/odhI-4* 引物扩增出缺失型  $\Delta odhI$  基因片段。纯化回收后的  $\Delta odhI$  基因片段与 pK18 质粒酶切后获得的线性化产物利用 DNA 连接酶连接, 将连接产物使用化学转化法导入 *E. coli* BL21 感受态细胞, 于 Kan 抗性平板培养, 挑取单菌落转接至 LB 培养基, 取菌液抽提重组质粒, 并分别作为模板进行 PCR 扩增验证, 将验证成功的重组质粒送至苏州金唯智生物科技有限公司测序以确认重组质粒 pK18- $\Delta odhI$  构建成功。

随后将确认后的重组质粒 pK18- $\Delta odhI$  以电穿孔法转化 *C. glutamicum* ATCC13032 感受态细胞, 培养 2 h 后涂布于 Kan 抗性的 BHI 平板, 30 °C 振荡培养 36–48 h 进行第一轮筛选, 挑取转化子在 Kan 抗性 BHI 平板划线, 30 °C 培养 24 h 后挑取单菌落于含有 Kan (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的液体 BHI 培养基继续培养 12 h, 吸取 100  $\mu\text{L}$  培养液涂布于含有 10% 蔗糖的 BHI 无抗固体培养基上, 进行第二轮筛选, 随机挑取在蔗糖平板上生长的转化子进行 PCR 鉴定, 筛选得到 *odhI* 缺失菌株 C7, 提取基因组后再次进行 PCR 验证并送至苏州金唯智生物科技有限公司测序以确认基因 *odhI* 被成功敲除。

其他基因敲除菌株 C8、C9、C10、C11 的构建与上述方法类似。将质粒 pXMJ19-*RphemA* 分别以电穿孔法转化入菌株 C7–C11 中, 获得重组菌株 CA7–CA11。

### 1.2.3 ALAS 酶活检测

ALAS 酶活反应体系为 100 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 200 mmol/L 甘氨酸, 0.2 mmol/L 琥珀酰 CoA, 0.1 mmol/L 磷酸吡哆醛和适量的粗酶。37 °C 温浴

10 min 后添加 10% (V/V) 三氯乙酸终止反应, 用 Ehrlich's 试剂显色法 (1 g 对二甲氨基苯甲醛与 8 mL 的 70% 的高氯酸用冰乙酸定容至 50 mL) 测定上清液 5-ALA 的浓度。以牛血清蛋白作为标准品, 采用 Bradford 方法测定蛋白质浓度<sup>[19]</sup>。酶活则定义为: 37 °C 下每分钟催化形成 1 nmol 5-ALA 的酶量为 1 U。

### 1.2.4 摇瓶发酵验证

将保存于 -80 °C 的菌种在 BHI 平板上划线活化, 从活化平板上挑取单菌落接入含有 Chl (15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 抗性的 10 mL BHI 液体培养基, 于 180 r/min、30 °C 培养 24 h, 然后以 1% 的接种量转接入 10 mL 含有相同浓度抗生素的种子培养基培养, 220 r/min、30 °C 过夜培养 24 h, 后以 10% 的接种量转接入 50 mL 发酵培养基 (Chl 浓度 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 发酵并且添加浓度为 0.5 mmol/L 诱导剂 IPTG 诱导表达。发酵控制温度为 30 °C, 转速为 220 r/min, 并且以 25%–30% 的氨水维持发酵过程 pH 为 6.5。转接之后补加 10 mg/mL 的甘氨酸进入发酵培养基。

### 1.2.5 代谢物检测方法

5-ALA 检测方法: 400  $\mu\text{L}$  稀释后的发酵液加入 200  $\mu\text{L}$  乙酸钠缓冲液 (pH 4.6), 然后加入 100  $\mu\text{L}$  乙酰丙酮, 于沸水中煮沸 15 min, 冷却至室温后加 700  $\mu\text{L}$  Ehrlich's 试剂, 显色 20 min 后于 554 nm 波长测定吸光度<sup>[20]</sup>。

葡萄糖分析方法: 采用山东省科学院生产的 SBA-40C 生物传感分析仪进行检测。

有机酸的检测方法: 高效液相色谱 (HPLC) 法检测琥珀酸, 液相色谱仪为安捷伦 1260, 色谱柱为 BIO-RAD Aminex<sup>®</sup> HPX-87H Column 300 mm $\times$ 7.8 mm, 流动相为 5 mmol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 流速为 0.4 mL/min, 柱温为 65 °C<sup>[21]</sup>。

### 1.2.6 通过核糖体结合位点工程优化 ALAS

核糖体结合位点 (Ribosome-binding site, RBS) 工程可有效调节基因的表达水平。为进一



步提高 5-ALA 的产量,本研究采用 RBS 工程策略调控 ALAS 的表达水平。筛选了 4 个较优的 RBS 序列 (RBS2: 5'-AAAGGAGGTTGTC-3'; RBS3: 5'-GAAAGGAGA-3'; RBS5: 5'-TCTTAATCATGC TGGGGAGGGTTTCTAATG-3'; RBS8: 5'-AAAG GCTGGAATT-3')<sup>[14]</sup>替代原始序列 (5'-AAAGGAG GGAAATC-3'),以优化 ALAS 的表达水平。按照 1.2.1 的方法在 *RphemA* 基因前替换不同的 RBS 序列以构建不同的重组菌株 CA3-CA6。再按照 1.2.3 和 1.2.4 的方法分别检测酶活并进行摇瓶水平验证。

使用引物 *RphemA-eamA*-1 和 *RphemA-eamA*-2 以质粒 pXMJ19-*RphemA* 为模板扩增 *RphemA* 基因片段;再使用引物 *eamA*-F 和 *eamA*-R 以 *E. coli* BL21 基因组为模板 PCR 扩增获得 5'端含有 Ptac 启动子序列的 *eamA* 基因片段,将上述两个片段进行融合 PCR 后获得串联目的基因片段,按照 1.2.1 的方法构建重组菌株 CA12。

### 1.2.7 sRNA 的设计及 ALAD 酶活检测

本研究中的 sRNA 结构包含 H11F 启动子、24 bp (*hemB*) mRNA 靶向结合序列、骨架序列和转录终止序列 4 个元件<sup>[22]</sup>,同时将 *E. coli* 来源的

*hfq* 蛋白与上述 sRNA 串联表达构建 pXMJ19-sRNA*hemB* 重组质粒来调控 *C. glutamicum hemB* 基因的表达<sup>[23]</sup>,以促进 5-ALA 的产量。mRNA 靶向结合序列经软件 <http://mfold.rna.albany.edu> 进行脱靶率计算后生成。

使用引物 p19-*hfq*-F1 和 p19-*hfq*-R1,以 *E. coli* BL21 基因组为模板扩增获得 *hfq* 基因,按照 1.2.1 的方法构建获得重组质粒 pXMJ19-*hfq*;以重组质粒 p19-*hfq* 为模板使用引物 p19-*hfq*-F1 和 end-p19-*hfq*-R 扩增获得 *hfq*-terminator 序列 (图 2 Fragment 1)。同时以合成的质粒 p0 为模板用引物 p19-ssRNA (*hemB*)-F2 和 p19-ssRNA (*hemB*)-R2 获得 24 bp 的 (*hemB*) mRNA 靶向结合序列、骨架序列以及转录终止序列;再以此目的片段为模板使用引物 H11F-sRNA*hemB*-F3 和 p19-ssRNA (*hemB*)-R2 进行扩增,在 5'端添加 H11F 高强度启动子序列,得到图 2 的 Fragment 2。然后将上述两个片段进行重叠延伸 PCR 获得 sRNA 目的片段 (图 2 Fragment 3),以 Fragment 3 为模板使用引物 p19-*hfq*-H11F-miccF4 和 p19-*hfq*-H11F-miccR4 扩增得到含同源臂的 sRNA 目的片段,同时用引物

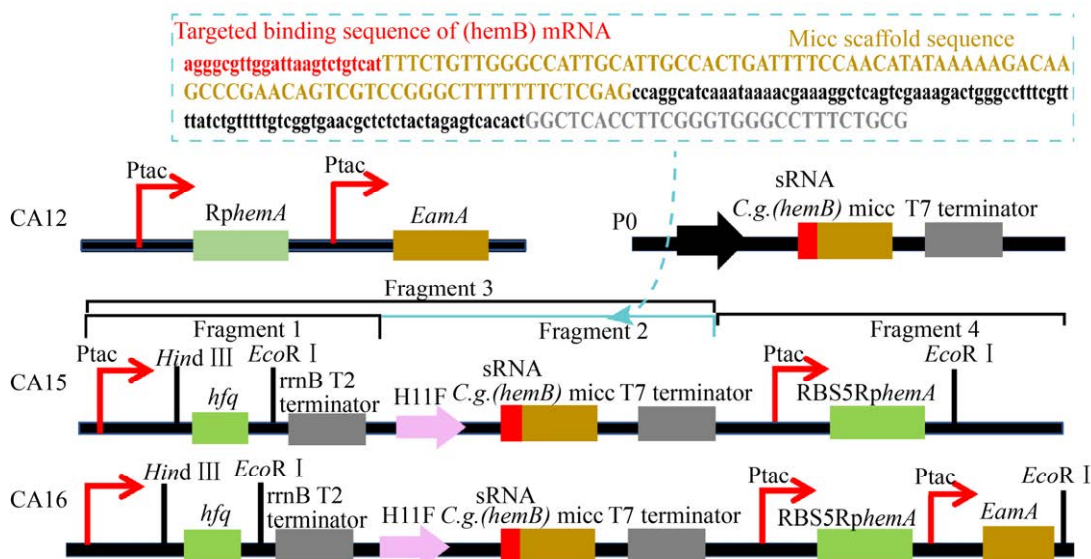


图 2 重组菌株 CA12、CA15 和 CA16 构建过程

Fig. 2 The construction process of recombinant strains CA12, CA15 and CA16.



RBS5*RphemA*-*hfq*-H11F-*micc*-F5 和 RBS5*RphemA*-*hfq*-H11F-*micc*-R5 以重组质粒 pXMJ19-RBS5*RphemA* 为模板扩增获得整个线性化质粒 (图 2 Fragment 4)。最后将含同源臂的 sRNA 目的片段和 pXMJ19-RBS5*RphemA* 线性化质粒片段进行同源重组连接, 将获得的产物使用化学转化法导入感受态细胞 *E. coli* BL21, 同方法 1.2.1 验证并确认成功后将菌株命名为 BL21-pXMJ19-sRNA*hemB*-RBS5*RphemA*, 将构建获得的质粒电转化 *C. glutamicum* ATCC13032, 获得验证正确的菌株即为 CA15。使用引物 *hemB*-F 和 *hemB*-R, 以 *C. glutamicum* ATCC13032 基因组为模板扩增出 *hemB* 基因片段, 同方法 1.2.1 构建 pXMJ19-*hemB* 质粒, 将其电转化 *C. glutamicum* ATCC13032 获得菌株 CA13。

ALAD 酶活的测定: 反应体系 (500  $\mu$ L) 包含 430  $\mu$ L 粗酶液, 5 mmol/L 5-ALA, 1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 50  $\mu$ mol/L ZnCl<sub>2</sub>, 50 mmol/L 磷酸钾溶液。反应以加入终浓度 5 mmol/L 的 5-ALA 为起始。于 37  $^{\circ}$ C 振荡反应 10 min 后, 加入等体积的 10% (V/V) 三氯乙酸溶液终止反应。8 000 r/min 离心 10 min, 取上清液至干净的离心管, 与等体积改良的 Ehrlich's 试剂混合, 静置 25 min 后显色稳定, 于 554 nm 测得其吸光值, 对照标准曲线计算对应产物 PBG 的含量<sup>[24]</sup>。

酶活定义: 37  $^{\circ}$ C 条件下, 每小时产生 1 nmol PBG 所需的酶量定义为一个酶活力单位 (1 U)。

### 1.2.8 5 L 发酵罐发酵条件

使用引物 P19-*RpeA*-F 和 P19-*RpeA*-R, 以质粒 pXMJ19-sRNA*hemB*-RBS5*RphemA* 为模板反向 PCR 扩增获得线性化质粒片段, 再用引物 Ptac-*eamA*-F 和 Ptac-*eamA*-R 以菌株 CA12 的重组质粒为模板扩增得到 Ptac-*eamA* 片段, 将 2 个基因片段使用同源重组酶克隆试剂盒进行连接, 将连接产物用化学热激转化法转化 *E. coli* BL21 感受态细胞, 验证成功构建重组菌株 BL21/pXMJ19-sRNA*hemB*-

RBS5*RphemA*-*eamA* 之后, 对其进行培养并取菌液提取质粒 pXMJ19-sRNA*hemB*-RBS5*RphemA*-*eamA*, 电穿孔法转化基因敲除菌株 C11, 获得重组菌株 CA16。将活化的菌株接入 20 mL 种子培养基, 而后转入发酵培养基, 30  $^{\circ}$ C、180 r/min 振荡培养 20–22 h 之后, 将发酵液转入含有 2 L 发酵培养基的 5 L 发酵罐, 30  $^{\circ}$ C 发酵, OD<sub>600</sub> 为 40 左右时加入终浓度为 0.1 mmol/L IPTG 诱导, 并加入终浓度为 4 g/L 的甘氨酸溶液, 于 30  $^{\circ}$ C 继续发酵 72 h。具体发酵条件为: 发酵前期控制 30% 溶氧, 用 25% 的氨水维持 pH 6.5, 24 h 后控制 10% 的溶氧, 同时调整发酵罐 pH 使其维持在 6.0。发酵过程流加 200 g/L 的甘氨酸和 800 g/L 的葡萄糖溶液。

## 2 结果与分析

### 2.1 ALAS 重组菌株的构建与优化

#### 2.1.1 不同来源的 ALAS 重组菌株的构建

按照 1.2.1 的方法在 *C. glutamicum* ATCC13032 中过表达 *RchemA* 和 *RphemA* 基因, 构建 5-ALA 生产菌株。首先在基因合成完成后通过 PCR 扩增获得 *hemA* 基因片段, PCR 结果如图 3A 和 3B 所示, *RchemA* 基因片段长度为 1 203 bp, *RphemA* 基因长度为 1 230 bp, 目的条带大小与预期一致。PCR 产物与载体 pXMJ19 连接转化获得转化子, 并将菌落 PCR 验证正确的转化子提取质粒送样测序, 最终确认成功构建重组质粒 pXMJ19-*RchemA* 和 pXMJ19-*RphemA*。分别将上述重组质粒以电穿孔法转化 *C. glutamicum* ATCC13032, 挑取转化子菌落 PCR 验证结果如图 3C 所示, 送样测序验证, 最终确认构建成功的菌株命名为 CA1 和 CA2。

按照 1.2.3 的方法检测重组菌株 CA0、CA1 和 CA2 的酶活, 结果如表 4 所示, 相同条件下菌株 CA2 比酶活可达 (158.80 $\pm$ 4.08) U/mg, 有较高的酶活力。进一步进行摇瓶发酵验证结果如图 4 所示, 菌株 CA1 在 66 h 的 5-ALA 积累量最高为 7.10 g/L, 而 CA2 菌株的最大产量在 66 h 为 7.58 g/L,

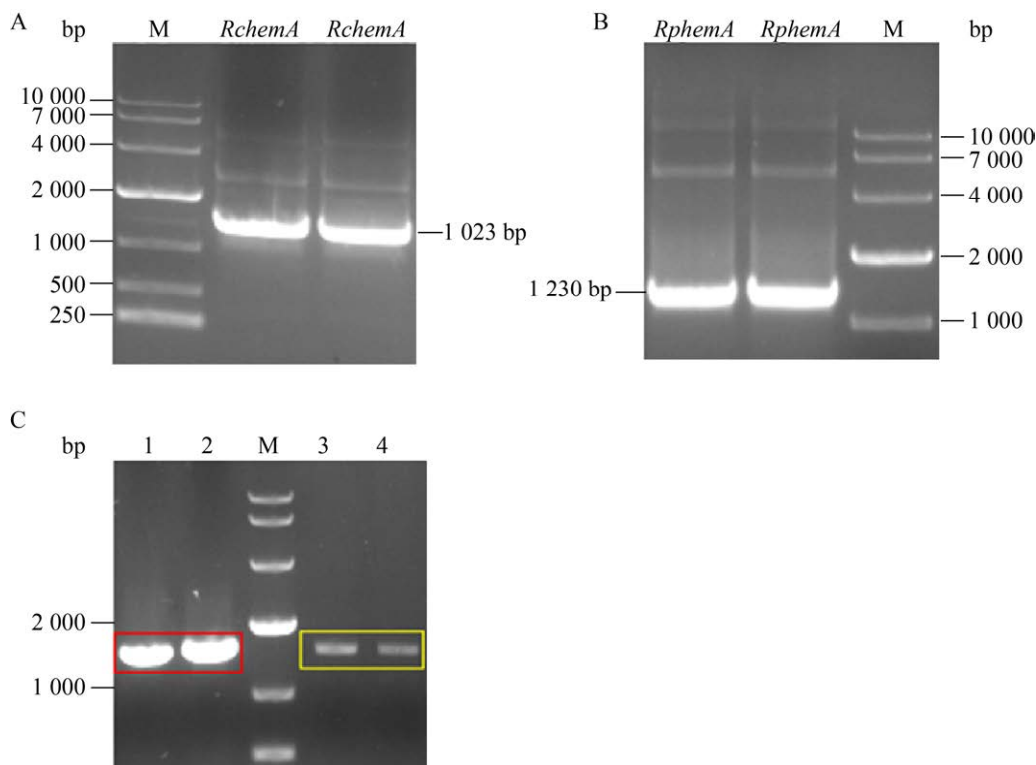


图 3 *RchemA* 和 *RphemA* 基因的克隆 (A, B) 和在 CA 中转化子的菌落 PCR 验证图 (C)

Fig. 3 The amplification of *RchemA* and *RphemA* gene (A, B) and colony PCR verification in *C. glutamicum* ATCC13032 (C). 1–2: CA1; M: DL10 000 marker; 3–4: CA2.

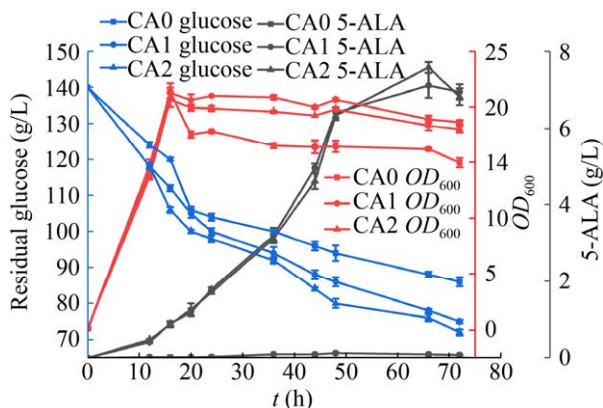


图 4 不同菌株从葡萄糖通过一步发酵生产 5-ALA

Fig. 4 One-step fermentative production of 5-ALA from glucose using strains CA0, CA1 and CA2.

表 4 重组菌株 ALAS 比酶活

Table 4 Specific ALAS activity of recombinant strains

Recombinant strains	Specific ALAS activity (U/mg)
CA0	9.13±0.32
CA1	131.68±2.34
CA2	158.80±4.08

相比于 CA1 高 6.76%。在 66 h, CA2 也相对消耗更多的葡萄糖, 剩余含量为 80 g/L。而底物葡萄糖的添加量是 140 g/L, 即 CA2 在 66 h 内的单位糖耗产 5-ALA 的量为 0.12 g/h。

综上, 我们选择 *RphemA* 进行深入的研究, 以提高生产效率并生产更多的 5-ALA。

### 2.1.2 通过 RBS 工程优化 ALAS 表达

按照 1.2.6 的方法构建菌株, 获得 4 株不同的重组菌株 CA3、CA4、CA5、CA6, 并测定相应的 ALAS 酶活, 结果如表 5 所示, CA3、CA5、CA6 三个菌株在粗提物中表现出更高的 ALAS 活性, 菌株 CA5 活性最高, 比酶活为 (221.87±3.10) U/mg, 比对照 CA2 菌株 (158.80±4.08) U/mg 提高 39.71%; 然而 CA4 菌株的比酶活较对照菌株低 16.19%。同时对上述菌株进行摇瓶验证, 结果如图 5 所示, 菌株首先主要消耗葡萄糖用于生长, 在 20 h 左右细胞  $OD_{600}$  值达到最高, 之后葡萄糖的消耗速率下

表 5 不同 RBS 序列重组菌株 ALAS 相对比酶活  
Table 5 Specific ALAS activity of recombinant strains with different RBS sequences

Recombinant strains	Specific ALAS activity (U/mg)
CA2	158.80±4.08
CA3	177.68±2.34
CA4	133.09±1.10
CA5	221.87±3.10
CA6	186.80±1.78

降, 5-ALA 也逐渐开始加速积累。如图 5B 所示, CA5 摇瓶发酵 5-ALA 积累量最高, 可达 9.47 g/L, 比原始菌株 CA2 提高了 24.93%。这表明核糖体结合位点 (RBS) 工程可优化 ALAS 表达, 且 RBS5 显示出了较高的 ALAS 表达水平, 促进 5-ALA 的合成。

## 2.2 5-ALA 代谢流的强化

### 2.2.1 增加前体琥珀酰 CoA 的供给

按照 1.2.2 的方法构建敲除菌株, 分别得到敲除

$\alpha$ -酮戊二酸 ( $\alpha$ -KG) 脱氢酶抑制蛋白 (*odhI*) 基因, 敲除 NADP 特异性谷氨酸脱氢酶 (*gdhA*) 基因, 敲除琥珀酸脱氢酶 (*sdhA*) 基因的菌株 C7、C8、C9 以及同时敲除 *odhI* 和 *gdhA* 两个基因的菌株 C10 和同时敲除 *odhI* 和 *sdhA* 的菌株 C11。再按照 1.2.1 的方法分别在上述菌株中过表达基因 *RphemA*, 获得菌株 CA7、CA8、CA9、CA10 和 CA11。对 CA7、CA8、CA10 三株菌株进行摇瓶发酵培养, 结果如图 6 所示, 与对照菌株 CA2 相比, 菌株 CA7 和 CA8 的菌体生长和 5-ALA 产量基本没有差异。而在菌株 C10 中过表达基因 *RphemA* 后, CA10 菌株消耗葡萄糖的能力明显降低, 生长受到抑制。推测  $\alpha$ -KG 途径的狭窄流量阻止了琥珀酰 CoA 的积累, 双敲除 *gdhA* 和 *odhI* 后严重影响了 TCA 循环。菌株 CA9 生长较对照菌株 CA2 缓慢, 5-ALA 积累也较低, 最高产量为 2.07 g/L。

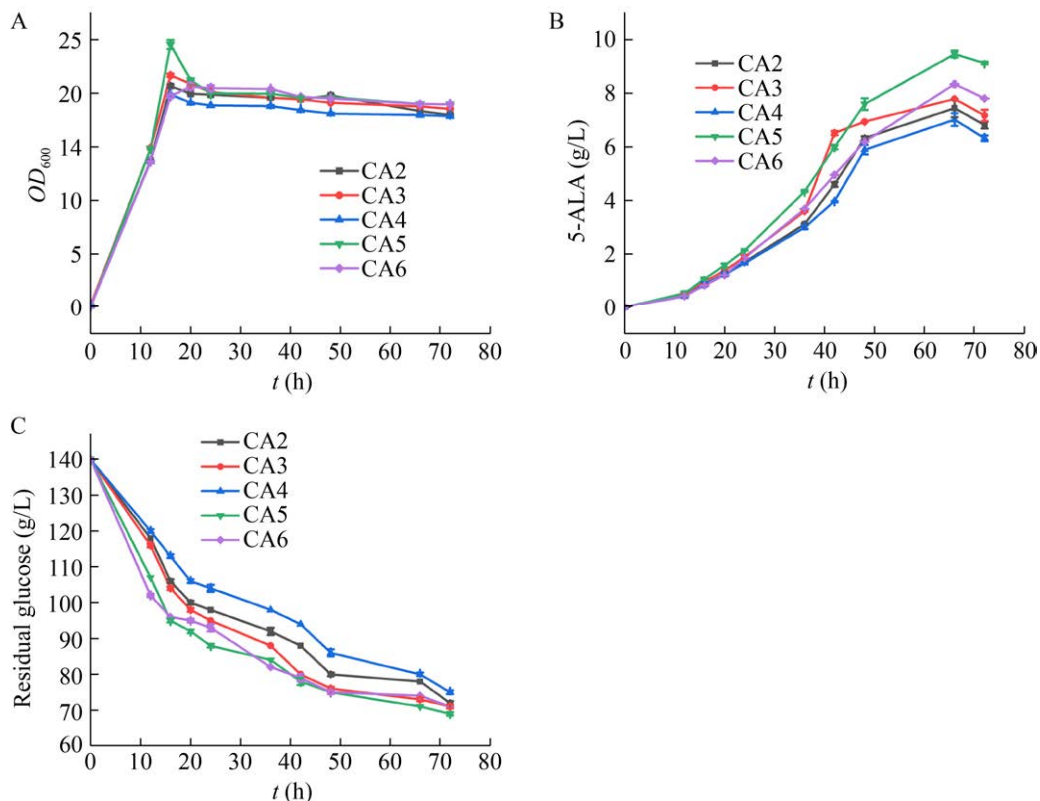


图 5 不同 RBS 序列重组菌株的发酵过程性能参数

Fig. 5 Fermentation profiles of recombinant strains with different RBS sequences. (A)  $OD_{600}$ . (B) 5-ALA production. (C) Residual glucose.

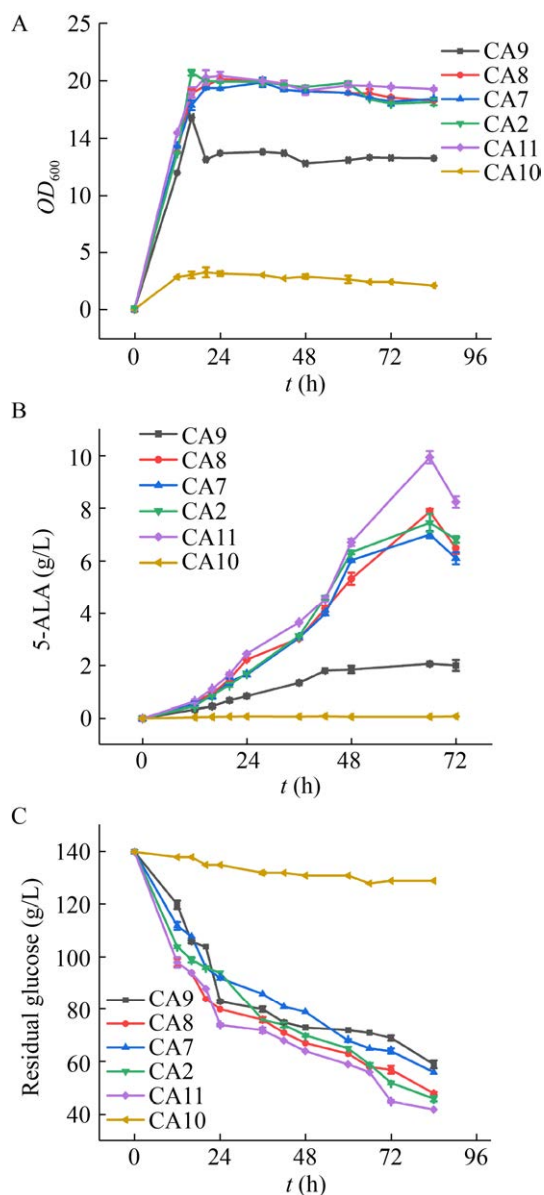


图6 基因敲除突变株的发酵过程性能参数  
 Fig. 6 Fermentation profiles of gene knockout mutants. (A)  $OD_{600}$ . (B) 5-ALA production. (C) Residual glucose.

而菌株 CA11 葡萄糖代谢相对较快,  $OD_{600}$  值略高, 生长良好, 5-ALA 积累也最多, 66 h 时产量达 9.94 g/L, 较对照菌株 CA2 提高了 33.42%, 这表明同时敲除 *sdhA* 和 *odhI* 基因能够有效增加 5-ALA 的积累。

### 2.2.2 sRNA 抑制 5-ALA 下游降解途径

我们构建了重组 *C. glutamicum* 工程菌株

CA15 且检测了部分重组 *C. glutamicum* ALAD 比活力的大小, 结果如表 6 所示, 菌株 CA13 的 ALAD 相对酶活为  $9.46 \times 10^3$  U/mg, 菌株 CA5 比酶活为 687.42 U/mg, 而菌株 CA15 通过 sRNA 弱化 *hemB* 基因后 ALAD 比酶活明显下降, 这表明以 sRNA 抑制可有地效减弱 *hemB* 基因的表达。菌株 CA5、CA13、CA15 的摇瓶发酵结果如图 7 所示, CA13 几乎不产 5-ALA, 菌株 CA15 的 5-ALA 产量较 CA5 略高, 65 h 产量最高达 9.73 g/L, 表明 sRNA 弱化 *hemB* 基因表达可促进 5-ALA 合成积累。

### 2.3 提高产物 5-ALA 的胞外分泌

通过改善 5-ALA 转运水平降低胞内 5-ALA 含量。*E. coli* 中苏氨酸和高丝氨酸外排系统 *rhtA* 转运蛋白的过表达可加速 *C. glutamicum* 中 5-ALA 的转运<sup>[21]</sup>。张良程证明半胱氨酸/O-乙酰丝氨酸转运蛋白 *eamA* 是 5-ALA 的向外转运蛋白, 过表达

表6 重组菌株 PBG 浓度和 ALAD 比酶活  
 Table 6 PBG concentration and specific ALAD activity of recombinant strains

Recombinant strains	PBG concentration (mg/L)	Specific ALAD activity (U/mg)
CA0	0.49±0.020	146.90±2.80
CA13	7.52±1.340	9 469.00±780.00
CA5	2.09±0.250	687.42±4.24
CA15	0.11±0.005	8.35±0.32

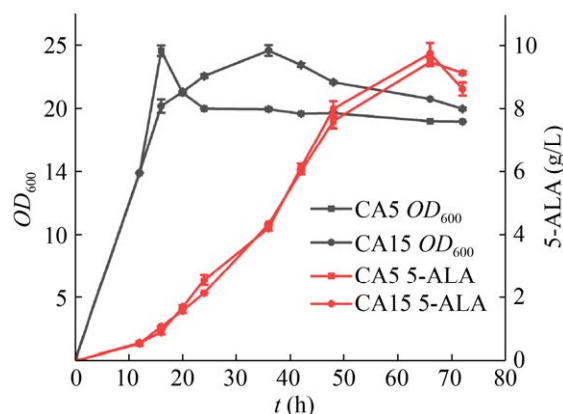


图7 sRNA 抑制 *hemB* 表达菌株发酵生产 5-ALA  
 Fig. 7 The yield of 5-ALA by strain where *hemB* expression was inhibited by sRNA.



*E. coli* 来源的 *eamA* 使得胞外 5-ALA 提高了 25.43%<sup>[25]</sup>。因此本文通过构建重组菌株 CA12 进一步增加了 5-ALA 的积累。

将菌株 CA2 和 CA12 同时进行摇瓶发酵, 结果如图 8 所示, 发酵 72 h 5-ALA 的最大产量从 7.58 g/L 提高到 9.56 g/L, 较对照菌株 CA2 提高了 26.12%, 这表明将 5-ALA 及时输送至胞外也能有效提高其胞外积累。

## 2.4 5 L 发酵罐的补料分批发酵

经上述代谢改造策略进行组合后获得重组菌株 CA16, 进行摇瓶发酵, 结果如图 9 所示, 在 72 h 5-ALA 产量最高为 11.90 g/L, 相比于原始菌

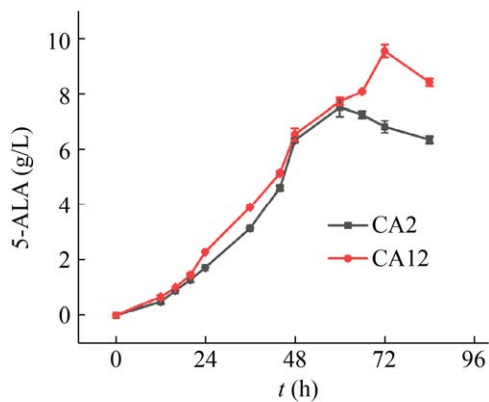


图 8 异源表达外排蛋白 *eamA* 重组菌株 5-ALA 产量  
Fig. 8 The yield of 5-ALA in recombinant strain with heterologous expression of efflux protein *eamA*.

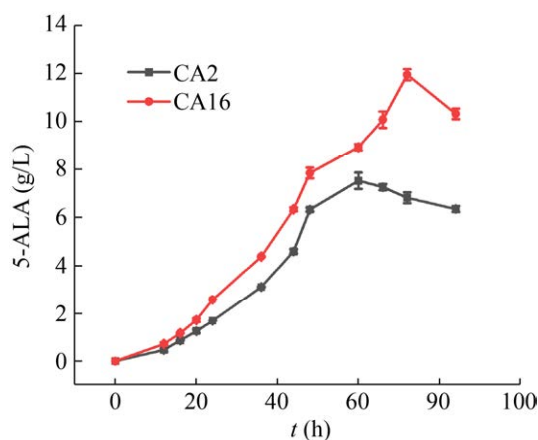


图 9 重组菌株 CA16 的 5-ALA 产量  
Fig. 9 Production of 5-ALA in recombinant strain CA16.

株 CA2, 产量得到明显提高。

将工程菌 CA16 进行补料分批发酵, 分别检测菌株  $OD_{600}$ 、残糖量和 5-ALA 的含量, 结果如图 10 所示, 发酵前 30 h 内菌株迅速增长, 菌株最大生物量出现在 30 h,  $OD_{600}$  值达 146.80。之后细胞生物量开始降低, 细胞进入稳定期, 不断积累 5-ALA。在 48 h 获得最高产量为 25.05 g/L, 之后由于酶活力下降以及 5-ALA 发生降解或其他代谢而使得 5-ALA 产量减少。

## 3 讨论

5-氨基乙酰丙酸广泛应用于农业、食品、生物医药等行业, 有着巨大的应用前景。

本研究通过系统代谢工程构建高产 5-ALA 重组 *C. glutamicum* 工程菌株。研究首先在 *C. glutamicum* ATCC13032 中异源表达 *R. palustris* 来源的高酶活 ALAS 基因 *hemA*, 并进行了后续深入的代谢研究。也筛选到 RBS5 序列优化了 *RphemA* 的表达, 提高了 5-ALA 的合成产量。这说明筛选高效的 ALAS 有利于 5-ALA 的积累。

本研究采用提高底物积聚, 平衡代谢流量的策略进一步提高 5-ALA 产量。敲除  $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶抑制蛋白 (*odhI*) 和琥珀酸脱氢酶编码基因 *sdhA* 可增加从琥珀酸向琥珀酰 CoA 方向的转换,

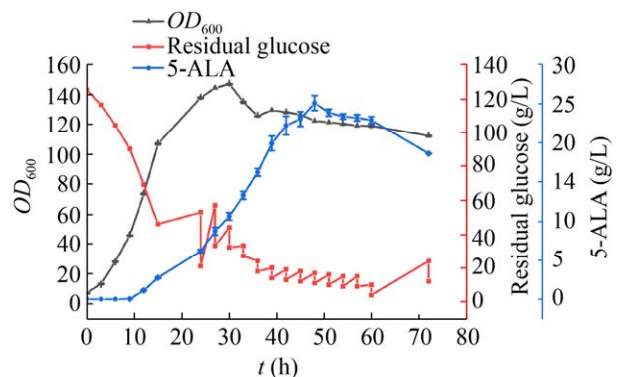


图 10 在 5 L 发酵罐中用于 5-ALA 生产的菌株 CA16 的补料分批发酵  
Fig. 10 Fed-batch fermentation profile of strain CA16 for 5-ALA production in a 5 L fermentation tank.

增加前体琥珀酰 CoA 的积累。敲除 *sdhA* 和 *odhI* 后细胞生长得以恢复, 5-ALA 积累量增加, *odhI* 和 *sdhA* 缺失菌株生长和产物合成得到更好地平衡。由于暂时缺失相关内容的深入研究和分析, 我们推测敲除 *sdhA* 导致了更多的琥珀酸富集, 促使琥珀酸与琥珀酰 CoA 的可逆反应偏向生成琥珀酰 CoA 的方向进行<sup>[26]</sup>, 而敲除 *odhI* 也增加了琥珀酰 CoA 积累量, 进而促进了 5-ALA 合成。另外 5-ALA 由胞内分泌到胞外对提高 5-ALA 的积累量至关重要。结果表明, *E. coli* 来源的 *eamA* 能够有效增加 *C. glutamicum* 工程菌中 5-ALA 的输出。sRNA 抑制 *hemB* 活性也可有效缓解下游中间体和最终产物血红素引起的反馈抑制, 从而增强 ALA 的积累<sup>[6]</sup>。

重组菌株 CA16 通过 5 L 发酵罐补料分批发酵, 在流加甘氨酸的情况下发酵 48 h 合成了 25.05 g/L 的 5-ALA, 生产率为 0.52 g/(L·h), 糖酸转化率达 16.79%, 这是以葡萄糖为碳源的一步发酵 5-ALA 的最高产量, 与此前报道的在 *C. glutamicum* C4 途径中以葡萄糖为碳源获得的最高产量 16.30 g/L 相比<sup>[14]</sup>, 提高了 53.68%, 未来继续研究在提高产量的同时也需要提高生产率, 减少碳源的消耗。综上所述, 本文所构建 C4 途径的高产 5-ALA 工程菌 *C. glutamicum* 为 5-ALA 的工业化生产进一步奠定了理论和实验基础, 具有较大的影响力和发展潜力。

## REFERENCES

- [1] Li JM, Brathwaite O, Cosloy SD, et al. 5-aminolevulinic acid synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1989, 171 (5): 2547-2552.
- [2] Inoue K. 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy for bladder cancer. *Int J Urol*, 2017, 24(2): 97-101.
- [3] Akram NA, Iqbal M, Muhammad A, et al. Aminolevulinic acid and nitric oxide regulate oxidative defense and secondary metabolisms in canola (*Brassica napus* L.) under drought stress. *Protoplasma*, 2018, 255(1): 163-174.
- [4] Yu XL, Jin HY, Liu WJ, et al. Engineering *Corynebacterium glutamicum* to produce 5-aminolevulinic acid from glucose. *Microb Cell Fact*, 2015, 14: 183.
- [5] Hara KY, Saito M, Kato H, et al. 5-aminolevulinic acid fermentation using engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact*, 2019, 18(1): 194.
- [6] Ding WW, Weng HJ, Du GC, et al. 5-aminolevulinic acid production from inexpensive glucose by engineering the C4 pathway in *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol Biot*, 2017, 44(8): 1127-1135.
- [7] Yang P, Liu W, Cheng X, et al. A new strategy for production of 5-aminolevulinic acid in recombinant *Corynebacterium glutamicum* with high yield. *Appl Environ Microbiol*, 2016, 82(9): 2709-2717.
- [8] Tran NT, Pham DN, Kim CJ. Production of 5-aminolevulinic acid by recombinant *Streptomyces coelicolor* expressing *hemA* from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biotechnol Bioproc E*, 2019, 24(3): 488-499.
- [9] Zhang J, Weng H, Zhou Z, et al. Engineering of multiple modular pathways for high-yield production of 5-aminolevulinic acid in *Escherichia coli*. *Bioresour Technol*, 2019, 274: 353-360.
- [10] Woodard SI, Dailey HA. Regulation of heme biosynthesis in *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys*, 1995, 316(1): 110-115.
- [11] Kang Z, Wang Y, Gu P, et al. Engineering *Escherichia coli* for efficient production of 5-aminolevulinic acid from glucose. *Metab Eng*, 2011, 13(5): 492-498.
- [12] Liu XX, Wang L, Wang YJ, et al. D-glucose enhanced 5-aminolevulinic acid production in recombinant *Escherichia coli* culture. *Appl Biochem Biotech*, 2010, 160(3): 822-830.
- [13] Lin J, Fu W, Cen P. Characterization of 5-aminolevulinic acid synthase from *Agrobacterium radiobacter*, screening new inhibitors for 5-aminolevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli* and their potential use for high 5-aminolevulinic acid production. *Bioresour Technol*, 2009, 100(7): 2293-2297.

- [14] Chen J, Wang Y, Guo X, et al. Efficient bioproduction of 5-aminolevulinic acid, a promising biostimulant and nutrient, from renewable bioresources by engineered *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol Biofuels*, 2020, 13: 41.
- [15] Zhang JL, Kang Z, Chen J, et al. Optimization of the heme biosynthesis pathway for the production of 5-aminolevulinic acid in *Escherichia coli*. *Sci Rep*, 2015, 5: 8584.
- [16] 陈丹园, 沈云杰, 杨燕, 等. 关键酶基因的过表达与环境因素对大肠杆菌血红素合成的调控. *食品与发酵工业*, 2018, 44(11): 7-14.  
Chen DY, Shen YJ, Yang Y, et al. Regulation of heme synthesis in *Escherichia coli* by overexpression of genes for the key enzymes and environmental factors. *Food Ferment Ind*, 2018, 44(11): 7-14 (in Chinese).
- [17] Sun D, Chen J, Wang Y, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* by synthetic small regulatory RNAs. *J Ind Microbiol Biot*, 2019, 46(2): 203-208.
- [18] Gibson DG. Enzymatic assembly of overlapping DNA fragments. *Methods Enzymol*, 2011, 498: 349-361.
- [19] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.
- [20] Li F, Wang Y, Gong K, et al. Constitutive expression of *RyhB* regulates the heme biosynthesis pathway and increases the 5-aminolevulinic acid accumulation in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*, 2014, 350(2): 209-215.
- [21] Feng LL, Zhang Y, Fu J, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for efficient production of 5-aminolevulinic acid. *Biotechnol Bioeng*, 2016, 113(6): 1284-1293.
- [22] Yoo SM, Na D, Lee SY. Design and use of synthetic regulatory small RNAs to control gene expression in *Escherichia coli*. *Nat Protoc*, 2013, 8(9): 1694-1707.
- [23] Aiba H. Mechanism of RNA silencing by Hfq-binding small RNAs. *Curr Opin Microbiol*, 2007, 10(2): 134-139.
- [24] 杨佳倩. 5-氨基乙酰丙酸脱水酶的克隆表达与酶学性质的初步研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2008.  
Yang JQ. Cloning and expression of 5-aminolevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli* Rosetta(DE3) and primary study on its enzymatic properties[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2008 (in Chinese).
- [25] 张良程. 大肠杆菌中 5-氨基乙酰丙酸转运蛋白的研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2016.  
Zhang LC. Study on 5-aminolevulinic acid transporters in *Escherichia coli*[D]. Tianjin: Tianjin University of Science & Technology, 2016 (in Chinese).
- [26] 蒲伟, 陈久洲, 孙村民, 等. 琥珀酸脱氢酶或琥珀酰辅酶 A 合成酶缺失促进大肠杆菌积累 5-氨基乙酰丙酸. *生物工程学报*, 2013, 29(10): 1494-1503.  
Pu W, Chen JZ, Sun CM, et al. Deficiency of succinic dehydrogenase or succinyl-CoA synthetase enhances the production of 5-aminolevulinic acid in recombinant *Escherichia coli*. *Chin J Biotech*, 2013, 29(10): 1494-1503 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)