卟啉代谢途径高价值产物及其微生物合成研究进展

朱子薇¹, 张健², 王倩², 崔志勇^{1*}, 祁庆生^{1*}

1 山东大学微生物技术研究院, 青岛 266237;

2 山东大学, 国家糖工程技术研究中心, 青岛 266237

* 联系人, E-mail: cuizhiyongbio@163.com; qiqingsheng@sdu.edu.cn

收稿日期: 2020-05-14; 接受日期: 2020-07-22; 网络版发表日期: 2020-09-21

国家自然科学基金(批准号: 2019YFA0904900)和中国博士后科学基金(批准号: 2019M662340)资助

摘要 卟啉是在卟吩环上拥有取代基的一类大环化合物的总称, 卟啉代谢途径中的一些中间代谢物, 如5-氨基乙酰丙酸、血红素、叶绿素、维生素B12等具有多种重要生理和代谢功能, 在医药、农业、食品和工业等领域有广泛的应用. 卟啉类化合物结构复杂且合成步骤繁琐, 因此相较于化学合成, 微生物发酵是其理想的生产方式. 本文在系统介绍生物体内卟啉生物合成途径的基础上, 重点介绍了代谢工程和合成生物学手段促进5-氨基乙酰丙酸、血红素、叶绿素、维生素B12等高附加值化学品的微生物合成的最新研究进展, 并探讨了卟啉类化合物进一步高效生物合成所面临的挑战及可能的解决方案.

关键词 5-氨基乙酰丙酸, 血红素, 叶绿素, 维生素B12, 生物合成

卟啉(porphyrin)是一类由四个吡咯类亚基的 α -碳原子通过次甲基桥(=CH-)互联而形成的大分子杂环化合物. 许多卟啉化合物以与金属离子结合的形式存在于自然界中, 如含有二氢卟吩与镁配位结构的叶绿素以及与铁配位的血红素. 卟啉化合物有广泛的应用, 常被作为光敏剂参与光动力学治疗, 通过具有免疫耐受, 延长组织寿命和改善亲水性等特性的复合材料来实现药物递送、受损器官的修复以及癌症诊断和治疗等^[1]. 此外, 有研究人员制备了一种包含卟啉单体单元的微孔聚酯和共聚酯用作新型光学金属离子传感器, 该传感器具有良好的热稳定性和高炭收率, 还可以作为水溶液中的染料吸附剂^[2]. 最近, 一种新型基于尿卟

啉基共价连接纳米材料的电化学生物传感器用于无酶和无底物电催化信号放大, 可以检测尿嘧啶DNA糖基化酶活性^[3].

卟啉生物合成途径存在于几乎所有真核细胞中, 其中叶绿素的合成途径通常存在于植物、藻类和光合细菌(图1). 卟啉合成代谢途径可分为6步: 5-氨基乙酰丙酸(5-aminolevulinic acid, 5-ALA)前体的合成, 吡咯单元胆色素原的形成, 尿卟啉原III的形成, 尿卟啉原III的氧化, 粪卟啉原III的氧化, 原卟啉原IX的氧化. 其中, 第二步缩合、第三步环合和第六步氧化涉及卟啉环的构建, 第四和第五步是对卟啉环的修饰^[4]. 卟啉代谢途径涉及多种重要的高附加值化合物, 如卟啉化

引用格式: 朱子薇, 张健, 王倩, 等. 卟啉代谢途径高价值产物及其微生物合成研究进展. 中国科学: 生命科学, 2020, 50: 1405–1417

Zhu Z W, Zhang J, Wang Q, et al. Recent advances in the production of high-value products of porphyrin metabolism pathways and their microbial synthesis (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2020, 50: 1405–1417, doi: [10.1360/SSV-2020-0152](https://doi.org/10.1360/SSV-2020-0152)

图1 卟啉和叶绿素代谢途径及其相关产物(网络版彩图)

Figure 1 Metabolic pathway of porphyrins and chlorophyll and their related products (color online)

合物合成的关键前体物质5-氨基乙酰丙酸, 尿卟啉原Ⅲ分支产物维生素B12、西罗血色素和原卟啉Ⅸ分支产物叶绿素、血红素等, 这些代谢产物在药物制造、疾病治疗、农业生产和食品生产等领域中都有重要作用^[4]. 因此, 通过理性改造微生物代谢途径, 实现这些产品的高效微生物合成具有重要研究和应用价值. 本文将阐述卟啉代谢相关化合物合成途径及微生物细胞工厂构建的研究进展, 同时探讨当前面临的主要挑战.

1 5-氨基乙酰丙酸

5-氨基乙酰丙酸是一种非蛋白类氨基酸, 广泛存在于植物、动物和微生物中. 它是四氢吡咯(四氢吡咯是构成卟啉化合物的基本结构单元)的前缀化合物, 是生物体合成叶绿素、血红素、维生素B12等必不可少的前体物质. 5-ALA作为一种环境相容性及选择性很高的新型光活化农药, 在农业领域应用非常广泛. 5-ALA可选择性杀灭双子叶植物, 对单子叶农作物、人体和牲畜都无害; 能够调节叶绿素合成, 促进光合作用、提高光合效率; 提高植物抗逆性, 促进植物组织分化, 调节幼株生长; 提高植物对氮肥的吸收. 此外, 5-ALA具有生物可降解性, 可做绿色杀虫剂, 不易产生害虫抗药性. 许多产5-ALA的紫色非硫细菌被用作新型生物肥料, 以促进种子萌发, 提高植物生长和作物产量, 并减轻铅毒性. 在医学领域, 5-ALA作为二代光敏剂也用于治疗疾病. 在过量5-ALA的情况下, 用可

见蓝光(375~445 nm)激发时, 会发出红色流感光(600~740 nm), 可对各种癌症进行光动力诊断, 这种药物定位性与传统疗法相比对细胞伤害小, 不会产生耐药性^[5].

在自然界中, 微生物、植物和动物都可以合成5-ALA, 其主要的生物合成途径有两条(图2): 碳四途径(C4 pathway)和碳五途径(C5 pathway). C4途径主要存在于动物体内、真菌以及非硫光合细菌中(如类球红细菌(*Rhodobacter*)和沼泽红假单胞菌(*Rhodospseudomonas palustris*)). C5途径主要存在于藻类、高等植物和细菌中(包括大肠杆菌(*Escherichia coli*)和谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)). C4途径较简单, 仅有一个关键酶, 即5-氨基乙酰丙酸合酶(5-ALA synthase, ALAS, *HemA*基因编码). 在该途径中, 甘氨酸和琥珀酰CoA会在依赖于磷酸吡哆醛的ALAS的催化下生成5-ALA. 很多生物体内都含有ALAS, 其中光合细菌包括类球红细菌、沼泽红假单胞菌以及放射形土壤杆菌(*Agrobacterium radiobacter*)的ALAS具有较高的酶活性. 在C5途径中, 谷氨酸是5-ALA合成的直接前体物. 谷氨酸在谷氨酰tRNA合成酶(glutamyl-tRNA synthetase, GluRS, *GltX*基因编码)的作用下生成谷氨酰tRNA, 然后谷氨酰tRNA在谷氨酰tRNA还原酶(glutamyl-tRNA reductase, GluTR, *HemA*s基因编码)的作用下还原为谷氨酰-1-半醛(glutamyl-1-semialdehyde, GSA), 一般认为GluTR是C5途径中的关键酶. 谷氨酰-1-半醛被谷氨酰酯-1-半醛2,1-氨基变位酶(glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase, GSA-AM, *HemL*基因编码)催化生成5-ALA. 由GluTR催化生成的谷氨酰-1-半醛是一个不稳定的中间产物, 会被迅速催化生成5-ALA, 为了减少中间产物GSA的损失并且加快反应速度, GluTR蛋白和GSA-AM蛋白通常形成酶复合体. 因此, GSA-AM也被认为是C5途径中参与5-ALA生物合成的重要酶^[5].

5-ALA应用范围广泛, 目前需求量很大, 化学合成法有操作复杂、化学污染严重、副产物多、产品回收率较低、成本较高等不足, 因此, 利用代谢工程手段改造微生物细胞是生产5-ALA的研究热点. 很早之前就有研究筛选出性能优良的类球红细菌来合成5-ALA, 在添加前体物、ALAS抑制剂乙酰丙酸的情况下, 厌氧光照培养, 产量达到可商业化生产的水平, 但是这种生产方法需在光照下进行, 特殊的反应器提高了生

图2 5-氨基乙酰丙酸(5-ALA)生物合成途径(网络版彩图)
Figure 2 Biosynthetic pathway of 5-aminolevulinic acid (5-ALA) (color online)

产成本^[6]。此后研究人员开始对筛选出的菌株进行诱变育种,使其能在黑暗好氧环境中生长。对红假单胞菌属的菌种进行化学诱变和紫外诱变,使5-ALA产量达到较高水平,但诱变方向难以掌握,难以集中得到大量高产突变菌株。近年来,理性代谢工程手段被用于增强5-ALA生产,相关研究主要集中在大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)等微生物宿主。大肠杆菌作为使用广泛的模式生物,具有遗传背景清楚、技术操作简单、培养条件简单等优势。而谷氨酸棒杆菌是一种革兰氏阳性菌,抗逆性能强、发酵性能稳定,与大肠杆菌相比不含内毒素,被认为是有安全性的微生物,广泛用于甘氨酸、赖氨酸等食用、药用氨基酸的生产。当前,提高5-ALA产量的微生物改造策略主要包括不同来源的5-氨基乙酰丙酸合成酶基因和其他相关基因的异源表达与优化,对细胞整体代谢流进行调控以提高代谢前体物的供给或降低副产物及下游产物代谢和优化发酵条件等。

1.1 异源5-ALA途径基因表达与优化

C4途径仅有一个关键酶ALAS参与,因此其表达调控更为简单,有助于5-ALA的高效微生物合成。有研究表明,在类球红细菌、沼泽红假单胞菌和放射形土壤杆菌中ALAS均表现出较高酶活性。Yang等人^[7]以能够积累琥珀酰CoA前体的谷氨酸棒状杆菌CgS1为宿主,探究不同来源ALAS对5-ALA生产的影响,发现来自*Rhodobacter capsulatus* SB1003的ALAS过表达菌株可以合成7.6 g/L的5-ALA。通过过表达大肠杆菌来

源的5-ALA转运蛋白RhtA和采用双阶段发酵策略,5-ALA产量达到了14.7 g/L。之后有研究发现,5-ALA合成与胞内氧化还原电势有关,当同时过表达依赖于NADPH的苹果酸酶基因*MaeB*和ALAS的编码基因*HemA*时,可提高ALAS活力^[6]。随着基因组测序的快速发展,很可能会鉴定和记录许多新颖的ALAS编码基因。因此,借助强大的蛋白质进化和高通量筛选技术,可以生成具有所需特性的新型ALAS变体用于5-ALA转化。最近,Zhang和Ye^[8]在谷氨酸棒杆菌中评估了不同来源的ALAS基因后,调节5-ALA合成酶和磷酸烯醇丙酮酸羧化酶的细胞内活性,重新平衡了5-ALA的生物合成,在5L生物反应器中以葡萄糖为底物产生了16.3 g/L的5-ALA。天津工业生物技术研究所团队^[9]发现,*Rhodospseudomonas palustris* ATCC 17001来源的*RpHemA*的过表达可以增强5-ALA合成,随后通过调控5-ALA生物合成途径和回补途径代谢通量使得分批补料发酵中5-ALA的产量达到16.3 g/L。为了降低原料成本,使用廉价的酶解木薯甘蔗渣代替葡萄糖,最后的5-ALA产量进一步提高到18.5 g/L。

尽管催化步骤更加复杂,但利用C5途径能够实现葡萄糖到5-ALA的从头合成,而无需添加甘氨酸前体。本课题组^[10]首次在大肠杆菌中引入C5途径,同时鉴定出GluTR是5-ALA合成途径的限速酶,对*HemAs*基因进行密码子优化使GluTR的稳定性提高,同时在鼠伤寒沙门氏菌(*S. typhimurium*)的*HemAs*基因编码Thr-2和Leu-3的氨基酸的密码子之间插入两个编码赖氨酸的密码子AAGAAG,显著提高了GluTR的稳定性。通过协同过表达*HemAs^M*,*HemL*和转运蛋白编码基因*RhtA*,5-ALA产量达到了4.13 g/L。此外,有研究人员通过酶工程手段改造GluTR,在其N末端加入精氨酸赖氨酸残基以提高其稳定性^[11]。辅因子对于C5途径同样重要,Zhang等人^[12]通过加强辅因子吡哆醛5'-磷酸的天然生物合成途径,提高了GSA-AM的活性。Zhao和Zhai^[13]发现,高等植物来源的GluTR及其刺激蛋白GBP(由*Prg7*基因编码)的共表达能够促进5-ALA合成,在添加了10 g/L谷氨酸和15 g/L葡萄糖的改良基本培养基中,能够生产7.6 g/L的5-ALA。诸多研究已经表明,C5途径关键基因*HemAs*和*HemL*的稳定和过量表达有助于5-ALA的高产,因此本课题组^[14]在先前工作中利用化学诱导染色体进化(chemically induced chromosomal evolution, CICE)技术实现了5-ALA合成途径基因的高拷

贝基因组整合表达, 同时结合适应性驯化解除*HemAs*和*HemL*超量表达造成的代谢压力, 最终大肠杆菌工程菌株的5-ALA产量相较出发菌株提高约450倍, 为4.55 g/L.

1.2 通过代谢调控提高前体物供应和抑制下游途径

5-ALA生物合成途径涉及多步酶催化反应, 并且其合成受到下游卟啉代谢中间物的复杂反馈调节, 因此需要对微生物宿主代谢途径进行合理调控以实现5-ALA的高效积累. 例如, 天津科技大学的研究团队^[9]构建了琥珀酸脱氢酶基因(*SdhA*)和乙醛酸操纵子阻遏蛋白基因(*IclR*)双缺陷大肠杆菌菌株, 使大肠杆菌在利于5-ALA前体琥珀酰CoA合成的微氧条件下保持正常碳源利用和生长代谢, 并同时抑制5-ALA脱水酶基因*HemB*表达, 将5-ALA产量提高到6.93 g/L; 增强丙酮酸代谢通量, 敲除乙酸、乳酸等副产物合成途径相关基因*Pqo*和*LdhA*减少乙酰-CoA的转化, 利用回补路径提高草酰乙酸含量也有利于提高5-ALA产量. Noh等人^[15]敲除*SucA*基因以阻断TCA循环, 促使碳通量流向5-ALA生产途径. 尽管所得菌株显示出严重的代谢失衡和低5-ALA产生, 但通过改变*AceA*的转录强度来进一步精确调节通向乙醛酸循环的碳通量可显著改善细胞生长和5-ALA产生. 来自韩国的研究人员通过定点诱变使 α -酮戊二酸脱氢酶抑制剂(oxoglutarate dehydrogenase inhibitor, OdhI)突变, 以防止OdhI蛋白磷酸化造成的 α -酮戊二酸脱氢酶复合物抑制活性的降低^[16]. 为了增强C4途径底物甘氨酸的供应, 有研究共表达*SerA*, *SerB*, *SerC*基因, 5-ALA产量提高69%; 过表达*GlyA*, 5-ALA产量提高1.5倍; 用强启动子代替*GlyA*的启动子, ALA产量也有所提升; 也可以敲除谷氨酸转运蛋白来增加前体物的积累^[17,18].

5-ALA在5-ALA脱水酶(5-ALA dehydratase, ALAD, 编码基因为*HemB*)催化下形成胆色素原, 从而进入卟啉合成代谢. 该途径对于细胞存活至关重要, 因此无法完全阻断. 抑制5-ALA脱水酶活性或者降低其表达水平可以阻止5-ALA向下游转化, 促进5-ALA的积累. Lee等人^[19]发现, D-葡萄糖可以作为ALAD抑制剂, 添加D-葡萄糖使5-ALA产量提高至3.8 g/L. 乙酰丙酸是ALAD的竞争性抑制剂, 培养基中添加适量乙酰丙酸可以显著提高5-ALA产量. Yu等人^[20]首次在大肠

杆菌中建立了C5合成途径, 通过转录组分析发现, 溶氧水平和 Fe^{2+} 浓度对5-ALA合成有重要影响; 同时他们发现, 除乙酰丙酸外, 马来酸、邻苯二甲酸和2-硝基苯甲酸均会影响5-ALA下游代谢途径. 小RNA *RyhB*参与大肠杆菌中铁代谢调控, 过表达*RyhB*后, 通过qRT-PCR分析发现, 大肠杆菌DALRA菌株中除了*AcnAB*, *SdhAB*, *FumA*和*CydAB*基因外, *HemB*和*HemH*的mRNA表达水平也降低, 5-ALA产量提高了16%^[21], 这表明小RNA *RyhB*可用作大肠杆菌中5-ALA合成的调节工具. Zhang等人^[22]的研究表明, *HemD*和*HemF*的上调有益于5-ALA的积累, 而*HemB*, *HemG*和*HemH*的过表达则会减少5-ALA的积累, 采用不同拷贝数质粒的*HemA*, *HemL*, *HemD*和*HemF*组合过表达策略, 5-ALA的产量提高到3.25 g/L. 最近, 本课题组^[23]使用CRISPR干扰(clustered regularly interspaced short palindromic repeats interference, CRISPRi)技术对*HemB*的表达进行了微调, 并研究了其对促进5-ALA积累的作用. 通过设计针对*HemB*不同区域的CRISPRi位点, ALAD的活性分别下调了15%, 19%, 33%, 36%, 71%和80%. 这些*HemB*抑制菌株的5-ALA积累量为原始菌株的90.2%~493.1%不等. 为了实现5-ALA生物合成的动态途径控制, 本课题组^[24]设计并构建了一个包含血红素生物传感器HrtR和CRISPRi的血红素响应调节系统. 通过半定量设计, 对HrtR进行位点饱和突变, 获得了一系列灵敏度和阈值变化的生物传感器并应用于5-ALA高产菌株构建, 5-ALA产量提高至5.35 g/L. 与之类似, Zhou等人^[25]鉴定到一个*Clostridium pasteurianum*来源的甘氨酸核糖开关, 并使用双重筛选路径将其改造为人工甘氨酸-OFF核糖开关. 实验结果表明, 使用人工的梭菌甘氨酸-OFF核糖开关可导致大肠杆菌中具有非天然生物合成途径的5-ALA显著增加.

1.3 促进胞内5-ALA的外排和无细胞体外合成体系

通常, 增强细胞的产物分泌效率不仅有助于降低反馈抑制, 而且可以防止产物降解, 从而促进下游步骤. 许多研究已经表明, 外排能力改造能够增强各种微生物细胞的产物合成能力. 为了增加5-ALA外排并减少底物的抑制和毒害作用, 可以引入来自大肠杆菌的苏氨酸运载体编码基因*RhtA*^[26]. *RhtA*已在不同微生物宿主中被证明能够促进5-ALA的外排和积累^[7,12,16].

此外, 敲除与细胞壁合成有关的高分子量青霉素结合蛋白编码基因*Pbp1b*, *Pbp2b*和*Pbp1a*, 也有助于5-ALA的外排和产量提高^[27].

除了利用微生物细胞发酵生产5-ALA, 早些年有实验开发了一种无细胞多酶催化途径, 通过募集ALAS, 结合大肠杆菌的琥珀酰CoA合酶和多磷酸激酶来生产5-ALA. 反应160 min后, 5-ALA的浓度增加到5.4 mmol/L^[28]. 近些年有实验报道了使用稳定体外酶系生产5-ALA的半透性系统. 葡萄糖、聚磷酸钠、ATP、tRNA、谷氨酸和NADPH被用作5-ALA合成的底物, 9种酶被用于合成系统构建: 腺苷酸激酶、聚磷酸激酶、葡萄糖6-磷酸脱氢酶、磷酸葡萄糖胺内酯酶、6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶、谷氨酰tRNA合成酶、从拟南芥中提取和纯化大肠杆菌中的谷氨酸-1-半醛氨基转移酶、从酵母中提取的己糖激酶以及从拟南芥中提取谷氨酰胺-tRNA还原酶和谷氨酰胺-tRNA还原酶结合蛋白, 体系构建完成反应48 h后, 谷氨酸转化率达到约95%^[29]. 这种体外合成系统促进了酶的再利用, 并有助于5-ALA产物的分离和纯化.

1.4 5-ALA生产菌株的发酵条件优化

5-ALA是一种光不稳定性物质, 同时其合成易受培养环境影响, 因此适宜的发酵条件有助于实现5-ALA的高产和稳定保存. 除了影响5-ALA合成过程中各种酶的活性之外, 温度也会造成水溶液中5-ALA稳定性的变化. 有研究表明, 当溶液pH为7.5的时候, 温度每升高10℃, 5-ALA的降解速度就会提高1.5倍. 有研究采取分阶段控温的方式, 即加IPTG诱导前(0~3 h)为30℃, 3~12 h温度控制在37℃, 12~24 h温度控制在30℃的时候, 5-ALA的产量最高, 这种控温策略对于5-ALA的放大生产也具有指导意义^[5]. 5-ALA在碱性条件下不稳定, 5-ALA的微生物生产通常随着培养pH的降低而增加. 因此, Zhang等人^[12]采用双阶段pH调控策略, 3L使得发酵罐中5-ALA产量达到了5.25 g/L.

Fe^{2+} 在血红素的合成过程中起着重要的作用, 而血红素的浓度对ALAS的活力具有反馈抑制的作用, 这说明 Fe^{2+} 的浓度可能会影响5-ALA的积累. 江南大学康振课题组^[30]通过优化体内血红素的生物合成途径和培养过程中的铁离子浓度, 开发了一种新的5-ALA生产工艺. 加入优化浓度(7.5 mg/L)的铁离子后, 重组大肠杆菌LADF-6菌株的5-ALA产量增加到2.8 g/L.

在2017年的一项研究中, 由于谷氨酸棒杆菌中*Hema*基因的表达使用的是诱导型启动子Trc启动子, Trc启动子受IPTG诱导, 诱导剂IPTG的浓度会影响ALAS的表达和5-ALA产量. 实验表明, 在5-ALA发酵生产中, IPTG浓度在0.1~0.5 mmol/L范围内时对菌株生长没有明显影响. 在5L发酵罐中5-ALA产量为10.08 g/L, 这是截至目前已报道的谷氨酸棒状杆菌一步发酵合成5-ALA的最高产量^[31]. 甘氨酸是C4途径的重要前体物质, 高浓度甘氨酸对菌株生长有抑制作用, 发酵体系中需要控制甘氨酸浓度在一定范围内. 有实验表明, 在相对低浓度下, 甘氨酸的浓度对菌株生长无明显影响且与5-ALA的产量成正比. 甘氨酸浓度超过一定值时, 对菌株生长有明显的抑制, 从而降低了5-ALA的产量. 有研究发现, 在提供充足甘氨酸时, 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中*Aco1*和*Aco2*编码的乌头酸酶成为限速酶, 在过表达ALAS蛋白时, *ACO2*的过表达进一步增强了5-ALA合成^[32]. 最新研究中, 为了降低原料成本, 使用廉价的原料代替葡萄糖. 事实证明, 酶水解木薯蔗渣是精制糖的理想替代品, 最终的5-ALA产量进一步提高至18.5 g/L. 玉米淀粉水解物达到了与葡萄糖相似的5-ALA产量(16.0 g/L), 而甜菜糖蜜的使用引起了严重的抑制作用. 据估计, 用木薯蔗渣代替葡萄糖将使碳源成本降低90.1%^[8].

2 血红素和西罗血红素

血红素是存在于生物体内的含铁卟啉衍生物, 由原卟啉和一个二价铁离子组成, 核心是亚铁离子, 具有携氧能力. 血红素是电子传递链蛋白的重要组分, 参与生物细胞中包括氧运输等的多种氧化代谢. 除了作为氧载体, 血红素还可以与二氧化碳、一氧化碳、氰离子结合. 4分子血红素与1分子珠蛋白构成血红蛋白, 血红蛋白是红细胞的主要成分, 参与氧气、二氧化碳结合与运输. 采用微生物发酵法生产的血红蛋白可赋予植物蛋白类似肉制品的颜色, 弥补植物蛋白中铁元素不足的问题, 利用这一特性可以开展人造肉的研究^[33]. 血红素还可用作药物和保健品, 有载氧、贮氧、促进氧化还原、进行电子传递等重要生物学功能. 血红素也是多种过氧化物酶的辅基, 对过氧化物酶活性有重要作用, 例如提高血红素合成有利于抗坏血酸过氧化物酶、染料脱色过氧化物酶活性的提高. 此外,

血红素可用作半合成血卟啉及其衍生物、原卟啉钠原料。在医药方面, 血红素可用于生产抗肝功能亢进、抗炎症和抗肿瘤的药品, 也可以作为高吸收率的补血剂^[34]。

包括血红素在内的卟啉类化合物可以用化学法合成, 但由于结构复杂, 合成过程步骤繁琐, 得率较低而价格高昂, 因此使用微生物生产成为一个较好的选择。血红素生物合成途径(图3)中, 两分子5-ALA在脱水酶ALAD(*HemB*基因编码)催化下缩合成胆色素原, 胆色素原经羟甲基胆素合成酶(*HemC*基因编码)催化生成羟甲基胆素, 羟甲基胆素在尿卟啉原合成酶III(*HemD*基因编码)的催化下环化生成尿卟啉原III, 尿卟啉原III在尿卟啉原脱羧酶III(*HemE*基因编码)催化下生成粪卟啉原, 粪卟啉原在粪卟啉原氧化酶(*HemF*基因编码)作用下生成原卟啉原IX, 接着在原卟啉原氧化酶(*HemG*基因编码)作用下合成原卟啉IX, 最后经过亚铁螯合酶(*HemH*基因编码)催化, 与亚铁离子结合生成血红素^[19]。在古菌中存在一条以西罗血红素为关键前体的可替代血红素的生物合成途径^[35]。西罗血红素是亚硫酸盐和亚硝酸盐还原酶的一类血红素辅因子, 参与微生物和植物中氨和硫化物的形成^[36]。它是由尿卟啉原III通过四步酶促反应合成, 即两步甲基化、一步脱氢和一步铁螯合反应。在大肠杆菌中, 一种CysG蛋白执行所有这些酶促反应^[37], 而在酿酒酵母中, 这些步骤由Met1p和Met8p执行^[38]。Met1p进行甲基化反应, Met8p负责脱氢和铁螯合反应。最后, 通过AhbA, AhbB, AhbC和AhbD的作用将其转化为血红素^[35]。

胞内血红素可以作为调节因子参与胞内多种基因的调控转录水平、翻译水平及蛋白质稳定调控。血红素前体物5-ALA的合成和转运对血红素产量有影响。研究发现, 5-ALA合成受血红素严格反馈调控, 表达*HemD*和*HemF*有利于5-ALA积累, 异源表达泛酸途径的*CoA*基因和卟啉合成途径的*HemB*, *HemC*, *HemD*, *HemE*基因可获得高产血红素菌株。*HemA*上调可提高血红素产量, 影响最为明显, 但同时引起*HemD*和*HemF*下调, 对血红素积累不利; *HemB*过表达引起*HemA*和*HemH*上调, *HemD*下调, *HemH*过表达引起*HemA*和*HemB*上调, *HemD*下调, *HemB*和*HemH*过表达可抑制血红素生成; *GltX*过表达使5-ALA产量下降, 同时上调了*HemB*表达; *HemA*和*HemD*共表达并未对血红素产量的提升产生明显效果, 说明两个有利基因的

图3 血红素以及西罗血红素合成途径(网络版彩图)

Figure 3 Biosynthetic pathway of heme and siroheme (color online)

常规共表达不一定能使效果叠加^[39]。2019年, 江南大学的研究人员利用Red重组技术敲除大肠杆菌中编码5-ALA转运蛋白RhtA的基因*RhtA*, 表达C5途径关键酶基因*HemAs*, 检测血红素和其前体物含量和相关基因表达水平。结果发现, 菌株生长未受到显著影响, 敲除*RhtA*的菌株与原始菌株比较, 5-ALA的胞外含量下降23%, 血红素含量提高12%, 尿卟啉原III、粪卟啉原III和原卟啉IX的含量都有所提高。敲除*RhtA*同时过表达*HemAs*的菌株与仅过表达*HemAs*的菌株相比, 胞外5-ALA减少了16%, 血红素含量提高了24%, 尿卟啉原III、粪卟啉原III和原卟啉IX含量提高更明显^[40]。该实验表明, *RhtA*敲除减少了5-ALA的外运, 使血红素产量得到提高。

血红素产量还受其他一些因素影响。有实验探究铁摄取调节子Fur对大肠杆菌血红素合成的影响。对*Fur*基因进行同源过表达, 考查菌株生长、铁离子浓度和血红素合成变化, 并分析血红素合成途径相关基因表达水平。结果显示, *Fur*过表达对菌株生长有抑制作用, 胞内铁离子减少。非限铁时, 过表达菌株血红素下降71.8%, 限铁时比非限铁时增加3.1倍, *Fur*过表达引起*HemAs*下调, *GltX*, *HemB*和*HemC*上调。结果表明, *Fur*过表达虽引起血红素合成相关基因表达水平上调, 但并未使血红素大量合成^[41]。

在环境因素对血红素合成影响方面, 有实验对大肠杆菌生产血红素的发酵条件进行研究。结果发现, 适量添加外源铁离子、谷氨酸、甘氨酸同时提升了5-ALA和血红素产量, 但温度对5-ALA和血红素的影响

不一致, 30℃时5-ALA产量最高, 而37℃时血红素产量最高; 溶氧对5-ALA产量没有影响, 而低溶氧时血红素产量有所提升^[42]. 在菌株构建方面, 有研究利用模块化方法用大肠杆菌构建血红素高产菌株, 该实验将5-ALA的C5途径关键酶基因*HemAs*和*HemL*作为模块一, 将来自大肠杆菌的*HemB*, *HemC*, *HemD*和*HemD*作为模块二, 将*HemF*, *HemG*和*HemH*作为模块三, 用拷贝数不同的质粒改变二、三模块基因表达强度, 并将两模块组合表达, 将摇瓶水平上产量最高的重组菌株在3L发酵罐培养, 48 h产量达0.954 μmol/L^[43].

3 维生素B12

维生素B12, 简称VB12, 又称为钴胺素(cobalamin), 是一类含有钴的咕啉类化合物总称. 它是目前已发现的最大、最复杂的维生素分子, 也是唯一含有金属离子的维生素, 其结晶为红色, 故又称红色维生素. 维生素B12结构复杂, 化学合成困难, 也是自然界中生物合成最繁复的小分子物质之一, 它参与人体细胞代谢, 影响DNA的合成与调节, 还参与脂肪酸的合成和能量的生成. 维生素B12作为生物活性物质, 在贫血、神经系统疾病、出生缺陷、评价指标和营养强化方面都有重要作用. 例如, 有研究发现, 维生素B12缺乏会影响小鼠肝脏脂肪和脂肪酸代谢, 并且会影响子代小鼠, 这说明维生素B12在调节肝脏脂质代谢相关酶基因方面有重要作用; 研究表明, 维生素B12对糖尿病视网膜神经细胞有一定的保护作用, 其机制可能是维生素B12通过抗氧化作用抑制Caspase-3的表达从而抑制神经细胞的凋亡; 有临床试验发现, 通过穴位注射维生素B12结合针灸对治疗颈椎病效果显著; 此外, 维生素B12还可以用作检测骨质疏松的指标, 及时发现高危人群, 有助于提早治疗^[44]. 近些年来, 维生素B12还广泛应用在饲料、食品和化妆品等领域. 维生素B12能够促进家禽、家畜, 特别是幼禽、幼畜的生长发育, 提高饲料蛋白质的利用率, 因而可用作饲料添加剂; 在发达国家, 维生素B12与其他物质复配用于化妆品; 在食品工业上, 维生素B12可作为火腿、香肠、冰淇淋、鱼肉酱等食品的着色剂^[45].

维生素B12的生物合成(图4)从五碳前体5-氨基乙酰丙酸开始, 这是好氧途径和厌氧途径共同的步骤, 该过程由5-ALA脱水酶(*HemB*基因编码)催化2个ALA分

子形成胆色素原, 再经胆色素原脱氨酶(*HemC*基因编码)催化形成前尿卟啉原, 再由尿卟啉原III合成酶(*HemD*基因编码)催化形成尿卟啉原III. 由尿卟啉原III到前咕啉或钴-前咕啉的生物合成涉及环缩合和去乙酰基, 是好氧过程和厌氧过程主要不同的环节^[6].

好氧合成途径中形成前咕啉6, 这一过程需要5个依赖于S-腺苷-L-甲硫氨酸(*S*-adenosyl-L-methionine, SAM)的甲基转移酶(*CobA*, *CobG*, *CobJ*, *CobM*和*CobF*)和单加氧酶. 厌氧合成途径中则将尿卟啉原III转化成钴-前咕啉6, 该过程也需要5个甲基转移酶(*CysG*, *CbiK*, *CbiL*, *CbiH*和*CbiF*). 前咕啉6转化成腺苷钴胺素的好氧途径中, *CobK*还原生成二氢前咕啉, 再经*CobL*催化的C-5和C-15位的甲基化及脱羧, 合成前咕啉8, 在*CobH*催化下, 经甲基重排形成氢咕啉酸, 氢咕啉酸在*CobB*催化下酰胺化形成氢咕啉酸*a,c*-二酰胺, 好氧菌利用依赖于ATP的钴整合酶(*CobNST*)催化得到具有钴元素的中间体, 钴(II)啉酸*a,c*-二酰胺. 厌氧途径中, 钴-前咕啉6在*CbiJ*, *CbiE*, *CbiT*, *CbiC*和*CbiA*等酶的作用下, 也经过还原、甲基化、脱羧、甲基重排及酰胺化反应生成钴(II)啉酸*a,c*-二酰. 从钴(II)啉酸*a,c*-二酰胺之后, 好氧和厌氧合成路径又重新趋于一致. 钴(II)啉酸*a,c*-二酰胺被多种酶催化, 经过还原、腺苷化、酰胺化等步骤, 生成腺苷酸、腺苷酸-GDP-钴酰胺最终合成腺苷钴胺素. 好氧与厌氧途径中的中间产物完全一致, 只是利用的催化酶有所差异^[45].

高等动物和植物都不能合成维生素B12, 化学合成法复杂、成本昂贵, 因此维生素B12几乎都采用微生物发酵合成^[45]. 目前, 工业上主要是通过利用费氏丙酸杆菌(*Propionibacterium freudenreichii*)和谢氏丙酸杆菌(*Propionibacterium shermanii*)的厌氧发酵, 以及利用脱氮假单胞菌(*Pseudomonas denitrificans*)的好氧发酵来进行维生素B12的工业生产. 有研究发现几种影响维生素B12合成的因素. 例如, 甜菜碱可以提高ALAS的活力, 促进维生素B12合成; 谷氨酸等氨基酸的存在显著影响脱氮假单胞杆菌的菌体量和维生素B12产量; 蓝光下可诱导费氏丙酸杆菌维生素B12合成酶的合成, 从而促进维生素B12合成; 发酵过程中采用补氨工艺以达到提高厌氧生物发酵单位的目的; 据研究, 维生素B12的合成速率同磷酸烯醇式丙酮酸羧化生成草酰乙酸的通量有显著相关性, 提高罐压增强二氧化碳溶解度以强化羧化回补途径的实验组比对照产

图4 维生素B12合成途径(网络版彩图)

Figure 4 Biosynthetic pathway of vitamin B12 (color online)

量高出19.7%; 脱氮假单胞菌合成维生素B12的发酵过程高耗氧, 为提升氧利用率, 引入透明颤菌(*Vitreoscilla*) *Vgb*基因, 结果维生素B12合成速率和得率都有显著提高^[46]。但这些微生物发酵周期长, 工业生产菌种遗传改造困难, 提高产量难度大。利用合成生物学手段, 从头设计组装维生素B12合成途径在异源细胞中实现生物合成, 具有重大的科学与技术创新价值。

在提高产量方面, 有实验采用NTG诱变结合利福平和庆大霉素抗性筛选的方法筛选出大量抗性突变株, 筛选到的突变株最高发酵水平达到243.3 $\mu\text{g/mL}$, 比原始菌株提高了33.5%。该筛选的方法提高了菌株的突变率, 加快了菌株选育进程, 有效提高了维生素B12的发酵水平^[47]。有研究通过筛选高表达启动子来过表达维生素B12合成途径基因, 以提高菌株的维生素B12生产能力。研究人员通过对脱氮假单胞菌中某些编码热激蛋白和分子伴侣基因内含启动子在内的非编码序列用启动子在线预测软件进行分析, 选取启动子的非编码区与编码绿色荧光蛋白的GFP报告基因相连, 检测GFP的荧光信号值。结果表明, 含有启动子 P_{dnak} 的非编码区表达的GFP荧光值最高。进而构建了强启动子 P_{dnak} 与维生素B12合成途径基因 $cobA$ 的过表达重组菌。结果表明, 与对照菌株相比, 重组菌株维生

素B12产量提高了21.5 mg/L ^[48]。

近年来, 不断有新的微生物被发现能够代谢合成维生素B12。利用豆渣为原料, 用酿酒酵母进行厌氧半固态发酵, 产量可增长5.9倍; 利用乳酸菌(*Lactobacillus Beijerinckii*)产维生素B12也有一定研究成果^[49]。天津工业生物技术研究团队^[50]使用遗传和代谢工程手段改造大肠杆菌, 解析了维生素B12好氧合成途径中钴螯合与腺苷钴啉醇酰胺磷酸的合成机制。他们通过异源表达荚膜布氏菌(*R. capsulatus*)、布氏菌(*Bruceella melitensis*)、鼠伤寒沙门氏菌和大红假单胞菌(*Rhodopseudomonas palustris*)等的总共28个基因来生产维生素B12, 这些基因被分为6个工程模块: 模块1的酶从Uro III产生HBA; 模块2从HBA产生CBAD; 模块3包含四种钴转运蛋白CbiM, N, Q, O, 可从环境中吸收钴; 模块4将CBAD和L-苏氨酸合成AdoCbi-P; 模块5包含来自内源大肠杆菌维生素B12挽救途径的生物合成酶CobU, CobS, CobT和CobC, 并用于将AdoCbi-P转化为AdoCbi; 模块6包括HemO, HemB, HemC和HemD, 可产生上述前体Uro III, 从而增加HBA的生物合成。每个模块都在单个双重质粒上表达或整合到大肠杆菌基因组中。之后经过发酵条件优化, 最终将维生素B12的产量提高至307.00 $\mu\text{g/mL}$ 。

4 叶绿素

叶绿素是一类含脂的色素家族, 为植物或者微生物进行光合作用的主要色素, 包括叶绿素a, b, c, d, f 以及原叶绿素和细菌叶绿素等. 其核心部分是一个卟啉环, 其功能是光吸收; 另一部分是一个很长的脂肪烃侧链, 称为叶绿醇, 叶绿素用这种侧链插入到类囊体膜. 与含铁的血红素不同的是, 叶绿素卟啉环中含有一个镁原子. 叶绿素很不稳定, 光、酸、碱、氧、氧化剂等都会使其分解. 酸性条件下, 叶绿素分子很容易失去卟啉环中的镁成为去镁叶绿素^[51]. 叶绿素有造血、提供维生素、解毒、抗病等多种用途. 叶绿素经过后期合成基因修饰后形成新的衍生物, 可用于体内光动力学治疗与肿瘤诊断, 以及体外病毒及微生物的光动力学杀灭. 它们在有利的光谱区域(650~850 nm)有强烈吸收, 并且治疗后易于降解, 已经被确认为用于肿瘤治疗的优良光敏剂^[52]. 有实验研究了叶绿素衍生物组装及其光声信号的关系, 建立了一种基于光声信号监测体内聚集效率的方法, 研究了分子的聚集比与比例光声信号之间的关系, 可用于优化光声检测窗口和组装分子设计的未来指导^[53]. 叶绿素荧光技术, 是以叶绿素荧光为探针检测植物光合作用状态分析植物抗胁迫能力的一种技术, 是无损获取植物信息的一种有效途径, 叶绿素荧光成像在植物生长环境温度、光照、水分、营养、盐胁迫研究中有重要应用^[54].

叶绿素a的生物合成(图5)首先由琥珀酰CoA和甘氨酸缩合成5-ALA, 两个5-ALA缩合成吡咯衍生物胆色素原, 胆色素原经过羟甲基胆色素原、尿卟啉原III、粪卟啉原III、原卟啉原IX等中间产物后生成原卟啉IX, 原卟啉IX经过Mg螯合酶H亚基(magnesium chelatase H subunit, MgCH)生成Mg-原卟啉IX, Mg-原卟啉IX经过Mg-原卟啉IX甲基转移酶(magnesium proto IX methyltransferase, MgPMT)生成Mg-原卟啉IX甲酯, Mg-原卟啉IX甲酯经过Mg-原卟啉IX甲酯环化酶(Mg-protoporphyrin IX monomethylester cyclase, MgPEC)生成联乙烯原叶绿素酸酯, 联乙烯原叶绿素酸酯经过3,8-联乙烯原叶绿素酸酯a 8-乙烯基还原酶(3,8-divinyl protochlorophyllide a 8-vinyl reductase, DVR)生成原叶绿素酸酯, 原叶绿素酸酯再通过原叶绿素酸酯氧化还原酶(protochlorophyllide oxidoreductase, POR)生成叶

图5 叶绿素a生物合成途径(网络版彩图)

Figure 5 Biosynthetic pathway of chlorophyll a (color online)

绿素酸酯a, 最终经过叶绿素a合酶(chlorophyll synthase, CHLG)合成叶绿素, 或再经过一系列反应生成细菌叶绿素^[55].

叶绿素合成过程受多种酶催化. 胆色素原脱氨酶被证明其某些氨基酸位点突变导致酶失活会对叶绿素产生影响, 很多植物叶绿素缺失突变体的产生也与尿卟啉原脱羧酶、粪卟啉原氧化酶和原卟啉原氧化酶有关. Mg螯合反应是进入叶绿素最终合成的关键步骤, Mg螯合酶活性受光影响, 光照条件下活性提高有利于叶绿素合成, Mg-原卟啉IX甲基转移酶的活性受光照、叶酸含量和叶绿体氧化还原状态调节, 也可通过与Mg螯合酶H亚基关联提高其活性, Mg-原卟啉IX甲酯环化酶受植物中带负电荷的脂质磷脂酰甘油影响^[55]. 外界环境也对叶绿素合成有影响. 5-ALA是叶绿素生物合成的前体物, 其合成过程有光参与调控. 用黄光照射豌豆和拟南芥会增加5-ALA的合成速率, 5-ALA的合成还需要谷氨酰-tRNA还原酶和谷氨酰胺合成酶的催化, 在植物的根、茎、叶、花等组织中, 这2种酶的基因表达在光照下转录会迅速增加. 有研究以*Rhodobactercapsulatus*为对象, 发现在同样的条件下, 氧分压的改变能影响ALAS的活性, 而光照强度的改变则不会影响其酶活性; 在低的氧分压下, 光照强度的变化会影响细菌叶绿素的在菌体内的积累, 把细菌叶绿素变成一种没有颜色的类似物, 而不会影响其合成途径^[56].

叶绿素合成受某些转录因子调控, 例如通用的氧

化还原调节蛋白FnrL和RegA。在调控细菌叶绿素合成途径中,处于活性状态的FnrL主要和ALAS编码基因*HemA*, *HemB*, *HemE*, *HemZ*, *BchCH*和*BchCG*等基因启动子上的回文序列结合,促进这些基因的转录。而RegA主要对*HemA*, *HemCD*和*HemH*等基因进行调节,调节方式类似于FnrL。氧阻抑蛋白CrtJ和AerR这两个转录因子在氧分压高的情况下处于活性状态,通过对*HemCD*和*HemH*基因的阻抑而实现对细菌叶绿素合成的调控^[57]。球红假单胞菌在光下进行光合作用并厌氧产生叶绿素a,说明叶绿素合成酶的编码基因依赖于氧和光控制。目前通过光合细菌产生叶绿素a通常采用厌氧光照培养模式,但这种方式不利于大规模生产,且发酵效价低。有研究利用球红假单胞菌作为出发菌株,经过紫外等离子复合诱变和亚硝基胍化学诱变后筛选高产菌株,对碳氮源、种龄、接种量、pH、转速、温度、装料量进行优化,最后在发酵罐上进行工艺放大,叶绿素a效价水平为出发菌株的114倍^[58]。

叶绿素生物合成途径的许多步骤已在光营养的突变菌株中进行了单独研究,但尚不清楚催化这些步骤的酶是否足以构成该途径并将原卟啉IX转换为叶绿素a。有研究组装了一个完整的编码叶绿素合成途径的遗传模块在大肠杆菌中验证,利用异源功能性环化酶AcsF,并用12个基因组装一个基因模块,编码完整的叶绿素生物合成途径,将内源性原卟啉IX转化为叶绿素a,使大肠杆菌细胞变绿,实验结果描述了制造叶绿素所需的最少酶,并将其建立在异养模式生物中^[57]。这种代谢工程策略不仅解决了重要的生物学问题,例如光合作用所需的最少遗传信息的概念,而且还为利用光合作用对细胞工厂进行工程化打下了基础。

5 展望

卟啉和叶绿素生物合成途径属于次级代谢,对于维持生物体正常生理功能至关重要,同时该途径中含有多种高附加值代谢中间物,包括5-氨基乙酰丙酸、维生素B12、血红素、西罗血红素、叶绿素等。随着这些化合物在农业、医药、食品等领域中的应用不断扩展,通过天然提取和化学合成已无法满足其市场

需求,开发绿色、低碳、可持续的微生物生产方法对于促进类卟啉和叶绿素化合物的应用具有重要意义。与此同时,由于卟啉和叶绿素合成途径参与呼吸作用、光合作用和固氮等多种关键的生理代谢活动,利用代谢工程和合成生物学手段实现血红素、叶绿素等化合物的微生物从头合成有助于相关机制的揭示,甚至可为构建具有特定功能的人造生命体提供底盘细胞。

5-ALA是卟啉化合物的直接前体,它的充足积累和供应是下游代谢产物合成的关键。此外,5-ALA本身具有重要应用价值,在农业领域被作为绿色杀虫剂和植物生长调节剂,预计未来市场规模十分巨大。然而,当前生物发酵5-ALA产量不足且成本较高,尚无法满足产业化要求。微生物5-ALA合成过程中代谢调控复杂,易受培养环境等影响。尽管已有大量研究工作致力于理性设计和改造微生物天然代谢途径,5-ALA生产能力仍然有较大提升空间。未来5-ALA微生物合成的研究重点应该是借助物理、化学或者生物全局诱变手段,挖掘能够特异性响应5-ALA的转录调控因子、核糖开关等生物传感器,开发5-ALA高通量检测技术并应用于高产菌株的筛选。当前最常用的5-ALA合成微生物宿主是大肠杆菌和谷氨酸棒状杆菌,可以尝试寻找其他不同工业微生物例,如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、酿酒酵母、解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)等进行代谢途径改造实现5-ALA高效生产。最后,利用非常规的工业农业废气、废渣等作为葡萄糖和甘油等的替代碳源,充分节省原料成本。维生素B12、血红素和叶绿素等次级代谢产物的生物合成需要经过多步催化反应,因此其途径构建和调控困难。长期以来,它们的主要来源是植物或者动物组织的提取,这大大限制了卟啉和叶绿素类化合物的供应和应用范围。近年来,随着现代生物技术尤其是合成生物学的发展,人们可以实现维生素B12、血红素和叶绿素的异源人工合成,但是相关报道较少,产物浓度依然较低。采用系统生物学和模块化代谢工程等策略将会进一步揭示卟啉化合物调控机制以及促进目标代谢产物的积累。综上所述,采用代谢工程和合成生物学手段重构微生物细胞工厂,有望实现卟啉和血红素代谢途径中关键化合物的高效生物合成。

参考文献

- 1 Liu W B. Porphyrin-based agents and their applications in cancer imaging and therapy. *Veter J*, 2013, 189: 246–247
- 2 Aly K I, Sayed M M, Mohamed M G, et al. A facile synthetic route and dual function of network luminescent porous polyester and copolyester containing porphyrin moiety for metal ions sensor and dyes adsorption. *Microporous Mesoporous Mater*, 2020, 298: 110063
- 3 Liu T, Cui L, Li D, et al. An enzyme-free and substrate-free electrochemical biosensor with robust porphyrin-based covalent-linked nanomaterial as nanoelectrocatalyst and efficient support for sensitive detection of uracil-DNA glycosylase. *Biosens Bioelectron*, 2020, 154: 112014
- 4 Su Y L, Zhang Y, Li J B, et al. Comparison of biosynthetic pathways and chemical synthesis methods of porphyrin (in chinese). *Univ Chem*, 2012, 27: 1–11 [苏优拉, 张逸, 李嘉宾, 等. 卟啉的生物合成途径与化学合成方法的比较. *大学化学*, 2012, 27: 1–11]
- 5 Kang Z, Ding W, Gong X, et al. Recent advances in production of 5-aminolevulinic acid using biological strategies. *World J Microbiol Biotechnol*, 2017, 33: 200
- 6 Kang Z, Zhang J, Zhou J, et al. Recent advances in microbial production of δ -aminolevulinic acid and vitamin B12. *Biotech Adv*, 2012, 30: 1533–1542
- 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: 2709–2717
- 8 Zhang B, Ye B C. Pathway engineering in *Corynebacterium glutamicum* S9114 for 5-aminolevulinic acid production. *3 Biotech*, 2018, 8: 247
- 9 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
- 10 Kang Z, Wang Y, Gu P, et al. Engineering *Escherichia coli* for efficient production of 5-aminolevulinic acid from glucose. *Metab Eng*, 2011, 13: 492–498
- 11 Zhou Y L. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for 5-aminolevulinic acid production (in chinese). Dissertation for Master's Degree. Tianjin: Tianjin University, 2017 [邹亚兰. 代谢工程改造谷氨酸棒杆菌生产5-氨基乙酰丙酸. 硕士学位论文. 天津: 天津大学, 2017]
- 12 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
- 13 Zhao A, Zhai M. Production of 5-aminolevulinic acid from glutamate by overexpressing *HemA1* and *pgr7* from *Arabidopsis thaliana* in *Escherichia coli*. *World J Microbiol Biotechnol*, 2019, 35: 175
- 14 Cui Z, Jiang Z, Zhang J, et al. Stable and efficient biosynthesis of 5-aminolevulinic acid using plasmid-free *Escherichia coli*. *J Agric Food Chem*, 2019, 67: 1478–1483
- 15 Noh M H, Lim H G, Park S, et al. Precise flux redistribution to glyoxylate cycle for 5-aminolevulinic acid production in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2017, 43: 1–8
- 16 Ko Y J, You S K, Kim M, et al. Enhanced production of 5-aminolevulinic acid via flux redistribution of TCA cycle toward l-glutamate in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol Bioproc Eng*, 2019, 24: 915–923
- 17 Zhang S H, Zhou Y L, Song X, et al. Advances in 5-aminolevulinic acid microbial production (in Chinese). *Chin J Bioproc Eng*, 2017, 15: 65–70 [张双虹, 邹亚兰, 宋鑫, 等. 代谢工程合成5-氨基乙酰丙酸的研究进展. *生物加工过程*, 2017, 15: 65–70]
- 18 Zhu C, Chen J, Wang Y, et al. Enhancing 5-aminolevulinic acid tolerance and production by engineering the antioxidant defense system of *Escherichia coli*. *Biotech Bioeng*, 2019, 116: 2018–2028
- 19 Pranawidjaja S, Choi S I, Lay B W, et al. Analysis of heme biosynthetic pathways in a recombinant *Escherichia coli*. *J Microbiol Biotech*, 2015, 25: 880–886
- 20 Yu X, Jin H, Liu W, et al. Engineering *Corynebacterium glutamicum* to produce 5-aminolevulinic acid from glucose. *Microb Cell Fact*, 2015, 14: 183
- 21 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: 209–215
- 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*. *Sci Rep*, 2015, 5: 8584
- 23 Su T, Guo Q, Zheng Y, et al. Fine-tuning of *hemB* using CRISPRi for increasing 5-aminolevulinic acid production in *Escherichia coli*. *Front Microbiol*, 2019, 10

- 24 Zhang J, Wang Z, Su T, et al. Tuning the binding affinity of heme-responsive biosensor for precise and dynamic pathway regulation. *iScience*, 2020, 23: 101067
- 25 Zhou L, Ren J, Li Z, et al. Characterization and engineering of a clostridium glycine riboswitch and its use to control a novel metabolic pathway for 5-aminolevulinic acid production in *Escherichia coli*. *ACS Synth Biol*, 2019, 8: 2327–2335
- 26 Shen G Y. Effect on 5-aminolevulinic acid fermentation by recombinant *Escherichia coli* (in Chinese). Dissertation for Master's Degree. Hangzhou: Zhejiang University, 2018 [沈观宇. 外向转运蛋白对重组大肠杆菌5-氨基乙酰丙酸发酵的影响. 硕士学位论文. 杭州: 浙江大学, 2018]
- 27 Feng L L. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for 5-aminolevulinic acid production (in Chinese). Dissertation for Doctoral Degree. Tianjin: Tianjin University, 2016 [冯丽丽. 代谢工程改造谷氨酸棒杆菌生产5-氨基乙酰丙酸的研究. 博士学位论文. 天津: 天津大学, 2016]
- 28 Meng Q, Zhang Y, Ju X, et al. Production of 5-aminolevulinic acid by cell free multi-enzyme catalysis. *J Biotech*, 2016, 226: 8–13
- 29 Aiguo Z, Ruiwen D, Meizhi Z. Multi-enzymatic recycling of ATP and NADPH for the synthesis of 5-aminolevulinic acid using a semipermeable reaction system. *Biosci Biotech Biochem*, 2019, 83: 2213–2219
- 30 Zhang J, Kang Z, Ding W, et al. Integrated optimization of the *in vivo* heme biosynthesis pathway and the *in vitro* iron concentration for 5-aminolevulinic acid production. *Appl Biochem Biotechnol*, 2016, 178: 1252–1262
- 31 Rao D M, Zhang L C, Chen J Z, et al. Construction of 5-aminolevulinic acid synthesis pathway and optimization of fermentation by *Corynebacterium glutamicum* (in Chinese). *Biotechnol Bull*, 2017, 33: 148–156 [饶德明, 张良程, 陈久洲, 等. 谷氨酸棒杆菌合成5-氨基乙酰丙酸的途径构建与发酵优化. 生物技术通报, 2017, 33: 148–156]
- 32 Hara K Y, Saito M, Kato H, et al. 5-Aminolevulinic acid fermentation using engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact*, 2019, 18: 194
- 33 Zhao X R, Zhang G Q, Li X L, et al. Commercial production of artificial meat (in Chinese). *Food Ferment Ind*, 2019, 45: 248–253 [赵鑫锐, 张国强, 李雪良, 等. 人造肉大规模生产的商品化技术. 食品与发酵工业, 2019, 45: 248–253]
- 34 Franken A C W, Lokman B C, Ram A F J, et al. Heme biosynthesis and its regulation: towards understanding and improvement of heme biosynthesis in filamentous fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 91: 447–460
- 35 Dailey H A, Dailey T A, Gerdes S, et al. Prokaryotic heme biosynthesis: multiple pathways to a common essential product. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2017, 81
- 36 Raux E, Leech H K, Beck R, et al. Identification and functional analysis of enzymes required for precorrin-2 dehydrogenation and metal ion insertion in the biosynthesis of sirohaem and cobalamin in *Bacillus megaterium*. *Biochem J*, 2003, 370: 505–516
- 37 Leustek T, Smith M, Murillo M, et al. Siroheme biosynthesis in higher plants. *J Biol Chem*, 1997, 272: 2744–2752
- 38 Schubert H L, Raux E, Brindley A A, et al. The structure of *Saccharomyces cerevisiae* Met8p, a bifunctional dehydrogenase and ferrochelatase. *EMBO J*, 2002, 21: 2068–2075
- 39 Lee M J, Kim H J, Lee J Y, et al. Effect of gene amplifications in porphyrin pathway on heme biosynthesis in a recombinant *Escherichia coli*. *J Microbiol Biotechnol*, 2013, 23: 668–673
- 40 Yang Y. The effect of rhtA deletion on heme synthesis in *Escherichia coli* (in Chinese). *Microbiol China*, 2019, 46: 3216–3224 [杨燕. 大肠杆菌 rhtA 缺失对血红素合成的影响. 微生物学通报, 2019, 46: 3216–3224]
- 41 Li M M, Wang Y X, Tang L. Effects of fur overexpression on heme synthesis in *Escherichia coli* (in Chinese). *Food Ferment Ind*, 2019, 45: 18–25 [李蒙蒙, 王雨萱, 唐蕾. Fur 过表达对大肠杆菌血红素合成的影响. 食品与发酵工业, 2019, 45: 18–25]
- 42 Chen D Y, Shen Y J, Yang Y, et al. Regulation of heme synthesis in *Escherichia coli* by overexpression of genes for the key enzymes and environmental factors (in Chinese). *Food Ferment Ind*, 2018, 44: 7–14 [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: 7–14]
- 43 Weng H J, Ding W W, Shi Y N, et al. Enhancement of heme synthesis pathway in *Escherichia coli* via a modular optimization strategy (in Chinese). *J Food Sci Biotechnol*, 2019, 38: 86–94 [翁焕娇, 丁雯雯, 石雅南, 等. 基于模块化优化策略强化大肠杆菌合成血红素. 食品与生物技术学报, 2019, 38: 86–94]
- 44 Roessner C A, Huang K X, Warren M J, et al. Isolation and characterization of 14 additional genes specifying the anaerobic biosynthesis of cobalamin (vitamin B12) in *Propionibacterium freudenreichii* (*P. shermanii*). *Microbiology*, 2002, 148: 1845–1853
- 45 Xu Q, Wang Z W, Liu Y, et al. Advances in biosynthesis and detection of vitamin B12 (in Chinese). *Food Ind*, 2019, 40: 271–276 [徐琼, 王志伟, 刘洋, 等. 维生素B12生物合成及检测技术研究进展. 食品工业, 2019, 40: 271–276]
- 46 Raux E, Schubert H L, Warren M J. Biosynthesis of cobalamin (vitamin B12): a bacterial conundrum. *Cell Mol Life Sci*, 2000, 57: 1880–1893

- 47 Han L, Ruan G X, Ma X J, et al. Screening for chemical mutagenesis and antibiotic resistance of vitamin B12 producing strain (in Chinese). *Fine Special Chem*, 2019, 27: 36–39 [韩龙, 阮国祥, 马杰希, 等. 维生素B12生产菌的化学诱变和抗生素抗性筛选. *精细与专用化学品*, 2019, 27: 36–39]
- 48 Shi H L. The construction of genetic recombinants of *P. denitrificans* and the optimization of industrial vitamin B12 fermentation process (in Chinese). Dissertation for Master's Degree. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2016 [施慧琳. 脱氮假单胞菌基因工程菌构建及维生素B12发酵过程优化. 硕士学位论文. 上海: 华东理工大学, 2016]
- 49 Fang H, Kang J, Zhang D. Microbial production of vitamin B12: a review and future perspectives. *Microb Cell Fact*, 2017, 16: 15
- 50 Fang H, Li D, Kang J, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for *de novo* biosynthesis of vitamin B12. *Nat Commun*, 2018, 9: 4917
- 51 Li J Z, Chen G P, Hu Z L, et al. Studies of photosynthetic bacteriochlorophyll metabolism (in Chinese). *Biotechnol Bull*, 2009, 8: 46–49 [李尽哲, 陈国平, 胡宗利, 等. 光合细菌叶绿素代谢研究进展. *生物技术通报*, 2009, 8: 46–49]
- 52 Gao Y H, Zhu X X, Zhu W, et al. Synthesis and evaluation of novel chlorophyll a derivatives as potent photosensitizers for photodynamic therapy. *Eur J Med Chem*, 2020, 187: 111959
- 53 Zhou J, Gao Z J, Cai J Q, et al. Synthesis and self-assembly behavior of chlorophyll derivatives for ratiometric photoacoustic signal optimization. *Langmuir*, 2020, 36: 1559–1568
- 54 Dong Z F, Men Y H, Zou Q Y, et al. Application of chlorophyll fluorescence imaging in plant growth environment stress (in Chinese). *J Shenyang Agric Univ*, 2019, 50: 250–256 [董贞芬, 门宇恒, 邹秋滢, 等. 叶绿素荧光成像在植物生长环境胁迫中的应用. *沈阳农业大学学报*, 2019, 50: 250–256]
- 55 Li J J, Yu X D, Cai Z P, et al. An overview of chlorophyll biosynthesis in higher plants (in Chinese). *Mol Plant Breeding*, 2019, 17: 6013–6019 [李佳佳, 于旭东, 蔡泽坪, 等. 高等植物叶绿素生物合成研究进展. *分子植物育种*, 2019, 17: 6013–6019]
- 56 Li H S, Xu Y. Effect of light on synthesis of chlorophylls (in Chinese). *Mod Agric Sci Technol*, 2014, 21: 161–164 [李汉生, 徐永. 光照对叶绿素合成的影响. *现代农业科技*, 2014, 21: 161–164]
- 57 Chen G E, Canniffe D P, Barnett S F H, et al. Complete enzyme set for chlorophyll biosynthesis in *Escherichia coli*. *Sci Adv*, 2018, 4: eaaq1407
- 58 Yu F, Fang J S, Ying L P, et al. The breeding and fermentation optimization of high-yield strains for producing bacteriochlorophyll a (in Chinese). *Chin J Antibiot*, 2020, 45: 567–572 [喻帆, 方佳双, 应灵萍, 等. 细菌叶绿素a高产菌株的选育和发酵工艺优化. *中国抗生素杂志*, 2020, 45: 567–572]

Recent advances in the production of high-value products of porphyrin metabolism pathways and their microbial synthesis

ZHU ZiWei¹, ZHANG Jian², WANG Qian², CUI ZhiYong¹ & QI QingSheng¹

¹ State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Qingdao 266237, China;

² National Glycoengineering Research Center, Shandong University, Qingdao 266237, China

Porphyrins are a class of macrocyclic compounds that contain substituents in the porphyrin ring. Some intermediate metabolites of the metabolism pathways of porphyrins, such as 5-aminolevulinic acid, heme, chlorophyll, and vitamin B12, have many important physiological and metabolic functions and are widely used in the field of medicine, agriculture, food, and industry. Microbial fermentation, when compared with chemical synthesis, is an ideal method to produce porphyrins. This paper focuses on the latest research developments in metabolic engineering and synthetic biology for promoting the abiotic synthesis of high value-added chemicals, such as 5-aminolevulinic acid, heme, chlorophyll, and vitamin B12, based on a systematic introduction of the pathway for *in vivo* porphyrin biosynthesis and discusses the challenges and possible solutions for further high-efficiency biological porphyrin synthesis.

5-aminolevulinic acid, heme, chlorophyll, vitamin B12, biosynthesis

doi: 10.1360/SSV-2020-0152