

表达酿酒酵母 ALAS 的重组大肠杆菌胞外 5-氨基乙酰丙酸的产量和纯化 Purification and Production of the Extracellular 5-aminolevulinate from Recombinant *Escherichia coli* Expressing Yeast ALAS

何晓梅,周 静,程 郢,范 军*

HE Xiao-Mei, ZHOU Jing, CHENG Ying and FAN Jun*

安徽农业大学生命科学学院,合肥 230036

School of Life Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China

摘 要 5-氨基乙酰丙酸(5-aminolevulinate, ALA)由 5-氨基乙酰丙酸合酶(5-aminolevulinic acid synthase, ALAS)催化产生。利用重组细菌在大肠杆菌合成 ALA 已有不少研究。重组真核生物 ALAS 在大肠杆菌合成 ALA 的研究没有报道。酿酒酵母 ALAS 在大肠杆菌重组表达,在摇瓶培养条件下,分析了胞外 ALA 的产量、重组菌的生长状况和细胞中 ALAS 的活性,利用两种国产树脂纯化 ALA,毛细管电泳分析确定 ALA 纯度在 LB 培养基中,初始 pH 6.5,含有 20mmol/L 的酮戊酸、20mmol/L 琥珀酸和 20mmol/L 的甘氨酸,37℃下诱导培养 12h,胞外 ALA 的产量为 162mg/L 培养基。纯化的 ALA 纯度达到 90%。

关键词 *hem1*, 酿酒酵母, 5-氨基乙酰丙酸产量, 5-氨基乙酰丙酸纯化

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)03-0520-05

Abstract Aminolevulinic acid (ALA) is biosynthesized by the enzyme ALA synthase (ALAS). The ALA production has been studied using the overproducing ALAS from several bacteria in *Escherichia coli*, respectively. However, ALAS from eucaryote expressed in *E. coli* for producing ALA in the culture is not known. The extracellular ALA production and cell growth were investigated respectively using the recombinant *E. coli* overproducing *Saccharomyces cerevisiae* ALAS in shake-flask fermentations. The ALAS activity from the cell extract was assayed. The extracellular ALA was purified by the national-made large-dimension resins and confirmed by the capillary electrophoresis measurements. At 12h after induction at 37°C, the extracellular ALA production was up to 162mg per liter LB culture at initial pH 6.5 with exogenous levulinate, succinate and glycine at the concentration of 20mmol/L respectively. The purity of ALA after purification is up to 90%.

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, 5-aminolevulinic acid synthase, 5-aminolevulinic acid production, 5-aminolevulinic acid purification

5-氨基乙酰丙酸(5-aminolevulinic acid, ALA)存在于大部分生物中,是血红素、叶绿素和维生素 B₁₂ 生物合成的共有前体,可作为无公害的天然杀虫剂、除草剂和植物生长促进剂,能提高植物对盐害和冻

害的抵抗力,此外,它还是抗微生物药物和治疗癌症的药物^[1]。ALA 在生物体内有两种合成途径,一种途径被称为 C₅ 途径,存在于植物和大部分细菌包括大肠杆菌中,ALA 来源于谷氨酸的碳骨架,由 3 个酶

Received: September 7, 2006; Accepted: December 20, 2006.

This work was supported by the grant from Anhui Provincial Commission of Science and Technology (No. 06013155C).

* Corresponding author. Tel: +86-551-2823795; E-mail: fanjun@ahau.edu.cn

安徽省科学技术厅资助项目(No. 06013155C)资助。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

催化。另一条途径称为 C_4 途径,存在于动物、真菌和 α 家族细菌中,由 5-氨基乙酰丙酸合酶(ALA synthase, ALAS)催化琥珀酰辅酶 A 和甘氨酸缩合成一分子的 ALA^[1]。

ALA 的生产有两种方法^[1],一种是利用光合细菌的突变体,然而突变体的筛选费时费力,光合细菌多为厌氧细菌,培养条件苛刻。另外一种方法是利用表达细菌 ALAS 的重组大肠杆菌生产 ALA^[2-6]。国内浙江大学开展了重组菌生产 ALA 的研究^[7-9],如重组 *Agrobacterium radiobacter* 的 ALAS 在大肠杆菌中表达,经过优化,ALA 的产量和国外报道的结果在同一数量级。目前,ALA 的生产仍没有达到工业化生产要求^[1]。

不同物种的 ALAS 在大肠杆菌表达所合成的 ALA 产量和比活有明显差异。目前表达浑球红细菌 (*Rhodobacter sphaeroides*) ALAS 的大肠杆菌的 ALA 产量最高,但是,纯化的酶比活大大低于重组小鼠 ALAS 的比活^[10,11],ALAS 是个限速酶,在细胞内受血红素的反馈抑制。从酿酒酵母中纯化的 ALAS 显示很高的比活^[12]。编码酵母 ALAS 的基因 *hem1* 已被克隆^[13],氨基酸序列比较显示和其它生物的 ALAS 有三个血红素结合模块相比,它只有一个结合模块^[14]。此前,我们已将酵母的 *hem1* 基因在大肠杆菌中获得活性表达^[15]。本研究中,我们尝试利用重组表达酵母 ALAS 的大肠杆菌合成 ALA,初步研究了测定了胞外 ALA 的产量,并利用国产树脂纯化了胞外 ALA。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂:表达酿酒酵母 ALAS 的重组质粒 pMAL-ALAS 由本实验室构建,并已确定在大肠杆菌得到活性表达^[15]。酵母浸出物和胰蛋白胨由英国 Oxoid 公司生产,琥珀酰辅酶 A、甘氨酸、磷酸吡哆醛和异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG)分别为美国 Sigma、BBI 和 Promega 公司产品,ALA 购自德国 Fluka 公司,强碱性阴离子交换树脂型号为 201 * γ (717) 和强酸性阳离子交换树脂型号为 001 * γ (723),由天津市光复精细化工研究所生产,其它试剂为国产分析纯。

1.1.2 仪器:紫外可见分光光度仪 U-2001 和高速冷冻离心机 SCR20BC 是日本 Hitachi 公司产品,毛细管电泳仪 P/ACE™ MDQ 是美国 Beckman 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 菌体生长及处理:将重组载体 pMAL-ALAS 转化大肠杆菌菌株 BL21(DE3),挑取新活化的重组单菌落,接种于 200mL 含有氨苄青霉素(终浓度 100 μ g/mL)的 Luria-Bertani (LB)培养基中,37 $^{\circ}$ C, 220r/min 振荡培养过夜。然后按 1:100 扩大培养,在 OD_{600} 约 0.5 时,加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L,诱导培养 12h。扩大培养根据需要添加一定的外源物质。

1.2.2 ALAS 酶活测定:分别取不同 pH 值培养的菌液,10000 \times g 离心 10min,收集菌体。用 10mL,50 mmol/L 的 Tris-HCl, pH 7.5 缓冲液悬浮,冰浴超声破碎(3-10-99, 300W \times 2),17000 \times g 离心 20min,收集上清。ALAS 的酶活测定参照文献^[11]。在 50mmol/L 的 Tris-HCl, pH 7.5 中,含有一定体积的蛋白提取液,以及底物包括 20mmol/L 的 $MgCl_2$ 、0.1 mol/L 的甘氨酸、0.1mmol/L 的磷酸吡哆醛和 0.2mmol/L 琥珀酰辅酶 A 终体积为 300 μ L。37 $^{\circ}$ C 温浴 10min 后,加入 150 μ L 的 10%(V/V)三氯乙酸,12000 \times g 离心 10min,取 300 μ L 上清液,加入 400 μ L 的中和溶液(1mol/L 的乙酸-乙酸钠缓冲液, pH 4.6),再加入和 ALA 反应的试剂,35 μ L 乙酰丙酮,100 $^{\circ}$ C 保温 15min,冷却至室温后加入 200 μ L 的 Ehrlich's 试剂(含 42mL 乙酸,8mL 的 70%高氯酸和 1g 的二甲氨基苯甲醛),室温反应 10min 后测 556nm 的吸光度。以不含有底物的反应液作对照。产物的光吸收系数是 60200 L/(mol \cdot cm),一个酶活力单位(u)定义每毫克蛋白为 37 $^{\circ}$ C 反应 1h 生成 1 μ mol 的 ALA。蛋白质浓度测定采用考马斯亮蓝法,以牛血清白蛋白作为对照。

1.2.3 胞外 ALA 的测定:取一定体积的细胞培养液,8000 \times g 离心 10min,弃沉淀,上清液取 700 μ L,加入和 ALA 反应的试剂,其后的操作步骤如 1.2.2 所述。

1.2.4 ALA 的纯化:参照文献^[16],有改进。将除去悬浮物的树脂用 0.5mol/L 的 HCl 处理,用 ddH₂O 洗至中性,再 0.5mol/L 的 NaOH 处理,重复 3 次,加入层析柱(1.6 \times 10cm)中,加入 3mol/L NaAc 洗脱至无 Cl⁻,再以 ddH₂O 平衡,加入 10 mL 离心的重组菌培养液,以 ddH₂O 洗脱,分步收集洗脱液,检测 ALA,合并含有 ALA 的水溶液,再加入经过碱酸处理的强酸性阳离子交换树脂(1.6 \times 10cm),以 ddH₂O 清洗 3 个柱体积,以 0.5mol/L 的 NaAc 洗脱,洗脱液冷冻干燥。

1.2.5 ALA 的鉴定:将冷冻干燥的 ALA 样品溶于适量的 ddH₂O,毛细管电泳法鉴定 ALA^[17],运行电压为 20kV,200nm 紫外检测,毛细管柱温为 30℃。以标准品作对照。

2 结果

2.1 菌株自身合成 ALA 的能力

由于大肠杆菌本身采用 C₅ 途径合成 ALA,因此本研究中测定了大肠杆菌的本底合成。在没有诱导的情况下,含有对照质粒和重组酵母 ALAS 质粒大肠杆菌的 ALA 有一定的表达量(表 1),而重组酵母 ALA 的大肠杆菌胞外 ALAS 产量明显高于对照,表明有一定的本底表达。培养 24 h 的未诱导重组大肠杆菌细胞呈现红色,在紫外光照射下有红色荧光,主要是血红素下游产物积累所致。表达 *R. sphaeroides* 的 ALAS 重组大肠杆菌中,也观察到这种现象^[13]。

表 1 未诱导大肠杆菌胞外的 ALA 产量
Table 1 The extracellular ALA production from the uninduced *E. coli* cells

| <i>E. coli</i> strains | Cells red fluorescence | Extracellular ALA production (mg/L culture) |
|------------------------|------------------------|---|
| BL21(DE3)γpMAL-2x | - | 1.823 ± 0.202 |
| BL21(DE3)γpMAL-ALAS | + | 19.372 ± 1.537 |

2.2 培养基初始 pH 值对 ALAS 酶活的影响

在初始 pH 5.5~8.0 下细胞提取液的 ALAS 比活呈一抛物线变化(图 1)。在 pH 5.5~7.0 时,酶的比活呈上升趋势,pH 7.0~8.0,酶的比活呈下降趋势。其中在初始 pH 7.0 条件下培养时,提取液的 ALAS 比活达最大。由于 ALA 在 pH 7.0 以上会产生非酶催化的二聚化,一般选择生产 ALA 的初始 pH 为 6.5^[11],从图 2 中显示,在 pH 6.5 酵母 ALAS 的酶活降低约 10%。

2.3 添加物对重组菌体生长及 ALA 产量的影响

在细胞内,ALA 被 5-氨基乙酰丙酸脱水酶转化成胆色素原。酮戊酸是该脱水酶的竞争性抑制剂,它能抑制 ALA 转化,促进 ALA 积累。但是,不同浓度的酮戊酸抑制重组细胞的生长(图 2A),添加 20mmol/L 的酮戊酸,胞外 ALA 的积累量达最高(图 2B),每升发酵液含有 122mg 的 ALA。随着 LA 浓度的增加,细胞合成胞外 ALA 的能力下降。

进一步添加琥珀酸,它在细胞体内会转化成 ALAS 的底物琥珀酰辅酶 A,20mmol/L 的外源琥珀酸不仅能促进重组细胞的生长,而且促进胞外 ALA 的

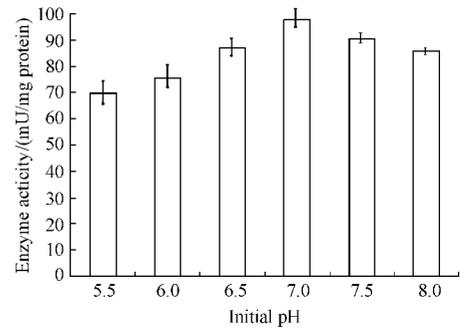


图 1 初始 pH 值对 ALAS 比活的影响

Fig. 1 The effect of initial pH on the recombinant ALAS specific activity

合成(图 3A,3B),每升发酵液能在胞外能合成约 151mg ALA。随着外源琥珀酸的浓度升高,细胞的生长和 ALA 的产量均下降。在表达 *R. sphaeroides* 的 ALAS 工程菌中,添加 30mmol/L 的琥珀酸能提高 ALA 的产量^[4]。

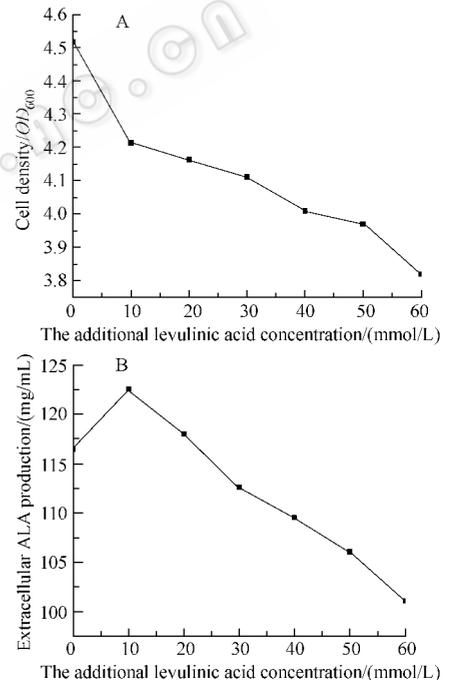


图 2 初始酮戊酸浓度对细胞生长(A)和胞外 ALA 产量(B)的影响

Fig. 2 The effect of additional levulinate at the various concentrations on the cell growth(A) and extracellular ALA production(B)

在上述培养的基础上,再添加一定浓度的甘氨酸,它是 ALAS 的底物之一。它对重组菌的生长和胞外 ALA 的产量和外源琥珀酸相似。20mmol/L 的甘氨酸促进细胞生长,提高胞外 ALA 的产量(图 4A,4B),每升发酵液中含有约 162mg 的 ALA。随着外源甘氨酸浓度增加,细胞生长受到抑制,胞外 ALA 的产量下降。

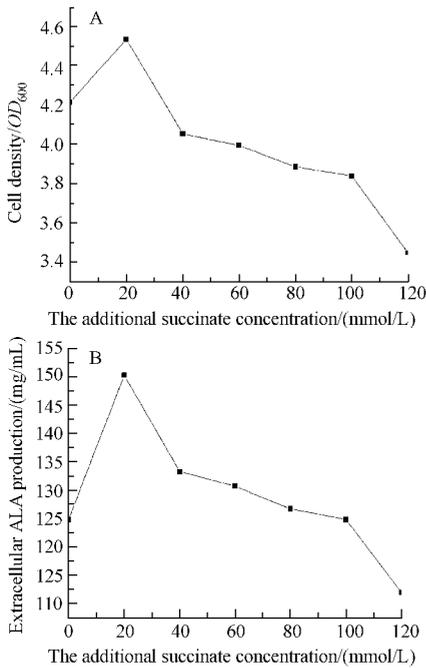


图3 初始琥珀酸浓度对细胞生长(A)和胞外 ALA 产量(B)的影响

Fig. 3 The effect of initial succinate concentration on the cell growth(A) and extracellular ALA production(B)

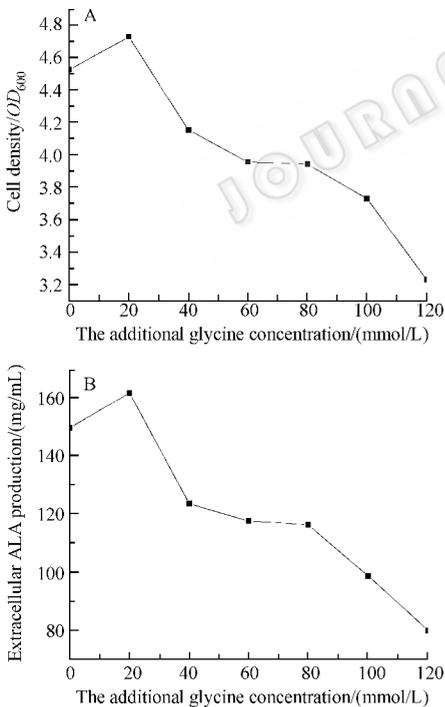


图4 初始甘氨酸浓度对细胞生长(A)和胞外 ALA 产量(B)的影响

Fig.4 The effect of additional glycine at the various concentrations on extracellular ALA production

2.4 ALA 的纯化

利用国产强碱性阴离子交换树脂和强酸性阳离子交换树脂纯化了 ALA, 得率为 66%(表 2)。纯化

的 ALA 经过毛细管电泳分析显示对应的一个主峰(图 5)表明国产树脂能有效纯化 ALA。

表 2 诱导表达酵母 ALAS 的大肠杆菌胞外 ALA 的纯化

Table 2 The purification of the extracellular ALA from the induced *E. coli* cells expressing yeast ALAS

| Purification step | ALA production/mg | Yield/% |
|------------------------------|-------------------|---------|
| Crude | 1.62 | 100 |
| Strongly basic anion resin | 1.30 | 82 |
| Strongly acidic cation resin | 0.98 | 66 |

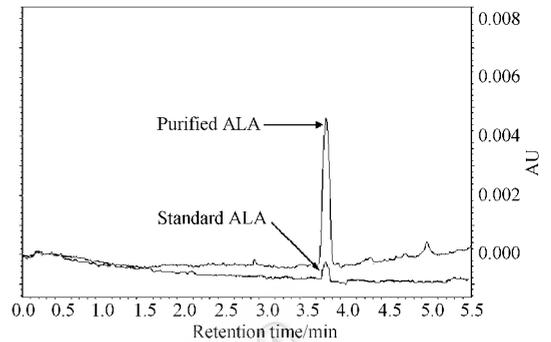


图5 ALA 的毛细管电泳鉴定

Fig. 5 Identification of the purified ALA by electropherogram

3 讨论

已知酵母的 *hem1* 基因编码的 ALAS 含有运输到线粒体的导肽^[9], 成熟 ALAS 的第一个氨基酸残基目前还不清楚。我们构建的表达 ALAS 是 Asn63 作为起始氨基酸^[15], 它在转基因烟草中证明有酶活^[18]。从酵母细胞中纯化的天然 ALAS 的最适 pH 值为 7.4^[12] 和我们所测的重组表达酵母 ALAS 有差异, 这可能是起始氨基酸残基的差异所致, 还可能与培养过程中细胞内部的 pH 值有关。重组菌生产 ALA 的培养基的最适 pH 值为 6.5, 高于 7.0 时, ALA 会环化成二聚体^[1]。酵母 ALAS 在 pH 6.5 时酶活有一定损失, 这部分限制了胞外 ALA 的产量。

对影响重组 ALAS 合成 ALA 的各种因子已有研究, 如 ALAS 的来源、表达载体、表达菌株、培养基组分、pH 值、氧气浓度、外源底物和前底物以及下游酶的抑制剂等^[2-9]。本研究中, 利用摇瓶培养重组酵母 ALAS 的大肠杆菌胞外 ALA 产量大大低于利用发酵罐培养的重组细菌 ALAS 的 ALA 产量。ALA 的生产需要厌氧条件和恒定的 pH, 摇瓶培养难以满足这两个条件, 但主要原因可能是酵母 ALAS 在大肠杆菌的表达量低^[15], 因此, 添加的外源底物和前底物, 以及抑制剂对 ALA 的产量提高有限。大幅提高胞外 ALA 的产量需改变酵母编码成熟 ALAS 基因的密码子偏爱性。

在 ALA 的生产中, 血红素生物合成下游的中间

物也会分泌到胞外。利用国产的强碱性阴离子交换树脂,能专一性吸附 ALA,除去其它杂物,部分纯化的 ALA 再经强酸性阳离子交换树脂,达到较高的纯度,这为 ALA 纯化工艺的建立奠定了基础。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Sasaki K, Watanabe M, Tanaka T, *et al.* Biosynthesis, biotechnological production and applications of 5-aminolevulinic acid. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, **58**(1): 23 - 29.
- [2] Mariet J, Werf MJ, Zeikus JG. 5-Aminolevulinic acid production by *Escherichia coli* containing the *Rhodobacter sphaeroides* hemA gene. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**(10): 3560 - 3566.
- [3] Nishikawa S, Watanabe K, Tanaka T, *et al.* *Rhodobacter sphaeroides* mutants which accumulate 5-aminolevulinic acid under aerobic and dark conditions. *J Biosci Bioeng*, 1999, **87**(6): 798 - 804.
- [4] Xie L, Eiteman MA, Altman E. Production of 5-aminolevulinic acid by an *Escherichia coli* aminolevulinic acid dehydratase mutant that overproduces *Rhodobacter sphaeroides* aminolevulinic acid synthase. *Biotechnol Lett*, 2003, **25**(20): 1751 - 1755.
- [5] Lee DH, Jun WJ, Shin DH, *et al.* Effect of culture conditions on production of 5-aminolevulinic acid by recombinant *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2005, **69**(3): 470 - 476.
- [6] Choi C, Hong BS, Sung HC, *et al.* Optimization of extracellular 5-aminolevulinic acid production from *Escherichia coli* transformed with ALA synthetase gene of *Bradyrhizobium japonicum*. *Biotechnol Lett*, 1999, **21**(6): 551 - 554.
- [7] Liu X, Lin J, Cen P. Effect of inducers on the production of 5-aminolevulinic acid by recombinant *Escherichia coli*. *Prep Biochem Biotechnol*, 2006, **36**(3): 223 - 233.
- [8] Liu X, Lin J, Qin G, Cen P. Expression of a new *hemA* gene from *Agrobacterium radiobacter* in *Escherichia coli* for 5-aminolevulinic acid production. *Chin J Chem Eng*, 2005, **23**(4): 522 - 528.
- [9] Qin G, Lin J, Liu X, Cen P. Effects of medium composition on production of 5-aminolevulinic acid by recombinant *Escherichia coli*. *J Biosci Bioeng*, 2006, **102**(4): 316 - 322.
- [10] Bolt EL, Kryszak L, Ryalls J, *et al.* Characterization of the *Rhodobacter sphaeroides* 5-aminolevulinic acid synthase isoenzymes, HemA and HemT, isolated from recombinant *Escherichia coli*. *Eur J Biochem*, 1999, **265**(1): 290 - 299.
- [11] Ferreira GC, Dailey HA. Expression of mammalian 5-aminolevulinic acid synthase in *Escherichia coli*. Overproduction, purification, and characterization. *J Biol Chem*, 1993, **268**(1): 584 - 590.
- [12] Volland C, Felix F. Isolation and properties of 5-aminolevulinic acid synthase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem*, 1984, **142**(3): 551 - 557.
- [13] Urban-Grimal D, Volland C, Granier T, *et al.* The nucleotide sequence of the HEM1 gene and evidence for a precursor form of the mitochondrial 5-aminolevulinic acid synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem*, 1986, **156**(3): 511 - 519.
- [14] Oh-hama T. Evolutionary consideration on 5-aminolevulinic acid synthase in nature. *Orig Life Evol Biosph*, 1997, **27**(4): 405 - 412.
- [15] He XL(何晓梅), Zhou J(周静), Fan J(范军), *et al.* Overexpression of 5-aminolevulinic acid synthase from *Saccharomyces cerevisiae* in *Escherichia coli*. *Journal of Anhui Agricultural University*(安徽农业大学学报). 2006, **33**(4): 492 - 495.
- [16] Mauzerall D, Granick S. The occurrence and determination of delta-aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine. *J Biol Chem*, 1956, **219**(1): 435 - 446.
- [17] Bunke A, Schmid H, Burmeister G, *et al.* Validation of a capillary electrophoresis method for determination of 5-aminolevulinic acid and degradation products. *J Chromatogr A*, 2000, **883**(1 - 2): 285 - 290.
- [18] Zavgorodnyaya A, Papenbrock J, Grimm B. Yeast 5-aminolevulinic acid synthase provides additional chlorophyll precursor in transgenic tobacco. *Plant J*, 1997, **12**(1): 169 - 178.