

研究报告

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

蒲伟^{1,2,3}, 陈久洲^{2,3}, 孙村民^{2,3}, 陈宁¹, 孙际宾^{2,3}, 郑平^{2,3}, 马延和²

1 天津科技大学 生物工程学院, 天津 300457

2 中国科学院 天津工业生物技术研究所, 天津 300308

3 中国科学院 系统微生物工程重点实验室, 天津 300308

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.

摘 要: 5-氨基乙酰丙酸 (ALA) 是生物体内四吡咯类化合物的合成前体, 在农业及医药领域应用广泛, 是极具开发价值的高附加值生物基化学品。目前利用外源 C4 途径的重组大肠杆菌发酵生产 ALA 的研究主要利用 LB 培养基并添加葡萄糖和琥珀酸、甘氨酸等合成前体, 成本较高。琥珀酸在 C4 途径中以琥珀酰辅酶 A 的形式直接参与 ALA 的合成。文中在以葡萄糖为主要碳源的无机盐培养基中研究了琥珀酰辅酶 A 下游代谢途径琥珀酸脱氢酶编码基因 *sdhAB* 和琥珀酰辅酶 A 合成酶编码基因 *sucCD* 缺失对 ALA 积累的影响。与仅表达异源 ALA 合成酶的对照菌株相比, *sdhAB* 和 *sucCD* 缺失菌株 ALA 的产量分别提高了 25.59% 和 12.40%, 且 ALA 的积累不依赖于琥珀酸的添加和 LB 培养基的使用, 从而大幅降低了生产成本, 显示出良好的工业应用前景。

关键词: 5-氨基乙酰丙酸, 琥珀酸脱氢酶, 琥珀酰辅酶 A 合成酶, 大肠杆菌, 基因敲除

Received: July 1, 2013; **Accepted:** August 5, 2013

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31070037), Knowledge Innovation Program of the Chinese Academy of Sciences (No. KSCX2-E-W-Q-13), Key Projects in the Tianjin Science & Technology Pillar Program (No. 11ZCZDSY08500).

Corresponding author: Ping Zheng. Tel/Fax: +86-22-84861943; E-mail: zheng_p@tib.cas.cn

国家自然科学基金 (No. 31070037), 中国科学院知识创新工程项目 (No. KSCX2-E-W-Q-13), 天津市科技支撑计划重大项目 (No. 11ZCZDSY08500) 资助。

Deficiency of succinic dehydrogenase or succinyl-CoA synthetase enhances the production of 5-aminolevulinic acid in recombinant *Escherichia coli*

Wei Pu^{1,2,3}, Jiuzhou Chen^{2,3}, Cunmin Sun^{2,3}, Ning Chen¹, Jibin Sun^{2,3}, Ping Zheng^{2,3}, and Yanhe Ma²

¹ College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

² Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

³ Key Laboratory of Systems Microbial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

Abstract: 5-aminolevulinic acid (ALA), a precursor for biosynthesis of pyrrole compounds in living organisms, has been widely used in agriculture and medical photodynamics therapy and is regarded as a promising value-added bio-based chemical. In the previous investigations on ALA production with recombinant *Escherichia coli* expressing heterogenous C4 pathway gene, LB media supplemented with glucose and ALA precursors succinate and glycine is widely used, leading to high production cost. Succinate participates in ALA biosynthesis in a form of succinyl-CoA. In this study, genes involved in succinyl-CoA consumption, *sdhAB* (encoding succinic dehydrogenase) or *sucCD* (encoding succinyl-CoA synthetase) of *E. coli* MG1655 was knocked out and tested for ALA accumulation. In comparison with the recombinant *E. coli* strain expressing heterogenous ALA synthetase, the *sdhAB*- or *sucCD*-deficient strain accumulate 25.59% and 12.40%, respectively, more ALA in a 5 L fermentor using a defined synthetic medium with glucose as main carbon source and without supplementation of succinate, providing a novel cost-effective approach for industrial production of ALA.

Keywords: 5-aminolevulinic acid, succinic dehydrogenase, succinyl-CoA synthetase, *Escherichia coli*, gene knock out

5-氨基乙酰丙酸(5-aminolevulinic acid, ALA)是生物体合成血红素、叶绿素、VB12等四吡咯化合物的必需前体,广泛存在于动物、植物和微生物中^[1]。在医药领域 ALA 可以作为光动力试剂治疗浅表型癌症^[2-3],在农业上可以用作杀虫剂、除草剂和植物生长调节剂^[1,4-5],因而引起了人们的广泛关注。目前 ALA 主要通过化学合成法制备^[6],生产成本高,医药级 ALA 高达 2 500 元/g,而且环境污染重,大大限制了 ALA 的推广和应用。因此,近年来利用高效低成本的微生物发酵法生产 ALA 成为人们的研究重点^[1]。

生物体内 ALA 的合成途径有两种,分别是 C4 途径和 C5 途径^[7-8]。由于 C4 途径利用 ALA 合成酶(5-aminolevulinic acid synthase, ALAS)只需

通过一步酶促反应即可催化中央代谢产物琥珀酰辅酶 A 和甘氨酸缩合生成 ALA,方法简单。研究思路主要有两种,一是利用诱变技术处理天然就能积累少量 ALA 的光合细菌,选育高产 ALA 突变株^[9-10],二是利用代谢工程技术改造微生物的代谢途径,例如构建过表达外源 C4 途径关键酶 ALA 合成酶的大肠杆菌工程菌,实现 ALA 的大量积累^[11-15]。野生型大肠杆菌采用 C5 途径,现有文献报道表达 C4 途径的重组大肠杆菌的 ALA 最高产量已经达到了 9.4 g/L^[14]。但是第 2 种思路中通常使用复杂培养基(Luria-Bertani、Terrific Broth 等),添加前体琥珀酸、甘氨酸和 ALA 脱水酶抑制剂^[16-20],导致生产成本较高,工艺控制复杂,限制了 ALA 的大规模工业化生产。并且生产菌的改

造大多仅限于克隆和优化表达外源 C4 合成途径的 ALAS, 还缺乏对宿主菌株系统的改造优化。

ALA 的合成前体之一琥珀酰辅酶 A 是三羧酸循环中的中间代谢产物, 在好氧条件下几乎不会积累^[21]。根据对大肠杆菌糖代谢途径的分析 (图 1), 推测通过琥珀酸脱氢酶或琥珀酰辅酶 A 合成酶的缺失可以使琥珀酰辅酶 A 或琥珀酸积累, 更多地流向 ALA 的合成。傅维琦^[22]在琥珀酸脱氢酶缺失的大肠杆菌中表达来源于类球红细菌 *Rhodobacter sphaeroides* 的 ALAS, 在添加底物琥珀酸、甘氨酸和葡萄糖的 LB 培养基中摇瓶发酵 ALA 的产量并没有增加, 而琥珀酸的摩尔转化率仅比 MG1655 提高了 8.6%。Kang 等^[23]利用发酵生产琥珀酸的菌株 QZ1111 (MG1655 Δ *ptsG* Δ *poxB* Δ *pta* Δ *iclR* Δ *sdhA*) 为宿主表达 ALAS, 在以葡萄糖为主要碳源的合成培养基中 ALA 产量由 85 mg/L 提高到 436 mg/L, 然而该菌株改造位点较多, 没

有明确琥珀酸脱氢酶缺失对 ALA 积累的作用。为了明确琥珀酰辅酶 A 下游途径缺失对 ALA 合成的影响, 探索以葡萄糖为底物实现 ALA 合成前体琥珀酰辅酶 A 的胞内供给, 本研究分别构建了琥珀酸脱氢酶编码基因 *sdhAB* 和琥珀酰辅酶 A 合成酶编码基因 *sucCD* 缺失的突变株, 并将研究室前期获得的来源于沼泽红假单胞菌 *Rhodospseudomonas palustris* ATCC17001 的 ALAS 在突变株中表达, 发酵结果表明琥珀酸脱氢酶或琥珀酰辅酶 A 合成酶的缺失均有助于 ALA 的积累和葡萄糖转化率的提高, 重组菌实现了以葡萄糖为主要碳源, 无需添加琥珀酸发酵生产 ALA, 大幅降低了生产成本。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂

DNA 聚合酶购自北京全式金生物技术有限公司; 限制性内切酶、DNA 连接酶购自 Fermentas 公司; 质粒小提试剂盒及 DNA 胶回收试剂盒购自 Biomiga 公司; 基因组提取试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司; 引物合成及测序服务由华大基因提供。酵母粉和胰蛋白胨购自英国 Oxoid 公司; 甘氨酸和 IPTG 购自 Promega 公司; ALA、对二甲氨基苯甲醛等购自 Sigma 公司; 琥珀酸钠、葡萄糖、冰醋酸、高氯酸、乙酰丙酮以及其他常用化学试剂购自国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 培养基

LB 培养基: 酵母提取物 5 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 氯化钠 10 g/L, 固体培养基额外加 15 g/L 琼脂粉。氨苄青霉素和卡那霉素的终浓度分别为 100 mg/L 和 50 mg/L。

摇瓶发酵培养基: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 17.1 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, NH_4Cl 1 g/L, NaCl 0.5 g/L, 酵母粉 2 g/L, MgSO_4 2 mmol/L, CaCl_2 0.1 mmol/L,

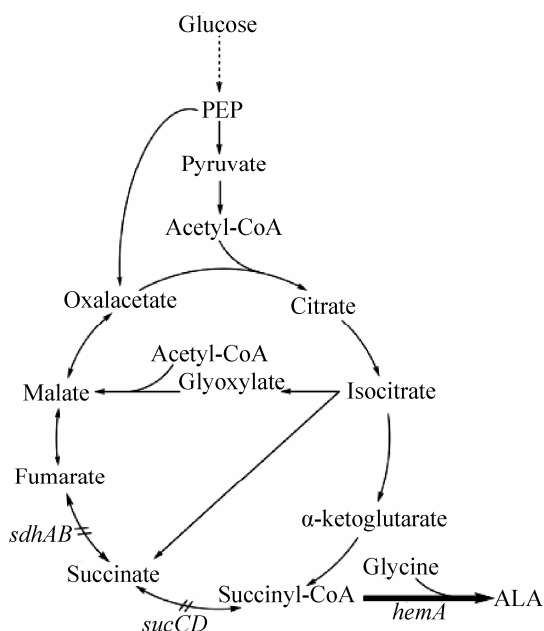


图 1 重组大肠杆菌利用葡萄糖合成 ALA 的途径
Fig. 1 Biosynthesis pathway of ALA from glucose in recombinant *E. coli*.

葡萄糖 10 g/L, 甘氨酸 4 g/L, 琥珀酸 10 g/L, 氨苄青霉素 100 mg/L, 异丙基硫代- β -D-半乳糖苷 (IPTG)终浓度为 0.05 mmol/L。

5 L 发酵罐培养基: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 17.1 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, NH_4Cl 8 g/L, NaCl 0.5 g/L, 酵母粉 5 g/L, MgSO_4 2 mmol/L, CaCl_2 0.1 mmol/L, 氨苄青霉素 100 mg/L, 初始葡萄糖为 10 g/L, 根据需要添加 12 g/L 的琥珀酸, IPTG 终浓度为 0.05 mmol/L。

1.1.3 菌株与质粒

本研究中所用菌株、质粒和引物见表 1。

1.2 方法

1.2.1 *sdhAB* 和 *sucCD* 缺失突变株的构建

大肠杆菌基因敲除采用经典的 Red 重组的方法参考相关文献^[24]进行, 具体操作如下: 首先根据 NCBI 公布的大肠杆菌 MG1655 的基因组序列及辅助载体 pKD13 的序列分别设计引物 *sdhAB*-1/*sdhAB*-2 和 *sucCD*-1/*sucCD*-2, 具体序列见表 1; 以 pKD13 为模板 PCR 扩增得到带有目的基因上下游同源臂的 Kan 抗性基因片段, *Dpn* I 处理后回收纯化得到敲除片段。将培养过夜的含有 pKD46 质粒的大肠杆菌按 1% 的接种量转入

表 1 本研究所用的菌株、质粒与引物

Table 1 Strains, plasmids and primers used in this study

| | Relative characteristics | Sources |
|-----------------------|---|------------|
| Strains | | |
| <i>E. coli</i> MG1655 | Wild type | Lab stock |
| ZPEcA2 | <i>E. coli</i> MG1655 (<i>sdhAB::kan</i>) | This study |
| ZPEcA3 | <i>E. coli</i> MG1655 (<i>sucCD::kan</i>) | This study |
| Plasmids | | |
| pTrc99A | pBR322 origin, <i>bla</i> | Lab stock |
| pKD46 | <i>bla</i> , helper plasmid | [24] |
| pKD13 | <i>bla</i> , FRT- <i>kan</i> -FRT | [24] |
| pZGA24 | pTrc99A containing <i>hemA</i> gene (<i>R. palustris</i> ATCC17001), <i>bla</i> | [15] |
| Primers | | |
| <i>sdhAB</i> -1 | 5'-CTGGTGGTTTACGTGATTTATGGATTCGTTGTGGTGTGGGGTGTGTGATGAT TCCGGGGATCCGTCGACC-3' | This study |
| <i>sdhAB</i> -2 | 5'-ACGGTTTACGCATTACGTTGCAACAACATCGACTTGATAATGGCCGATGGCT GTAGGCTGGAGCTGCTTCG-3' | This study |
| <i>sdhAB</i> -3 | 5'-TTATGGATTCGTTGTGGTGTGGGGT-3' | This study |
| <i>sdhAB</i> -4 | 5'-TGCGCGTCTTATCAGGCCTA-3' | This study |
| <i>sucCD</i> -1 | 5'-GGTCTACGGTTTAAAAGATAACGATTACTGAAGGATGGACAGAACACATGA TTCCGGGGATCCGTCGACC-3' | This study |
| <i>sucCD</i> -2 | 5'-CGGCGAGGGCTATTTCTTATTACAGATATTTATTCAGAACAGTTTTTCAGTG TAGGCTGGAGCTGCTTCG-3' | This study |
| <i>sucCD</i> -3 | 5'-GTTAACGTGTCTTATCAGGCCT-3' | This study |
| <i>sucCD</i> -4 | 5'-CGAAAATCATCGCGATAAGCACA-3' | This study |

100 mL 的 LB 培养基中培养,同时添加终浓度为 1 mmol/L 的 L-阿拉伯糖,培养至 OD_{600} 为 0.5~0.6。将菌液冰浴 20 min, 4 °C 条件下 4 000 r/min 离心 10 min。利用 10%的甘油清洗菌体 3 次,获得电转化感受态细胞。将 10 μ L 的重组片段加入 100 μ L 的感受态细胞中,混匀后冰浴 5 min, 1 800 V 电击 5 ms, 加入 1 mL LB 培养基, 37 °C 培养 1 h 后涂布卡那霉素抗性平板。转化子分别利用 *sdhAB-3/sdhAB-4* 和 *sucCD-3/sucCD-4* 引物进行 PCR 验证,根据条带大小挑选正确突变株,突变株 42 °C 培养去除 pKD46 质粒,并分别命名为 ZPEcA2 和 ZPEcA3。

1.2.2 工程菌株的构建

将带有沼泽红假单胞菌 ATCC17001 菌株 ALAS 的重组质粒 pZGA24 转化至野生型大肠杆菌 MG1655 及 *sdhAB* 缺失突变株 ZPEcA2 和 *sucCD* 缺失突变株 ZPEcA3,涂布氨苄青霉素抗性 LB 平板,过夜培养后挑取阳性克隆提取质粒验证,分别获得重组菌株 MG1655/pZGA24、ZPEcA2/pZGA24 和 ZPEcA3/pZGA24。

1.2.3 摇瓶发酵

将保藏在-80 °C 甘油管中的菌体划线在相应抗性的固体平板上,置于 37 °C 恒温箱培养 12 h 后,挑取单菌落接于液体 LB 培养基中,37 °C、220 r/min 培养 8 h 作为种子培养液。将种子液按 1%的接种量,接入装有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中。在 37 °C、220 r/min 下培养 2 h 后加入终浓度为 0.05 mmol/L 的 IPTG 诱导培养 18 h。

1.2.4 发酵罐发酵

5 L 发酵罐(上海国强生化工程装备有限公司)装液量为 2 L,接种量为 5%,发酵过程温度控制在 37 °C,自动流加浓氨水控制 pH 在 6.5,溶氧维持在 30%以上。发酵过程通过流加 500 g/L 的葡萄糖控制葡萄糖浓度在 5~15 g/L。发酵培养 4 h 后

加入终浓度为 0.05 mmol/L 的 IPTG 和 4 g/L 的甘氨酸,并在 9 h、12 h 和 15 h 时分别补加 2 g/L 的甘氨酸。

1.2.5 代谢物检测方法

ALA 的检测方法:200 μ L 稀释的发酵液加入 100 μ L 乙酸钠缓冲液(pH 4.6),然后加入 5 μ L 乙酰丙酮,100 °C 水浴 15 min,冷却至室温后加入等体积的 Ehrlich's 试剂(42 mL 冰醋酸,8 mL 70%高氯酸,1 g 二甲氨基苯甲醛),显色 10 min 后测 553 nm 波长下的吸光度。

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

有机酸检测方法:菌液室温下 12 000 r/min 离心 2 min,用去离子水稀释 10 倍后,100 °C 煮沸 15 min,室温下 12 000 r/min 离心 15 min,取上清然后用孔径为 0.22 μ m 的无菌滤膜过滤,利用日本岛津高效液相色谱仪(HPLC)检测发酵产物中有机酸成分,色谱柱为 BioRad 公司 Aminex HPX-87H column(300 mm \times 7.8 mm;9 μ m),流动相 2.75 mmol/L 的 H_2SO_4 ,流速 0.6 mL/min,紫外检测波长为 210 nm,柱温 50 °C,进样量为 10 μ L,测样停留时间为 25 min。

2 结果与分析

2.1 *sdhAB* 及 *sucCD* 缺失突变株的构建

利用 Red 重组系统,在野生型大肠杆菌 MG1655 中分别敲除琥珀酸脱氢酶编码基因 *sdhAB* 和琥珀酰辅酶 A 合成酶编码基因 *sucCD*,转化子 PCR 验证结果如图 2 所示,野生型大肠杆菌 *sdhAB* 基因片段大小为 2 553 bp, *sucCD* 基因片段大小为 2 267 bp;而 *sdhAB* 基因缺失的菌株中目的条带大小为 1 408 bp, *sucCD* 基因缺失的菌株中目的条带大小为 1 558 bp,根据条带大小挑选正确转化子并分别命名为 ZPEcA2 和 ZPEcA3。

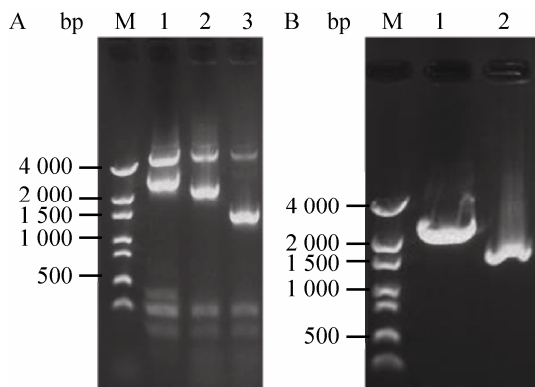


图 2 *sdhAB* 和 *sucCD* 缺失突变株的菌落 PCR 验证
Fig. 2 Colony PCR verification of gene knockout mutants of *E. coli*. (A) M: Trans 4K DNA marker; 1, 2: PCR product of *sdhAB* gene; 3: PCR product of *sdhAB::kan*. (B) M: Trans 4K DNA marker; 1: PCR product of *sucCD* gene; 2: PCR product of *sucCD::kan*.

2.2 琥珀酸脱氢酶缺失对 ALA 积累的影响

为了考察琥珀酸脱氢酶缺失对 ALA 积累的影响, 首先将带有沼泽红假单胞菌 ATCC17001 ALAS 的表达载体 pZGA24 转化 ZPEcA2, 得到重组菌 ZPEcA2/pZGA24, 然后在 250 mL 摇瓶中利用添加底物琥珀酸和甘氨酸的无机盐培养基发酵验证其产 ALA 的能力。结果如表 2 所示, 琥珀酸脱氢酶缺失的 ZPEcA2/pZGA24 菌株中 ALA 产量达到了 2.8 g/L, 比对照菌株 MG1655/pZGA24 提高了 35.9%, 单位菌体 ALA 得率提高 36.9%。该结果表明琥珀酸脱氢酶缺失有助于 ALA 的积累。

考虑到摇瓶培养中 pH、溶氧等因素均无法精细控制, 我们进一步在 5 L 发酵罐中考察了琥珀酸脱氢酶缺失对 ALA 积累的影响, 结果如图 3 所示。在初始添加了 12 g/L 琥珀酸的发酵培养基中, 琥珀酸脱氢酶缺失对菌株的生长并没有明显影响; 在培养 21 h 后, ZPEcA2/pZGA24 的 ALA 的产量达到了 6.35 g/L, 比 MG1655/pZGA24 (5.33 g/L)

表 2 250 mL 摇瓶发酵验证琥珀酸脱氢酶缺失对 ALA 积累的影响

Table 2 Effect of succinic dehydrogenase deficiency on ALA accumulation in 250 mL Erlenmeyer flasks

| Strains ^a | ALA (g/L) | Y_{ALA}/OD_{600} |
|----------------------|-----------|--------------------|
| MG1655/pZGA24 | 2.06±0.07 | 0.46±0.02 |
| ZPEcA2/pZGA24 | 2.80±0.05 | 0.63±0.02 |

The data are presented as the means ± standard deviations from three independent replications. ^aStrains were cultivated in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL M9 medium with 2 g/L yeast extract, 10 g/L succinate, 10 g/L glucose and 4 g/L glycine for 20 hours.

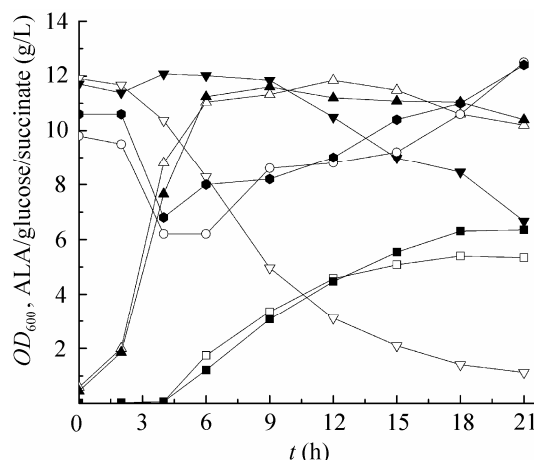


图 3 5 L 发酵罐发酵验证琥珀酸脱氢酶缺失对 ALA 积累的影响

Fig. 3 Effect of succinic dehydrogenase deficiency on ALA accumulation in 5 L fermentor. MG1655/pZGA24 (open symbols), ZPEcA2/pZGA24 (solid symbols), ALA concentration (■□), OD_{600} (△▲), succinate (▽▼), glucose (○●).

的产量提高了 19.14%, 再次证实了琥珀酸脱氢酶缺失能够显著提高 ALA 的产量。有趣的是, 我们发现在 4 h 进行 IPTG 诱导使 ALA 快速产生的阶段 (4~9 h), ZPEcA2/pZGA24 体系中琥珀酸基本上没有消耗, 而 MG1655/pZGA24 体系中的琥珀酸大量消耗, 这意味着在琥珀酸脱氢酶缺失菌株

中 ALA 的产生可能并不依赖于外加琥珀酸,提示我们在该体系中可能无需添加琥珀酸。

2.3 不添加琥珀酸的发酵体系中琥珀酸脱氢酶缺失突变株 ALA 的合成

基于以上分析,我们尝试在不含琥珀酸的合成培养基中进行了 5 L 发酵罐发酵验证。结果如图 4 所示,培养 21 h 后 ZPEcA2/pZGA24 的 ALA 产量仍然可以达到 6.38 g/L,在外源添加甘氨酸时相对于葡萄糖的摩尔转化率达到 0.34。该结果表明突变株可以实现在不外源添加琥珀酸的情况下达到积累 ALA 的目的,从而摆脱了传统的利用 C4 途径合成 ALA 过程中对外源琥珀酸添加的依赖,实现了以葡萄糖为主要碳源仅添加甘氨酸合成 ALA,降低了生产成本。

2.4 琥珀酰辅酶 A 合成酶缺失对 ALA 积累的影响

ALA 的直接合成底物是琥珀酰辅酶 A,根据

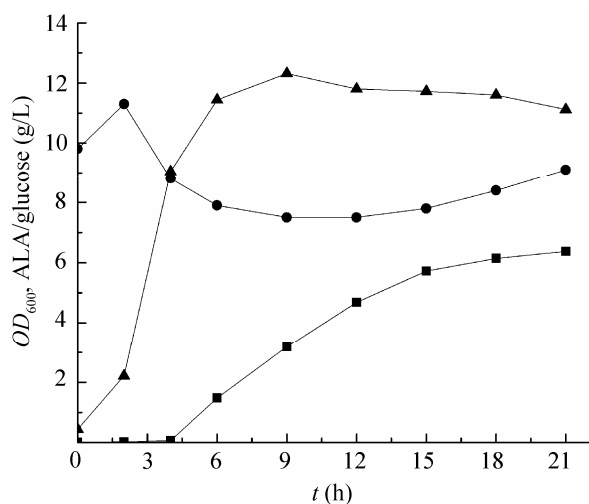


图 4 不添加琥珀酸的培养基中 ZPEcA2/pZGA24 的发酵结果

Fig. 4 ALA accumulation by ZPEcA2/pZGA24 in medium without adding succinate. ALA concentration (■), OD_{600} (▲), glucose (●).

图 1 大肠杆菌代谢途径显示,缺失琥珀酰辅酶 A 合成酶也可能有助于琥珀酰辅酶 A 在胞内的积累,从而强化前体供给,进一步提高 ALA 的积累量。因此,我们将大肠杆菌的琥珀酰辅酶 A 合成酶编码基因 *sucCD* 敲除,得到突变株 ZPEcA3,并将带有 ALAS 的表达载体 pZGA24 转化至 ZPEcA3 中,得到重组菌 ZPEcA3/pZGA24。在不添加琥珀酸的无机盐培养基中进行摇瓶发酵,突变株中 ALA 的产量比对照菌株 MG1655/pZGA24 有明显提高,ALA 产量达到了 1.51 g/L,比对照菌株提高了 17.97%,在仅添加甘氨酸时葡萄糖摩尔转化率提高了 14.29%,单位菌体 ALA 得率提高了 16.67%,该结果表明琥珀酰辅酶 A 合成酶的缺失有助于 ALA 的积累。

为了进一步确认琥珀酰辅酶 A 合成酶缺失对 ALA 积累的作用,我们在不含琥珀酸的合成培养基中进行了 5 L 发酵罐发酵验证,结果如图 5 所示。

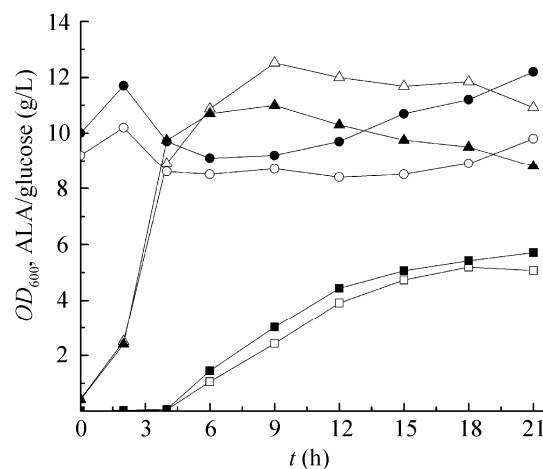


图 5 5 L 发酵罐发酵验证琥珀酰辅酶 A 合成酶缺失对 ALA 积累的影响

Fig. 5 Effect of succinyl-CoA synthetase deficiency on ALA accumulation in 5 L fermentor without supplementation of succinate. MG1655/pZGA24 (open symbols), ZPEcA3/pZGA24 (solid symbols), ALA concentration (■□), OD_{600} (▲△), glucose (○●).

对比两个菌株的生长发现,在 4 h 诱导表达 ALAS 后,琥珀酰辅酶 A 合成酶缺失菌株 ZPEcA3/pZGA24 的生长出现了大幅减缓,在此后整个发酵过程中其生长显著低于对照菌株。但即使如此,到发酵终点 21 h 时 ZPEcA3/pZGA24 的 ALA 产量达到 5.71 g/L,仍比对照菌株提高了 12.4%,单位菌体 ALA 的产量达到了 0.65 g/(L·OD₆₀₀),比对照菌株提高了 39.57%,该结果说明琥珀酰辅酶 A 合成酶的缺失确实有助于 ALA 的积累。

3 讨论

本文通过对大肠杆菌中 ALA 的合成及其前体琥珀酰辅酶 A 的合成途径进行分析,提出敲除琥珀酸脱氢酶编码基因 *sdhAB* 或琥珀酰辅酶 A 编码基因 *sucCD* 有利于 ALA 合成的设想。通过实验证实了在以葡萄糖为主要碳源的改良 M9 培养基中,分别敲除 *sdhAB* 和 *sucCD* 均可以显著提高菌株积累 ALA 的能力,其中琥珀酸脱氢酶缺失菌株 ZPEcA2/pZGA24 中 ALA 的产量比对照菌株提高了 25.59%,而琥珀酰辅酶 A 合成酶缺失对 ALA 合成也有显著的促进作用,其单位菌体 ALA 得率比对照菌株提高了 39.6%。特别是两个重组菌株都可以在不添加昂贵的外源琥珀酸前体的情况下累积 ALA,达到与添加外源琥珀酸相当的发酵水平,显示出良好的过程经济性。在没有外源琥珀酸的情况下,重组菌株利用较廉价的葡萄糖通过三羧酸循环高效地提供琥珀酰辅酶 A。缺失 *sdhAB* 或 *sucCD* 均造成三羧酸循环中断,但是细胞合成代谢的重要前体 α -酮戊二酸、琥珀酰辅酶 A 和草酰乙酸等都能够通过 TCA 循环的正反两个半环得以顺利合成,不会对菌体生长造成致命的影响。而由于琥珀酰辅酶 A 合成酶或琥珀酸脱氢酶的缺失,相当于在 TCA 循环中筑起一条大坝,正向 TCA 循环的结果将强制性地产生大量的琥珀酰辅酶 A

或琥珀酸,为 ALA 的合成提供充沛的前体,ALA 的合成得以不再依赖于外源琥珀酸的添加。

sdhAB 基因的敲除对细胞生长基本没有影响,而 *sucCD* 的敲除则明显地抑制了生长,但是单位菌体 ALA 合成效率更高。由于琥珀酰辅酶 A 在合成代谢中的特殊作用,不能合成琥珀酰辅酶 A 对于微生物是致死的。文献报道 α -酮戊二酸脱氢酶编码基因 *sucAB* 和琥珀酰辅酶 A 合成酶编码基因 *sucCD* 同时缺失则细胞不能存活,而单独缺失 *sucAB* 或 *sucCD* 的细胞仍然可以存活^[25]。在本研究中 *sucCD* 缺失后菌体仍然能够生长,但是受到一定影响,而 *sdhAB* 缺失对菌体生长没有影响。*sucCD* 缺失后除细胞自身的合成代谢和在异源 ALA 合成酶作用下的 ALA 合成外,琥珀酰辅酶 A 没有别的去向,可能造成辅酶 A 的过度占用。由于辅酶 A 对于乙酰辅酶 A 和琥珀酰辅酶 A 等酰基辅酶 A 的合成非常重要,辅酶 A 的相对不足可能因此对细胞生长产生明显的影响。预计通过强化 ALA 合成从而促进辅酶 A 的释放,或通过强化辅酶 A 的供给,比如外源添加有助于辅酶 A 合成的泛酸等物质或人为强化辅酶 A 的生物合成途径,都有助于生长的恢复,最终促进 ALA 的合成。而 *sdhAB* 缺失的情况则不同。琥珀酰辅酶 A 合成酶催化的反应是可逆的,一方面,过量的琥珀酰辅酶 A 可以通过琥珀酰辅酶 A 合成酶转变为琥珀酸,因而辅酶 A 不存在被过度占用的问题,已知琥珀酸可以在大肠杆菌体内体外过量积累,从而不会对细胞生长造成明显影响。另一方面,高浓度的琥珀酸也使得琥珀酰辅酶 A 合成酶催化反应的可逆性程度有所转变,可能使得琥珀酰辅酶 A 也有较高浓度的积累,从而推动 ALA 的高效合成。琥珀酸就像细胞内部的一个大型水库,能够有效地调控辅酶 A 和琥珀酰辅酶 A 的平衡。所以,与 *sucCD* 缺失突变株相比,*sdhAB* 缺失突变株中琥珀

酰辅酶 A 的去向将更加灵活, 细胞生长和 ALA 合成得到更好的平衡。这些分析和假设可以通过仔细设计的代谢组学实验获得证实。

本研究首次清晰地证实了利用重组大肠杆菌生产 ALA 可以不需要添加外源琥珀酸, 建立了以葡萄糖为主要碳源的 ALA 发酵体系, 摆脱了现有技术中对琥珀酸的依赖和 LB 加富培养基的使用, 将显著降低 ALA 的生产成本, 对 ALA 的工业化和应用推广有重要的意义。

REFERENCES

- [1] Sasaki K, Watanabe M, Tanaka T. Biosynthesis, biotechnological production and applications of 5-aminolevulinic acid. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 58(1): 23–29.
- [2] Kennedy JC, Pottier RH, Pross DC. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. *J Photochem Photobiol B*, 1990, 6(1/2): 143–148.
- [3] Preuß M, Renner C, Krupp W, et al. The use of 5-aminolevulinic acid fluorescence guidance in resection of pediatric brain tumors. *Childs Nerv Syst*, 2013, 29: 1263–1267.
- [4] Edwards S, Jackson D, Reynoldson J, et al. Neuropharmacology of delta-aminolaevulinic acid. II. Effect of chronic administration in mice. *Neurosci Lett*, 1984, 50(1/3): 169–173.
- [5] Zhao YY, Hu XH, Zou ZR, et al. Effects of seed soaking with different concentrations of 5-aminolevulinic acid on the germination of tomato (*Solanum lycopersicum*) seeds under NaCl stress. *Acta Ecol Sin*, 2013, 33(1): 62–70 (in Chinese). 赵艳艳, 胡晓辉, 邹志荣, 等. 不同浓度 5-氨基乙酰丙酸(ALA)浸种对 NaCl 胁迫下番茄种子发芽率及芽苗生长的影响. *生态学报*, 2013, 33(1): 62–70.
- [6] Miyachi N, Tanaka T, Nishikawa S, et al. Preparation and chemical properties of 5-aminolevulinic acid and its derivatives. *Porphyrins*, 1998, 7(2/3): 342–347.
- [7] Burnham BF. δ -Aminolevulinic acid synthase (*Rhodospseudomonas sphaeroides*). *Methods Enzymol*, 1970, 17A: 195–204.
- [8] Schön A, Krupp G, Gough S, et al. The RNA required in the first step of chlorophyll biosynthesis is a chloroplast glutamate tRNA. *Nature*, 1986, 322(6076): 281–284.
- [9] Nishikawa S, Watanabe K, Tanaka T, et al. *Rhodobacter sphaeroides* mutants which accumulate 5-aminolevulinic acid under aerobic and dark conditions. *J Biosci Bioeng*, 1999, 87(6): 798–804.
- [10] Kamiyama H, Hotta Y, Tanaka T, et al. Production of 5-aminolevulinic acid by a mutant strain of a Photosynthetic bacterium. *J Biosci Bioeng*, 2000, 78(2): 48–55.
- [11] Van der Werf MJ, Zeikus JG. 5-Aminolevulinate production by *Escherichia coli* containing the *Rhodobacter sphaeroides hemA* gene. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(10): 3560–3566.
- [12] Xie L, Hall D, Eiteman MA, et al. Optimization of recombinant aminolevulinate synthase production in *Escherichia coli* using factorial design. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, 63: 267–273.
- [13] Lin JP, Fu WQ, Cen PL. 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. *Bioresour Technol*, 2009, 100: 2293–2297.
- [14] Lin JP, Zhu L, Yang J, et al. A method using transient anaerobic fermentation of recombinant *Escherichia coli* metabolism regulation: China, 201210013562.0. 2012-10-24 (in Chinese). 林建平, 朱力, 杨俊, 等. 一种用短暂厌氧发酵调节重组大肠杆菌代谢的方法: 中国专利, 201210013562.0. 2012-10-24.
- [15] Zhang LL, Chen JZ, Chen N, et al. Cloning of two 5-Aminolevulinic acid synthase isozymes HemA and HemO from *Rhodospseudomonas palustris* with favorable characters for 5-aminolevulinic acid production. *Biotechnol Lett*, 2013, doi: 10.1007/s10529-013-1143-4.

- [16] Choi HP, Lee YM, Yun CW, et al. Extracellular 5-aminolevulinic acid production by *Escherichia coli* containing the *Rhodopseudomonas palustris* KUGB306 *hemA* gene. *J Microbiol Biotechnol*, 2008, 18(6): 1136–1140.
- [17] Choi C, Hong BS, Sung HC, et al. Optimization of extracellular 5-aminolevulinic acid production from *Escherichia coli* transformed with ALA synthase gene of *Bradyrhizobium japonicum*. *Biotechnol Lett*, 1999, 21(6): 551–554.
- [18] Qin G, Lin J, Liu X, et al. Effects of medium composition on production of 5-aminolevulinic acid by recombinant *Escherichia coli*. *J Biosci Bioeng*, 2006, 102(4): 316–322.
- [19] Liu XX, Wang L, Wang YJ, et al. D-glucose enhanced 5-aminolevulinic acid production in recombinant *Escherichia coli* culture. *Appl Biochem Biotechnol*, 2010, 160(3): 822–830.
- [20] Lee DH, Jun WJ, Shin DH, et al. Effect of culture conditions on production of 5-aminolevulinic acid by recombinant *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2005, 69(3): 470–476.
- [21] Zhang YX, Wang J, Wang D, et al. Advances in genetic engineering for production of succinic acid by *Escherichia coli*. *China Biotechnol*, 2009, 29(7): 108–117 (in Chinese).
张玉秀, 王姣, 王丹, 等. 大肠杆菌产琥珀酸基因工程研究进展. *中国生物工程杂志*, 2009, 29(7): 108–117.
- [22] Fu WQ. Studies on 5-aminolevulinate production via recombinants optimization and process design [D]. Zhejiang: Zhejiang University, 2009 (in Chinese).
傅维琦. 产 5-氨基乙酰丙酸重组菌的优化和发酵过程调控研究[D]. 浙江: 浙江大学, 2009.
- [23] Kang Z, Wang Y, Wang Q, et al. Metabolic engineering to improve 5-aminolevulinic acid production. *Bioeng Bugs*, 2011, 2(6): 342–345.
- [24] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(12): 6640–6645.
- [25] Yu BJ, Sung BH, Lee JY, et al. *sucAB* and *sucCD* are mutually essential genes in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*, 2006, 254(2): 245–250.

(本文责编 陈宏宇)