



## 研究报告

谷氨酸代谢调控及 *hemA* 过表达促进大肠杆菌血红素合成潘梅<sup>1</sup> 刘爽欣<sup>2</sup> 唐蕾<sup>\*1,2</sup>

1 江南大学工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122

2 江南大学生物工程学院 江苏 无锡 214122

**摘要:**【背景】大肠杆菌(*Escherichia coli*)以谷氨酸为前体经 C5 途径合成有限的血红素。【目的】探究胞内谷氨酸代谢及谷氨酰-tRNA 还原酶基因(*hemA*)过表达对 5-氨基乙酰丙酸(5-Aminolevulinic Acid, ALA)和血红素合成的影响。【方法】通过 Red 同源重组敲除与谷氨酸代谢有关的 *mscS* 与 *aroG*, 构建 *hemA* 表达载体并导入基因缺失菌株中。【结果】*mscS* 单敲除或 *mscS* 与 *aroG* 双敲除对菌体生长无显著影响。与出发菌株相比, 单敲除与双敲除菌株的谷氨酸含量均有所增加, ALA 含量略微下降, 血红素含量分别增加了 11.6% 和 35.7%。在双敲除菌株中进一步过表达 *hemA* 后, 胞内血红素含量增至 47.603  $\mu\text{mol/L}$ 。【结论】通过调控谷氨酸代谢流量与过表达 *hemA* 可促进血红素的合成, 该结果为增强 C5 途径的血红素合成提供了新的思路。

**关键词:** 大肠杆菌, 谷氨酰-tRNA 还原酶, Red 同源重组, 谷氨酸, 血红素

Enhancing heme synthesis in *Escherichia coli* by regulating glutamic acid metabolism and over-expressing *hemA*PAN Mei<sup>1</sup> LIU Shuangxin<sup>2</sup> TANG Lei<sup>\*1,2</sup>

1 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

2 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

**Abstract:** [Background] *Escherichia coli* uses glutamic acid as a precursor to synthesize limited heme through the C5 pathway. [Objective] The purpose of this study was to investigate the effects of the regulation of intracellular glutamic acid metabolism and over-expression of glutamyl-tRNA reductase gene (*hemA*) on 5-aminolevulinic acid (ALA) and heme synthesis. [Methods] Through Red homologous recombination, *mscS* and *aroG* which are related to glutamate metabolism were knocked out, and the *hemA* expression vector was constructed and introduced into the gene-knockout strains. [Results] The single and double gene-knockout had no significant effect on cell growth, but the content of glutamic acid increased, whereas that of ALA decreased slightly. The heme content in single and double gene-knockout strains

**Foundation items:** Program of Introducing Talents of Discipline to Universities (111-2-06); National Light Industry Technology and Engineering First-Class Discipline Independent Project Fund (LITE2018-27)

**\*Corresponding author:** Tel: 86-510-85918296; E-mail: ltang@jiangnan.edu.cn

**Received:** 04-05-2020; **Accepted:** 04-07-2020; **Published online:** 23-07-2020

**基金项目:** 高等学校学科创新引智计划(111-2-06); 国家轻工技术与工程一流学科自主课题资助项目(LITE2018-27)

**\*通信作者:** Tel: 0510-85918296; E-mail: ltang@jiangnan.edu.cn

**收稿日期:** 2020-05-04; **接受日期:** 2020-07-04; **网络首发日期:** 2020-07-23

increased by 11.6% and 35.7% compared with that in the parental strain respectively. **[Conclusion]** The over-expression of *hemA* in the double gene-knockout strain caused the increase of heme to 47.603  $\mu\text{mol/L}$ . Heme synthesis can be promoted by regulation of intracellular glutamate metabolic flow and over-expression of *hemA* which provides a new approach for heme enhancement through C5 pathway.

**Keywords:** *Escherichia coli*, glutamyl-tRNA reductase, Red homologous recombination, glutamic acid, heme

血红素是一类重要的含铁卟啉类化合物,参与电子转移、活性氧分解、底物氧化、基因表达调控等生物体内生化反应<sup>[1]</sup>。在实际应用中,血红素及其卟啉衍生物可用于食品增色、贫血病和卟啉症的治疗<sup>[2-4]</sup>。此外,以血红素为辅基的蛋白,如染料脱色过氧化物酶(Dye-Decolorizing Peroxidase, DyP)可用于废弃染料的降解<sup>[5]</sup>。目前以酶法和从生物材料中提取血红素存在产量低、环境不友好等缺点。可以利用微生物发酵法生产血红素和重组血红素蛋白,但是由于血红素的胞内合成受到严格调控,工业化困难。因此,通过代谢工程改造提高微生物细胞的血红素合成能力至关重要。

大肠杆菌(*Escherichia coli*)作为重要的基因工程宿主菌,主要以谷氨酸为前体经 C5 途径合成血红素<sup>[6]</sup> (图 1),其中 *hemA* 编码的谷氨酰-tRNA 还

原酶被认为是 C5 途径的关键酶<sup>[7]</sup>。以往的研究报道多以提高 5-氨基乙酰丙酸(5-Aminolevulinic Acid, ALA)的胞内合成量以及增强 ALA 下游代谢流的方式提升胞内血红素的合成<sup>[8-10]</sup>。由于 ALA 合成的增强将拉动上游代谢,因此可通过上游的代谢工程改造,使胞内的碳代谢流更多地流向前体谷氨酸,结合过表达 *hemA*,以提高血红素的含量。

在调控谷氨酸代谢流方面,3-脱氧-D-阿拉伯庚酮糖-7-磷酸(3-Deoxy-D-Arabinose-Heptulosonate-7-Phosphate, DAHP)合成酶(*aroG*)作为 DAHP 合成酶的主要同工酶,与磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶竞争底物磷酸烯醇式丙酮酸(Phosphoenolpyruvate, PEP)<sup>[11]</sup>,催化芳香族氨基酸前体 DAHP 的合成,从而分流了 PEP 向草酰乙酸的代谢通量,进而影

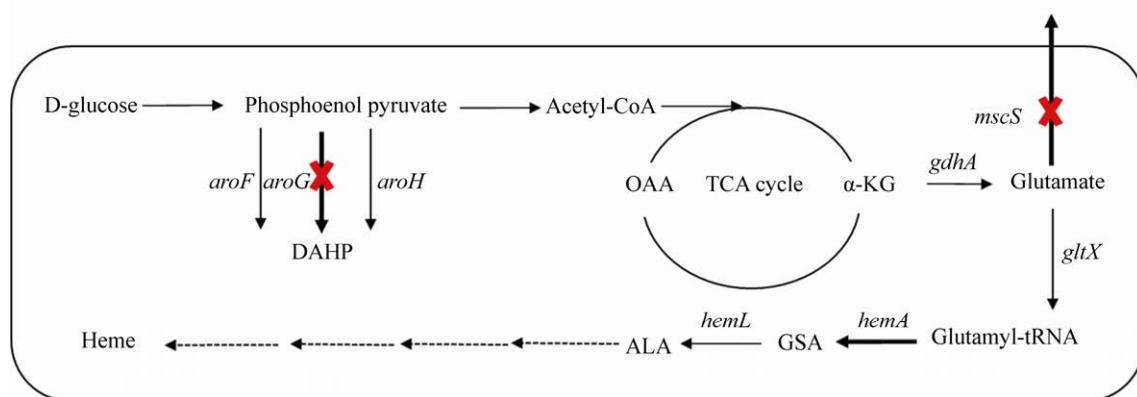


图 1 大肠杆菌血红素合成的 C5 途径

Figure 1 The C5 pathway of heme synthesis in *E. coli*

注: DAHP: 3-脱氧-D-阿拉伯庚酮糖-7 磷酸; *aroG*: DAHP 合成酶; *gdhA*: 谷氨酸脱氢酶; *mscS*: 机械敏感通道蛋白; *gltX*: 谷氨酰-tRNA 合成酶; *hemA*: 谷氨酰-tRNA 还原酶; *hemL*: ALA 合成酶

Note: DAHP: 3-Deoxy-D-Arabinose-heptulosonate-7-Phosphate; *aroG*: DAHP synthase; *gdhA*: Glutamate dehydrogenase; *mscS*: Mechanosensitive channel of small conductance protein; *gltX*: Glutamyl-tRNA synthetase; *hemA*: Glutamyl-tRNA reductase; *hemL*: ALA synthase

响  $\alpha$ -酮戊二酸( $\alpha$ -Ketoglutarate,  $\alpha$ -KG)和谷氨酸的生成<sup>[12]</sup>。小电导类机械敏感型离子通道(Mechanosensitive Channel of Small Conductance, MscS)在感知膜张力变化、保护细胞免受低渗透压的冲击中发挥作用<sup>[13]</sup>, 其在  $\text{Ca}^{2+}$ 调节、细胞分裂和氨基酸转运中具有生理功能<sup>[14]</sup>。最近有研究表明, 在谷氨酸棒状杆菌中谷氨酸的转运是由 MscCG (也称为 NCgl1221)介导的。MscS 类蛋白的 N 端结构域参与 L-谷氨酸外泌<sup>[15]</sup>, 在敲除该基因后, 胞内谷氨酸的积累增加<sup>[15-16]</sup>。大肠杆菌的 MscS 蛋白与谷氨酸棒状杆菌的 MscCG 同源, 且 N 端结构域相似<sup>[16-17]</sup>。综上, 本研究通过敲除 *aroG* 和 *mscS*, 降低糖代谢中心途径中 PEP 向芳香族氨基酸的代谢流<sup>[11-12,18-19]</sup>、阻塞机械敏感型离子通道, 减少谷氨酸的外泌<sup>[15-17]</sup>, 提高因过表达 *hemA* 后可能导致的谷氨酸胞内供给不足。本文报道通过调控谷氨酸代谢及 *hemA* 过表达促进大肠杆菌血红素合成的研究结果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株与引物

实验所用的菌株和质粒见表 1, 所用引物(表 2)

由天霖生物科技有限公司(上海)合成。

1.1.2 主要试剂和仪器

限制性内切酶、基因组提取、片段纯化和质粒提取试剂盒, TaKaRa 公司; ClonExpress® MultiS One Step Cloning Kit, 南京诺唯赞生物科技有限公司; 抗生素(Kan、Amp 和 Cmr)、L-阿拉伯糖, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 其他试剂均为国产或进口分析纯。

电转仪、凝胶成像仪, Bio-Rad 公司; 安捷伦高效液相色谱仪, Sykam 公司; EnSpire 多标记检测系统(酶标仪), PerkinElmer 公司。

1.1.3 培养基

LB 培养基(g/L): NaCl 10.0, 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, 琼脂粉 20 (固体培养基加入)。pH 7.0,  $1\times10^5$  Pa 灭菌 20 min。需要添加抗生素的菌株, Kan、Amp 和 Cmr 添加的终浓度分别为 100、50 和 15 mg/L。

1.2 方法

1.2.1 基因敲除菌株的构建

基因打靶片段扩增方法参考文献[20]。基因敲除方法参考文献[21]。*mscS* 敲除菌命名为 WT $\Delta$ *mscS*, *mscS* 和 *aroG* 双缺失菌命名为 WT $\Delta$ *mscS* $\Delta$ *aroG*。

表 1 菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids

菌株/质粒 Strains/Plasmids	特性 Features	来源 Sources
Strains		
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Expression strain	Our laboratory
WT $\Delta$ <i>mscS</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3) deleted <i>mscS</i>	This study
WT $\Delta$ <i>mscS</i> $\Delta$ <i>aroG</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3) deleted <i>mscS</i> and <i>aroG</i>	This study
WT/pET	<i>E. coli</i> BL21(DE3) transformed with plasmid pET-28a	Our laboratory
WT/pEA	<i>E. coli</i> BL21(DE3) transformed with plasmid pEA	Our laboratory
WT $\Delta$ <i>mscS</i> /pEA	WT $\Delta$ <i>mscS</i> transformed with plasmid pEA	This study
WT $\Delta$ <i>mscS</i> $\Delta$ <i>aroG</i> /pEA	WT $\Delta$ <i>mscS</i> $\Delta$ <i>aroG</i> transformed with plasmid pEA	This study
Plasmids		
pET-28a, pET-22b	Expression plasmids	Our laboratory
pKD46, pKD4, pCP20	Red homologous recombination deletion plasmids	Our laboratory
pBUKD	Plasmid containing <i>UmscS</i> , <i>KanM</i> and <i>DmscS</i>	This study
pEA	pET-28a inserted with <i>hemA</i>	Our laboratory

表 2 本研究中所用引物  
Table 2 Sequence of primers used in this study

引物名称	引物序列
Primers name	Primers sequence (5'→3')
UmscSF	ggataacaattccce <u>TCTAGAG</u> CGAAGATCAGCCGAACA ( <i>Xba</i> I)
UmscSR	acGTGCCGCCACGATGTTTA
DmscSF	tcatatggaccTAAGCGGGTGAAAGAAGACA
DmscSR	ttgtcgacggagctc <u>GAATTC</u> AGGCTGCCCAGTACAACAAA ( <i>Eco</i> R I)
KmscSF	taaacatcggtggcgacGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
KmscSR	acccgcttaGGTCCATATGAATATCCTCCTTAG
rmscSF	GCGAAGATCAGCCGAACA
rmscSR	AGGCTGCCCAGTACAACAAA
QmscSF	GAACGAAGCTTATCTGCAGG
QmscSR	GGTTCCACATCAAGTTGCC
UaroGF	ATGAATTATCAGAACGACGATTTACGCATCAAAGAA ATCAAAGAGTTACTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
DaroGR	TTACCCGCGACGCGCTTTTACTGCATTCGCCAGTTGA CGTAACAGAGCATCATGGGAATTAGCCATGGTC
QaroGF	CCCGTTTACACATTCTGACG
QaroGR	TGATTCATCGGATACGCCAC

注：下划线为酶切位点  
Note: The sequences of restriction sites are underlined

1.2.2 生长曲线测定

将各菌株于 37 °C、200 r/min 活化过夜，次日以 1%的比例转接于 50 mL 的 LB 培养基中。每间隔 2 h 取样，测定菌液在 600 nm 下的吸光度值，共测定 12 h。

1.2.3 谷氨酸含量测定

使用氨基酸专用高效液相色谱仪测定谷氨酸含量，具体操作如下：活化菌体过夜，次日转接培养 7 h。取培养后的菌体于 4 °C、8 000 r/min 离心 15 min，磷酸缓冲液洗涤菌体后重悬菌体，在低温条件下对细胞进行超声破碎，于 4 °C、10 000 r/min 离心 30 min，取 4 mL 上清液，加入 4 mL 浓盐酸，充氮气，放入 120 °C 烘箱水解 22 h。将水解样品加入 10 mol/L NaOH 中和，定容至 25 mL。双层滤纸过滤，取 1 mL 澄清液于室温下 12 000 r/min 离心 30 min。取 400 μL 上清液置于液相瓶中进行液相分析检测。

1.2.4 血红素及 5-氨基乙酰丙酸浓度测定

参照文献[10]测定血红素浓度，参照文献[22]测定 ALA 含量。采用 GraphPad Prism 软件分析数

据结果。

2 结果与分析

2.1 构建 *mscS* 基因缺失菌

以 pBUKD 质粒为模板、*rmscSF* 和 *rmscSR* 为引物扩增出 2 639 bp 的打靶片段，导入含 pKD46 质粒的 *E. coli* BL21(DE3)制备的电转感受态细胞中(图 2A)，以 *QmscSF*/*QmscSR* 为鉴定引物对阳性单菌落进行 PCR 扩增验证。理论上，经 PCR 扩增后，同源重组成功的菌株应得到长度为 2 704 bp 的片段，而对照菌 WT 扩增后的片段长度应为 1 950 bp。电泳结果显示：阳性菌 PCR 扩增后的条带大小与理论计算值相一致(图 2B)，表明已成功进行同源重组。将 pCP20 质粒转入重组菌，通过 *QmscSF*/*QmscSR* 引物对阳性转化菌进行 PCR 扩增验证，理论上 *mscS* 缺失后 PCR 扩增可获得长度为 1 311 bp 的扩增片段，而对照菌为 1 950 bp。电泳结果显示：菌落 PCR 扩增后的条带大小与理论计算值相一致(图 2C)。将 PCR 产物进行测序分析，得到的序列结果正确，表明 *mscS* 已成功缺失，将

缺失菌株命名为  $WT\Delta mscS$ 。

## 2.2 构建 *mscS/aroG* 双敲除菌

以 pKD4 质粒为模板、*UaroGF/DaroGR* 为引物扩增出 1 607 bp 的打靶片段导入  $WT\Delta mscS$  中(图 3A), 以 *QaroGF/QaroGR* 为鉴定引物对阳性单菌落进行扩增验证。理论上, 经 PCR 扩增后, 同源重组成功的菌株应得到长度为 1 724 bp 的扩增片段, 而对照菌(WT)扩增后的片段长度应为 1 180 bp。电泳结果显示: 挑取的阳性菌落扩增后条带大小与理论值一致(图 3B), 表明已成功进行同源重组。将 pCP20 质粒转入重组菌, 通过 *QaroGF/QaroGR*

引物对阳性转化菌进行 PCR 扩增验证。理论上 *aroG* 缺失后可获得长度为 331 bp 的 PCR 扩增片段, 而对照菌为 1 180 bp。电泳结果显示: 扩增得到的条带大小与理论值相一致(图 3C); 对 PCR 产物进行测序分析, 所得序列结果正确, 表明 *aroG* 也已成功缺失, 将缺失菌株命名为  $WT\Delta mscS\Delta aroG$ 。

## 2.3 基因缺失对于大肠杆菌生长状态的影响

在 LB 培养基中培养对照菌(WT)和敲除菌株, 测定不同培养时间下的菌体浓度绘制生长曲线(图 4)。结果表明, 在不同的培养时间内,  $WT\Delta mscS$

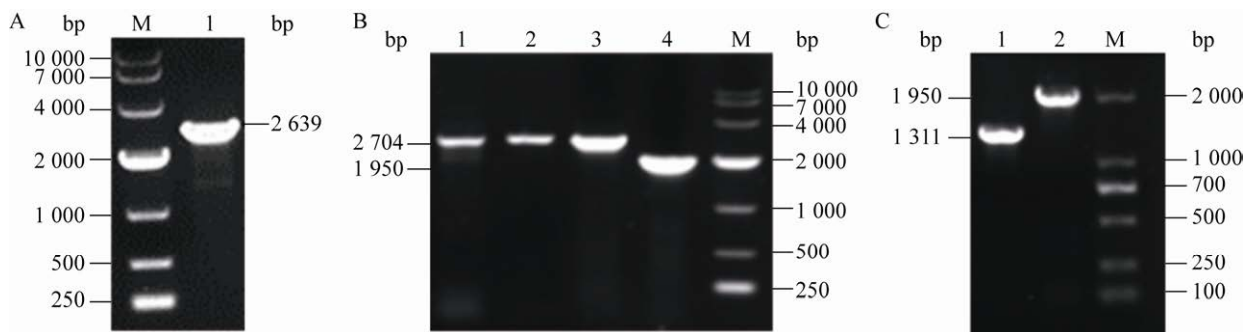


图 2 *mscS* 敲除电泳验证

### Figure 2 Electrophoretic verification of *mscS* knockout

注: M: DL10000 DNA Marker。A: 扩增打靶片段; 1: 打靶片段; B: 同源重组验证; 1-3: 重组成功菌; 4: WT 对照; C: 抗性消除验证; 1: *mscS* 缺失菌; 2: WT 对照

Note: M: DL10000 DNA Marker. A: Amplification of target fragment; 1: Target fragment; B: Verification of homologous recombination; 1-3: Strain with homologous recombinant; 4: WT control. C: Verification after elimination of resistance; 1: Strain with *mscS* deletion; 2: WT control

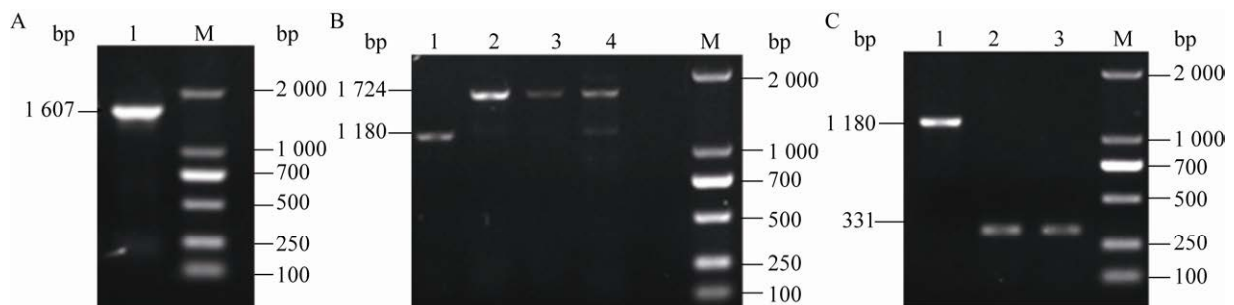


图 3 *mscS/aroG* 敲除电泳验证

### Figure 3 Electrophoretic verification of *mscS/aroG* knockout

注: M: DL2000 DNA Marker。A: 扩增打靶片段; 1: 打靶片段; B: 同源重组验证; 1: WT 对照; 2-4: 重组成功菌; C: 抗性消除验证; 1: WT; 2-3: *mscS/aroG* 缺失菌

Note: M: DL2000 DNA Marker. A: Amplification of target fragment; 1: Target fragment; B: Verification of homologous recombination; 1: WT control; 2-4: Strains with homologous recombinant; C: Verification after elimination of resistance; 1: WT control; 2-3: Strains with *mscS/aroG* deletion

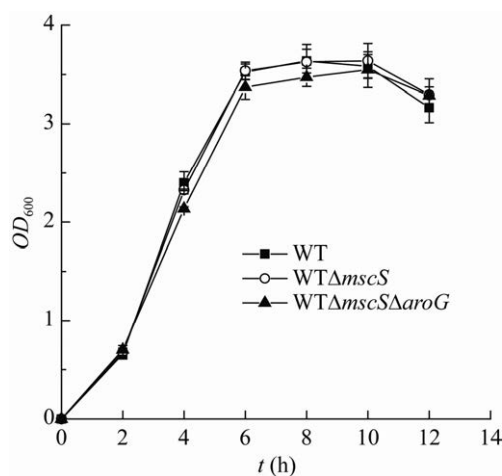


图4 各菌株生长曲线

Figure 4 Growth curve of each strain

与 WT 的菌体浓度几乎一致, 无显著差异; 在 2–10 h 内, WTΔ*mscS*Δ*aroG* 的菌体浓度略低于 WT; 在 10–12 h 内又恢复到与 WT 一致的水平。

以上结果表明敲除 *mscS* 与 *aroG* 对于大肠杆菌的生长没有显著影响, 分析原因可能是由于:

(1) 作为氨基酸转运的机械敏感型离子通道, MscS 的缺失只会降低氨基酸的外泌, 不会导致菌体生长所需氨基酸的缺乏, 因此不会对细胞生长产生不利

影响; (2) *aroG* 仅是 3 个 DAHP 合成酶(*aroG*、*aroH*、*aroF*)之一<sup>[18]</sup>, 即使 *aroG* 缺失, *aroF* 和 *aroH* 仍然可以催化芳香族氨基酸的合成, 满足细胞生长的需求。

## 2.4 基因缺失对于大肠杆菌谷氨酸积累的影响

对 WT、WTΔ*mscS* 和 WTΔ*mscS*Δ*aroG* 的谷氨酸含量进行分析的结果表明, WTΔ*mscS* 和 WTΔ*mscS*Δ*aroG* 的谷氨酸含量分别为 0.248 g/g-DCW 和 0.260 g/g-DCW, 与 WT 相比, 分别提升了 2.0% 和 7.0%。*mscS* 和 *aroG* 的缺失并未造成胞内谷氨酸的大量积累, 增加的谷氨酸是否用于血红素的合成需要进一步的分析。

## 2.5 基因缺失对于大肠杆菌 ALA 积累和血红素合成的影响

对血红素及 ALA 含量的分析表明, WTΔ*mscS* 与 WTΔ*mscS*Δ*aroG* 的胞内血红素含量分别为 2.357 μmol/L 与 2.866 μmol/L, 与 WT 相比, 分别增加了 11.6% 和 35.7% (图 5A); 胞外 ALA 含量分别为 8.822 mg/L 和 8.354 mg/L, 与 WT 相比, 分别下降了 3.5% 和 8.6% (图 5B), 推测 ALA 进一步转化成为了血红素。

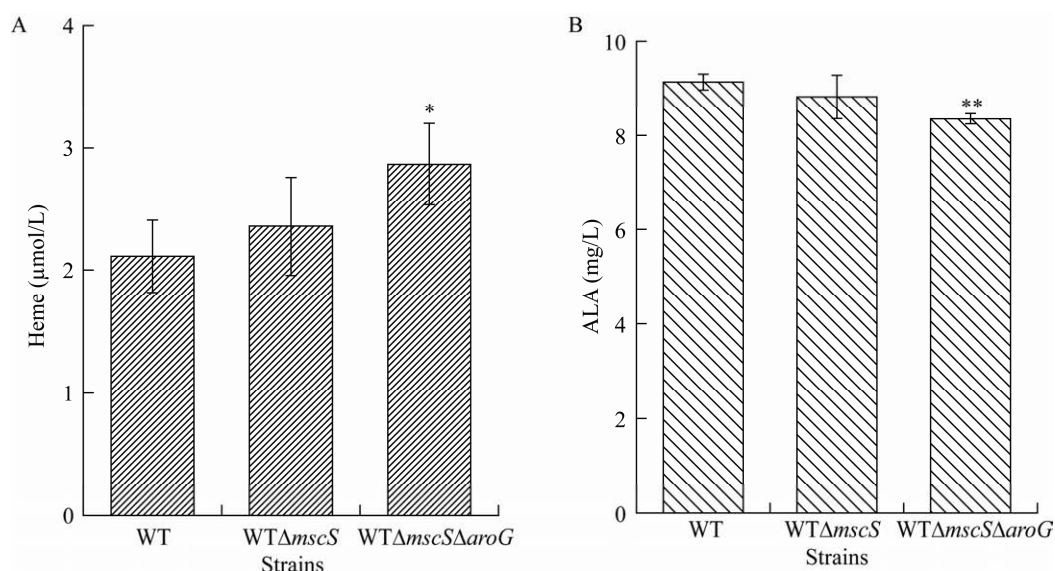


图5 各菌株的血红素(A)与 ALA (B)含量比较

Figure 5 Contents of heme (A) and ALA (B) in each strain

Note: \*:  $P \leq 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$



2.6 过表达 *hemA* 对缺失菌 ALA 积累和血红素合成的影响

C5 途径中 *hemA* 是关键基因,编码谷氨酰-tRNA 还原酶,该酶参与 ALA 合成,是血红素合成途径中的限速步骤<sup>[23-24]</sup>。将 *hemA* 导入缺失菌中的结果表明, WT/pEA 的血红素含量为 34.117  $\mu\text{mol/L}$ , WT $\Delta\text{mscS}$ /pEA 和 WT $\Delta\text{mscS}\Delta\text{aroG}$ /pEA 的血红素含量比 WT/pEA 的血红素含量增加了 34.4%和 39.5%; 其中, WT $\Delta\text{mscS}\Delta\text{aroG}$ /pEA 的血红素含量达到 47.603  $\mu\text{mol/L}$ , 约为未过表达菌株 WT 的 22倍(图 6A)。WT/pEA 的 ALA 含量为 10.827  $\text{mg/L}$ , 较未过表达菌株有较大提升,有利于血红素的合成(图 6B)。因此,在缺失菌株中过表达 *hemA* 可显著增强血红素的合成。

3 讨论与结论

血红素应用广泛,是大多数原核和真核生物细胞呼吸的重要辅助因子,也是优质的铁源<sup>[25]</sup>,以血红素为辅基的蛋白对各种生物学过程至关重要。

在以血红素为辅基的重组酶合成中,血红素不足是导致酶活性不高的重要因素<sup>[5,26]</sup>。最新研究表明,血红素辅因子的充足供应对于可溶性和功能性血红蛋白的生产至关重要<sup>[26-27]</sup>,为了提高血红蛋白的溶解度和稳定性,目前主要是通过添加血红素及其前体 ALA,从而使新合成的蛋白质和血红素有效结合<sup>[1]</sup>,因此提高血红素的含量有利于提高重组酶活性。在以往关于 *E. coli* 血红素合成代谢途径的研究中,侧重于 ALA 合成及之后的下游相关基因之间的调控和相互作用对血红素合成的影响。例如, Kwon 等<sup>[28]</sup>将血红素合成途径中的 *hemA*、*hemB/C/D*、*hemE* 和 *hemH* 共表达,在 LB 培养基中培养细胞获得 3.300  $\mu\text{mol/L}$  胞内血红素; Pranawidjaja 等<sup>[29]</sup>通过共表达异源 *hemA* 和编码内源泛酸激酶 *coaA*,并在培养基中添加琥珀酸、甘氨酸和  $\text{FeCl}_3$ ,胞内血红素含量达到 9.100  $\mu\text{mol/g}$ -细胞;翁焕娇<sup>[30]</sup>通过对血红素合成途径的模块化组装优化和补料分批发酵,胞内血红素产量达到 1.399  $\text{mg/L}$ 。

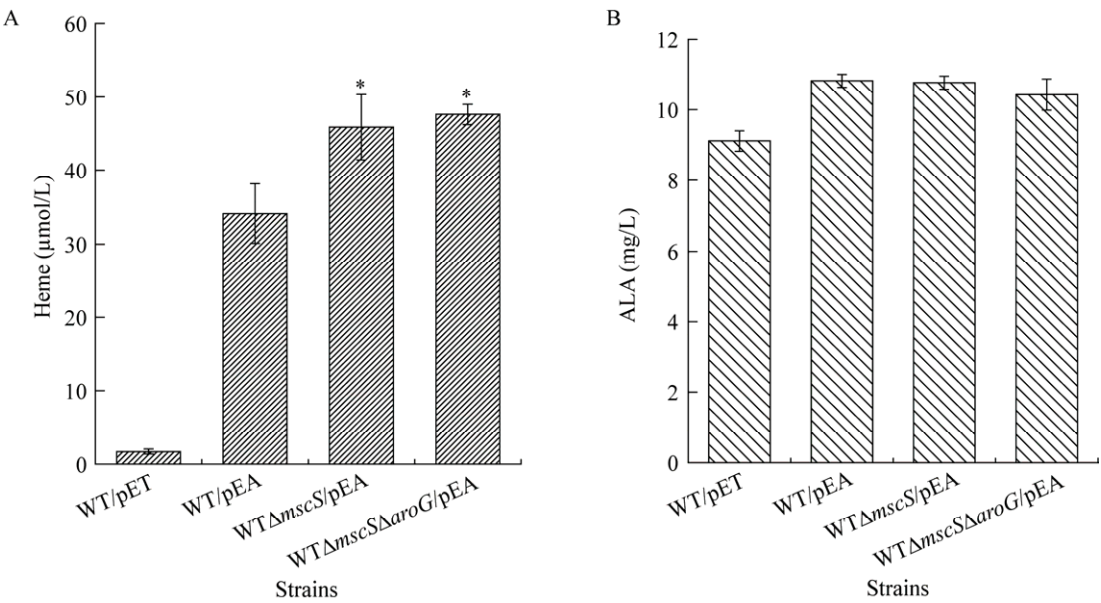


图 6 各菌株血红素(A)与 ALA (B)含量  
Figure 6 Contents of heme (A) and ALA (B) in each strain  
Note: \*:  $P \leq 0.05$

与上述报道不同,本文主要关注了过表达内源 *hemA* 后上游前体物的供给问题,通过芳香氨基酸合成基因的缺失和谷氨酸外泌的阻塞,调控谷氨酸代谢流。结果表明,在基因缺失菌株中过表达 *hemA*, 血红素含量增至 47.603  $\mu\text{mol/L}$ , 约为出发菌株的 22 倍。

本研究仅过表达了 *hemA*, 虽然过程简单且血红素含量有明显提升,但未能结合 ALA 下游基因的表达调控。今后可根据已有的文献报道<sup>[10,30]</sup>进行 ALA 下游基因的共表达或模块化设计,进一步拉动 C5 代谢流流向血红素。

## REFERENCES

- [1] Sudhamsu J, Kabir M, Airola MV, Patel BA, Yeh SR, Rousseau DL, Crane BR. Co-expression of ferrochelatase allows for complete heme incorporation into recombinant proteins produced in *E. coli*[J]. Protein Expression and Purification, 2010, 73(1): 78-82
- [2] In MJ, Chae HJ, Oh NS. Process development for heme-enriched peptide by enzymatic hydrolysis of hemoglobin[J]. Bioresource Technology, 2002, 84(1): 63-68
- [3] Li ZZ, Ye CH. Research progress of application and production technology of heme[J]. Food Research and Development, 2000, 21(5): 12-14 (in Chinese)  
李志钊, 叶春华. 血红素的应用与生产技术研究进展[J]. 食品研究与开发, 2000, 21(5): 12-14
- [4] Watson CJ, Pierach CA, Bossenmaier I, Cardinal R. Postulated deficiency of hepatic heme and repair by hematin infusions in the “inducible” hepatic porphyrias[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1977, 74(5): 2118-2120
- [5] Ramzi AB, Hyeon JE, Han SO. Improved catalytic activities of a dye-decolorizing peroxidase (DyP) by overexpression of ALA and heme biosynthesis genes in *Escherichia coli*[J]. Process Biochemistry, 2015, 50(8): 1272-1276
- [6] Li FF, Wang Y, Gong K, Wang Q, Liang QF, Qi QS. Constitutive expression of RyhB regulates the heme biosynthesis pathway and increases the 5-aminolevulinic acid accumulation in *Escherichia coli*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2014, 350(2): 209-215
- [7] Beale SI, Gough SP, Granick S. Biosynthesis of 5-aminolevulinic acid from the intact carbon skeleton of glutamic acid in greening barley[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1975, 72(7): 2719-2723
- [8] Ge BS, Chen Y, Yu Q, Lin SJ, 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
- [9] Ramzi AB, Hyeon JE, Kim SW, Park C, Han SO. 5-Aminolevulinic acid production in engineered *Corynebacterium glutamicum* via C<sub>5</sub> biosynthesis pathway[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2015, 81: 1-7
- [10] 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)  
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
- [11] Li YH. Advances in biosynthesis of phenylalanine[J]. Letters in Biotechnology, 2002, 13(4): 296-300 (in Chinese)  
李永辉. 苯丙氨酸生物合成的研究进展[J]. 生物技术通讯, 2002, 13(4): 296-300
- [12] Zhao CG, Wei HB, Xu QY, Zhang CL, Chen N. Effect of deletion of genes in glutamate biosynthesis pathway on L-tryptophan fermentation by *Escherichia coli*[J]. Food and Fermentation Industries, 2016, 42(9): 8-14 (in Chinese)  
赵春光, 魏洪波, 徐庆阳, 张成林, 陈宁. 谷氨酸合成途径基因缺失对大肠杆菌发酵 L-色氨酸的影响[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(9): 8-14
- [13] Yamashita C, Hashimoto KI, Kumagai K, Maeda T, Takada A, Yabe I, Kawasaki H, Wachi M. L-Glutamate secretion by the N-terminal domain of the *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 mechanosensitive channel[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2013, 77(5): 1008-1013
- [14] Cox CD, Nakayama Y, Nomura T, Martinac B. The evolutionary ‘tinkering’ of MscS-like channels: generation of structural and functional diversity[J]. Pflügers Archiv-European Journal of Physiology, 2015, 467(1): 3-13
- [15] Hashimoto KI, Nakamura K, Kuroda T, Yabe I, Nakamatsu T, Kawasaki H. The protein encoded by NCgl1221 in *Corynebacterium glutamicum* functions as a mechanosensitive channel[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2010, 74(12): 2546-2549
- [16] Nakamura J, Hirano S, Ito H, Wachi M. Mutations of the *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 gene, encoding a mechanosensitive channel homolog, induce L-glutamic acid production[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(14): 4491-4498
- [17] Hashimoto KI, Murata J, Konishi T, Yabe I, Nakamatsu T, Kawasaki H. Glutamate is excreted across the cytoplasmic membrane through the NCgl1221 channel of *Corynebacterium glutamicum* by passive diffusion[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2012, 76(7): 1422-1424
- [18] Xu JF, Hu CY, Shen SY, Wang WR, Jiang PH, Huang WD. Requirement of the N-terminus for dimer formation of phenylalanine-sensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate



- synthase AroG of *Escherichia coli*[J]. Journal of Basic Microbiology, 2004, 44(5): 400-406
- [19] Fan CS, Zeng XB, Chai YR, Jiang PH, Huang WD. Expression of genes *aroG* and *pheA* in phenylalanine biosynthesis[J]. Acta Microbiologica Sinica, 1999, 39(5): 430-435 (in Chinese)  
范长胜, 曾小冰, 柴运嵘, 江培翎, 黄伟达. 苯丙氨酸合成的关键酶基因 *aroG* 与 *pheA* 串联表达[J]. 微生物学报, 1999, 39(5): 430-435
- [20] Yang Y, Zheng K, Pan M. The effect of *rhtA* deletion on heme synthesis in *Escherichia coli*[J]. Microbiology China, 2019, 46(12): 3216-3224 (in Chinese)  
杨燕, 郑珂, 潘梅. 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
- [21] Datsenko KA. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(12): 6640-6645
- [22] Zhang JL, Kang Z, Chen J, Du GC. Optimization of the heme biosynthesis pathway for the production of 5-aminolevulinic acid in *Escherichia coli*[J]. Scientific Reports, 2015, 5(1): 8584
- [23] 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, 2017, 81(1): e00048-16
- [24] Zhang B, Ye BG. Pathway engineering in *Corynebacterium glutamicum* S9114 for 5-aminolevulinic acid production[J]. 3 Biotech, 2018, 8(5): 247
- [25] Khan AA, Quigley JG. Control of intracellular heme levels: heme transporters and heme oxygenases[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2011, 1813(5): 668-682
- [26] Graves PE, Henderson DP, Horstman MJ, Solomon BJ, Olson JS. Enhancing stability and expression of recombinant human hemoglobin in *E. coli*: progress in the development of a recombinant HBOC source[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, 2008, 1784(10): 1471-1479
- [27] Akhtar MK, Jones PR. Cofactor engineering for enhancing the flux of metabolic pathways[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2014, 2: 30
- [28] Kwon SJ, De Boer AL, Petri R, Schmidt-Dannert C. High-level production of porphyrins in metabolically engineered *Escherichia coli*: systematic extension of a pathway assembled from overexpressed genes involved in heme biosynthesis[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(8): 4875-4883
- [29] 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
- [30] Weng HJ. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for enhancing the production of heme[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2017 (in Chinese)  
翁焕娇. 代谢工程改造大肠杆菌强化血红素的合成[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2017