

## 四吡咯化合物生物合成研究进展

潘斐<sup>1,2</sup>, 严一凡<sup>1,2</sup>, 朱逸凡<sup>1,2</sup>, 胡毅<sup>1,2</sup>, 续晓琪<sup>1,2</sup>, 徐铮<sup>1,2</sup>, 王瑞<sup>1,2</sup>, 李莎<sup>1,2</sup>, 徐虹<sup>1,2</sup>, 罗正山<sup>1,2,3</sup>

1 南京工业大学 食品与轻工学院, 江苏 南京 211816

2 南京工业大学 材料化学工程国家重点实验室, 江苏 南京 211816

3 南京轩凯生物科技股份有限公司, 江苏 南京 211816

潘斐, 严一凡, 朱逸凡, 胡毅, 续晓琪, 徐铮, 王瑞, 李莎, 徐虹, 罗正山. 四吡咯化合物生物合成研究进展. 生物工程学报, 2022, 38(4): 1307-1321.

PAN F, YAN YF, ZHU YF, HU Y, XU XQ, XU Z, WANG R, LI S, XU H, LUO ZS. Advances in the biosynthesis of tetrapyrrole compounds. Chin J Biotech, 2022, 38(4): 1307-1321.

**摘 要:** 四吡咯化合物是存在于生物体中一类具有重要功能的化合物, 已经广泛应用于农业、食品和医药等领域。由于化学合成法的烦琐流程和高昂成本以及动植物提取法存在品质不均一等缺点, 大幅度限制了其工业化生产与相关应用。近年来, 合成生物学的快速发展为微生物利用可再生生物质资源高效合成四吡咯化合物提供了新的技术手段。针对四吡咯化合物生物合成的最新研究进展, 文中综述了利用生物法合成这类化合物的各种策略, 探讨了提高其生物合成效率的方法, 并展望了这类化合物的研究方向, 以期四吡咯化合物的生物合成提供参考。

**关键词:** 血红素; 维生素 B<sub>12</sub>; 叶绿素; 胆色素; 生物合成; 代谢工程; 合成生物学

**Received:** May 22, 2021; **Accepted:** September 30, 2021; **Published online:** October 9, 2021

**Supported by:** National Key Research and Development Program of China (2021YFC2101700); National Natural Science Foundation of China (22108122); Natural Science Foundation of Jiangsu Province, China (BK20200692); Jiangsu Agriculture Science and Technology Innovation Fund, China (JASTIF) (CX(20)3049); China Postdoctoral Science Foundation (2020M671466); Natural Science Foundation of the Jiangsu Higher Education Institutions of China (20KJB530016); Jiangsu Postdoctoral Research Foundation, China (2020Z115)

**Corresponding author:** LUO Zhengshan. Tel/Fax: +86-25-58139433; E-mail: luozs@njtech.edu.cn

**基金项目:** 国家重点研发计划 (2021YFC2101700); 国家自然科学基金 (22108122); 江苏省自然科学基金 (BK20200692); 江苏省农业科技自主创新资金 (CX(20)3049); 中国博士后基金面上项目 (2020M671466); 江苏省高等学校自然科学研究项目 (20KJB530016); 江苏省博士后科研资助 B 类 (2020Z115)

# Advances in the biosynthesis of tetrapyrrole compounds

PAN Fei<sup>1,2</sup>, YAN Yifan<sup>1,2</sup>, ZHU Yifan<sup>1,2</sup>, HU Yi<sup>1,2</sup>, XU Xiaoqi<sup>1,2</sup>, XU Zheng<sup>1,2</sup>, WANG Rui<sup>1,2</sup>, LI Sha<sup>1,2</sup>, XU Hong<sup>1,2</sup>, LUO Zhengshan<sup>1,2,3</sup>

1 School of Food and Light Industry, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, Jiangsu, China

2 State Key Laboratory of Materials and Chemical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, Jiangsu, China

3 Nanjing Shineking Biotech Co., Ltd., Nanjing 211816, Jiangsu, China

**Abstract:** Tetrapyrrole compounds are a class of compounds with important functions. They exist in living organisms and have been widely used in agriculture, food, medicine, and other fields. The cumbersome process and high cost of chemical synthesis, as well as the shortcomings of unstable quality of animal and plant extraction methods, greatly hampered the industrial production and applications of tetrapyrrole compounds. In recent years, the rapid development of synthetic biology has provided new tools for microorganisms to efficiently synthesize tetrapyrrole compounds from renewable biomass resources. This article summarizes various strategies for the biosynthesis of tetrapyrrole compounds, discusses methods to improve its biosynthesis efficiency and future prospects, with the aim to facilitate the research on biosynthesis of tetrapyrrole compounds.

**Keywords:** heme; vitamin B<sub>12</sub>; chlorophyll; bilin; biosynthesis; metabolic engineering; synthetic biology

四吡咯化合物是由 4 个吡咯环通过不饱和次甲基连接而产生的大环化合物,如图 1 所示,主要包括血红素 (heme)、叶绿素 (chlorophyll, Chl)、维生素 B<sub>12</sub> (vitamin B<sub>12</sub>)、胆色素 (bilin) 和辅酶 F<sub>430</sub> (coenzyme F<sub>430</sub>) 等。四吡咯化合物具有光吸收、电子转移、氧结合和信号转导等功能,在呼吸作用和光合作用等生命过程中起着至关重要的作用,目前已经广泛应用于农业、食品、医疗保健和化妆品等行业<sup>[1]</sup>。

随着市场需求不断扩大,当前以化学合成和动植物提取等传统生产方法获得的四吡咯化合物已经无法满足日益增加的应用需求。此外,传统生产方法的步骤繁琐以及环境污染等问题也将大幅度限制其产业化应用。近年来,合成生物学的快速发展为微生物利用可再生生物质资源合成四吡咯化合物提供了新的机遇,以期弥补传统化学合成和动植物提取法的不足<sup>[2-5]</sup>。

研究人员经过近 20 年的研究,目前已基本解析了四吡咯化合物的合成途径,并构建了不同四吡咯化合物合成的细胞工厂。本文首先总结了利用合成生物学技术合成四吡咯化合物的方法和进展;接着,针对生物合成所存在的问题进行系统分析并提出相应的解决策略;最后,在深入分析和总结的基础上提出了当前生物法制备四吡咯化合物面临的挑战和未来的展望,以期为其生物合成及产业制造提供一定的指导。

## 1 四吡咯化合物关键前体的生物合成

### 1.1 前体 5-氨基乙酰丙酸的生物合成

四吡咯化合物在细胞内的定位及功能各不相同,其胞内合成途径被分成许多具有不同功能的分支,但是都拥有一个共同的前体——5-氨基乙酰丙酸 (5-aminolevulinic acid, 5-ALA)。5-ALA 作为一种功能性非蛋白质氨基酸,目前

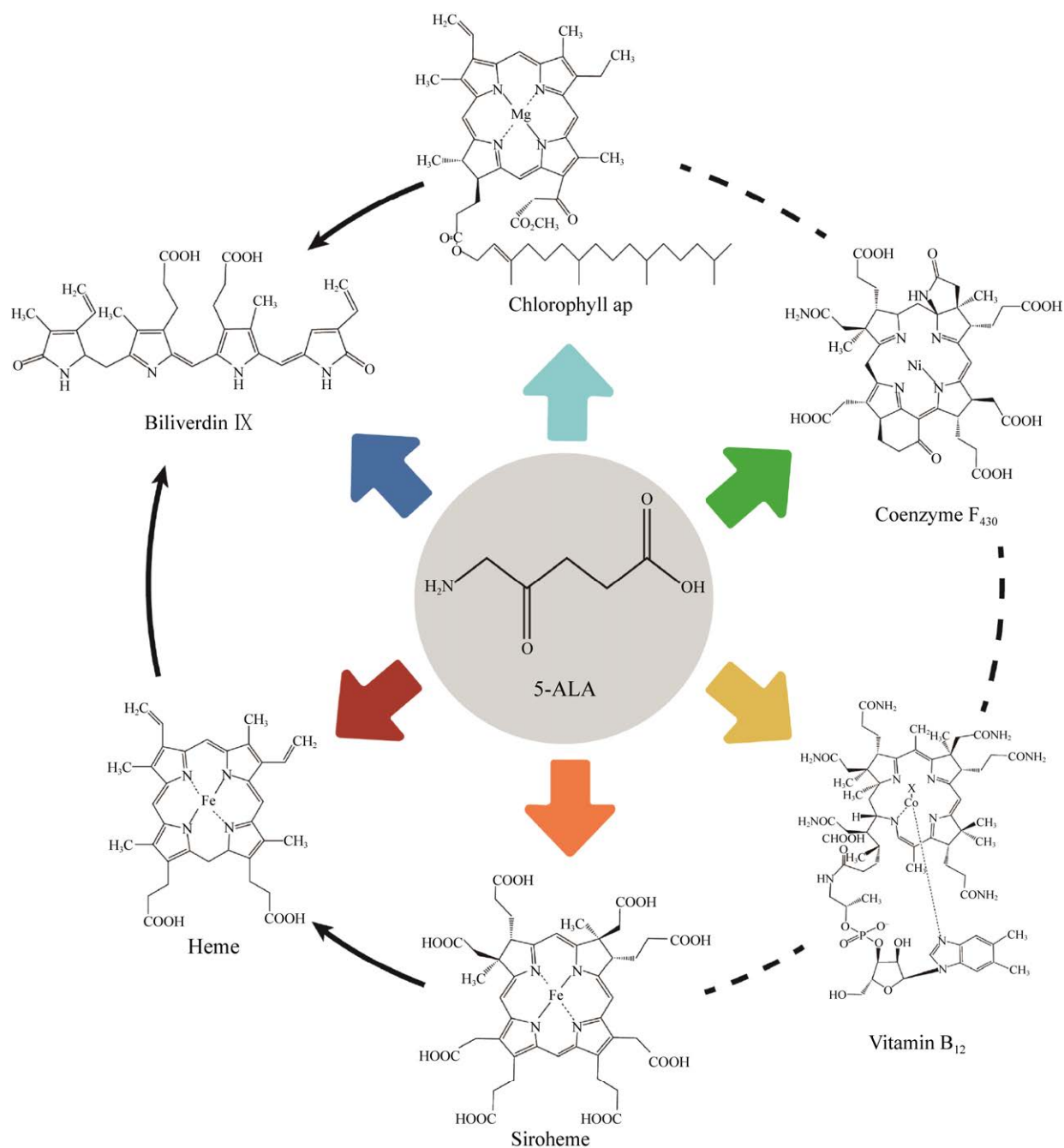


图 1 常见四吡咯化合物及中间体化学式

Figure 1 The chemical formulas of common tetrapyrrole compounds and intermediates.

已经广泛应用于生物、医药和农业等领域<sup>[6-7]</sup>。随着基因工程和生物信息学的发展, 5-ALA 的合成途径已被完整解析, 自然界中主要通过 C4 和 C5 两种途径进行 5-ALA 的生物合成 (图 2)。

其中, 在 C4 途径中, ALA 合酶 ( $\delta$ -aminolevulinic synthase, ALAS) 直接将甘氨酸和琥珀酰辅酶 A 转化为 5-氨基乙酰丙酸, 该途径主要存在于人类、动物和真菌等生物中<sup>[8]</sup>。而在 C5 途径中, 首先,

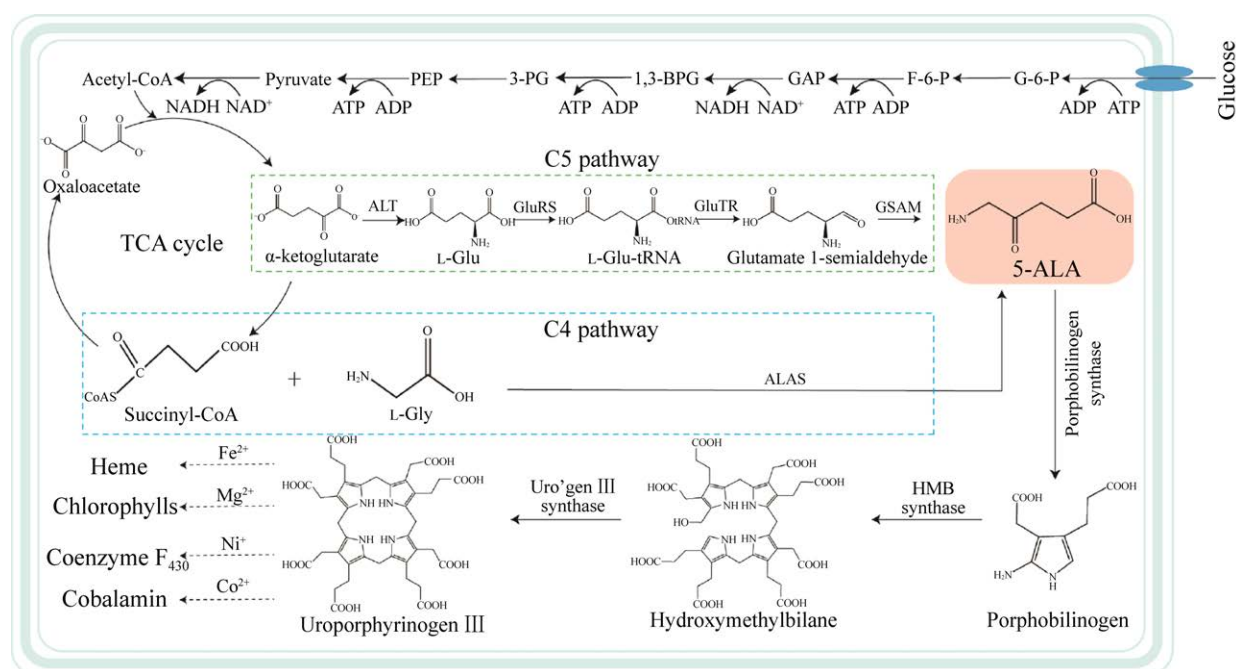


图2 5-ALA的生物合成途径

Figure 2 The biosynthetic pathway of 5-ALA. G-6-P: glucose-6-phosphate; F-6-P: fructose-6-phosphate; 1,3-BPG: 1,3-diphosphoglycerate; 3-PG: 3-phosphoglycerate; PEP: phosphoenolpyruvate; GAP: glyceraldehyde-3-phosphate; 5-ALA: 5-aminolevulinic acid; ALT: alanine aminotransferase; GluRS: glutamyl-tRNA synthase; GluTR: glutamyl-tRNA reductase; ALAS:  $\delta$ -aminolevulinic synthase; HMB synthase: hydroxymethylbilane synthase; GASAM: glutamate-1-semialdehyde-2,1-aminomutase; Uro'gen III synthase: uroporphyrinogen III synthase.

谷氨酰-tRNA 合酶 (glutamyl-tRNA synthetase, GluRS/GltX) 催化谷氨酸形成谷氨酰-tRNA。接着, 在谷氨酰-tRNA 还原酶 (glutamyl-tRNA reductase, GluTR/HemA) 的作用下形成谷氨酸-1-半醛。最终, 谷氨酸-1-半醛在谷氨酸-1-半醛氨基转移酶 (glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, GASAM/HemL) 催化下合成 5-ALA。该途径主要存在于植物、细菌和古菌中<sup>[9]</sup>。

目前, 强化微生物合成 5-ALA 的代谢工程改造研究主要集中在针对 C4 和 C5 途径进行调控优化。在 C4 途径中, 经研究发现光合生物中 ALAS 的酶活相对较高, 因此科研人员开始利用小球藻进行 5-ALA 的合成。Ano 等利用 C4 途径, 以葡萄糖和甘氨酸分别作为碳源和氮源, 通过培养分离得到的小球藻, 使得 5-ALA 的产

量达到了 3.7 mmol/L<sup>[10]</sup>。由于光合生物对于光照要求较高及生长缓慢, 无法满足工业化大规模生产的需求。因此科研人员将目光转向生长速度较快且具有成熟基因编辑技术的模式微生物——大肠杆菌 (*Escherichia coli*)。Lin 等通过在大肠杆菌中过表达活力更高且稳定性更强的放射性土壤杆菌来源的 ALAS 并抑制 5-ALA 脱氢酶的活性, 使得 5-ALA 在大肠杆菌中的产量达到了 56 mmol/L<sup>[11]</sup>。然而, 在进行代谢改造过程中发现, 大肠杆菌对于 5-ALA 的底物——甘氨酸的耐受性较低, 这严重影响了在大肠杆菌中利用 C4 途径合成 5-ALA 的产量。此外, 谷氨酸棒杆菌作为一种遗传背景清晰且被公认为安全的革兰氏阳性菌株并且对于各种不良环境的耐受性较强, 开始受到科研人员的关注。Yang

等筛选到一种在谷氨酸棒杆菌中具有极佳表达水平的 5-氨基乙酰丙酸合酶, 并且在此基础上表达了 5-ALA 转运蛋白 (5-ALA exporter, RhtA) 来加速胞内 5-ALA 向胞外的转运以避免产物的反馈抑制以及对细胞产生的代谢压力, 并进一步优化补料发酵工艺, 最后, 获得了 14.7 g/L (112 mmol/L) 的 5-ALA<sup>[12]</sup>。但是谷氨酸棒杆菌作为革兰氏阳性菌, 其相应的遗传操作相对困难且发酵周期较长, 后续需要针对谷氨酸棒杆菌开发高效的基因编辑工具以提高该菌株的改造效率。

C5 途径作为细菌合成 5-ALA 的内源途径, 同样也是研究人员关注的重点。Zhang 等在优化 *hemA* 和 *hemL* 表达水平的基础上, 通过抑制 5-ALA 脱氢酶的表达以减弱 5-ALA 的分解, 最终 5-ALA 的产量达到了 5.25 g/L<sup>[13]</sup>。Noh 等将 *hemA*、*hemL* 基因过表达以及破坏 TCA 循环使得碳通量流向 5-ALA 的合成, 并且通过精确调节乙醛酸循环以维持细胞正常的生命活动, 5-ALA 的产量达到 3.4 g/L (26 mmol/L)<sup>[14]</sup>。研究表明, 在 5-ALA 产量增加的同时, 下游产物也在大量累积, 因此需要对下游途径进行合理调控, Zhang 等利用 *hemF* 基因 (编码粪卟啉原氧化酶/coproporphyrinogen III oxidase) 的过表达来抑制 5-ALA 脱氢酶的活性从而减少 5-ALA 向下游转化, 并且在过表达途径基因以及优化铁离子浓度的条件下, 5-ALA 产量达到 4.05 g/L<sup>[15]</sup>。如表 1 所示, 近年来利用微生物合成 5-ALA 已经取得了巨大的进步, 在分析相关研究发现, 5-ALA 代谢流程受到严格的胞内调控, 因此在后续改造过程中胞内整体代谢流、前体供应以及胞外转运将是未来研究人员的研究重点, 并以此为基础推动工业化进程<sup>[11-30]</sup>。

## 1.2 环状中间体——尿卟啉原Ⅲ的生物合成

从关键前体 5-ALA 到环状中间体——尿卟

啉原Ⅲ的转化需要经过 3 步酶催化反应 (图 2), 进而逐步形成四吡咯化合物的环状结构<sup>[31]</sup>。首先, 5-ALA 在 5-ALA 脱氢酶即卟啉原合酶 (porphobilinogen synthase, PBGs) 的催化下, 两个 5-ALA 分子不对称缩合形成胆色素原 (porphobilinogen, PBG)。研究发现, 卟啉原合酶具有两个 5-ALA 结合位点, 与该酶结合的第一个 5-ALA 分子形成胆色素原的丙酸脂侧链, 而第二个形成了乙酸脂侧链。接着, 胆色素原在 HMB 合酶 (hydroxymethylbilan synthase, HMBs) 的催化下, 4 个胆色素原聚合形成羟甲基胆素 (hydroxymethylbilan, HMB)。HMB 合酶又被称为 PBG 脱氨酶, 负责催化 PBG 分子的氮甲基发生脱氨基作用后将其以高度有序的方式连接形成线性四吡咯 HMB。最后, 在尿卟啉原Ⅲ合酶 (uroporphyrinogen III synthase, UroS) 的催化下发生环化进而产生第一个环状中间体尿卟啉原Ⅲ<sup>[32]</sup>。

作为四吡咯生物合成的第一个主要分支位点, 当尿卟啉原Ⅲ被甲基化, 该前体进入西罗血红素、钴胺素以及辅酶 F<sub>430</sub> 的生物合成途径。然而, 当尿卟啉原Ⅲ发生脱羧反应时, 则进入血红素、叶绿素以及胆色素的生物合成途径。目前, 虽然研究人员通过合成生物学和代谢工程手段调控分支位点尿卟啉原Ⅲ的流向, 已经实现了不同四吡咯化合物的生物合成, 但由于该位点调控的局限性和复杂性往往会造成对菌株生长的不利影响, 最终导致四吡咯化合物的产量都相对较低。因此, 理性调控尿卟啉原Ⅲ流向和通量对于不同四吡咯化合物的生物合成至关重要。在后续研究中, 构建基于生物传感器的动态调控系统对该位点的流向进行时空调控, 达到平衡菌株生长与四吡咯化合物合成的目的, 对于实现目标产物合成通量的最大化十分重要。

表 1 5-ALA 的生物合成进展

Table 1 Advances in the biosynthesis of 5-ALA

Strains	Metabolic engineering strategy	Yield (g/L)	References
<i>E. coli</i>	Expression of heterologous <i>hemA</i> , inhibition of 5-ALA dehydrogenase activity and fed-feed fermentation	7.30	[11]
<i>E. coli</i>	Expression of <i>hemA</i> and <i>hemL</i> with different promoters, regulating the expression of 5-ALA dehydrogenase and increasing the synthesis of pyridoxal phosphate	5.25	[13]
<i>E. coli</i>	Regulating the glyoxylic acid cycle precisely to promote 5-ALA accumulation	3.40	[14]
<i>E. coli</i>	Overexpression of <i>hemF</i> gene inhibits the activity of 5-ALA dehydrogenase and optimization of culture conditions	3.40	[15]
<i>E. coli</i>	Increasing the activity of heterologous 5-ALA synthase by chaperone proteins, expression of <i>RhtA</i> and enhancing the synthesis of PLP	7.47	[16]
<i>E. coli</i>	Co-expression of heterologous <i>HemA1</i> and <i>pgr7</i> genes and fermentation optimization	7.64	[17]
<i>E. coli</i>	Expression of heterologous <i>hemA</i> gene, optimization of biosynthesis pathways towards coenzyme A and precursor	2.81	[18]
<i>E. coli</i>	Expression of heterologous <i>hemA</i> gene and optimization of culture conditions	8.80	[19]
<i>E. coli</i>	Optimization of heme pathway to increase 5-ALA production	3.25	[20]
<i>E. coli</i>	Expression of 5-ALA synthase and inhibition of <i>hemB</i> by antisense RNA	1.23	[21]
<i>E. coli</i>	Expression of heterologous <i>hemA</i> and expression of poly-3-hydroxybutyrate synthesis pathways	3.60	[22]
<i>E. coli</i>	Influencing the expression of <i>hemB</i> by CRISPRi, guide carbon flux and fermentation optimization	6.93	[23]
<i>E. coli</i>	Co-expression of <i>hemA</i> and chaperone	5.66	[24]
<i>E. coli</i>	Fine-tuning the expression of <i>hemB</i> to different degrees by CRISPRi	0.86	[25]
<i>C. glutamicum</i>	Co-expression of <i>hemA</i> and <i>hemL</i> , knocking out <i>ncgl1221</i> and other genes	0.89	[26]
<i>C. glutamicum</i>	Expression of heterologous <i>hemA</i> , regulation of glycine synthesis pathway	3.40	[27]
<i>C. glutamicum</i>	Screening the ALAS, expression of 5-ALA transporter, and two-step fermentation	14.70	[12]
<i>C. glutamicum</i>	Screening the <i>hemA</i> and optimize the codons, overexpression of <i>ppc</i> and knock out the <i>HMW-PBPs</i> related genes	7.53	[28]
<i>C. glutamicum</i>	Expression of <i>hemAL</i> operon and fermentation optimization	2.20	[29]
<i>C. glutamicum</i>	Co-expression of heterologous <i>hemA</i> and <i>hemL</i> , inhibiting the pathway of heme synthesis	1.79	[30]

## 2 四吡咯化合物的生物合成研究进展

四吡咯化合物广泛存在于自然界的各种生物中, 因其自身结构多样性赋予其功能的多样性, 在生命活动中发挥着重要作用。目前已广泛应用于各个行业, 具体功能与应用如表 2 所示<sup>[33-38]</sup>。

### 2.1 血红素生物合成的研究进展

血红素是一类存在于生物体内重要的含铁卟啉化合物。因其含有亚铁离子, 具备结合氧气的的能力, 成为呼吸作用以及电子传递链中相关蛋白质的重要组成成分。近年来, 在生物信息学和系统生物学的发展背景下, 科研人员已

表 2 四吡咯化合物及其应用

Table 2 Tetrapyrrole compounds and their applications

Type	Function	Application
Heme	Combining oxygen, peroxidase coenzyme & regulating expression of gene	Food additives Anti-anemia drugs Tumor location and treatment
Vitamin B <sub>12</sub>	Promoting methyl transfer, promoting nucleic acid biosynthesis & participating in the growth of red blood cell, promoting folic acid absorption	Treatment of megaloblastic anemia Treat depression Treatment of Alzheimer's disease
Chlorophyll	Absorbing light energy & maintaining enzyme activity	Anti-cancer drugs Cosmetic Food additives Feed additives
Bilin	Participating in photosynthesis & participating in the luminescence	Optical therapy Disease diagnosis Antioxidant drugs Food colorant
Coenzyme F <sub>430</sub>	Cofactor for methyl-coenzyme M reductase	Methane biosynthesis Bio-use of methane

经解析了血红素的合成途径并对其合成关键酶进行了鉴定,其合成途径如图 3 所示<sup>[39]</sup>。原卟啉依赖途径 (protoporphyrin-dependent pathway, PPD): 首先,尿卟啉原Ⅲ经过尿卟啉原脱羧酶Ⅲ (HemE) 转化形成粪卟啉原。然后,粪卟啉原在粪卟啉原氧化酶 (HemF) 的催化作用下产生原卟啉原Ⅸ。接着,在原卟啉原氧化酶 (HemG) 的作用下,原卟啉原Ⅸ转化成原卟啉Ⅸ。最终,亚铁螯合酶 (HemH) 将亚铁离子插入到原卟啉Ⅸ的卟啉环核心进而生成血红素,该途径主要存在于真核生物以及大部分革兰氏阴性 (G<sup>-</sup>) 细菌中。另外,革兰氏阳性细菌中血红素合成途径为粪卟啉依赖途径 (coproporphyrin-dependent pathway, CPD),与 PPD 途径相比,在粪卟啉原的位置出现分支:粪卟啉原在原卟啉原氧化酶 (HemY) 的作用下生成粪卟啉。之后亚铁螯合酶催化粪卟啉的吡咯环发生变形进而将亚铁离子插入。最终在脱羧酶 (HemQ) 的催化下产生血红素。研究人员发现,在硫酸盐还原细菌和某些古菌还存在

一种以西罗血红素为中间体的西罗血红素依赖途径 (siroheme-dependent pathway, SHD)<sup>[40]</sup>。

随着血红素市场需求的不断扩大,目前迫切需要能够适用于大规模生产血红素的方法,研究人员开始尝试构建微生物细胞工厂,利用葡萄糖等廉价底物来合成血红素。例如,2003 年 Kwon 等在大肠杆菌中利用 C4 途径以及 PPD 途径构建了血红素的合成途径,发现中间产物卟啉的浓度大幅度上升且达到了 90 μmol/L,然而并没有检测到血红素<sup>[41]</sup>。在此基础上,通过构建共表达 ALAS、NADP 依赖性苹果酸酶和二羧酸转运蛋白对细胞整体代谢途径进行进一步的调控优化,最终检测到微量血红素的产生<sup>[12]</sup>。此外,2013 年 Lee 为了增强血红素的合成,将血红素合成途径相关的基因在重组大肠杆菌中进行共表达且强化了血红素各种前体的合成,最终该菌株血红素的产量达到 0.49 μmol/g-DCW<sup>[42]</sup>。2018 年, Zhao 等利用 C5 途径以及 PPD 途径进行游离血红素的合成,分析血红素合成途径中不同基因表达情况对于产量的影响,通过利用不



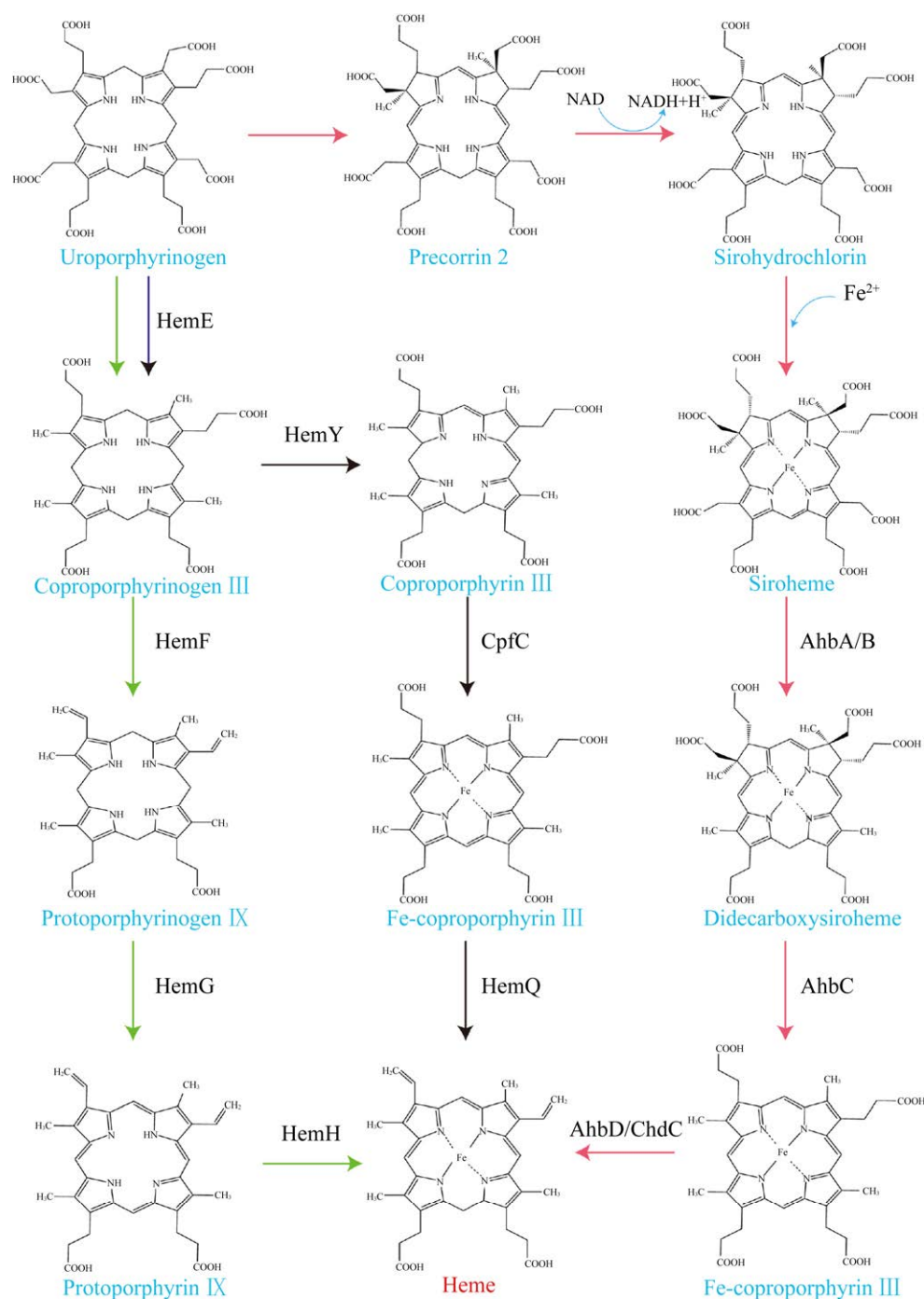


图3 血红素合成途径

Figure 3 The biosynthesis pathway of heme. Green arrow is the CPD pathway, red arrow is the SHD pathway, black arrow is the PPD pathway. HemE: uroporphyrinogen III decarboxylase; HemF: coproporphyrinogen III decarboxylase; HemG: protoporphyrinogen IX oxidase; HemH: protoporphyrin IX ferrochelatase; HemY: coproporphyrinogen III oxidase; CpfC: coproporphyrin III ferrochelatase; HemQ: coproheme decarboxylase; AhbA/B: siroheme decarboxylase; AhbC: 12,18-didecarboxysiroheme deacetylase; AhbD: heme b synthase.



同拷贝数的质粒表达途径基因以避免可能存在的途径反馈抑制,同时表达了血红素转运蛋白 CcmABC 和敲除 *ldh* 等竞争基因与血红素降解基因 *yfeX*,最后在发酵过程中补加葡萄糖以及谷氨酸等前体,使得血红素产量达到了 239.3 mg/L,其中 151.4 mg/L 为胞外血红素<sup>[43]</sup>。该研究较好地解析了血红素途径基因的相互调控关系,并鉴定了血红素的降解基因和血红素胞外转运相关基因,为后续高产血红素细胞工厂的构建奠定了坚实的基础。

血红素作为细胞所必需的辅因子和铁来源,在细胞的生长与各种生命过程中起着非常关键的作用。然而,由于血红素具有高氧化还原电位,在胞内积累会对细胞造成较大负担。因此,通过载体工程策略将血红素及时转运到胞外缓解其对细胞生长的不利,对改善菌株积累血红素的研究非常重要。另外,血红素在胞内的合成途径是高度保守且受到严格调控的,在后续研究中可能需要进一步探索底物之间的反馈调节以及不同酶之间的调节机制,通过合理分配细胞资源,进而获得最佳产量。

## 2.2 维生素 B<sub>12</sub> 生物合成的研究进展

维生素 B<sub>12</sub>,又称为钴胺素 (cobalamin),是由含钴的咕啉环所组成的一类复杂分子,同时也是唯一含有金属离子的水溶性维生素。目前发现仅有微生物有能力通过需氧和厌氧途径合成钴胺素<sup>[44-46]</sup>。如图 4 所示,尿卟啉原Ⅲ在钴胺素合成的关键酶——尿卟啉原Ⅲ甲基转移酶的催化下,将 SAM 的两个甲基转移到尿卟啉原Ⅲ上,进而生成前咕啉 2 (preccorin-2)。从前咕啉 2 开始,钴胺素的生物合成开始出现差异。在好氧途径中,首先,前咕啉 2 在氧气存在条件下被羟基化以及咕啉环发生缩化反应后生成前咕啉 5。接着,前咕啉 5 在经过甲基化反应、脱羧反应以及酰胺化反应后生成中间体氢咕啉

酸 (hydrogenobyrrinic acid)。之后,钴螯合酶将钴原子插入到咕啉环的中心生成钴啉酸 a,c-二酰胺。最终,在经过侧链的腺苷化和酰胺化产生腺苷钴酸 a,c-二酰胺。而厌氧途径的最大特点在于能够在无氧条件下进行以及将钴原子在早期插入到咕啉环的中心。前咕啉 2 通过去除两个质子和电子以及咕啉环的氧化产生西罗盐酸 (sirohydrochlorin)。接着在钴螯合酶的催化下,钴元素插入到咕啉环中。这一步钴原子插入后,因其具有一个正电荷,可以促进咕啉环的缩合作用。最后,经过甲基化、甲基重排以及酰胺化反应生成腺苷钴酸 a,c-二酰胺<sup>[47]</sup>。在腺苷钴酸 a,c-二酰胺合成以后,厌氧和好氧途径重新归于一致。腺苷钴酸 a,c-二酰胺在腺苷转移酶的作用下,咕啉环中心的钴元素与腺苷基团相连接并且咕啉环的羧基发生酰胺化生成腺苷钴啉氨酸。之后,腺苷钴啉氨酸与氨基丙醇磷酸酯 (aminopropanol phosphate)、鸟嘌呤核苷酸 (GMP) 以及  $\alpha$ -硝唑磷酸脂 ( $\alpha$ -ribazole phosphate) 相结合生成钴胺素<sup>[48]</sup>。

科研人员经过数十年的努力,基本解析了钴胺素在好氧细菌脱氮假单胞菌中生物合成途径,但是该途径的具体调节机制仍未清楚<sup>[49]</sup>。目前,钴胺素的工业生产方式为微生物发酵,主要菌种为脱氮假单胞菌、费氏丙酸杆菌和苜蓿中华根瘤菌等非模式菌株。例如,在脱氮假单胞菌的发酵过程中,Li 等通过添加不同的碳源和甲基供体确保培养基的 pH 保持稳定,实现 214.3 mg/L 的最大产量<sup>[50]</sup>。但是这些非模式菌株存在途径基因尚未完全解析以及缺乏成熟的基因编辑工具等缺点,使得对这些菌株的代谢改造非常困难,因此目前提高钴胺素产量的方法大多集中在对菌株的诱变和发酵优化等方法<sup>[51]</sup>。除了钴胺素的工业生产菌株之外,许多其他菌株也被发现可以用于钴胺素生产。例如,

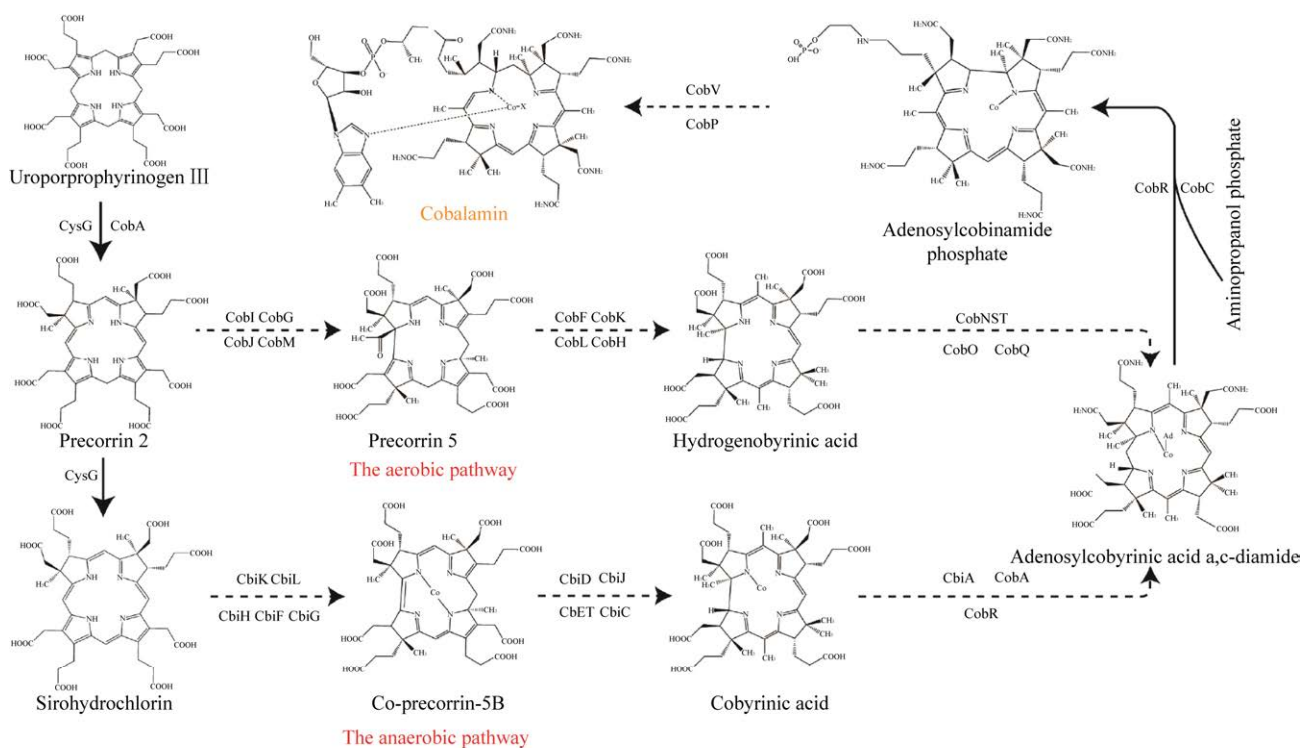


图4 维生素 B<sub>12</sub> 生物合成途径

Figure 4 The biosynthesis pathway of vitamin B<sub>12</sub>. CysG: siroheme synthase; CobA: uroporphyrin III methylase; CobI: precorrin-2 C(20)-methyltransferase; CobG: precorrin-3B synthase; CobJ: precorrin-3BC(17)-methyltransferase; CobM: precorrin-4 C(11)-methyltransferase; CobF: precorrin-6A synthase; CobK: precorrin-6A reductase; CobNST: cobaltochelate subunit; CobL: cordon-bleu WH2 repeat; CobH: precorrin-8X methylmutase; CobO: cob(II)yrinic acid a,c-diamide adenosyltransferase; CobQ: cobyric acid synthase; CobC: alpha-ribazole phosphatase; CobV: adenosylcobinamide-GDP ribazoletransferase; CbiK: sirohydrochlorin cobaltochelate; CobP: bifunctional adenosylcobinamide kinase/adenosylcobinamide-phosphate guanylyltransferase; CbiL: precorrin-2 C(20)-methyltransferase; CbiH: precorrin-3B C(17)-methyltransferase; CbiF: precorrin-4 C(11)-methyltransferase; CbiG: cobalt-precorrin 5A hydrolase; CbiD: cobalt-precorrin-5B (C(1))-methyltransferase; CbiJ: cobalt-precorrin-6A reductase; CbiC: precorrin-8X methylmutase; CbiE: precorrin-6y C5,15-methyltransferase; CbiT: precorrin-6y C5,15-methyltransferase; CbiA: cobyric acid a,c-diamide synthase; CobA: uroporphyrinogen-III C-methyltransferase.

Mohammed 等在巨大芽孢杆菌的发酵中建立两步培养策略, 优化钴胺素生产条件, 产量达到 204.46  $\mu\text{g/L}$ <sup>[52]</sup>。此外, 研究人员还发现广泛应用于发酵食品的乳酸菌也可以用于合成钴胺素, 这为富含钴胺素的保健食品的开发奠定了基础<sup>[53-54]</sup>。

目前微生物合成钴胺素存在的主要问题是产量普遍较低、发酵周期较长以及成本高昂。主要原因在于传统非模式生产菌株的代谢改造

困难、钴胺素生物合成代谢调控机理尚未解析以及培养条件较为苛刻。因此, 迫切需要对钴胺素合成途径的调控机理进行深入解析以及开发适用于当前生产菌株的基因编辑工具以提高代谢改造和途径优化效率。另外, 针对目前宿主中产量低下的缺点, 可以结合随机诱变和高通量筛选方法对当前生产菌株进行定向诱变筛选获得高产菌株。在此基础上, 运用组学技术

和反向代谢工程等策略解析钴胺素高产机制。通过系统代谢工程进一步提高关键合成途径与底盘细胞的适配性,进而优化胞内钴胺素合成代谢流。

### 2.3 叶绿素生物合成研究进展

叶绿素作为植物中含量最高的四吡咯化合物,可以接收光能并将光能转移至反应中心,是光合作用的基础物质<sup>[55]</sup>。随着生化技术的发展,叶绿素的结构及合成途径被逐渐解析。叶绿素主要由含有镁离子的卟啉环以及和卟啉环相结合的叶绿醇所组成。叶绿素合成途径中的前一部分与钴胺素和血红素的生物合成途径相同,以原卟啉IX (protoporphyrin IX) 作为分支,原卟啉IX在镁螯合酶 (magnesium chelatase, MgCH) 的作用下,镁原子插入到卟啉环的中心进而形成镁-原卟啉IX。镁螯合反应是叶绿素合成的标志之一,催化此过程的酶——镁螯合酶也是叶绿素合成的关键酶<sup>[56]</sup>。然后,镁-原卟啉IX在镁-原卟啉IX甲基转移酶 (magnesium-protoporphyrin IX methyltransferase, MgPMT) 的作用下,发生甲基化生成镁-原卟啉IX甲酯。然后在环化酶的作用下,生成联乙烯原叶绿素酸酯。之后经过两次还原以及1次氧化反应生成叶绿素酸酯b (chlide b)。最后在叶绿素合酶的作用下,即可生成叶绿素<sup>[57]</sup>。目前,在拟南芥中,从谷氨酰-tRNA到叶绿素a和b的途径中的所有15个步骤的基因已经被解析,但是关于这些酶的详细调控机制仍未完全明确<sup>[58]</sup>。

目前,受限于生产成本以及产量等问题,叶绿素的生产主要依赖从植物和蚕沙中提取。在利用微生物合成叶绿素方面,仅有少量研究报道。Chen等通过在*E. coli*中表达叶绿素途径中起到环化酶作用的AcsF以及共表达12个途径基因,成功地将原卟啉IX转化为叶绿素a,且发酵液颜色呈现绿色,实现了叶绿素a的体外

重组合成<sup>[59]</sup>。该研究不仅突破了在异养生物中合成叶绿素的瓶颈,而且分析出了叶绿素异源生物合成所需的最短途径基因,对叶绿素异源生物合成研究有极大的推动作用。2020年,喻帆等利用球红假单胞菌作为初始菌株合成细菌叶绿素a,通过紫外、常压室温等离子体 (atmospheric room temperature plasma, ARTP) 以及亚硝基胍 (nitrosoguanidine, NTG) 诱变方法,并优化发酵条件,使得叶绿素产量比原始菌株提高了近114倍,达285.7 mg/L<sup>[60]</sup>。

随着研究的深入,已经明确几种调节叶绿素代谢的新机制,并确定参与叶绿素转运的关键蛋白质,揭示更多关于植物如何控制叶绿素代谢流的信息<sup>[61-63]</sup>。叶绿素代谢的过程在胞内受到严格的调控,除受到叶绿素途径中酶与底物之间的相互调节之外,还受到血红素的反馈调节,抑制谷氨酰 tRNA 还原酶的活性,影响前体的供应。随着叶绿素代谢网络的不断解析,对合成途径了解逐渐深入,未来可以构建高产叶绿素的细胞工厂。但目前仍存在一定问题亟待解决:(1) 宿主选择的局限性:由于产物的特殊性,天然叶绿素仅能由植物、藻类和部分细菌等生物进行合成,大幅度限制了代谢工程改造平台的选择。(2) 代谢改造困难:目前叶绿素的生产菌株缺乏成熟的基因编辑工具,因此,通过菌株代谢途径的理性改造和设计获得叶绿素高产菌株较为困难。

### 2.4 胆色素生物合成研究进展

胆色素是来源于血红素以及叶绿素的线性四吡咯化合物,主要包括胆绿素、藻蓝胆素和藻红胆素等<sup>[64]</sup>。在胆色素合成途径中,首先,血红素在血红素氧化酶的催化下,环状卟啉环发生断裂进而形成胆绿素<sup>[65]</sup>。之后,胆绿素在不同铁氧还原酶的作用下,转化成其他多种类型的藻胆色素。目前已鉴定的铁氧还原酶主要

有 5 种, 其中, 藻蓝素铁氧还蛋白氧化还原酶 (ferredoxin oxidoreductase, PcyA) 催化胆绿素形成藻蓝胆素 (phycocyanobilin, PCB), 藻红胆素合成酶 (phycoerythrin synthase, PebS) 催化胆绿素生成藻红胆素 (phycoerythrobilin, PEB)。另外, 在藻红胆素还原酶 A (phycoerythrin reductase A, PebA) 和藻红胆素还原酶 B (phycoerythrin reductase B, PebB) 的共同催化下, 胆绿素也可以转化成 PEB<sup>[66]</sup>。

随着胆色素生物合成研究的不断深入, 研究人员已经实现了多种胆色素的异源生物合成。当前, 胆色素生物合成的宿主菌株主要为大肠杆菌, 以该菌株合成的血红素为前体, 通过异源表达途径关键基因构建和优化血红素合成胆色素的生物合成途径。如, Gambetta 等将来源于聚球藻 (*Synechococcus* sp.) 的 PcyA 和血红素氧化酶 (heme oxygenase, Ho1) 在 *E. coli* 中共表达, 成功获得了 0.65 mg/L 的 PCB<sup>[67]</sup>。之后, Chen 等在 *E. coli* 中构建和优化胆绿素的生物合成途径, 进一步采用补料分批发酵策略优化该菌株的发酵过程, 实现了 23.5 mg/L 的胆绿素产量<sup>[68]</sup>。另外, Stieflmaier 等将外源 *hol* 和 *pebS* 基因在 *E. coli* 共表达, 在经过发酵优化后获得 5.02 mg/L 的 PEB<sup>[69]</sup>。然而, 目前国内外关于胆色素生物合成的研究主要是简单构建其合成途径和优化其发酵过程, 缺少从机理层面解析和解决胆色素合成存在的一些瓶颈问题, 同时也没有对胆色素生物合成进行全面理性的优化。

### 3 总结与展望

近年来, 合成生物学技术的迅速发展, 很大程度上拉高了四吡咯化合物生物合成研究的热度。但是, 在实现四吡咯化合物的大规模工业化生产的过程中仍存在一定的问題: (1) 合成途径

长, 产率低。(2) 关键酶的转化效率低。(3) 目的产物和中间产物的负反馈抑制及其在细胞内累积对细胞的毒害作用。

为了构建稳定高效的合成四吡咯化合物的细胞工厂, 需要在合成途径、代谢网络以及细胞等方面进行多维度研究。因此需要从以下几个方向进行探索: (1) 筛选最优关键酶: 利用计算生物学和结构生物学的方法, 筛选并建立关键酶库, 优化途径中不同酶的组合以获得最佳催化效率。(2) 优化异源途径在底盘细胞中的表达: 利用 N-末端以及信号肽工程定位关键酶的空间位置, 或者在原核生物中并且合理调节异源途径与自身代谢途径的表达水平, 实现细胞资源的合理分配。(3) 胞外分泌途径的强化: 利用蛋白质工程技术优化筛选特定四吡咯化合物转运蛋白来改善四吡咯化合物向胞外转运的效率, 缓解四吡咯化合物积累对细胞的毒害。随着合成生物学技术的成熟, 微生物合成过程中所遇到的问题将被逐步解决, 最终实现四吡咯化合物高产细胞工厂的构建。

### REFERENCES

- [1] Bryant DA, Hunter CN, Warren MJ. Biosynthesis of the modified tetrapyrroles-the pigments of life. *J Biol Chem*, 2020, 295(20): 6888-6925.
- [2] Luo Z, Liu N, Lazar Z, et al. Enhancing isoprenoid synthesis in *Yarrowia lipolytica* by expressing the isopentenol utilization pathway and modulating intracellular hydrophobicity. *Metab Eng*, 2020, 61: 344-351.
- [3] Luo Z, Liu S, Du G, et al. Enhanced pyruvate production in *Candida glabrata* by carrier engineering. *Biotechnol Bioeng*, 2018, 115(2): 473-482.
- [4] Luo Z, Yu S, Zeng W, et al. Comparative analysis of the chemical and biochemical synthesis of keto acids. *Biotechnol Adv*, 2021, 47: 107706.
- [5] Romanowski S, Eustáquio AS. Synthetic biology for natural product drug production and engineering. *Curr Opin Chem Biol*, 2020, 58: 137-145.

- [6] Matoba Y, Banno K, Kisu I, et al. Clinical application of photodynamic diagnosis and photodynamic therapy for gynecologic malignant diseases: a review. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2018, 24: 52-57.
- [7] Cui ZY, Zhu ZW, Zhang JH, et al. Efficient 5-aminolevulinic acid production through reconstructing the metabolic pathway in SDH-deficient *Yarrowia lipolytica*. *Biochem Eng J*, 2021, 174: 108125.
- [8] Bechara EJH, Ramos LD, Stevani CV. 5-aminolevulinic acid: a matter of life and caveats. *J Photochem Photobiol*, 2021, 7: 100036.
- [9] Zhang C, Li Y, Zhu F, et al. Metabolic engineering of an auto-regulated *Corynebacterium glutamicum* chassis for biosynthesis of 5-aminolevulinic acid. *Bioresour Technol*, 2020, 318: 124064.
- [10] Ano A, Funahashi H, Nakao K, et al. Effect of *Glycine* on 5-aminolevulinic acid biosynthesis in heterotrophic culture of *Chlorella regularis* YA-603. *J Biosci Bioeng*, 1999, 88(1): 57-60.
- [11] 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(7): 2293-2297.
- [12] Yang P, Liu W, Cheng X, et al. A new strategy for production of 5-aminolevulinic acid in recombinant *Corynebacterium glutamicum* with high yield. *Appl Environ Microbiol*, 2016, 82(9): 2709-2717.
- [13] 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.
- [14] Noh MH, Lim HG, Park S, et al. Precise flux redistribution to glyoxylate cycle for 5-aminolevulinic acid production in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2017, 43(pt a): 1-8.
- [15] Zhang JL, Kang Z, Ding WW, et al. Integrated optimization of the *in vivo* heme biosynthesis pathway and the *in vitro* iron concentration for 5-aminolevulinate production. *Appl Biochem Biotechnol*, 2016, 178(6): 1252-1262.
- [16] Shih IT, Yi YC, Ng IS. Plasmid-free system and modular design for efficient 5-aminolevulinic acid production by engineered *Escherichia coli*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2021: 1-14.
- [17] Aiguo Z, Meizhi Z. Production of 5-aminolevulinic acid from glutamate by overexpressing HemA1 and pgr7 from *Arabidopsis thaliana* in *Escherichia coli*. *World J Microbiol Biotechnol*, 2019, 35(11): 175.
- [18] Ding W, Weng H, Du G, et al. 5-aminolevulinic acid production from inexpensive glucose by engineering the C4 pathway in *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2017, 44(8): 1127-1135.
- [19] Lou JW, Zhu L, Wu MB, et al. High-level soluble expression of the hemA gene from *Rhodobacter capsulatus* and comparative study of its enzymatic properties. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2014, 15(5): 491-499.
- [20] 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.
- [21] Ge F, Wen D, Ren Y, et al. Downregulating of hemB via synthetic antisense RNAs for improving 5-aminolevulinic acid production in *Escherichia coli*. *3 Biotech*, 2021, 11(5): 230.
- [22] Li T, Guo YY, Qiao GQ, et al. Microbial synthesis of 5-aminolevulinic acid and its coproduction with polyhydroxybutyrate. *ACS Synth Biol*, 2016, 5(11): 1264-1274.
- [23] Miscevic D, Mao JY, Kefale T, et al. Strain engineering for high-level 5-aminolevulinic acid production in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 2021, 118(1): 30-42.
- [24] Yu TH, Yi YC, Shih IT, et al. Enhanced 5-aminolevulinic acid production by co-expression of codon-optimized hemA gene with chaperone in genetic engineered *Escherichia coli*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2020, 191(1): 299-312.
- [25] 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: 1731.
- [26] Zhang B, Ye BC. Pathway engineering in *Corynebacterium glutamicum* S9114 for 5-aminolevulinic acid production. *3 Biotech*, 2018, 8(5): 247.
- [27] Zou Y, Chen T, Feng L, et al. Enhancement of 5-aminolevulinic acid production by metabolic engineering of the glycine biosynthesis pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol Lett*, 2017, 39(9): 1369-1374.
- [28] Feng L, Zhang Y, Fu J, et al. Metabolic engineering of

- Corynebacterium glutamicum* for efficient production of 5-aminolevulinic acid. *Biotechnol Bioeng*, 2016, 113(6): 1284-1293.
- [29] Ramzi AB, Hyeon JE, Kim SW, et al. 5-aminolevulinic acid production in engineered *Corynebacterium glutamicum* via C5 biosynthesis pathway. *Enzyme Microb Technol*, 2015, 81: 1-7.
- [30] Yu X, Jin H, Liu W, et al. Engineering *Corynebacterium glutamicum* to produce 5-aminolevulinic acid from glucose. *Microb Cell Fact*, 2015, 14: 183.
- [31] Fiorito V, Allocco AL, Petrillo S, et al. The heme synthesis-export system regulates the tricarboxylic acid cycle flux and oxidative phosphorylation. *Cell Rep*, 2021, 35(11): 109252.
- [32] Labbé S, Mourer T, Brault A, et al. Machinery for fungal heme acquisition. *Curr Genet*, 2020, 66(4): 703-711.
- [33] Zik C. Late life vitamin B<sub>12</sub> deficiency. *Clin Geriatr Med*, 2019, 35(3): 319-325.
- [34] Cai JQ, Liu XM, Gao ZJ, et al. Chlorophylls derivatives: photophysical properties, assemblies, nanostructures and biomedical applications. *Mater Today*, 2021, 45: 77-92.
- [35] Queiroz Zepka L, Jacob-Lopes E, Roca M. Catabolism and bioactive properties of chlorophylls. *Curr Opin Food Sci*, 2019, 26: 94-100.
- [36] Wolffenbutter BHR, Wouters HJCM, Heiner-Fokkema MR, et al. The many faces of cobalamin (vitamin B<sub>12</sub>) deficiency. *Mayo Clin Proc Innov Qual Outcomes*, 2019, 3(2): 200-214.
- [37] Urits I, Yilmaz M, Bahrin E, et al. Utilization of B<sub>12</sub> for the treatment of chronic migraine. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, 2020, 34(3): 479-491.
- [38] Golding J, Gregory S, Clark R, et al. Maternal prenatal vitamin B<sub>12</sub> intake is associated with speech development and mathematical abilities in childhood. *Nutr Res*, 2021, 86: 68-78.
- [39] Frère F, Reents H, Schubert WD, et al. Tracking the evolution of porphobilinogen synthase metal dependence *in vitro*. *J Mol Biol*, 2005, 345(5): 1059-1070.
- [40] Layer G. Heme biosynthesis in prokaryotes. *Biochim et Biophys Acta BBA-Mol Cell Res*, 2021, 1868(1): 118861.
- [41] Kwon SJ, Boer AD, Petri R, et al. High-level production of porphyrins in metabolically engineered *Escherichia coli*: systematic extension of a pathway assembled from overexpressed genes involved in heme biosynthesis. *Applied Environmental Microbiology*, 2003, 69(8): 4875-4883.
- [42] Lee MJ. Effect of gene amplifications in porphyrin pathway on heme biosynthesis in a recombinant *Escherichia coli*. *J Microbiol Biotechnol*, 2013, 23(5): 668-673.
- [43] Zhao XR, Choi KR, Lee SY. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for secretory production of free haem. *Nat Catal*, 2018, 1(9): 720-728.
- [44] Hedayati R, Hosseini M, Najafpour GD. Optimization of semi-anaerobic vitamin B<sub>12</sub> (cyanocobalamin) production from rice bran oil using *Propionibacterium freudenreichii* PTCC1674. *Biocatal Agric Biotechnol*, 2020, 23: 101444.
- [45] Wang ZQ, Xu GX, Du W, et al. Efficient ex-situ biosynthesis of vitamin B<sub>12</sub> by *Propionibacterium freudenreichii* using membrane separation coupling technology. *Biochem Eng J*, 2020, 161: 107688.
- [46] Moore SJ, Warren MJ. The anaerobic biosynthesis of vitamin B<sub>12</sub>. *Biochem Soc Trans*, 2012, 40(3): 581-586.
- [47] Croft MT, Lawrence AD, Raux-Deery E, et al. Algae acquire vitamin B<sub>12</sub> through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature*, 2005, 438(7064): 90-93.
- [48] Li D, Fang H, Gai Y, et al. Metabolic engineering and optimization of the fermentation medium for vitamin B<sub>12</sub> production in *Escherichia coli*. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2020, 43(10): 1735-1745.
- [49] Chamlagain B, Deptula P, Edelmann M, et al. Effect of the lower ligand precursors on vitamin B<sub>12</sub> production by food-grade *Propionibacteria*. *LWT-Food Sci Technol*, 2016, 72: 117-124.
- [50] Li KT, Liu DH, Chu J, et al. An effective and simplified pH-stat control strategy for the industrial fermentation of vitamin B<sub>12</sub> by *Pseudomonas denitrificans*. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2008, 31(6): 605-610.
- [51] Deery E, Ikeru P, Warren MJ. Cofactors and coenzymes biosynthesis of vitamin B<sub>12</sub> (cobalamin) and related corrinoids//Jez J, Ed. *Encyclopedia of Biological Chemistry III*. Amsterdam: Elsevier, 2021: 321-333.
- [52] Mohammed Y, Lee B, Kang Z, et al. Development of a two-step cultivation strategy for the production of vitamin B<sub>12</sub> by *Bacillus megaterium*. *Microb Cell Fact*, 2014, 13: 102.
- [53] Li P, Gu Q, Yang L, et al. Characterization of extracellular vitamin B<sub>12</sub> producing *Lactobacillus plantarum* strains and assessment of the probiotic potentials. *Food Chem*, 2017, 234: 494-501.

- [54] Fang H, Kang J, Zhang D. Microbial production of vitamin B<sub>12</sub>: a review and future perspectives. *Microb Cell Fact*, 2017, 16(1): 15.
- [55] Lin YP, Charnng YY. Chlorophyll dephytylation in chlorophyll metabolism: a simple reaction catalyzed by various enzymes. *Plant Sci*, 2021, 302: 110682.
- [56] 刘子琦, 汪佳. 镁螯合酶的结构与功能. *中国生物化学与分子生物学报*, 2018, 34(1): 18-24.  
Liu ZQ, Wang J. Structure and function of the magnesium chelatase. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2018, 34(1): 18-24 (in Chinese).
- [57] Garnett JMR, Wellner N, Mayes AG, et al. Using induced chlorophyll production to monitor the physiological state of stored potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *Postharvest Biol Technol*, 2018, 145: 222-229.
- [58] Kim DH, Yang JH, Kim HJ, et al. Recent advances in genetic regulation of chlorophyll metabolism in plants. *Korean J Breed Sci*, 2020, 52(4): 281-297.
- [59] Chen GE, Canniffe DP, Barnett SFH, et al. Complete enzyme set for chlorophyll biosynthesis in *Escherichia coli*. *Sci Adv*, 2018, 4(1): eaaq1407.
- [60] 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(6): 567-572.  
Yu Fan, Fang Jiashuang, Ying Lingping, et al. Breeding of high-yielding bacterial chlorophyll a strain and optimization of fermentation process. *Chin J Antibiot*, 2020, 54(6): 567-572 (in Chinese).
- [61] Zhang C, Zhang B, Mu B, et al. A thylakoid membrane protein functions synergistically with GUN<sub>5</sub> in chlorophyll biosynthesis. *Plant Commun*, 2020, 1(5): 100094.
- [62] Borah KD, Bhuyan J. Magnesium porphyrins with relevance to chlorophylls. *Dalton Trans*, 2017, 46(20): 6497-6509.
- [63] Yu N, Liu Q, Zhang Y, et al. CS3, a Ycf54 domain-containing protein, affects chlorophyll biosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci*, 2019, 283: 11-22.
- [64] Rockwell NC, Lagarias JC. Ferredoxin-dependent bilin reductases in eukaryotic algae: ubiquity and diversity. *J Plant Physiol*, 2017, 217: 57-67.
- [65] Sugishima M, Wada K, Unno M, et al. Bilin-metabolizing enzymes: site-specific reductions catalyzed by two different type of enzymes. *Curr Opin Struct Biol*, 2019, 59: 73-80.
- [66] 曹潇丹. 胆色素荧光蛋白的分子机理和超快动力学研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2019.  
Cao XD. Ultrafast dynamics and mechanism of bilin-based fluorescent proteins[D]. Shanghai: East China Normal University, 2019 (in Chinese).
- [67] Gambetta GA, Lagarias JC. Genetic engineering of phytochrome biosynthesis in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(19): 10566-10571.
- [68] Chen D, Brown JD, Kawasaki Y, et al. Scalable production of biliverdin IX $\alpha$  by *Escherichia coli*. *BMC Biotechnol*, 2012, 12: 89.
- [69] Stiefelmaier J, Ledermann B, Sorg M, et al. Pink bacteria-production of the pink chromophore phycoerythrobilin with *Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 2018, 274: 47-53.

(本文责编 郝丽芳)