

产 5-氨基乙酰丙酸酿酒酵母工程菌株的构建

张俊丽^{1,2}, 康振^{1,2}, 钱晟东^{1,2}, 邱玲^{1,2}, 陈坚^{1,2}, 堵国成^{*1,2}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 5-氨基乙酰丙酸(5-aminolevulinic acid, ALA)是一种天然存在的非蛋白质类氨基酸,在医学和农业领域应用广泛。为构建生产 ALA 的酿酒酵母细胞工厂,作者首先在酿酒酵母中分别表达了来源于酿酒酵母和类球红细菌中编码 ALA 生物合成 C4 途径 ALA 合酶的 *hemI* 和 *hemA* 基因,同时又表达了来源于大肠杆菌编码 C5 途径关键酶谷氨酰-tRNA 还原酶和谷氨酰氨基转移酶的基因 *hemA* 和 *hemL*。结果表明,表达酿酒酵母自身来源的 *hemI* 基因更利于 ALA 的合成,ALA 产量为 327.6 mg/L。在此基础上将 C4 和 C5 途径的基因 *hemI*、*hemA* 和 *hemL* 在酿酒酵母中过量表达,在添加前体物质甘氨酸和琥珀酸的条件下,ALA 产量为 525.8 mg/L,实现了在酿酒酵母中合成 ALA。

关键词: 5-氨基乙酰丙酸;C4 途径;C5 途径;5-氨基乙酰丙酸合酶;酿酒酵母

中图分类号: TQ 922.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2018)03-0232-08

Construction of Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* for Production of 5-Aminolevulinic Acid

ZHANG Junli^{1,2}, KANG Zhen^{1,2}, QIAN Shengdong^{1,2}, QIU Ling^{1,2}, CHEN Jian^{1,2}, DU Guocheng^{*1,2}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: 5-aminolevulinic acid (ALA), a naturally occurring non-protein amino acid, has been widely applied in the industry of medicine and agriculture. To construct a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* for production of ALA, genes *hemI* cloned from *S. cerevisiae* and *hemA* cloned from *Rhodobacter spheroides* 2.4.1 encoded ALA synthase of C4 pathway was overexpressed, respectively. Meanwhile, glutamyl-tRNA reductase (encoded by *hemA*) and glutamate-1-semialdehyde aminotransferase (encoded by *hemL*), the key enzymes of C5 pathway from *Escherichia coli* were also overexpressed. The result demonstrated that overexpression of *hemI* was more beneficial to the production of ALA, 327.6 mg/L. Moreover, genes *hemI*, *hemA* and *hemL* were co-overexpressed, resulting recombinant strain IN-PY1AL. The production of ALA was 525.8

收稿日期: 2015-06-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(31200020); 国家 973 计划项目(2013CB733602, 2014CB745103); 长江学者和创新团队发展计划项目(IRT1135)。

* 通信作者: 堵国成(1965—), 男, 江苏常州人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事代谢工程、发酵过程优化与控制等方面的研究。E-mail: gdcu@jiangnan.edu.cn

引用本文: 张俊丽, 康振, 钱晟东, 等. 产 5-氨基乙酰丙酸酿酒酵母工程菌株的构建[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(03): 232-239.

mg/L with addition of precursor glycine and succinic acid. This realized the biosynthesis of ALA in *S. cerevisiae*.

Keywords: 5-aminolevulinic acid, C4 pathway, C5 pathway, ALA synthase, *Saccharomyces cerevisiae*

5-氨基乙酰丙酸(5-aminolevulinic acid, ALA), 作为一种天然存在于细菌、真菌、动物及植物等生物机体活细胞中的非蛋白类氨基酸, 是血红素、叶绿素、维生素 B₁₂ 等吡咯类化合物的关键前体物质^[1-2]。ALA 具有安全、选择性和渗透性好以及环境相容性等特点, 在农业和医学领域应用非常广泛^[3-5]。自然界中主要存在两条 ALA 合成途径, 分别是 C4 途径(Shemin pathway)和 C5 途径^[6]。其中 C4 途径是在 5-氨基乙酰丙酸合酶(5-aminolevulinic acid synthase, ALAS)的作用下, 催化甘氨酸和琥珀酰-CoA 生成 ALA, 主要存在于光合细菌(如紫细菌等)、真菌和动物细胞^[7-8]。C5 途径存在于植物、藻类及细菌中(如肠杆菌属等), 由谷氨酸经过三步酶促反应生成 ALA。包括谷氨酰-tRNA 合成酶(GluRS, *gltX* 基因编码)、谷氨酰-tRNA 还原酶(GluTR, *hemA* 基因编码)和谷氨酰氨基转移酶(GSA-AM, *hemL* 基因编码)^[9-10]。

目前 ALA 主要通过化学法合成, 但由于化学合成存在诸多问题^[6,11], 近年来微生物发酵生产 ALA 已成为研究热点^[1]。早期, 人们筛选到产 ALA 的光合细菌类球红细菌, 通过诱变育种筛选高产菌株并经发酵条件优化, ALA 的产量达到 27.5 mmol/L^[12-15]。但由于光合细菌生长的特殊性, 其成本较高, 不适合大规模的工业化生产。随着基因工程技术的成熟, Van der Werf 等以大肠杆菌为宿主细胞, 成功表达了来源于类球红细菌的 ALAS, 通过添加前体物质, ALA 产量达到 22.0 mmol/L^[8]。随后基于 C4 途径的全细胞催化生产 ALA 的研究, 从 ALA 合酶来源、宿主细胞、前体物质添加、培养基及培养条件优化等方面进行, ALA 产量达到 56.0 mmol/L^[16-20]。Kang 等通过分析大肠杆菌 C5 途径的调控机制, 发现途径的关键基因 *hemA* 和 *hemL*, 实现了以葡萄糖为碳源发酵生产 ALA^[21]。前期我们通过分析下游血红素合成途径的基因, 发现过量表达 *hemD* 和 *hemF* 基因, 利于 ALA 的进一步积累, 在组合优化表达 *hemA*, *hemL*, *hemD* 和 *hemL* 时, ALA 产量提高了 25%^[22]。

酿酒酵母属于单细胞真核微生物, 被美国食品

药品监督管理局认定为 GRAS (Generally recognized as safe) 生物^[23]。酿酒酵母基因组测序已于 1996 年完成, 其遗传背景和生理特征十分清楚, 遗传操作工具成熟, 具有转录后加工修饰功能^[24]。另外, 酿酒酵母生长迅速, 可利用底物较广, 培养条件简单, 次级代谢产物简单, 并且有较好的耐酸和耐高渗透的能力, 可以进行大规模的发酵生产^[25-27]。自 1981 年 Hitzemom 等用酿酒酵母成功表达人干扰素以来^[28], 在酿酒酵母中已成功表达了多种原核和真核生物来源的蛋白质及代谢产物^[29-32]。

ALA 在碱性环境下能自发可逆二聚化缩合生成 2,5-(β -羧乙基)二羟吡嗪, 而该物质能进一步不可逆的氧化生成 2,5-(β -羧乙基)吡嗪, 所以发酵过程中需维持 pH 在酸性条件以维持 ALA 稳定, 因此改造酿酒酵母合成 ALA 具有明显优势。作者选择酿酒酵母为宿主细胞, 以 C4 和 C5 途径为基础运用代谢工程方法构建酿酒酵母工程菌株, 研究真核生物合成 ALA 的能力, 为构建高产 ALA 的酿酒酵母工程菌提供了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 大肠杆菌 *Escherichia coli* JM109 及酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* INVsc1: 由作者所在实验室保藏; 类球红细菌 *Rhodobacter spheroides* 2.4.1: 购于中国工业微生物种保藏管理中心(CICC)。其中 *E. coli* JM109 用于质粒构建和保存以及 C5 途径基因 *hemA* 和 *hemL* 的扩增, *S. cerevisiae* INVsc1 作为宿主细胞并用于扩增编码 ALAS 的 *hemI* 基因和启动子 ADH1, *R. spheroides* 2.4.1 用于扩增编码 ALAS 的 *hemA* 基因。本研究所用菌株和质粒分别列于表 1 和表 2 中。

1.1.2 主要工具酶和试剂 PrimeSTAR DNA 聚合酶、DNA 连接酶、感受态制备试剂盒: 购于 TaKaRa 公司; 限制性内切酶、PCR 产物胶回收试剂盒及片段柱纯化试剂盒: 购于 Thermo Fisher 公司; 氨苄青霉素、亮氨酸、组氨酸、色氨酸、YNB、质粒提取试剂盒和基因组提取试剂盒: 购于上海生工生物有限公

表 1 本研究所用的菌株

Table 1 Strains used in this study

名称	特征	来源
<i>Escherichia coli</i> JM109	<i>endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 recA1 Δ(lac-proAB) e14- [F' traD36 proAB+ lacIq lacZ ΔM15] hsdR17(rK⁻ mK⁺)</i>	作者所在实验室
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> INVsc1	MATa <i>his3Δ1 leu2 trp1-289 ura3-52/MATα his3Δ1 leu2 trp1-289 ura3-52</i>	作者所在实验室
<i>Rhodobacter spheroides</i> 2.4.1	野生菌株	CICC
IN-PY	<i>S. cerevisiae</i> INVsc1 harboring pY26	本研究
IN-PY1	<i>S. cerevisiae</i> INVsc1 harboring pY26- <i>hemI</i>	本研究
IN-PYA	<i>S. cerevisiae</i> INVsc1 harboring pY26- <i>hemA</i>	本研究
IN-PYAL	<i>S. cerevisiae</i> INVsc1 harboring pY26- <i>hemA'</i> - <i>hemL</i>	本研究
IN-PYAL1	<i>S. cerevisiae</i> INVsc1 harboring pY26- <i>hemA'</i> - <i>hemL</i> -ADH1- <i>hemI</i>	本研究

注:*hemA'*代表来源于 *E. coli* 编码 C5 途径 GluTR 的基因 *hemA*, 以此与来源于 *R. spheroides* 2.4.1 编码 C4 途径 ALAS 的基因 *hemA* 区别,下同。

表 2 本研究所用的质粒

Table 2 Plasmids used in this study

质粒	特征	来源
pMD19	Amp ^R , pMB1 ori, lacZ operator	TaKaRa
pY26	Amp ^R , pMB1 ori, 2 micron ori, TEF promoter, GPD promoter	作者所在实验室
pY26- <i>hemI</i>	pY26 containing <i>hemI</i> from <i>S. cerevisiae</i> INVsc1	本研究
pY26- <i>hemA</i>	pY26 containing <i>hemA</i> from <i>R. spheroides</i> 2.4.1	本研究
pY26- <i>hemA'</i> - <i>hemL</i>	pY26 containing <i>hemA</i> and <i>hemL</i> from <i>E. coli</i>	本研究
pY26- <i>hemA'</i> - <i>hemL</i> -ADH1- <i>hemI</i>	pY26- <i>hemA'</i> - <i>hemL</i> containing <i>hemI</i> from <i>S. cerevisiae</i> INVsc1	本研究

司;蛋白胨和酵母粉:购于 Oxoid 公司;5-氨基乙酰丙酸:购于 Sigma-Aldrich 公司;其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.1.3 培养基及培养条件 LB 培养基(g/L):胰蛋白胨 10,酵母粉 5.0,NaCl 10;固体培养基添加 2.0 g/dL 琼脂;根据需要添加终质量浓度 100 μg/mL 的氨基青霉素。

YNB 选择培养基(g/L):葡萄糖 20,硫酸铵 5.0, YNB 1.7,pH 5.6~6.0;固体培养基添加 2.0 g/dL 琼脂;根据需要添加终质量浓度为 50 μg/mL 的亮氨酸、组氨酸、色氨酸。

YPD 发酵培养基(g/L):葡萄糖 20,酵母粉 10,胰蛋白胨 20,根据情况添加甘氨酸 1.5,琥珀酸 2.0。

1.2 实验方法

1.2.1 重组质粒的构建 本文用于构建质粒所用引物列于表 3。

1) 质粒 pY26-*hemI* 的构建:以 *S. cerevisiae* INVsc1 基因组为模板扩增 *hemI* 基因,选择 *NotI* 和 *BglII* 限制性酶切位点,将酶切得到的 *hemI* 基因片

段连接质粒 pY26 启动子 TEF 后,得到质粒 pY26-*hemI*,见图 1(a)。

2) 质粒 pY26-*hemA* 的构建:以 *R. spheroides* 2.4.1 基因组为模板扩增 *hemA* 基因,选择 *NotI* 和 *HpaI* 限制性酶切位点,将酶切得到的 *hemA* 基因片段连接质粒 pY26 启动子 TEF 后,得到质粒 pY26-*hemA*,见图 1(b)。

3) 质粒 pY26-*hemA'*-*hemL* 的构建:以 *E. coli* JM109 基因组为模板分别扩增 *hemA* 和 *hemL* 基因,选择 *SacII* 和 *BglII* 限制性酶切位点,将酶切得到的 *hemA* 基因片段连接质粒 pY26 启动子 TEF 后,得到质粒 pY26-*hemA'*,在此基因上,用 *SpeI* 和 *SmaI* 两个限制性酶切位点,将酶切得到的 *hemL* 基因片段连接质粒 pY26-*hemA'* 启动子 GPD 后,得到质粒 pY26-*hemA'*-*hemL*,见图 2。

4) 质粒 pY26-*hemA'*-*hemL*-ADH1-*hemI* 的构建:由于质粒 pY26 自身酶切位点的限制,以质粒 pY26-*hemA'*为基础,先连接片段 ADH1-*hemI*,再连接基因 *hemL*。首先以酿酒酵母基因组为模板分别

表 3 本文所用的引物

Table 3 Primers used for plasmids construction in this study

引物名称	序列(5'-3')
pY26- <i>hem1</i>	
<i>hem1</i> F	GCGGCCGCTACACAATGCAACGCTCCATTTTTC
<i>hem1</i> R	AGATCTTTACTGCTTGATACCACTAGAAACCTC
pY26- <i>hemA</i>	
<i>hemA</i> F	GCGGCCGCTACACAATGGACTACAATCTGGCACTCG
<i>hemA</i> R	GTTAACTTAGGCAACGACCTCGGC
pY26- <i>hemA'</i> - <i>hemL</i>	
<i>hemA'</i> F	CCGCGGTACACAATGACCCTTTATGCACTCGG
<i>hemA'</i> R	AGATCTTTACTCCAGCCCGAGGCTGTC
<i>hemL</i> F	ACTAGTTACACAATGAGTAAGTCTGAAAATCTTTACAGCG
<i>hemL</i> R	CCCGGGCCTAGGTTACAACCTCGCAAACACCCG
pY26- <i>hemA'</i> - <i>hemL</i> -ADH1- <i>hem1</i>	
<i>hemL</i> F	ACTAGTTACACAATGAGTAAGTCTGAAAATCTTTACAGCG
<i>hemL</i> R	CCCGGGTTACAACCTTCGCAAACACCCG
ADH1 F	GAATTCGAGGGTTGACTACATCAGCATGA
ADH1 R	CTCGAGCGGCGCGGATCCTGAGATAGTTGATTCTATGCTTGGTAT
<i>hem1</i> F	GGATCCTACACAATGCAACGCTCCATTTTTC
<i>hem1</i> R	CTCGAGTTACTGCTTGATACCACTAGAAACC

注:下划线代表酶切位点。

扩增乙醇脱氢酶的启动子 ADH1 和编码 ALAS 的基因 *hem1*,以 pMD19 为载体组装 ADH1-*hem1*,随后用 *Eco*RI 和 *Xho*I 两个限制性酶切位点构建 pY26-*hemA'*-ADH1-*hem1*。然后与经 *Spe*I 和 *Sma*I 酶切得到的 *hemL* 片段进行连接,得到质粒 pY26-*hemA'*-*hemL*-ADH1-*hem1*,见图 3。所有构建质粒均经测序验证正确。

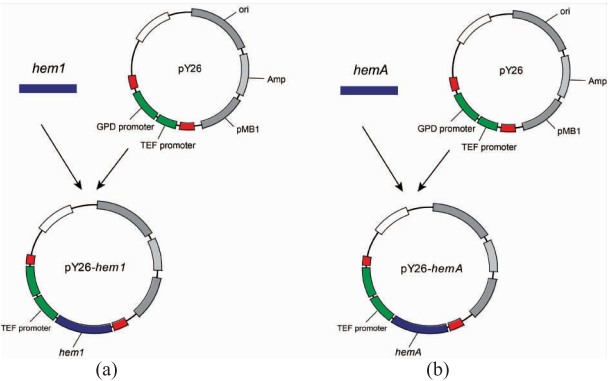


图 1 编码 ALAS 的基因 *hem1* 和 *hemA* 质粒构建过程图

Fig. 1 Schematic of plasmids construction with genes encoded ALAS. pY26-*hem1*, pY26-*hemA*

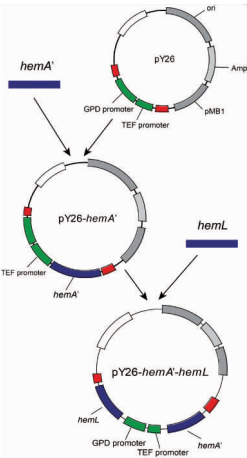


图 2 质粒 pY26-*hemA'*-*hemL* 构建过程图

Fig. 2 Schematic of plasmid construction pY26-*hemA'*-*hemL*

1.2.2 酿酒酵母转化及重组菌培养方法 按照 Invitrogen 公司提供的 LiAc/SS-DNA/PEG 法制作酿酒酵母感受态细胞,转化重组质粒,涂布含所需氨基酸的 YNB 选择性平板,获得的酵母转化子经菌落 PCR 检验。

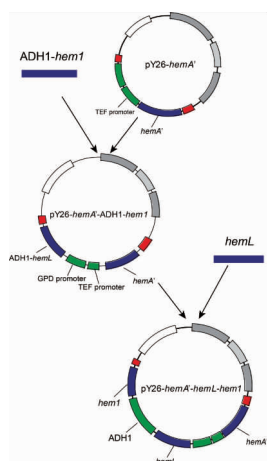


图3 共表达 C4 和 C5 途径关键基因质粒构建过程图

Fig. 3 Schematic of plasmids construction for co-expression of genes in the co-expression C4 and C5 pathway

大肠杆菌培养条件为 37 °C, 220 r/min 培养约 12 h。

重组酿酒酵母培养方法: 挑取验证正确的酵母转化子接种于 YNB 液体培养基中, 在 28 °C、220 r/min 条件下培养 36 h, 按 10% 接种体积分数转接至 YPD 培养基中, 28 °C、220 r/min 下培养 48 h。

1.2.3 菌体浓度和 ALA 的测定 菌体浓度测定方法(测定细胞 OD 值): 用蒸馏水将发酵液稀释到合适的倍数, 使用 UV-1700 分光光度计(Shimadzu, Kyoto, Japan)在 600 nm 处测定吸光值。

ALA 的测定采用比色法^[33]。首先将样品在 12 000 r/min 离心 2 min, 将胞外上清液进行适当稀释后, 取稀释液 300 μL, 分别加入 400 μL 的乙酸钠缓冲液(82 g 无水乙酸钠与 57 mL 的冰乙酸用水定容至 1 L)和 35 μL 的乙酰丙酮, 煮沸反应 15 min。冷却至室温, 加入 Modified Ehrlich's reagent 试剂(1.0 g 对二甲氨基苯甲醛与 8.0 mL 的 70% 的高氯酸用冰乙酸定容至 50 mL)反应 10 min, 然后在 554 nm 处测定吸光度, 根据 ALA/OD554 的标准曲线计算 ALA 的质量浓度。

1.2.4 ALA 合酶的酶活力测定 取相同细胞量的发酵液在 4 °C、12 000 r/min 条件下离心 2 min, 收集菌体, 用 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5)洗涤菌体两次后重悬菌体, 在低温条件下利用玻璃珠对酵母细胞振荡破碎, 4 °C、12 000 r/min 条件下离心 5 min, 收集上清液并测定 ALA 合酶的酶活力。

ALA 合酶的酶活力定义为: 37 °C 下 1 min 生成 1 μmol 的 ALA 所需的酶量为一个酶活力单位(U)。具体测定方法如下^[34]: 在 1 mL 的 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5)中, 包括 0.1 mol/L 的甘氨酸、0.2 mol/L 的琥珀酰-CoA、1.0 mmol/L 的磷酸吡哆醛和 50 μL 的样品。37 °C 水浴 30 min 后, 加入 150 μL 的体积分数 10% 三氯乙酸终止反应, 12 000 r/min 下离心 5 min, 取上清液测定 ALA。

2 结果与讨论

2.1 通过 C4 途径改造酿酒酵母合成 ALA

酿酒酵母自身含有编码 C4 途径关键酶 ALAS 的基因 *hem1*。另外, 目前研究较广泛的是来源于光合细菌类球红细菌中编码 ALAS 的基因 *hemA*^[8,35], 为构建生产 ALA 的酿酒酵母细胞, 在 *S. cerevisiae* INVsc1 中分别过量表达自身来源的基因 *hem1* 和来源于 *R. sphaeroides* 2.4.1 的基因 *hemA*, 考察 ALA 的合成情况, 结果见图 4。根据酿酒酵母合成 ALA 的差异选择 ALAS 的基因来源。

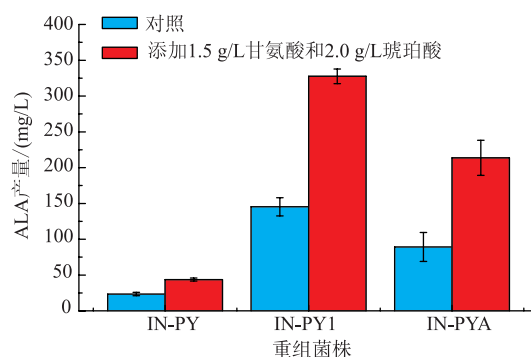


图4 不同条件下重组酿酒酵母合成 ALA 的情况

Fig. 4 ALA production of the recombinant *S. cerevisiae* with precursors or not

从图 4 中看出, 酿酒酵母自身合成 ALA 的量很少, 表达不同来源的 ALAS 后, ALA 产量均有一定的提高。在添加前体物质甘氨酸和琥珀酸后, ALA 的产量明显提高。其中表达自身来源的 *hem1* 基因, ALA 产量最高, 为 327.6 mg/L, 高于表达 *R. sphaeroides* 2.4.1 基因 *hemA* 的 301.8 mg/L。结合表 4 中 ALAS 酶活可以看出, *hem1* 基因编码的 ALAS 的活性高于 *hemA* 基因编码的 ALAS。文献报道酿酒酵母和类球红细菌来源的 ALA 合酶对底物甘氨酸的 K_m 值分别为 3.0 mmol/L 和 8.33 mmol/L, 说明酿酒酵母来源的

ALA 合酶对底物的亲和力比类球红细菌来源的 ALA 合酶大^[36-37]。所以选择酿酒酵母来源的 *hem1* 基因作为下一步在 *S. cerevisiae* INVsc1 中改造 C4 途径提高 ALA 产量的基础。

表 4 不同重组酿酒酵母 ALAS 酶活

Table 4 Activity of ALAS with different recombinants

重组菌	ALAS 酶活/U
IN-PY	3.58±0.02
IN-PY1	25.31±1.03
IN-PYA	13.58±0.97

2.2 通过 C5 途径改造酿酒酵母合成 ALA

在酿酒酵母细胞中不含有 ALA 合成的 C5 途径,研究发现在大肠杆菌 C5 途径中,分别由基因 *hemA* 和 *hemL* 编码的 GluTR 和 GSA-AM 是途径中的关键酶^[21]。为了在酿酒酵母中引入 C5 合成途径,将来源于大肠杆菌中的基因 *hemA* 和 *hemL* 在酿酒酵母中表达,分析 ALA 的合成情况,结果见图 5。

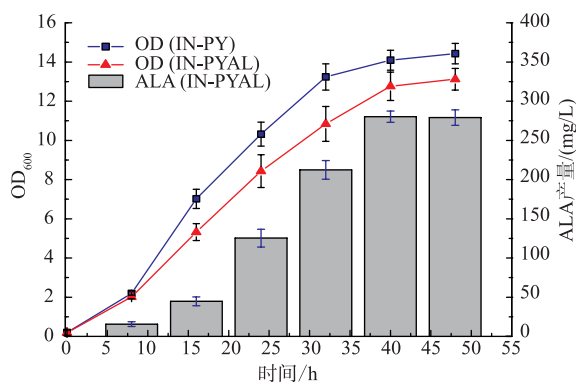


图 5 表达 C5 途径关键酶对酿酒酵母生长和合成 ALA 的影响

Fig. 5 Effect of key enzymes of C5 pathway on cell growth and ALA production in *S. cerevisiae*

可以看出,表达基因 *hemA* 和 *hemL* 后,ALA 产量有一定的提高,为 280.2 mg/L,但低于表达基因 *hem1* 时 ALA 的产量。同时菌体生长受到影响,由于 C5 合成途径的关键前体物质谷氨酸,它是一种丰富型氮源,当细胞中存在谷氨酸时,酿酒酵母细胞会利用部分谷氨酸,将其转化为谷氨酰胺参与氮代谢途径^[38]。当表达 C5 合成途径的基因时,利用了一部分谷氨酸,使得菌体可利用的谷氨酸减少,一定程度上影响了菌体的生长。

2.3 结合 C4 和 C5 途径改造酿酒酵母合成 ALA

目前,仅发现在 *Euglena gracilis* 和 *Scenedesmus obliquus* spp. 中同时存在 C4 和 C5 途径^[39]。为了进一

步提高酿酒酵母合成 ALA 的能力,在分别改造 C4、C5 途径合成 ALA 的基础上,将 C4 和 C5 两条途径结合,在 *S. cerevisiae* INVsc1 细胞中共表达编码 C4 途径关键酶 ALAS 的基因 *hem1* 和编码 C5 途径限速酶 GluTR 和 GSA-AM 的基因 *hemA* 和 *hemL*,分析二者对酿酒酵母细胞生长和 ALA 合成的影响,结果见图 6。

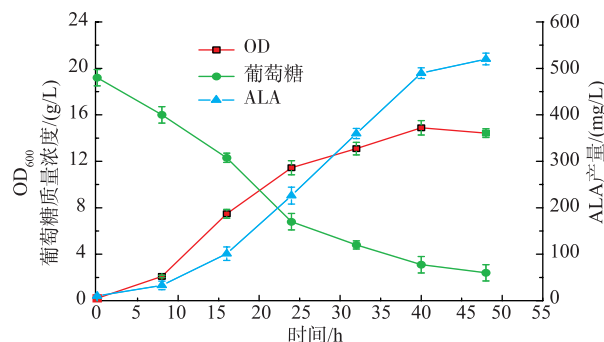


图 6 共表达 C4 和 C5 途径关键酶对酿酒酵母生长和合成 ALA 的影响

Fig. 6 Effect of key enzymes of C4 and C5 pathway on cell growth and ALA production in *S. cerevisiae*

由于 C4 和 C5 途径的代谢流同时指向 ALA 的生成,因此将这两条途径有机地结合在一起,同时培养基中添加了前体物质,琥珀酸在一定程度上影响细胞内 TCA 循环,使得胞内谷氨酸的量提高,更有利于在酿酒酵母细胞中积累 ALA,ALA 产量为 525.8 mg/L。

3 结语

酿酒酵母作为单细胞真核微生物,具有性质稳定、研究彻底、运用广泛、生长迅速,利于发酵等特点。近年来,随着合成生物学技术的发展,通过设计装配目的产物合成模块,打破生物制造的物种界限,各种来源的化合物逐渐在酿酒酵母中实现了生物合成途径的重构^[29,40]。在本研究中,通过代谢工程手段根据 ALA 的合成途径在酿酒酵母里实现了 ALA 的合成,酿酒酵母作为安全菌株用于合成 ALA,一定程度上扩展了 ALA 的应用价值。但产量仍较低,仍需要在酶分子改造,代谢途径优化及培养条件控制等方面进行系统分析研究以进一步提高酿酒酵母合成 ALA。本研究改造酿酒酵母生产 ALA 对真核生物合成五碳化合物等方面的研究有着积极意义。

参考文献:

- [1] KANG Z,ZHANG J,ZHOU J,et al. Recent advances in microbial production of δ -aminolevulinic acid and vitamin B12[J]. **Biotechnology Advances**,2012,30(6):1533-1542.
- [2] KANG Zhen,ZHANG Junli,YANG Sen,et al. Advanced in microbial production of 5-aminolevulinic acid[J]. **Chinese Journal of Biotechnology**,2013,29(9):1214-1222.(in Chinese)
- [3] SASIKALA C, RAMANA C V, RAO P R. 5- Aminolevulinic acid;a potential herbicide/insecticide from microorganisms[J]. **Biotechnology Progress**,1994,10(5):451-459.
- [4] BHOWMICK R,GIROTTI A W. Cytoprotective induction of nitric oxide synthase in a cellular model of 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy[J]. **Free Radical Biology and Medicine**,2010,48(10):1296-1301.
- [5] MIKOLAJEWSKA P,DONNELLY R F,GARLAND M J,et al. Microneedle pre-treatment of human skin improves 5-aminolevulinic acid (ALA)- and 5-aminolevulinic acid methyl ester (MAL)-induced PpIX production for topical photodynamic therapy without increase in pain or erythema[J]. **Pharmaceutical Research**,2010,27(10):2213-2220.
- [6] SASAKI K, WATANABE M, TANAKA T. Biosynthesis,biotechnological production and applications of 5-aminolevulinic acid [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2002,58(1):23-29.
- [7] HUNTER G, FERREIRA G. 5-Aminolevulinate synthase:catalysis of the first step of heme biosynthesis[J]. **Cell and Molecular Biology (Noisy-le-grand)**,2009,55(1):102-110.
- [8] VAN Der Werf M J,ZEIKUS J G. 5-Aminolevulinate production by *Escherichia coli* containing the *Rhodobacter sphaeroides hemA* gene[J]. **Applied and Environmental Microbiology**,1996,62(10):3560-3566.
- [9] BEALE S I. Biosynthesis of the tetrapyrrole pigment precursor, delta-aminolevulinic acid, from glutamate[J]. **Plant Physiology**,1990,93(4):1273-1279.
- [10] LUER C,SCHAUER S,MOBIUS K,et al. Complex formation between glutamyl-tRNA reductase and glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase in *Escherichia coli* during the initial reactions of porphyrin biosynthesis[J]. **Journal of Biological Chemistry**,2005,280(19):18568-18572.
- [11] TAKEYA H, TANAKA T, HOTTA T, et al. Production methods and applications of 5- aminolevulinic acid[J]. **Porphyrins**,1997,6:127-135.
- [12] SASAKI K, IKEDA S, NISHIZAWA Y, et al. Production of 5-aminolevulinic acid by photosynthetic bacteria[J]. **Journal of Fermentation Technology**,1987,65(5):511-515.
- [13] SASAKI K, TANAKA T, NISHIZAWA Y, et al. Production of a herbicide, 5-aminolevulinic acid, by *Rhodobacter sphaeroides* using the effluent of swine waste from an anaerobic digester[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,1990,32(6):727-31.
- [14] NISHIKAWA S, WATANABE K, TANAKA T, et al. *Rhodobacter sphaeroides* mutants which accumulate 5-aminolevulinic acid under aerobic and dark conditions[J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**,1999,87(6):798-804.
- [15] KAMIYAMA H, HOTTA Y, TANAKA T, et al. Production of 5-aminolevulinic acid by a mutant strain of a photosynthetic bacterium[J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**,2000,78(2):48-55.
- [16] XIE L, HALL D, EITEMAN M A, et al. Optimization of recombinant aminolevulinate synthase production in *Escherichia coli* using factorial design[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2003,63(3):267-273.
- [17] CHUNG S Y, SEO K H, RHEE J I. Influence of culture conditions on the production of extra-cellular 5-aminolevulinic acid (ALA) by recombinant *E. coli*[J]. **Process Biochemistry**,2005,40(1):385-394.
- [18] QIN G, LIN J, LIU X, et al. Effects of medium composition on production of 5-aminolevulinic acid by recombinant *Escherichia coli*[J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**,2006,102(4):316-322.
- [19] FU W, LIN J, CEN P. Enhancement of 5-aminolevulinate production with recombinant *Escherichia coli* using batch and fed-batch culture system[J]. **Bioresource Technology**,2008,99(11):4864-4870.
- [20] LIN J, FU W, CEN P. Characterization of 5-aminolevulinate synthase from *Agrobacterium radiobacter*, screening new inhibitors for 5-aminolevulinate dehydratase from *Escherichia coli* and their potential use for high 5-aminolevulinate production [J]. **Bioresource Technology**,2009,100(7):2293-2297.
- [21] KANG Z, WANG Y, GU P, et al. Engineering *Escherichia coli* for efficient production of 5-aminolevulinic acid from glucose[J].

- Metabolic Engineering**, 2011, 13(5):492-498.
- [22] ZHANG J, KANG Z, CHEN J, et al. Optimization of the heme biosynthesis pathway for the production of 5-aminolevulinic acid in *Escherichia coli*[J]. **Scientific Reports**, 2015, 5:8584.
- [23] TANG Xiangshan, ZHANG Xuewen. *Saccharomyces cerevisiae* expression system[J]. **Life Science Research**, 2004, 8(2):106-109. (in Chinese)
- [24] GOFFEAU A. Four years of post-genomic life with 6000 yeast genes[J]. **FEBS Letters**, 2000, 480(1):37-41.
- [25] DOMBEK K M, INGRAM L O. Ethanol production during batch fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*: changes in glycolytic enzymes and internal pH[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 1987, 53(6):1286-1291.
- [26] PORRO D, BRAMBILLA L, RANZI B M, et al. Development of metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* cells for the production of lactic acid[J]. **Biotechnology Progress**, 1995, 11(3):294-298.
- [27] VAN Maris A J A, WINKLER A A, PORRO D, et al. Homofermentative lactate production cannot sustain anaerobic growth of engineered *Saccharomyces cerevisiae*: possible consequence of energy-dependent lactate export[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2004, 70(5):2898-2905.
- [28] HITZEMAN R A, HAGIE F E, LEVINE H L, et al. Expression of a human gene for interferon in yeast[J]. **Nature**, 1981, 293(5835):717-722.
- [29] NEVOIGT E. Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 2008, 72(3):379-412.
- [30] SYDOR T, SCHAFFER S, BOLES E. Considerable increase in resveratrol production by recombinant industrial yeast strains with use of rich medium[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2010, 76(10):3361-3363.
- [31] DAI Z, LIU Y, HUANG L, et al. Production of miltiradiene by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Biotechnology Bioengineering**, 2012, 109(11):2845-2853.
- [32] PADDON C J, WESTFALL P J, PITERA D J, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin[J]. **Nature**, 2013, 496(7446):528-532.
- [33] MAUZERALL D, GRANICK S. The occurrence and determination of δ -aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 1956, 219(1):435-446.
- [34] KWON O H, KIM S, HAHM D H, et al. Potential application of the recombinant *Escherichia coli*-synthesized heme as a bioavailable iron source[J]. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2009, 19(6):604-609.
- [35] NEIDLE E L, KAPLAN S. Expression of the *Rhodobacter sphaeroides* *hemA* and *hemT* genes, encoding two 5-aminolevulinic acid synthase isozymes[J]. **Journal of Bacteriology**, 1993, 175(8):2292-2303.
- [36] VOLLAND C, FELIX F. Isolation and properties of 5-aminolevulinate synthase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. **European Journal of Biochemistry**, 1984, 142(3):551-557.
- [37] SATO K, ISHIDA K, MUTSUSHIKA O, et al. Purification and some properties of δ -aminolevulinic acid synthases from *Protaminobacter ruber* and *Rhodopseudomonas spheroides* [J]. **Agricultural and Biological Chemistry**, 1985, 49(12):3415-3421.
- [38] CONRAD M, SCHOTHORST J, KANKIPATI H N, et al. Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **FEMS Microbiology Reviews**, 2014, 38(2):254-299.
- [39] LI J M, BRATHWAITE O, COSLOY S D, et al. 5-Aminolevulinic acid synthesis in *Escherichia coli*[J]. **Journal of Bacteriology**, 1989, 171(5):2547-2552.
- [40] NIELSEN J, LARSSON C, VAN Maris A, et al. Metabolic engineering of yeast for production of fuels and chemicals[J]. **Current Opinion in Biotechnology**, 2013, 24(3):398-404.