

解淀粉芽胞杆菌 *hemX* 基因缺失对血红素合成的影响

刘佳萌¹, 刘业学¹, 赵晨旭¹, 王稳航², 李庆刚¹, 路福平¹, 李玉^{1*}

1 天津科技大学生物工程学院 工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津 300457

2 天津科技大学食品科学与工程学院, 天津 300457

刘佳萌, 刘业学, 赵晨旭, 王稳航, 李庆刚, 路福平, 李玉. 解淀粉芽胞杆菌 *hemX* 基因缺失对血红素合成的影响[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 1119-1130.

LIU Jiameng, LIU Yexue, ZHAO Chenxu, WANG Wenhong, LI Qinggang, LU Fuping, LI Yu. Effect of *hemX* gene deletion on heme synthesis in *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 1119-1130.

摘要: 血红素是一种广泛存在于生物体中的卟啉类化合物, 具有多种生理功能。解淀粉芽胞杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)具有易于培养、分泌表达能力较强等特点, 是一种重要的工业菌株。为了筛选血红素合成的最优出发菌株, 以不添加和添加 5-氨基乙酰丙酸(5-aminolevulinic acid, ALA)的方式, 对实验室保藏菌株进行筛选, 发现不添加 ALA 时, 菌株 BA、BA Δ 6、BA Δ 6 Δ *sigF* 的血红素产量无明显差别; 然而添加 ALA 后, BA Δ 6 Δ *sigF* 的血红素产量和比生产能力均为最高, 分别达到 200.77 μ mol/L 和 615.70 μ mol/(L·g DCW)。因此, 以 BA Δ 6 Δ *sigF* 为出发菌株, 敲除编码细胞色素组装蛋白 HemX 的 *hemX* 基因, 探究其在血红素合成途径中的作用, 发现敲除菌株发酵液明显变红, 且生长未受到明显影响; 摇瓶发酵 12 h 时 ALA 浓度最高, 为 82.13 mg/L, 略高于对照的 75.11 mg/L; 不添加 ALA 时, 血红素产量和比生产能力分别为对照的 1.99 倍和 1.45 倍; 添加 ALA 后, 血红素产量和比生产能力分别为对照的 2.08 倍和 1.72 倍; 实时定量荧光 PCR (real-time quantitative fluorescent PCR, RT-qPCR)表明, *hemA*、*hemL*、*hemB*、*hemC*、*hemD*、*hemQ* 基因的转录水平上调。说明 *hemX* 基因的缺失可提高血红素产量, 这为高产血红素菌株的开发奠定了基础。
关键词: 解淀粉芽胞杆菌; 血红素; 5-氨基乙酰丙酸; *hemX* 基因

资助项目: 天津市合成生物技术创新能力提升行动(TSBICIP-KJGG-004); 天津科技大学研究生科研创新项目(KYS202132)
This work was supported by the Tianjin Synthetic Biotechnology Innovation Capacity Improvement Project (TSBICIP-KJGG-004) and the Tianjin University of Science and Technology Graduate Research Innovation Program (KYS202132).

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-22-60601958, E-mail: liyu@tust.edu.cn

Received: 2022-06-27; Accepted: 2022-09-07

Effect of *hemX* gene deletion on heme synthesis in *Bacillus amyloliquefaciens*

LIU Jiameng¹, LIU Yexue¹, ZHAO Chenxu¹, WANG Wenhong², LI Qinggang¹,
LU Fuping¹, LI Yu^{1*}

1 Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, College of Bioengineering,
Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

2 School of Food Science and Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

Abstract: Heme, which exists widely in living organisms, is a porphyrin compound with a variety of physiological functions. *Bacillus amyloliquefaciens* is an important industrial strain with the characteristics of easy cultivation and strong ability for expression and secretion of proteins. In order to screen the optimal starting strain for heme synthesis, the laboratory preserved strains were screened with and without addition of 5-aminolevulinic acid (ALA). There was no significant difference in the heme production of strains BA, BA Δ 6 and BA Δ 6 Δ *sigF*. However, upon addition of ALA, the heme titer and specific heme production of strain BA Δ 6 Δ *sigF* were the highest, reaching 200.77 μ mol/L and 615.70 μ mol/(L·g DCW), respectively. Subsequently, the *hemX* gene (encoding the cytochrome assembly protein HemX) of strain BA Δ 6 Δ *sigF* was knocked out to explore its role in heme synthesis. It was found that the fermentation broth of the knockout strain turned red, while the growth was not significantly affected. The highest ALA concentration in flask fermentation reached 82.13 mg/L at 12 h, which was slightly higher than that of the control 75.11 mg/L. When ALA was not added, the heme titer and specific heme production were 1.99 times and 1.45 times that of the control, respectively. After adding ALA, the heme titer and specific heme production were 2.08 times and 1.72 times higher than that of the control, respectively. Real-time quantitative fluorescent PCR showed that the expressions of *hemA*, *hemL*, *hemB*, *hemC*, *hemD*, and *hemQ* genes at transcription level were up-regulated. We demonstrated that deletion of *hemX* gene can improve the production of heme, which may facilitate future development of heme-producing strain.

Keywords: *Bacillus amyloliquefaciens*; heme; 5-aminolevulinic acid; *hemX* gene

血红素是一种含铁的卟啉化合物, 具有氧气运输、电子传递等多种生理功能, 在食品、医疗、妆化等方面均有广泛应用^[1]。近年来, 随着对植物血红蛋白的不断研究, 作为其呈色物质的血红素也引起了越来越多的关注^[2]。微生物合成法因其安全性、环境友好性逐步成为合成血红素的一种可行性的策略, 目前已有研究分别利用大肠杆菌^[3]和谷氨酸棒杆菌^[4]为宿

主菌初步实现血红素的合成, 然而由于血红素合成途径的复杂性, 血红素的产量仍然较低。

解淀粉芽胞杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)是一种革兰氏阳性菌, 被美国食品和药物管理局(Food and Drug Administration, FDA)认证为安全菌株(generally recognized as safe, GRAS)^[5], 是生产众多的酶类、有机酸以及多糖等产品的重要工业生产菌株^[6]。在 *B. amyloliquefaciens* 中,

血红素的合成途径如图 1 所示, 谷氨酸通过 C5 途径合成 5-氨基乙酰丙酸(5-aminolevulinic acid, ALA)后, 分别经过革兰氏阳性菌固有的粪卟啉依赖性(coproporphyrin-dependent, CPD)途径和常见于革兰氏阴性菌的原卟啉依赖性(protoporphyrin-dependent, PPD)途径合成血红素^[7], 相关基因仅位于 4 个基因簇上, 其中基因 *hemA*、*hemL*、*hemB*、*hemC*、*hemD* 属于 *hemAXCDBL* 基因簇^[8], *hemE*、*hemY*、*hemH* 属于 *hemEHY* 基因簇^[9]。而在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中, 血红素通过 PPD 途径合成, 相关基因位于 8 个不同的基因簇^[3]; 另一常用底盘谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)通过 CPD 途径合成血红素, 相关基因位于 5 个基因簇上^[4], 这意味着基因簇更少的 *B. amyloliquefaciens* 更易于通过表达元件优化为理想的生产菌株。

研究表明, 位于 *hemAXCDBL* 基因簇的 *hemX* 基因编码的蛋白 HemX 是一种细胞色素组装蛋白^[10], 该蛋白对 HemA (谷氨酰-tRNA 还原酶)的蛋白浓度具有负调节作用, 从而使 HemA 浓度在菌体内维持较低的水平^[11]。而 HemA 的表达水平和血红素合成的关键前体 ALA 呈正相关, 充足的 ALA 供应是血红素合成的必要前提^[12]。

因此, 本研究从实验室已有的菌株中筛选出适合血红素合成的最佳出发菌株, 然后以同源重组的方式对出发菌株中的 *hemX* 基因进行敲除, 分别从菌体生长状况、ALA 及血红素积累情况和血红素合成相关基因的转录水平几个方面, 探讨 *hemX* 基因缺失对血红素合成的影响, 为开发以 *B. amyloliquefaciens* 为宿主菌进行血红素的合成和血红素的工业化生产奠定基础。

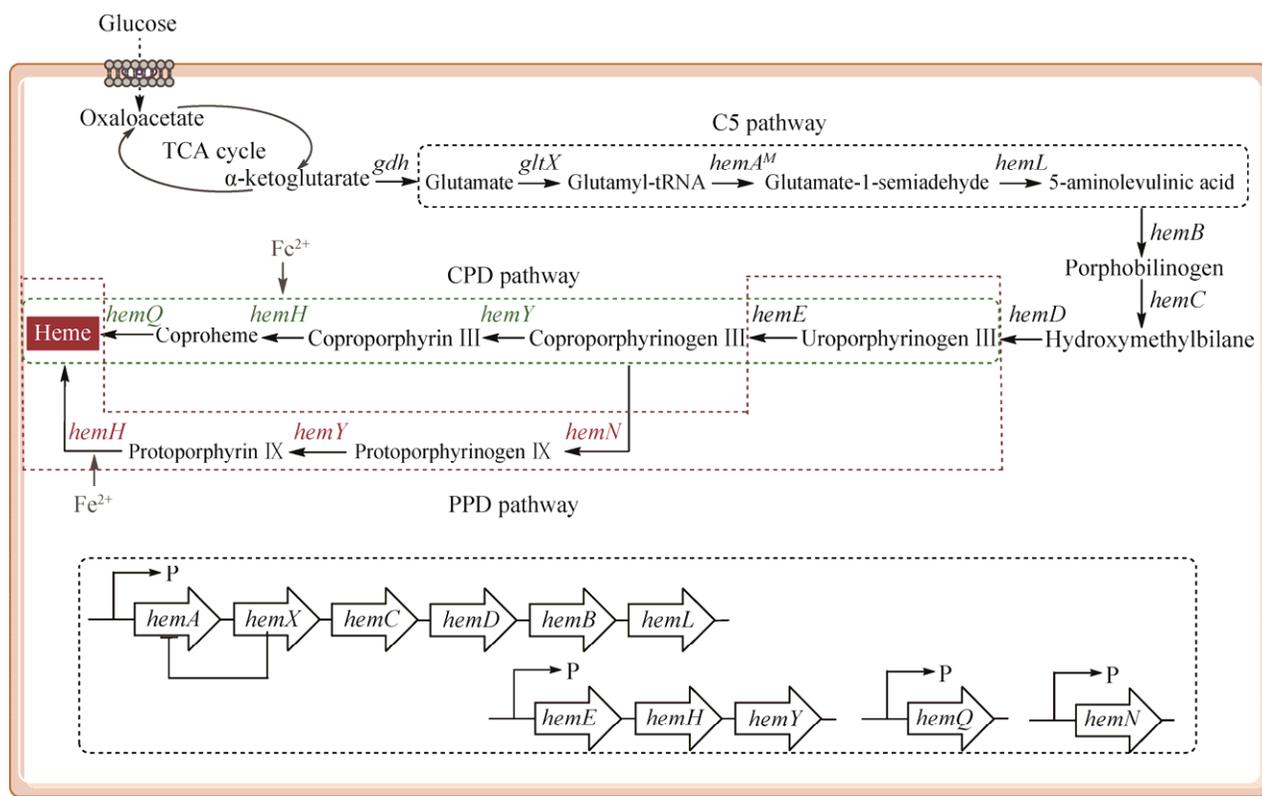


图 1 解淀粉芽胞杆菌中血红素合成途径

Figure 1 Heme synthesis pathway in *Bacillus amyloliquefaciens*.

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和引物

本研究中使用的amp;所有菌株、质粒均列于表 1 中。

本研究中所用引物详细信息见表 2，由天津金唯智生物科技有限公司合成。

1.1.2 主要试剂和仪器

限制性内切酶 *Xba* I 和 *Sma* I，购自 Thermo 公司；ClonExpress® MultiS One Step Cloning Kit 和反转录试剂盒，购自北京全式金生物技术有限公司；质粒提取试剂盒、纯化试剂盒，购自 Omega 公司；总 RNA 提取试剂盒，

购自北京天根生化试剂有限公司；5-氨基乙酰丙酸盐酸盐(ALA-HCl)标准品、氯高铁血红素(hemin)标准品，购自 Sigma 公司；血红素检测试剂盒，购自 BioAssay Systems 公司；卡那霉素(kanamycin)、阿拉伯糖(arabinose)，购自上海现代制药股份有限公司。

电击转化仪，购自 Bio-Rad 公司；MaxQ6000 型恒温调速摇床，购自 Thermo Scientific 公司；酶标仪，购自 Thermo Scientific 公司。

1.1.3 培养基

Luria Bertani (LB) 液体培养基：0.5%酵母粉，1%蛋白胨，1%氯化钠，121 °C、20 min 灭菌。

LB 固体培养基：LB 液体培养基加入 1.8%的琼脂粉，121 °C、20 min 灭菌。

表 1 本研究中所使用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in the study

Strains/Plasmids	Characteristics	Sources
Strains		
<i>E. coli</i> JM109	Host for plasmid construction	Laboratory stock
<i>E. coli</i> EC135 pM.Bam	Host for plasmid-methylated modification	Laboratory stock
<i>B. amyloliquefaciens</i> TCCC111018 (BA)	Wild type strain, host for strain screening	Laboratory stock
BAΔ6	Genome deleted strain knocking-out six extracellular protease genes <i>nprE</i> , <i>aprE</i> , <i>bpr</i> , <i>epi</i> , <i>vpr</i> , <i>mpr</i> , host for strain screening	[13]
BAΔ6Δ <i>sigF</i>	Genome deleted strain knocking-out six extracellular protease genes <i>nprE</i> , <i>aprE</i> , <i>bpr</i> , <i>epi</i> , <i>vpr</i> , <i>mpr</i> , and spore formation gene <i>sigF</i> , host for strain screening	[13]
BAΔ6Δ <i>sigF</i> Δ <i>hemX</i>	BAΔ6Δ <i>sigF</i> deleting gene <i>hemX</i>	This study
Plasmids		
pWH-T2	Kan ^r , <i>E. coli</i> - <i>B. amyloliquefacien</i> shuttle vector for homologous recombination knockout	Hubei University
pWH-T2-Δ <i>hemX</i>	Kan ^r , pWH-T2 harboring Up and Down of <i>hemX</i>	This study

表 2 本研究所用的引物

Table 2 Primers used in the study

Primers	Sequences (5'→3')
Up-F	ccaccgcggtggcgccgctctagaATCCTGCGCTGAACGATCTTG
Up-R	gcaggaagtaAGCCTTCCGGTTGTGTTGAAG
Down-F	ccggaagctTACTTCCTGCTCGGAAGCCTATC
Down-R	ttaacgaattctgcagcccgggACGACATCATCTTCCAGCCC

The lowercase letters in the table are the homology arm sequences.

1.1.4 母液的配制

FeSO₄: 称取 0.75 g FeSO₄, 去离子水定容至 1 L, 经 0.22 μm 滤膜过滤除菌后于 -20 °C 冰箱保存备用。

ALA-HCl: 称取 5 g ALA-HCl, 去离子水定容至 50 mL, 经 0.22 μm 滤膜过滤除菌后于 -20 °C 冰箱保存备用。

1.2 方法

1.2.1 出发菌株的筛选

以菌株 BA、BAΔ6 和 BAΔ6Δ*sigF* 为研究对象, 分为(-) ALA 组(不添加 ALA-HCl)和(+) ALA 组(添加 ALA-HCl)筛选出血红素合成的出发菌株。即经过三区划线活化后, 挑取单克隆接种于含 50 mL 的新鲜 LB 培养基的 250 mL 锥形瓶中, 37 °C 培养过夜, 以 2% 的接种量接种到新鲜 LB 培养基中, 待 OD₆₀₀ 达到 1.0 时, 向(-) ALA 组加入 500 μL 的 FeSO₄ 溶液, 向(+) ALA 组加入 500 μL 的 FeSO₄ 溶液和 1 500 μL 的 ALA-HCl 溶液, 培养 60 h 检测发酵液中血红素的产量及菌体干重。

1.2.2 解淀粉芽胞杆菌 *hemX* 基因的敲除

以本实验室保存的 BAΔ6Δ*sigF* 为出发菌株, 参考相关文献进行感受态的制备^[14]。大肠杆菌 *E. coli* JM109 和 *E. coli* EC135 pM.Bam 分别用于质粒构建和质粒甲基化修饰, 根据文献制备感受态^[15]。基因敲除方法具体参考文献^[16]。利用表 2 中的引物扩增敲除基因 *hemX* 的上下游同源臂, 与线性载体 pWH-T2 通过无缝克隆连接, 将连接产物转化至 *E. coli* JM109 感受态细胞中; 将构建成功的质粒经过 *E. coli* EC135 pM.Bam 甲基化后, 通过电穿孔法转化至 BAΔ6Δ*sigF* 感受态细胞中; 之后, 在 45 °C 传代培养至第 3 代(单交换)、37 °C 传代培养至第 2 代(双交换)后, 以影印平板法在无抗性和含卡那霉素抗性的 LB 固体平板培养基上筛选,

通过菌落 PCR 扩增及琼脂糖凝胶电泳验证条带大小正确后, 送至天津金唯智生物科技有限公司测序。

1.2.3 菌株生长曲线的测定

将缺失菌株和对照菌株活化后以 2% 的接种量接种于含有 50 mL 新鲜 LB 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中, 37 °C、220 r/min 振荡培养 48 h, 前期每隔 2 h 取样, 待菌体浓度下降后隔 6 h 取样, 使用酶标仪在 600 nm 波长处检测菌液吸光度, 并绘制各菌株的生长曲线。

1.2.4 菌体干重的测定

将发酵液以 12 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体, 经过 0.8% 生理盐水清洗 2 遍, 将菌体置于 115 °C 干燥箱中, 干燥至前后 2 次质量差不超过 2 mg, 即为菌体干重。

1.2.5 ALA 浓度的检测

参考 Mauzerall 等改良的 Ehrlich's 方法^[17]检测 ALA。取稀释或未稀释的发酵液上清 100 μL, 加入 134 μL 的乙酸钠缓冲液(pH 4.6)和 12 μL 的乙酰丙酮, 振荡混匀后, 100 °C 煮沸 15 min, 自然冷却到室温, 加入 246 μL 的 DMAB 试剂(84 mL 冰乙酸、16 mL 70%高氯酸、2 g 对二甲氨基苯甲醛), 混匀后反应 10 min, 利用酶标仪在 554 nm 波长处检测, 并根据以 ALA-HCl 为标品绘制的标准曲线计算 ALA 浓度。

1.2.6 血红素产量的检测

根据血红素检测试剂盒的说明书, 基于改良的碱性溶液方法将血红素转化成颜色均匀的有色物质, 使其在 400 nm 波长处测得的颜色强度与样品中的血红素浓度成正比。即分别吸取 50 μL 的超纯水(空白)、标准品和样品于 96 孔板底部; 之后, 向超纯水和标准品中分别加入 200 μL 的水, 向样品中加入等量的检测试剂, 反应 5 min 后, 利用酶标仪在 400 nm 波长处对血红素产量进行检测^[18-19], 并按照以下公式进行换算:

$$C_t = \frac{OD_{\text{样品}} - OD_{\text{空白}}}{OD_{\text{标准品}} - OD_{\text{空白}}} \times 62.5 \text{ (}\mu\text{mol/L)}$$

1.2.7 基因转录水平的检测

各菌株以 37 °C、220 r/min 的条件发酵培养至对数期后,离心收集菌体,之后按照天根 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA,并使用核酸定量仪测定提取的 RNA 浓度。接着,按照反转录试剂盒说明书将 RNA 直接反转录成 cDNA,通过 SYBR® Green I 嵌合荧光法,以水为阴性对照,以 16S rRNA 基因为内参基因,以反转录的 cDNA 为模板,按表 3 中的引物进行实时荧光定量 PCR。利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 比较各个基

表 3 本研究所用实时荧光定量 PCR 引物

Table 3 Primers used for real time fluorescent quantitative PCR

Genes	Primers	Sequences (5'→3')
<i>glx</i>	qXF	ACGTGAAGAGCAGATCGCCC
	qXR	AGTCGCCGATACCGTCTGATTC
<i>hemA</i>	qAF	CCGATTCTGAAAGCGAAAGAG
	qAR	TGAAACGAATGAACCGTCTGG
<i>hemL</i>	qLF	GGCTGACGCAGGCGTATTT
	qLR	AGCGGCTGATAGTCTGGAACA
<i>hemB</i>	qBF	ACCTGCCGCTGGTCGCTTAT
	qBR	CCTGCACGTTTCATGCTCGTTA
<i>hemC</i>	qCF	GCCGAACGGGCTTTCTTG
	qCR	CAGACATCATCGCCGCACA
<i>hemD</i>	qDF	ATGCGGTCGGAGACGAAAA
	qDR	TATAGGTGTCAGGCACATGGG
<i>hemE</i>	qEF	ACGCCAGAAAACAAGGCATC
	qER	GGGAATACGCCGTGTCCTAAA
<i>hemN</i>	qNF	CGTGAGGAGCAGATTGAAGA
	qNR	GTCAACCGAGCGTCCGAAT
<i>hemY</i>	qYF	ACCTGTGTCACCCGCTGG
	qYR	CCCACCCCTTCAAAGATGC
<i>hemH</i>	qHF	GGCAGAGCGAAGGGAACAC
	qHR	GAAGCCTGCGGGCACATA
<i>hemQ</i>	qQF	GATTCTTCGCCGACAATGG
	qQR	TTTCGCTTCCGGCAGCTC
16S	16S-F	GGGCTACACACGTGCTACAATGG
rRNA	16S-R	GTATTCACCGCGCATGCTG

因 C_t 值从而计算其转录水平,将出发菌株 (BA Δ 6 Δ *sigF*) 基因的转录水平定为恒定值表示敲除菌株基因的相对转录水平。

1.2.8 数据分析

使用 SPSS Statistics 26 进行数据的处理及分析。

2 结果与分析

2.1 解淀粉芽胞杆菌合成血红素出发菌株的筛选

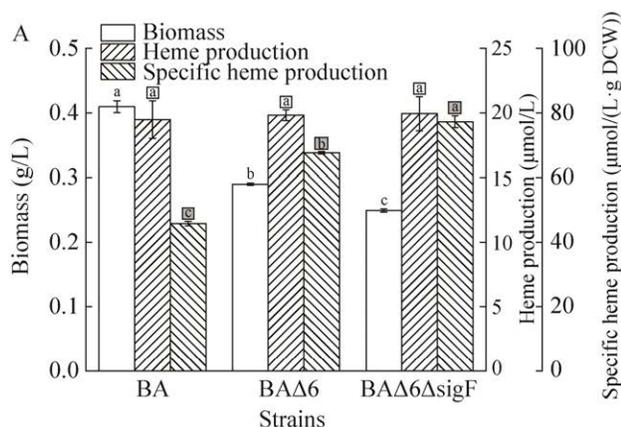
研究发现,在敲除 *B. amyloliquefaciens* 中的 6 个胞外蛋白酶后可显著提高外源碱性蛋白酶表达量^[13],与枯草芽胞杆菌的相关报道相似^[20]。在此基础上,芽胞形成因子 *sigF* 基因的敲除可使碱性蛋白酶的酶活力得到进一步提升^[21]。然而,这些研究主要着重于异源酶表达方面^[22],异源酶表达优良的基因组删减菌株是否适用于血红素等小分子的生产需要进一步研究。

因此,以野生型菌株 BA、敲除 6 个胞外蛋白酶的菌株 BA Δ 6、敲除 6 个胞外蛋白酶和芽胞形成因子 *sigF* 的菌株 BA Δ 6 Δ *sigF* 为研究对象,对摇瓶培养 60 h 后发酵液中的血红素产量进行分析,结果如图 2A 所示。不添加 ALA 时,菌株 BA、BA Δ 6 和 BA Δ 6 Δ *sigF* 的血红素产量无明显差别,而 BA Δ 6 和 BA Δ 6 Δ *sigF* 的血红素比生产能力却均远高于 BA,最高的菌株为 BA Δ 6 Δ *sigF*,达到 77.23 μ mol/(L·g DCW),分别为 BA 和 BA Δ 6 的 1.69 倍和 1.14 倍,说明该菌生长情况弱于二者,但对能量和碳源的利用效率较高,充足的 ALA 是血红素高产的必要前提,为了探究删减菌株在 ALA 充足情况下是否仍具有优势,当培养至 OD_{600} 达到 1.0 时,向摇瓶中添加终浓度为 3.0 g/L 的 ALA-HCl,并在 60 h 时分析血红素产量(图 2B)。结果表明,在 ALA 充足

的情况下,菌株 BA 的血红素产量为 $90.97 \mu\text{mol/L}$, 比生产能力为 $187.15 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{g DCW})$; 敲除 6 个胞外蛋白酶后,菌株 BA Δ 6 的血红素产量大幅提高,达到 $176.61 \mu\text{mol/L}$, 为 BA 的 1.94 倍, 其比生产能力为 BA 的 2.37 倍; 与上文一致, 菌株 BA Δ 6 Δ sigF 的血红素产量仍最高, 可达 $200.76 \mu\text{mol/L}$, 为 BA 的 2.21 倍, 其比生产能力为 BA 的 3.29 倍。说明虽然菌株 BA Δ 6 Δ sigF 生长情况相对较差, 但不影响血红素的生产合成, 总产量高于 BA 和 BA Δ 6; 而比生产能力高则证明该菌单位菌体生产能力较强, 具有更优的底物利用率, 可进一步节约成本。综上所述, 菌株 BA Δ 6 Δ sigF 为血红素合成的理想出发菌株。

2.2 解淀粉芽胞杆菌 *hemX* 基因缺失菌株的构建

从上文可知, 添加 ALA 可使血红素大量合成, 而 *hemX* 基因编码的 HemX 蛋白对 ALA 合成的关键酶 HemA 具有负调节作用^[11]。为了探究 *B. amyloliquefaciens* 中 *hemX* 基因的缺失对血红素合成的影响, 本研究以 BA Δ 6 Δ sigF 为出发菌株, 对 *hemX* 基因进行敲除(图 3A)。



如图 3B 所示, 菌液出现明显的红色; 对其进行进一步验证, 结果如图 3C 所示, 通过菌落 PCR 扩增得到 1 719 bp 大小的条带, 较阴性对照缺失 681 bp, 结合测序结果, 证明 *hemX* 基因已被成功敲除, 将敲除菌株命名为 BA Δ 6 Δ sigF Δ *hemX*。

2.3 *hemX* 基因缺失对生长的影响

为了研究敲除 *hemX* 基因对菌体生长的影响, 在 LB 液体培养基中对敲除菌株 BA Δ 6 Δ sigF Δ *hemX* 和对照菌株 BA Δ 6 Δ sigF 的 0–48 h 内生长情况进行检测, 并绘制生长曲线(图 4)。结果表明, 敲除 *hemX* 基因后的菌体密度与出发菌株无显著性差异($P>0.05$), 且均在第 16 h 时达到最大值, 说明 *hemX* 基因的缺失不会对菌体生长造成负面影响。

2.4 *hemX* 基因缺失对 ALA 的影响

HemX 蛋白对 HemA 蛋白具有负调节作用^[11], 因此探究了 *B. amyloliquefaciens* 中 *hemX* 基因的缺失是否会使 ALA 积累, 通过定点取样检测了 BA Δ 6 Δ sigF 和 BA Δ 6 Δ sigF Δ *hemX* 发酵液中 ALA 浓度。如图 5 所示, BA Δ 6 Δ sigF Δ *hemX* 和 BA Δ 6 Δ sigF 在发酵第 12 h 时的 ALA 浓度最

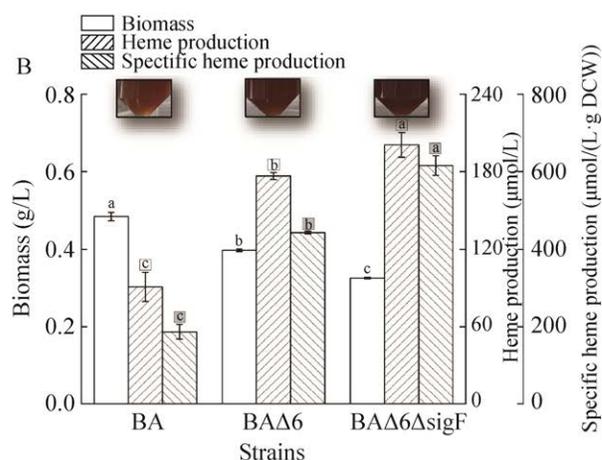


图 2 菌株 BA、BA Δ 6 和 BA Δ 6 Δ sigF 血红素合成情况

Figure 2 Comparison of heme production in different strains of BA, BA Δ 6 and BA Δ 6 Δ sigF. A: Without addition of ALA. B: Addition ALA of 3.0 g/L. The data compares with each other in the filled frame with same color and different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$).

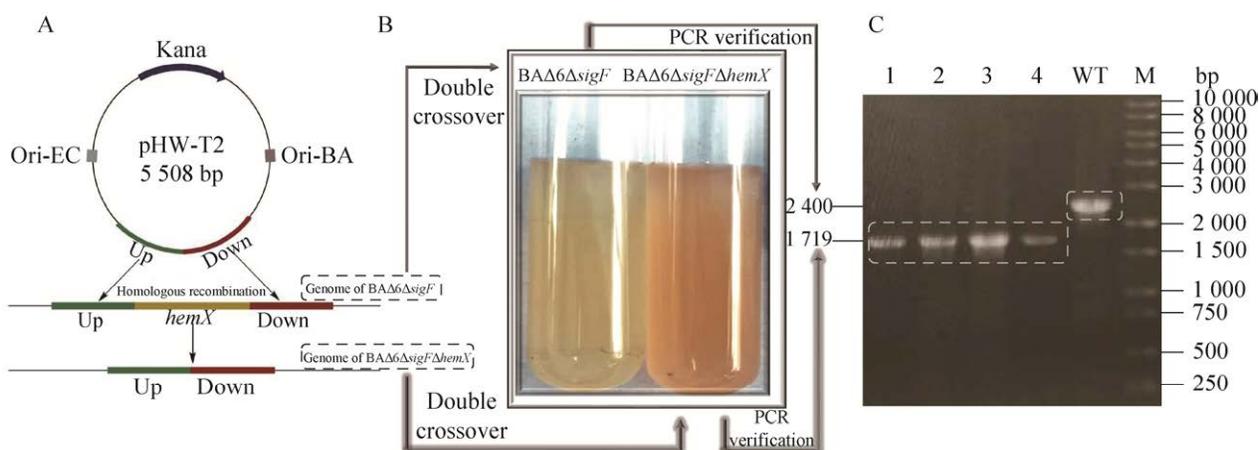


图3 菌株 $BA\Delta 6\Delta sigF\Delta hemX$ 的构建

Figure 3 Construction of strain $BA\Delta 6\Delta sigF\Delta hemX$. A: Flow chart of *hemX* gene knocked-out. B: Color of fermentation broth. C: PCR identification.

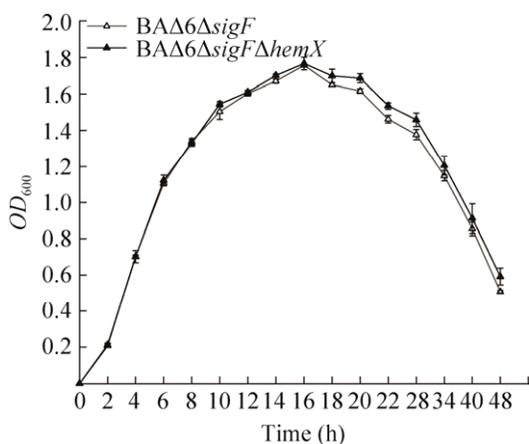


图4 *hemX* 基因敲除对菌株生长的影响

Figure 4 Effect of *hemX* gene knockout on strain growth.

高, 分别为 82.13 mg/L 和 75.11 mg/L, 敲除菌株的 ALA 浓度提高了 9% ($P < 0.05$); 之后, 二者的 ALA 浓度均随着时间而降低, 直到 48 h 逐渐趋于平稳, 敲除菌株 ALA 浓度的下降速度快于出发菌株 ($P < 0.05$), 可能是 *hemX* 基因敲除后, 更利于 ALA 消耗以合成血红素。

2.5 *hemX* 基因缺失对血红素积累的影响

为了探究 *hemX* 基因缺失后 ALA 消耗速度的变化对菌株 $BA\Delta 6\Delta sigF$ 和 $BA\Delta 6\Delta sigF\Delta hemX$

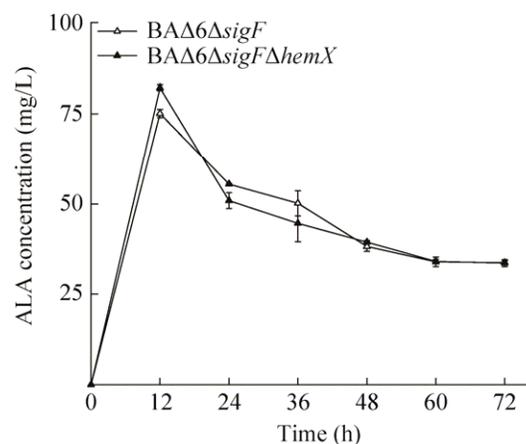


图5 *hemX* 基因敲除对菌株 ALA 浓度的影响

Figure 5 Effect of *hemX* gene knockout on the concentration of ALA.

合成血红素的影响, 对发酵过程中血红素的产量进行检测。结果如图 6A、6B 所示, 发现敲除 *hemX* 基因后, 菌体在发酵第 60 h 达到血红素的最大产量 39.63 $\mu\text{mol/L}$, 且发酵全程血红素产量较对照菌株差异极显著; 在发酵第 60 h 时, 敲除菌的菌体干重和血红素比生产能力均有所提高, 比生产能力为 111.61 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{g DCW})$, 为出发菌的 1.44 倍。产量和比生产能力的双重提高证明了 *hemX* 基因的缺失有利于改善菌体

合成血红素的能力及能源的利用效率。

为了研究充足 ALA 和 *hemX* 基因的缺失对血红素的积累是否有叠加的正面影响, 在 BA Δ 6 Δ *sigF* 和 BA Δ 6 Δ *sigF* Δ *hemX* 菌体密度为 1.0 时, 添加终浓度为 3.0 g/L 的 ALA-HCl 溶液, 检测其发酵 12–72 h 的血红素产量和 ALA 的消耗情况, 结果如图 6C、6D 所示。添加 ALA 后, 菌株 BA Δ 6 Δ *sigF* Δ *hemX* 在 12–36 h 内的 ALA 消耗速度明显快于对照菌($P < 0.05$), 之后 ALA 消耗速度低于对照菌, 并逐渐趋于平稳状态; 菌株 BA Δ 6 Δ *sigF* Δ *hemX* 的血红素产量同样在发

酵第 60 h 时达到最大值 416.85 $\mu\text{mol/L}$, 为出发菌的 2.07 倍; 比生产能力为对照菌的 1.72 倍, 达到了 1 058.54 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{g DCW})$ 。这些结果不仅说明 *hemX* 基因的敲除有利于积累血红素, 还说明充足的 ALA 可使该影响更为显著。因此, 如何使菌体自身合成更多 ALA 值得更进一步研究。

2.6 *hemX* 基因缺失对血红素合成途径关键基因转录水平的影响

为了探究敲除 *hemX* 基因导致血红素积累的原因, 对 *B. amyloliquefaciens* 中合成血红素

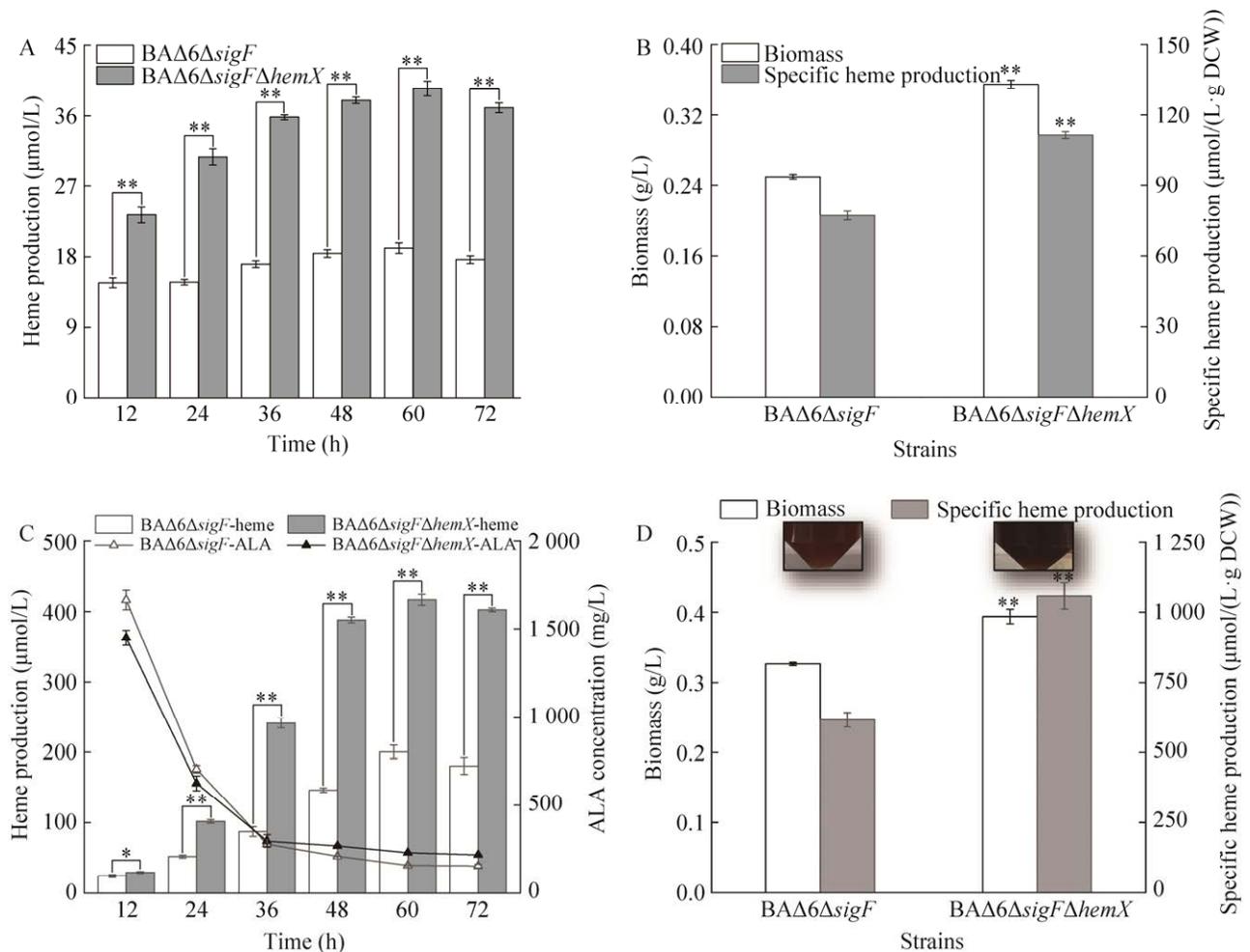


图 6 *hemX* 基因敲除对菌株血红素合成的影响

Figure 6 Effect of *hemX* gene knockout on the production of heme. A–B: Without addition of ALA. C–D: Addition ALA of 3.0 g/L. *: Significant at $P < 0.05$; **: Significant at $P < 0.01$.

的 11 个相关基因的转录水平进行了分析, 以出发菌株(BA Δ 6 Δ sigF)的基因转录水平为参照, 敲除菌株合成血红素相关基因的转录水平如图 7 所示。敲除菌株 BA Δ 6 Δ sigF Δ hemX 的 hemACDBL 基因簇的转录水平发生不同程度的上调, 其中 hemA 基因的转录水平上调最为显著, 说明 HemX 蛋白不仅从翻译方面影响 HemA 蛋白的表达, 而且 hemX 基因对 hemA 基因在转录方面同样具有负调控作用; ALA 合成的另一关键基因 hemL 转录水平同样表现出显著的上调表达, 这可能是导致 ALA 出现积累的原因, 也说明了 ALA 合成非关键基因 gltX 转录水平下降的原因可能与 ALA 浓度的升高有关(图 5)^[23]; hemB、hemC 及 hemD 基因的转录水平稍微上调, 这可能是导致发酵 12 h 后 BA Δ 6 Δ sigF Δ hemX 中的 ALA 浓度低于 BA Δ 6 Δ sigF 的原因(图 5); 虽然 hemN 和 hemEHY 基因的转录水平低于对照, 但 hemQ 基因转录水平的上调有利于提高粪血红素到血红素的转

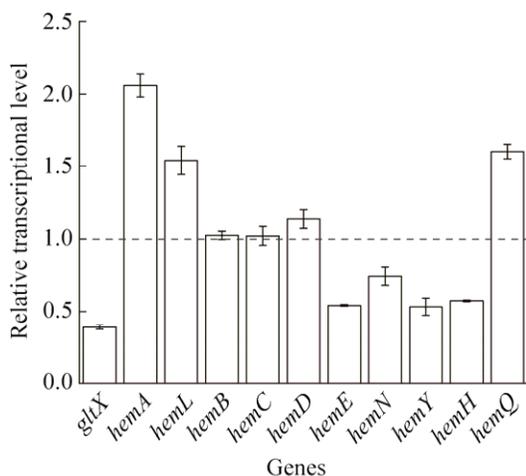


图 7 敲除 hemX 基因后血红素合成途径中各基因的相对转录水平

Figure 7 Relative transcriptional level of each gene in the heme synthesis pathway after deleting hemX. The dotted line represents the gene transcript level of the control strain.

化率, 说明 hemX 基因敲除后, CPD 途径成为合成血红素的主要途径。

3 讨论与结论

本研究通过对野生型菌株和基因组删减菌株比较, 筛选出血红素合成最优的出发菌株 BA Δ 6 Δ sigF。研究发现, 添加 ALA 后, 敲除 6 个胞外蛋白酶使血红素产量和比生产能力均高于野生型, 在该基础上敲除芽胞形成因子基因 sigF 后, 血红素产量和比生产能力进一步得到提高。分析原因, 可能是由于这些与血红素合成无关基因(6 个胞外蛋白酶基因)的缺失减少了能量的非必要损耗^[24], 使其更多地流向对血红素合成有利的代谢途径。而在此基础上, sigF 基因的缺失使菌体生长受到影响, 则其用于芽胞形成等应对生存不利的能量得以转移及再分配^[8,21]; 或者由于敲除 sigF 后, 解除对涉及碳代谢和氮代谢的全局转录调控因子 codY 的激活作用^[25]——该基因通过利用血红素以摄取铁离子^[26], 从而间接影响血红素的合成。这意味着基因删减菌株不仅适用于异源酶表达, 在血红素等次级代谢产物的生产合成中同样具有潜在的应用前景。然而, 其他非必需基因的缺失是否会使血红素产量进一步提高值得更进一步研究。

之后, 本研究以 BA Δ 6 Δ sigF 为出发菌株, 研究血红素合成非必需基因 hemX 的缺失对血红素合成的影响。发现敲除 hemX 基因后, 生长状况未有明显变化, 并且 ALA 浓度及血红素产量较对照菌株均有所提高。我们对敲除菌 BA Δ 6 Δ sigF Δ hemX 合成血红素的各基因转录水平进行分析发现, hemA、hemL、hemB、hemC、hemD、hemQ 基因的转录水平上调, 其中 hemA、hemL、hemQ 基因上调显著, 间接解释了 ALA 浓度和血红素产量上升的原因; 但是 hemN 和

hemEHY 转录水平却有所下降, 需要针对这一现象进行更进一步研究。

近年来, 关于血红素的研究逐渐增多, 但是大多数仍集中在血红素合成途径中相关基因的作用及调控, 然而途径固有的复杂性阻碍着对合成途径的深入研究, 仍旧存在着血红素产量较低、代谢机制不明等问题。本研究以安全生产用菌——*B. amyloliquefaciens* 为宿主菌, 该菌血红素合成基因位于更少的基因簇上, 简化了代谢改造的操作及流程; 筛选了合成血红素的理想出发菌株, 提高能源的利用效率, 并大幅提高了血红素产量; 以调控血红素合成途径关键基因表达的 *hemX* 基因为切入点, 避开了血红素复杂的代谢机制, 节约了时间和精力, 这些研究策略对其他卟啉的生产具有重要指导作用。

REFERENCES

- [1] 刘佳萌, 李雪莹, 刘业学, 王稳航, 李庆刚, 路福平, 李玉. 微生物以 5-氨基乙酰丙酸为唯一前体物合成血红素的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2022, 42(3): 99-109.
LIU JM, LI XY, LIU YX, WANG WH, LI QG, LU FP, LI Y. Research progress on microbial synthesis of heme using 5-aminolevulinic acid as the sole precursor[J]. China Biotechnology, 2022, 42(3): 99-109 (in Chinese).
- [2] ZHAO XR, ZHOU JW, DU GC, CHEN J. Recent advances in the microbial synthesis of hemoglobin[J]. Trends in Biotechnology, 2021, 39(3): 286-297.
- [3] ZHAO XR, CHOI KR, LEE SY. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for secretory production of free haem[J]. Nature Catalysis, 2018, 1(9): 720-728.
- [4] KO YJ, KIM M, YOU SK, SHIN SK, CHANG J, CHOI HJ, JEONG WY, LEE ME, HWANG DH, HAN SO. Animal-free heme production for artificial meat in *Corynebacterium glutamicum* via systems metabolic and membrane engineering[J]. Metabolic Engineering, 2021, 66: 217-228.
- [5] 邱益彬, 马艳琴, 沙媛媛, 朱逸凡, 苏二正, 雷鹏, 李莎, 徐虹. 解淀粉芽孢杆菌分子遗传操作及其应
用研究进展[J]. 生物技术通报, 2022, 38(2): 205-217.
QIU YB, MA YQ, SHA YY, ZHU YF, SU EZ, LEI P, LI S, XU H. Research progress in molecular genetic manipulation technology of *Bacillus amyloliquefaciens* and its application[J]. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(2): 205-217 (in Chinese).
- [6] 王世伟, 王卿惠, 翟丽萍, 刘军, 于志丹. 解淀粉芽孢杆菌产酶多样性及应用研究进展[J]. 微生物学杂志, 2019, 39(5): 105-113.
WANG SW, WANG QH, ZHAI LP, LIU J, YU ZD. Advances in diversity of enzymes production by *Bacillus amyloliquefaciens* and their applications[J]. Journal of Microbiology, 2019, 39(5): 105-113 (in Chinese).
- [7] DAILEY HA, DAILEY TA, GERDES S, JAHN D, JAHN M, O'BRIAN MR, WARREN MJ. Prokaryotic heme biosynthesis: multiple pathways to a common essential product[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR, 2017, 81(1): e00048-e00016.
- [8] HANSSON M, RUTBERG L, SCHRÖDER I, HEDERSTEDT L. The *Bacillus subtilis hemAXCDBL* gene cluster, which encodes enzymes of the biosynthetic pathway from glutamate to uroporphyrinogen III[J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(8): 2590-2599.
- [9] HANSSON M, HEDERSTEDT L. Cloning and characterization of the *Bacillus subtilis hemEHY* gene cluster, which encodes protoheme IX biosynthetic enzymes[J]. Journal of Bacteriology, 1992, 174(24): 8081-93.
- [10] PETRICEK M, RUTBERG L, SCHRÖDER I, HEDERSTEDT L. Cloning and characterization of the *hemA* region of the *Bacillus subtilis* chromosome[J]. Journal of Bacteriology, 1990, 172(5): 2250-2258.
- [11] SCHRÖDER I, JOHANSSON P, RUTBERG L, HEDERSTEDT L. The *hemX* gene of the *Bacillus subtilis* *hemAXCDBL* operon encodes a membrane protein, negatively affecting the steady-state cellular concentration of HemA (glutamyl-tRNA reductase)[J]. Microbiology (Reading, England), 1994, 140(Pt 4): 731-740.
- [12] 杨燕, 郑珂, 潘梅, 唐蕾. 大肠杆菌 *rhtA* 缺失对血红素合成的影响[J]. 微生物学通报, 2019, 46(12): 3216-3224.
YANG Y, ZHENG K, PAN M, TANG L. The effect of *rhtA* deletion on heme synthesis in *Escherichia coli*[J]. Microbiology China, 2019, 46(12): 3216-3224 (in

- Chinese).
- [13] ZHANG JF, ZHU BY, LI XY, XU XJ, LI DK, ZENG F, ZHOU CX, LIU YH, LI Y, LU F. Multiple modular engineering of *Bacillus amyloliquefaciens* cell factories for enhanced production of alkaline proteases from *B. clausii*[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022, 10: 1-16.
- [14] ZHOU CX, LIU H, YUAN FY, CHAI HN, WANG HK, LIU FF, LI Y, ZHANG HT, LU FP. Development and application of a CRISPR/Cas9 system for *Bacillus licheniformis* genome editing[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 122: 329-337.
- [15] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning. Laboratory Manual*. 2nd ed[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 54-58.
- [16] 李昕悦, 张金方, 徐小健, 路福平, 李玉. 芽胞形成相关基因缺失对解淀粉芽胞杆菌生物量及胞外酶表达的影响[J]. *生物技术通报*, 2021, 37(3): 35-43.
LI XY, ZHANG JF, XU XJ, LU FP, LI Y. Effects of spore formation related gene deletion on biomass and extracellular enzyme expression of *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2021, 37(3): 35-43 (in Chinese).
- [17] MAUZERALL D, GRANICK S. The occurrence and determination of delta-amino-levulinic acid and porphobilinogen in urine[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1956, 219(1): 435-446.
- [18] GE BS, CHEN Y, YU Q, LIN XJ, LI JQ, QIN S. Regulation of the heme biosynthetic pathway for combinational biosynthesis of phycocyanobilin in *Escherichia coli*[J]. *Process Biochemistry*, 2018, 71: 23-30.
- [19] PRANAWIDJAJA S, CHOI SI, LAY BW, KIM P. Analysis of heme biosynthetic pathways in a recombinant *Escherichia coli*[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2015, 25(6): 880-886.
- [20] 牛馨, 张莹, 王茂军, 刘文龙, 路福平, 李玉. 解淀粉芽胞杆菌不同整合位点对外源碱性蛋白酶表达的影响[J]. *生物技术通报*, 2022, 38(4): 253-260.
NIU X, ZHANG Y, WANG MJ, LIU WL, LU FP, LI Y. Effects of different integration sites on the expression of exogenous alkaline protease in *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2022, 38(4): 253-260 (in Chinese).
- [21] ZHANG JF, XU XJ, LI XY, CHEN XJ, ZHOU CX, LIU YH, LI Y, LU FP. Reducing the cell lysis to enhance yield of acid-stable alpha amylase by deletion of multiple peptidoglycan hydrolase-related genes in *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 167: 777-786.
- [22] 张金方, 李昕悦, 徐小健, 陈雪佳, 牛馨, 任绍东, 李玉, 路福平. 枯草芽胞杆菌基因组删减对异源酶表达影响的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(3): 859-872.
ZHANG JF, LI XY, XU XJ, CHEN XJ, NIU X, REN SD, LI Y, LU FP. Advance in the effect of reduction of the *Bacillus subtilis* genome on the expression of heterologous enzymes[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(3): 859-872 (in Chinese).
- [23] 陈丹园, 沈云杰, 杨燕, 唐蕾. 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[J]. *食品与发酵工业*, 2018, 44(11): 7-14.
CHEN DY, SHEN YJ, YANG Y, TANG L. Regulation of heme synthesis in *Escherichia coli* by overexpression of genes for the key enzymes and environmental factors[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2018, 44(11): 7-14 (in Chinese).
- [24] WU XC, LEE W, TRAN L, WONG SL. Engineering a *Bacillus subtilis* expression-secretion system with a strain deficient in six extracellular proteases[J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(16): 4952-4958.
- [25] ARRIETA-ORTIZ MARIO L, CHRISTOPH H, ROSE BA, TIMOTHY C, ALEX G, BENTLEY S, BARRY SAMANTHA N, MATTHEW G, BRIAN L, THADEOUS K, FRANCIS S, JIE C, RODRIGUES CHRISTOPHER DA, TSUTOMU S, RUDNER DAVID Z, ADAM D, RICHARD B, PATRICK E. An experimentally supported model of the *Bacillus subtilis* global transcriptional regulatory network[J]. *Molecular Systems Biology*, 2015, 11(11): 839.
- [26] CHÂTEAU A, van SCHAIK W, SIX A, AUCHER W, FOUET A. CodY regulation is required for full virulence and heme iron acquisition in *Bacillus anthracis*[J]. *FASEB Journal*, 2011, 25(12): 4445-4456.

(本文责编 郝丽芳)