

综述

微生物发酵生产5-氨基乙酰丙酸研究进展

康振^{1,2}, 张俊丽^{1,2}, 杨森^{1,2}, 堵国成^{2,3}, 陈坚^{2,4}

- 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
- 3 江南大学 糖化学与生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122
- 4 江南大学 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122

康振, 张俊丽, 杨森, 等. 微生物发酵生产5-氨基乙酰丙酸研究进展. 生物工程学报, 2013, 29(9): 1214-1222.

Kang Z, Zhang JL, Yang S, et al. Advances in microbial production of 5-aminolevulinic acid. Chin J Biotech, 2013, 29(9): 1214-1222.

摘要: 5-氨基乙酰丙酸是生物体内吡咯生物合成途径的关键中间产物, 具有广泛的应用前景。文中从三方面归纳了国内外关于5-氨基乙酰丙酸的最新研究进展: 生产5-氨基乙酰丙酸的微生物筛选分离与诱变; 基于C₄途径的微生物全细胞生物转化合成5-氨基乙酰丙酸; 基于微生物代谢工程改造构建高产5-氨基乙酰丙酸的工程菌株。最后, 预测了未来5-氨基乙酰丙酸的研究方向和焦点。

关键词: 5-氨基乙酰丙酸, C₄途径, C₅途径, 代谢工程, 大肠杆菌

Advances in microbial production of 5-aminolevulinic acid

Zhen Kang^{1,2}, Junli Zhang^{1,2}, Sen Yang^{1,2}, Guocheng Du^{2,3}, and Jian Chen^{2,4}

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

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

3 Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

4 National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: 5-aminolevulinic acid is the key intermediate of the tetrapyrrole biosynthesis pathway in organisms and has broad application potentials. This review summarized and discussed recent progress in microbial production of 5-aminolevulinic acid, including screening, isolation and mutation of microbes to produce 5-aminolevulinic acid; microbial

Received: April 7, 2013; **Accepted:** May 17, 2013

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 31200020, 31000054), Jiangsu Planned Projects for Postdoctoral Research Funds (No. 1101053C).

Corresponding author: Jian Chen. Tel: +86-510-85329031; Fax: +86-510-85918309; E-mail: jchen@jiangnan.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 31200020, 31000054), 江苏省博士后科研资助计划项目 (No. 1101053C) 资助。

whole-cell transformation to synthesize 5-aminolevulinic acid depending on the C₄ pathway; construction of high-yield 5-aminolevulinic acid producing strains by metabolic engineering. Finally, future research directions in microbial production of 5-aminolevulinic acid were addressed.

Keywords: 5-aminolevulinic acid, C₄ pathway, C₅ pathway, metabolic engineering, *Escherichia coli*

5-氨基乙酰丙酸 (5-aminolevulinic acid, 5-ALA) 是一种非蛋白类的 5 碳氨基酸, 广泛存在于细菌、真菌、植物以及动物中。在生物体内, 5-ALA 是合成吡咯类化合物 (如血红素、细胞色素、叶绿素以及维生素 B₁₂) 的关键中间代谢产物。近年来, 5-ALA 作为一种安全、选择、渗透性好的光动力学药物在医学领域引起广泛关注。目前, 5-ALA 已经应用于诸多癌症 (如皮肤癌、膀胱癌、消化道癌及肺癌等) 的诊断与光动力治疗 (PDT) 中^[1]。此外, 由于 5-ALA 在环境中易降解, 无残留, 对哺乳动物无毒性, 因此, 5-ALA 在农业上具有重要的应用前景 (如作为一种无公害的绿色农药、除草剂以及植物生长调节剂)^[1-2]。

目前, 5-ALA 主要通过化学法合成^[3], 然而由于化学合成反应步骤多、副产物多、分离提纯难、5-ALA 的得率低以及环境污染严重等问题, 生物法合成 5-ALA 成为未来研究发展的趋势^[1]。自然界中, 5-ALA 的合成存在两条途径^[1], 一条是 C₄ 途径 (因 4 碳的琥珀酸而得名^[4]), 另一条是 C₅ 途径 (因 5 碳的谷氨酸而得名^[5])。前者较为简单, 由 5-氨基乙酰丙酸合酶 (5-aminolevulinic acid synthase, ALAS) 催化琥珀酰 CoA 和甘氨酸生成 5-ALA, 该途径主要存在于光合细菌 (如紫细菌属等)、真菌以及动物体中; 后者由谷氨酸起始经过三步酶促反应生成 5-ALA^[1], 该途径广泛存在于植物、藻类以及细菌中 (如肠杆菌属等)。随着基因重组技术、代

谢工程以及合成生物学的发展, 构建性状优良的微生物工程菌株从而实现 5-ALA 的微生物法合成已经成为现实。

1 自然界 5-氨基乙酰丙酸生产微生物的筛选、诱变以及培养优化

早期, 微生物合成 5-ALA 的相关研究主要集中于从自然界中筛选 5-ALA 的生产菌株。1970 年, Beale 等^[6]筛选到一株小球藻 *Chlorella vulgaris*, 研究发现 *C. vulgaris* 可以利用 CO₂ 积累 5-ALA, 随后其他不同小球藻也被报道具有合成积累 5-ALA 的能力^[7-8]。然而, 由于微藻类积累 5-ALA 的浓度及应用价值较低, 后来筛选工作主要集中于从自然界中筛选生产 5-ALA 的光合细菌。1987 年, Sasaki 等^[9]筛选到一株类球红细菌 *Rhodobacter sphaeroides*, 通过人为添加 5-ALA 的两个前体物琥珀酸和甘氨酸, 5-ALA 积累到 2.0 mmol/L, 随后进一步添加乙酸和丙酸, 5-ALA 产量提高至 4.2 mmol/L^[10] (表 1)。在获得优良的母本菌株后, 为进一步提高 *R. sphaeroides* 菌株的生产性能, 研究者采用亚硝基胍 (1-methyl-3-nitro-1-nitroso-guanidin) 等诱变剂对菌株 *R. sphaeroides* 进行多轮诱变, 5-ALA 的产量得到显著提高^[1] (表 1)。

在生物体内, 5-ALA 可以通过 5-ALA 脱水酶 (HemB, 由 *hemB* 基因编码) 的催化转化为胆色素原 (Porphobilinogen)。研究发现乙酰丙酸

(Levulinic acid) 是 5-ALA 脱水酶的竞争性抑制剂, 因此, 人为添加适量的乙酰丙酸抑制 5-ALA 脱水酶的活性以积累 5-ALA 成为发酵优化中的一个策略^[11]。另一方面, 通过优化培养条件, 突变菌株 *R. sphaeroides* CR720 积累 5-ALA 达到 27.5 mmol/L^[12]。但由于光合细菌发酵周期长、且发酵过程需要光照, 使得发酵成本高, 因而不适合大规模工业化发酵生产。

2 微生物全细胞催化合成 5-氨基乙酰丙酸

随着生物技术的发展, 采用模式微生物表达异源蛋白基因, 实现酶的活性表达或者构建新的代谢途径已经获得飞速发展。大肠杆菌 *Escherichia coli* 这一模式微生物由于其诸多优点 (如遗传背景清晰、遗传操作工具完善、操作简单、营养要求简单等) 而受到研究者的青睐。1993 年, Neidle 等^[13-14]从 *R. sphaeroides* 菌株中成功克隆编码 ALAS 的两个同工酶基因 *hemA* 和 *hemT*。研究发现, 在 *R. sphaeroides* 菌株中, *hemA* 基因发挥主要功能。随后, van der Werf 等^[15]成功将来源于 *R. sphaeroides* 菌株中的 *hemA* 基因克隆至 *E. coli*, 实现了 *hemA* 基因的活性表达以及 5-ALA 的异源生物转化。通过 ALAS 的酶学性质研究以及添加 5-ALA 前体物甘氨酸、琥珀酸以及 ATP, 5-ALA 产量提高到 22.0 mmol/L (表 1)。

在基于 C₄ 途径的全细胞催化中 (图 1), ALAS 发挥着最重要的作用, 提高 ALAS 的活力是实现 5-ALA 高产的关键。2003 年, Xie 等^[16]

考察了初始琥珀酸和葡萄糖浓度以及 IPTG 诱导浓度对来源于 *R. sphaeroides* 菌株的 *hemA* 基因编码的 ALAS 的酶活力的影响, 并且通过优化培养实现 ALAS 的最大活力, 5-ALA 产量提高至 39.0 mmol/L (表 1)。基于提高 ALAS 的表达及活力, Fu 等将来源于 *R. sphaeroides* 的 *hemA* 基因克隆至依赖于 T7 聚合酶的表达系统, 并分析了 *E. coli* BL21(DE3) 和 Rosetta (DE3) (可优化表达稀有密码子的菌株) 的表达差异。研究发现, *hemA* 基因在 Rosetta (DE3) 菌株中实现了更好的表达, 5-ALA 产量提高至 29.0 mmol/L^[17] (表 1)。同时, 不同课题组分别从大豆根瘤菌 *Bradyrhizobium japonicum*^[18-19]、放射形土壤杆菌 *Agrobacterium radiobacter*^[20-22]、沼泽红假单胞菌 *Rhodospseudomonas palustris*^[23] 菌株中克隆 *hemA* 基因并在 *E. coli* 中进行表达分析 (表 1)。研究表明, 不同来源的 ALAS 在 *E. coli* 中的活性差异较大。Shin 等^[24]发现通过共表达依赖于 NADPH 的苹果酸酶基因 *maeB*, ALAS 的活性得到显著提高, 最终引起 5-ALA 的高效积累, 这表明 5-ALA 的合成可能与细胞内的氧化还原电势具有密切的关系。

在生物体内, 5-ALA 的合成是吡咯类化合物合成的限速步骤, 它的合成受到严格的调控 (ALAS 受血红素的反馈抑制)。基于此, 最近 Zhang 等^[25]从 *R. palustris* 中克隆了 ALAS 的两个同工酶基因 *hemA* 和 *hemO*, 研究发现由 *hemO* 基因编码的 ALAS 具有较高的抗反馈抑制能力 (hemin), 最终通过表达基因 *hemO*, 5-ALA 产量达到 48.1 mmol/L (表 1)。

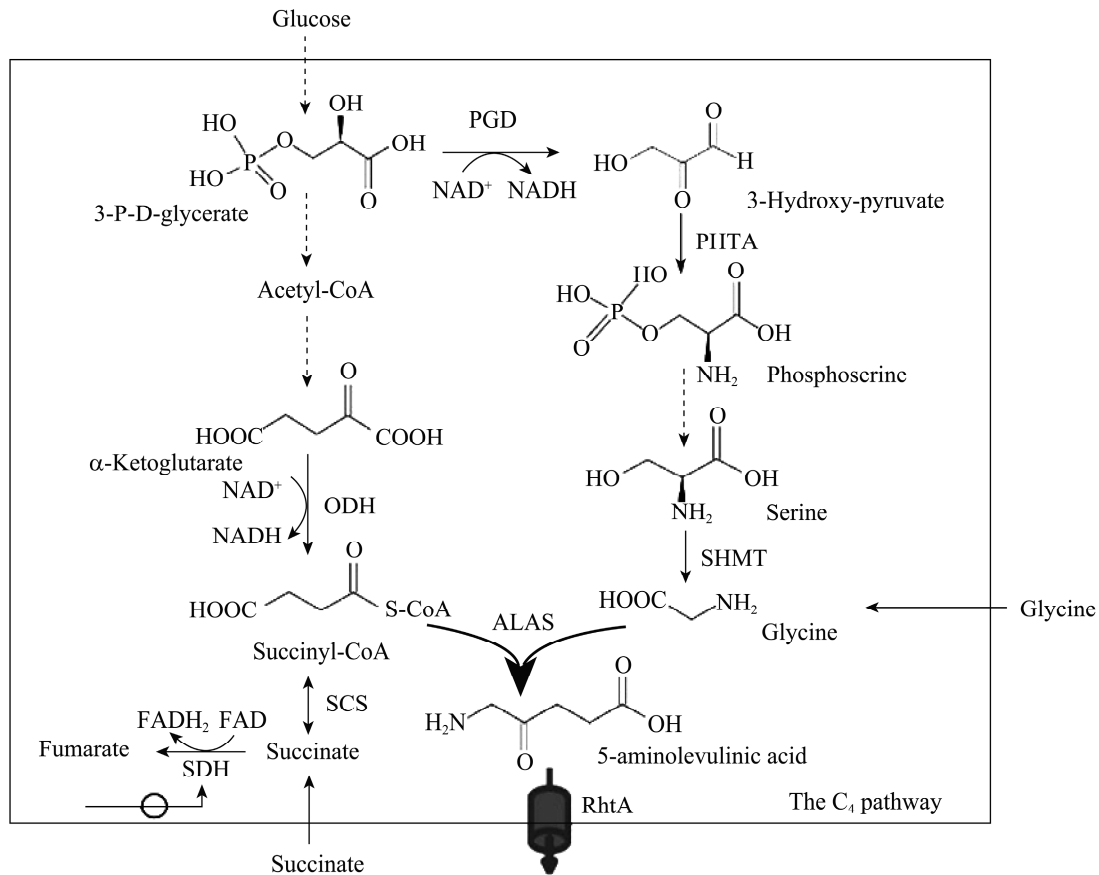


图 1 大肠杆菌中重组 5-氨基乙酰丙酸 C₄ 合成途径

Fig. 1 Recombinant C₄ pathway engineered for 5-aminolevulinic acid biosynthesis in *E. coli*. PGD: 3-phosphoglycerate dehydrogenase; ODH: 2-oxoglutarate dehydrogenase; SCS: succinyl-CoA synthetase; SDH: succinate dehydrogenase; PHTA: phosphoserine aminotransferase; SHMT: serine hydroxymethyltransferase; ALAS: 5-aminolevulinic acid synthase. The bold line means the genes need to be overexpressed for increasing ALA production. \ominus indicates the reaction needs to be blocked. During biotransformation, glucose, succinate and glycine as substrates were added.

此外，研究发现甘氨酸对细胞有一定的毒性，当甘氨酸浓度大于 23.0 mmol/L 时，菌体生长受到显著抑制^[15]。另外，最近研究表明，葡萄糖以及木糖对 5-ALA 脱水酶的活性均有一定的抑制作用^[22]。因此，为进一步提高 5-ALA 的产量，发酵过程优化控制显得尤为重要。Fu 等^[26]通过控制流加发酵液的 pH，5-ALA 产量提高至 50.4 mmol/L (表 1)。随后，Lin 等^[27]通过优化发

酵碳源以及控制发酵 pH，5-ALA 产量提高至 56.0 mmol/L (表 1)。

3 代谢工程改造微生物合成 5-氨基乙酰丙酸

目前，基于 C₄ 途径的全细胞生物转化合成 5-ALA 得到了长足发展。但研究报道中所用培养基多为营养丰富、实验室用的 LB 培养基，不

利于 5-ALA 的工业化生产。同时, 甘氨酸对菌体的生长抑制作用使得发酵工艺相对复杂。因此, 构建直接发酵葡萄糖生产 5-ALA 的微生物菌株具有更大优势。近年来, 代谢工程作为一个强大的工具已经成功应用于微生物代谢的调控及工程菌株的构建中^[28]。

最近, Kang 等^[29]将来源于 *R. sphaeroides* 编码 ALAS 的基因 *hemA* 分别克隆至野生型的 *E. coli* MG1655 菌株以及好氧琥珀酸发酵菌株 *E. coli* QZ1111^[30]中, 并进行比较分析。研究发现, 野生型的 *E. coli* 在表达 ALAS 后, 以葡萄糖 (111.1 mmol/L) 为唯一碳源积累 5-ALA 至 0.6 mmol/L。而相同条件下好氧琥珀酸发酵菌株中 5-ALA 产量为 3.3 mmol/L (表 1)。以上研究结果表明, 通过对 5-ALA 的 C₄ 相关途径改造

(图 1), 可以实现一步法发酵葡萄糖生产 5-ALA。此外, 通过对表达 *hemA* 的好氧琥珀酸发酵菌株的代谢产物分析发现, 琥珀酸由于过量而分泌到胞外。以上结果表明, 为提高 5-ALA 的高效合成, 通过进一步代谢途径改造实现甘氨酸的积累是非常必要的, 如解除丝氨酸对 3-磷酸甘油酸脱氢酶的反馈抑制 (图 1)。

此外, Kang 等^[31]首次通过改造 *E. coli* 5-ALA 的 C₅ 途径 (图 2), 实现了在无机盐培养基中一步发酵葡萄糖生产 5-ALA 的设想。

通过研究发现, 由 *hemA* 基因编码的谷氨酰-tRNA 还原酶以及由 *hemL* 基因编码的谷氨酸-1 半醛氨基转移酶是 C₅ 途径的限速酶, 二者存在协同作用。通过单独表达 *hemA* 突变体基因以及共表达 *hemA* 突变体基因和 *hemL* 基因, 5-ALA

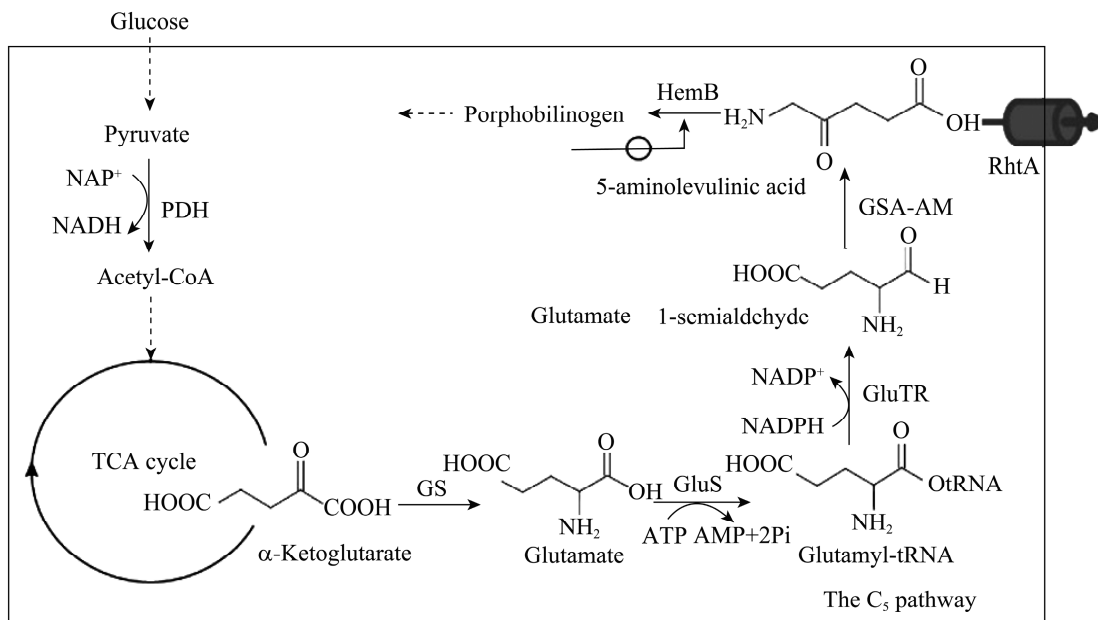


图 2 大肠杆菌中重组 5-氨基乙酰丙酸 C₅ 合成途径^[31]

Fig. 2 Recombinant C₅ pathway engineered for 5-aminolevulinic acid biosynthesis in *E. coli*^[31]. PDH: pyruvate dehydrogenase; GS: glutamate dehydrogenase; GluS: glutamyl-tRNA synthetase; GluTR: glutamyl-tRNA reductase; GSA-AM: glutamate-1-semialdehyde aminotransferase.

产量分别提高了 5.7 倍 (1.3 mmol/L) 和 66 倍 (15.5 mmol/L) (对照菌株为转化空载体的野生型 *E. coli*)。同时发现, 由 *gltX* 基因编码的谷氨酰-tRNA 合成酶对 C₅ 途径中的编码 5-ALA 脱水酶的 *hemB* 基因存在上调作用。

在 *E. coli* 中, 许多潜在的氨基酸转运蛋白已经被鉴定出来^[32], 并成功应用于氨基酸的发酵生产^[33]。因此, 为加速 5-ALA 的胞外分泌, 研究者对 5-ALA 相关潜在的运输蛋白载体 YeaS^[34] (亮氨酸胞外转运蛋白, 由 *yeaS* 基因编

表 1 微生物发酵生产 5-氨基乙酰丙酸

Table 1 Microbial production of 5-aminolevulinic acid

Strains and plasmids	Substrates	ALA (mmol/L)	Reference
Algae			
<i>Chlorella vulgaris</i>	CO ₂	1.4	[6]
<i>Chlorella</i> sp.	Glucose, glycine	2.0	[7]
<i>Chlorella regularis</i>	Glucose, glycine	3.7	[8]
Photosynthetic bacteria			
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Succinate, glycine	2.0	[9]
<i>R. sphaeroides</i>	Acetate, glycine, propionate	4.2	[10]
<i>R. sphaeroides</i>	Succinate, glycine	16.0	[1]
<i>R. sphaeroides</i>	Glucose, glycine, LA	20.0	[11]
<i>R. sphaeroides</i> CR720	Glucose, glycine	27.5	[12]
Escherichia coli			
BL21(DE3) (<i>hemA</i> ◆)	Succinate, glycine, levulinic acid	20.0	[18]
DH1 (<i>hemA</i> ※)	Succinate, glycine, ATP	22.0	[15]
BL21(DE3) (<i>hemA</i> ◆)	Succinate, glycine	23.0	[19]
BL21(DE3) (<i>hemA</i> ▲)	Succinate, glucose, glycine, levulinic acid	23.1	[20]
BL21(DE3)(<i>hemA</i> ▲)	Succinate, glycine, glucose	23.7	[21]
Rosetta (DE3) (<i>hemA</i> ※)	Succinate, glycine, glucose	29.0	[17]
MG1655 (<i>hemA</i> ※)	Succinate, glycine	39.0	[16]
BL21(<i>hemA</i> ☆)	Succinate, glycine, glucose	39.3	[23]
MG1655 (<i>hemA</i> ☆)	Succinate, glycine, glucose	43.6	[25]
MG1655 (<i>hemO</i> ☆)	Succinate, glycine, glucose	48.1	[25]
Rosetta(DE3) (<i>hemA</i> ▲)	Succinate, glycine, glucose	50.0	[22]
Rosetta (DE3) (<i>hemA</i> ※)	Succinate, glycine, glucose	50.4	[26]
Rosetta(DE3) (<i>hemA</i> ▲)	Succinate, glycine, glucose, xylose	56.0	[27]
QZ1111(<i>hemA</i> ※)	Glucose	3.3	[29]
DH5α (<i>hemA</i> ^M , <i>hemL</i> and <i>rhtA</i>)	Glucose	31.5	[31]

Strain QZ1111 was the MG1655 derivate with five mutations^[30]. Gene *hemA* resources: ◆, *Bradyrhizobium japonicum*; ▲, *Agrobacterium radiobacter*; ☆, *Rhodopseudomonas palustris*; ※, *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1.

码) 以及 RhtA^[35] (苏氨酸和高丝氨酸胞外转运蛋白, 由 *rhtA* 基因编码) 进行了分析, 研究发现 RhtA 转运蛋白对 5-ALA 具有较强的运输能力, 通过共表达 *rhtA* 基因, 胞外 5-ALA 的产量提高了约 46% (22.6 mmol/L) (对照菌株是共表达 *hemA* 突变体和 *hemL* 的 *E. coli*)。最终, 在优化发酵培养基 (严格控制 Fe²⁺ 浓度) 的基础上通过分批发酵, 5-ALA 浓度最终为 31.5 mmol/L (表 1) (5-ALA/葡萄糖转化率为 16.8%)^[31]。

4 展望

在过去几年里, 5-ALA 的微生物合成取得了巨大进步, 实现微生物高效合成 5-ALA 已经成为现实。基于实现 5-ALA 的微生物法工业化生产, 相关研究将主要集中于以下几个方面:

1) 全细胞生物转化法合成 5-ALA: 在该过程中, ALAS 的高活力以及抗血红素的反馈抑制是提高 5-ALA 合成的关键。以往研究多集中于从自然界不同宿主中调取 ALAS 的同工酶基因, 并对其分析比较。随着酶工程的发展, 理性改造技术 (借助于生物信息学以及结构生物学的定点突变以及饱和迭代突变等^[36]) 以及非理性改造技术 (借助 error-prone PCR、DNA shuffling 等^[37]) 已经广泛应用于酶分子改造。因此, 借助以上技术实现 ALAS 的分子改造已成为可能。另外, 加速 5-ALA 的胞外运输也是研究的一个方向。2) 代谢工程改造微生物实现葡萄糖一步发酵合成 5-ALA: 目前, 基于对 C₄ 途径和 C₅ 途径的改造, 在无机盐培养基中一步发酵葡萄糖合成 5-ALA 已经成为现实。但由于生物体内 5-ALA 的合成调控极其复杂, 为进一步提高 5-ALA 的合成效率, 未来相关研究可借助系统生物学手段^[38]从基

因组水平对 5-ALA 的合成途径进行系统分析, 同时利用合成生物学等调控元件和策略^[39-40]实现 5-ALA 合成途径中的关键基因的精细调控表达^[41]以及对工程菌株发酵过程各参数的系统优化, 最终实现以葡萄糖为碳源高效合成 5-ALA 的工业化生产。

REFERENCES

- [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] Edwards S, Jackson D, Reynoldson J, et al. Neuropharmacology of delta-aminolaevulinic acid. II. Effect of chronic administration in mice. *Neurosci Lett*, 1984, 50(1/3): 169–173.
- [3] Miyachi N, Tanaka T, Nishikawa S, et al. Preparation and chemical properties of 5-aminolevulinic acid and its derivatives. *Porphyria*, 1998, 7(2/3): 342–347.
- [4] Burnham BF. δ -Aminolevulinic acid synthase (*Rhodospseudomonas sphaeroides*). *Methods Enzymol*, 1970, 17A: 195–204.
- [5] Schön A, Krupp G, Gough S, et al. The RNA required in the first step of chlorophyll biosynthesis is a chloroplast glutamate tRNA. *Nature*, 1986, 322(6076): 281–284.
- [6] Beale SI. The biosynthesis of δ -aminolevulinic acid in *Chlorella*. *Plant Physiol*, 1970, 45(4): 504–506.
- [7] Sasaki K, Watanabe K, Tanaka T, et al. 5-Aminolevulinic acid production by *Chlorella* sp. during heterotrophic cultivation in the dark. *World J Microbiol Biotechnol*, 1995, 11(3): 361–362.
- [8] 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.
- [9] Sasaki K, Ikeda S, Nishizawa Y, et al. Production of 5-aminolevulinic acid by photosynthetic

- bacteria. *J Ferment Technol*, 1987, 65(5): 511–515.
- [10] Sasaki K, Tanaka T, Nishizawa Y, et al. Production of a herbicide, 5-aminolevulinic acid, by *Rhodobacter sphaeroides* using the effluent of swine waste from an anaerobic digester. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1990, 32(6): 727–731.
- [11] 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.
- [12] Kamiyama H, Hotta Y, Tanaka T, et al. Production of 5-aminolevulinic acid by a mutant strain of a Photosynthetic bacterium. *J Biosci Bioeng*, 2000, 78(2): 48–55.
- [13] Neidle EL, Kaplan S. 5-Aminolevulinic acid availability and control of spectral complex formation in HemA and HemT mutants of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol*, 1993, 175(8): 2304–2313.
- [14] Neidle EL, Kaplan S. Expression of the *Rhodobacter sphaeroides hemA* and *hemT* genes, encoding two 5-aminolevulinic acid synthase isozymes. *J Bacteriol*, 1993, 175(8): 2292–2303.
- [15] van der 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.
- [16] Xie L, Hall D, Eiteman MA, et al. Optimization of recombinant aminolevulinic acid synthase production in *Escherichia coli* using factorial design. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, 63(3): 267–273.
- [17] Fu WQ, Lin JP, Cen PL. 5-Aminolevulinic acid production with recombinant *Escherichia coli* using a rare codon optimizer host strain. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 75(4): 777–782.
- [18] Choi C, Hong BS, Sung HC, et al. Optimization of extracellular 5-aminolevulinic acid production from *Escherichia coli* transformed with ALA synthase gene of *Bradyrhizobium japonicum*. *Biotechnol Lett*, 1999, 21(6): 551–554.
- [19] 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.
- [20] Qin G, Lin J, Liu X, et al. Effects of medium composition on production of 5-aminolevulinic acid by recombinant *Escherichia coli*. *J Biosci Bioeng*, 2006, 102(4): 316–322.
- [21] Liu XX, Wang L, Wang YJ, et al. D-glucose enhanced 5-aminolevulinic acid production in recombinant *Escherichia coli* culture. *Appl Biochem Biotechnol*, 2010, 160(3): 822–830.
- [22] Fu WQ, Lin JP, Cen PL. Expression of a hemA gene from *Agrobacterium radiobacter* in a rare codon optimizing *Escherichia coli* for improving 5-aminolevulinic acid production. *Appl Biochem Biotechnol*, 2010, 160(2): 456–466.
- [23] Choi HP, Lee YM, Yun CW, et al. Extracellular 5-aminolevulinic acid production by *Escherichia coli* containing the *Rhodospirillum rubrum palustris* KUGB306 *hemA* gene. *J Microbiol Biotechnol*, 2008, 18(6): 1136–1140.
- [24] Shin JA, Kwon YD, Kwon OH, et al. 5-aminolevulinic acid biosynthesis in *Escherichia coli* coexpressing NADP-dependent malic enzyme and 5-aminolevulinic acid synthase. *J Microbiol Biotechnol*, 2007, 17(9): 1579–1584.
- [25] Zhang L, Chen J, Chen N, et al. Cloning of two 5-aminolevulinic acid synthase isozymes HemA and HemO from *Rhodospirillum rubrum palustris* with favorable characteristics for 5-aminolevulinic acid production. *Biotechnol Lett*, 2013, 35(5): 763–768.
- [26] Fu WQ, Lin JP, Cen PL. Enhancement of 5-aminolevulinic acid production with recombinant *Escherichia coli* using batch and fed-batch culture system. *Bioresour Technol*, 2008, 99(11): 4864–4870.
- [27] Lin JP, Fu WQ, Cen PL. Characterization of 5-aminolevulinic acid synthase from *Agrobacterium radiobacter*, screening new inhibitors for 5-aminolevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli* and their potential use for high 5-aminolevulinic acid production. *Bioresour Technol*,

- 2009, 100(7): 2293–2297.
- [28] Stephanopoulos G. Metabolic fluxes and metabolic engineering. *Metab Eng*, 1999, 1(1): 1–11.
- [29] Kang Z, Wang Y, Wang Q, et al. Metabolic engineering to improve 5-aminolevulinic acid production. *Bioeng Bugs*, 2011, 2(6): 342–345.
- [30] Kang Z, Geng YP, Zhang YY, et al. Construction of engineered *Escherichia coli* for aerobic succinate production. *Chin J Biotech*, 2008, 24(12): 2081–2085 (in Chinese).
康振, 耿艳平, 张园园, 等. 好氧发酵生产琥珀酸工程菌株的构建. *生物工程学报*, 2008, 24(12): 2081–2085.
- [31] Kang Z, Wang Y, Gu P, et al. Engineering *Escherichia coli* for efficient production of 5-aminolevulinic acid from glucose. *Metab Eng*, 2011, 13(5): 492–498.
- [32] Burkovski A, Krämer R. Bacterial amino acid transport proteins: occurrence, functions, and significance for biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 58(3): 265–274.
- [33] Park JH, Lee SY. Fermentative production of branched chain amino acids: a focus on metabolic engineering. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 85(3): 491–506.
- [34] Kutukova EA, Livshits VA, Altman IP, et al. The *yeaS* (*leuE*) gene of *Escherichia coli* encodes an exporter of leucine, and the Lrp protein regulates its expression. *FEBS Lett*, 2005, 579(21): 4629–34.
- [35] Livshits VA, Zakataeva NP, Aleshin VV, et al. Identification and characterization of the new gene *rhtA* involved in threonine and homoserine efflux in *Escherichia coli*. *Res Microbiol*, 2003, 154(2): 123–135.
- [36] Reetz MT, Carballeira JD. Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes. *Nat Protoc*, 2007, 2(4): 891–903.
- [37] Cole MF, Cox VE, Gratton KL, et al. Reconstructing evolutionary adaptive paths for protein engineering. *Methods Mol Biol*, 2013, 978: 115–125.
- [38] Lee SY, Mattanovich D, Villaverde A. Systems metabolic engineering, industrial biotechnology and microbial cell factories. *Microb Cell Fact*, 2012, 11: 156–158.
- [39] Nielsen J, Pronk JT. Metabolic engineering, synthetic biology and systems biology. *FEMS Yeast Res*, 2012, 12(2): 103.
- [40] Nielsen J, Keasling JD. Synergies between synthetic biology and metabolic engineering. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(8): 693–695.
- [41] Dueber JE, Wu GC, Malmirchegini GR, et al. Synthetic protein scaffolds provide modular control over metabolic flux. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(8): 753–759.

(本文责编 陈宏宇)