

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2021-010

5-氨基乙酰丙酸生物合成技术的发展及展望

陈久洲, 王钰, 蒲伟, 郑平, 孙际宾

(中国科学院天津工业生物技术研究所, 中国科学院系统微生物工程重点实验室, 天津 300308)

摘要: 5-氨基乙酰丙酸 (5-ALA) 是生物体内天然存在的一种功能性非蛋白质氨基酸, 在医药保健和农牧领域具有重要的应用价值。尽管化学合成技术率先打通了5-ALA的制备路线, 但工艺的复杂性和高成本问题, 限制了其生产规模和应用推广。随着生物技术的兴起, 生物合成作为一种绿色替代技术成为解决上述问题的突破口。本文回顾了近50年来5-ALA生物合成技术的发展历程, 综述了5-ALA生物合成的3种主要策略, 即天然菌株诱变筛选、利用重组外源C₄途径的工程菌株催化合成以及基于代谢工程的高效细胞工厂构建, 总结了每种策略的技术特点和主要问题, 重点介绍了代谢工程改造策略和合成生物技术在5-ALA微生物细胞工厂开发中的应用和研究进展。在此基础上, 本文进一步分析了限制5-ALA生物合成的瓶颈, 阐述了血红素合成代谢的复杂调控作用和多底物的协同供给在5-ALA生物合成中的重要作用, 并从新靶点、新底盘和新技术策略的角度, 对合成生物学时代5-ALA生物合成技术未来的发展进行了展望。

关键词: 5-氨基乙酰丙酸; 生物合成; 代谢工程; 合成生物学; 微生物细胞工厂

中图分类号: Q81 文献标志码: A

Advances and perspective on bioproduction of 5-aminolevulinic acid

CHEN Jiuzhou, WANG Yu, PU Wei, ZHENG Ping, SUN Jibin

(Key Laboratory of Systems Microbial Biotechnology, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China)

Abstract: As a functional non-proteinogenic amino acid, 5-aminolevulinic acid (5-ALA) is naturally synthesized by microbes, plants, and animals. It is a precursor for biosynthesis of tetrapyrrole compounds, such as heme, porphyrin, chlorophyll, and vitamin B₁₂. Because of the critical roles of tetrapyrrole compounds in cellular metabolism, 5-ALA has gained increasing attention in the fields of medicine, health care, agriculture, and animal husbandry. Methods for chemical synthesis of 5-ALA have been established for decades and are the primary routes for industrial production of 5-ALA. However, the high complexity and relatively low yield of the synthesis process lead to the high price of 5-ALA, which seriously limits the production scale and its widespread applications, especially in the fields of agriculture and animal feed. As an alternative technology, bioproduction of 5-ALA from renewable resources holds

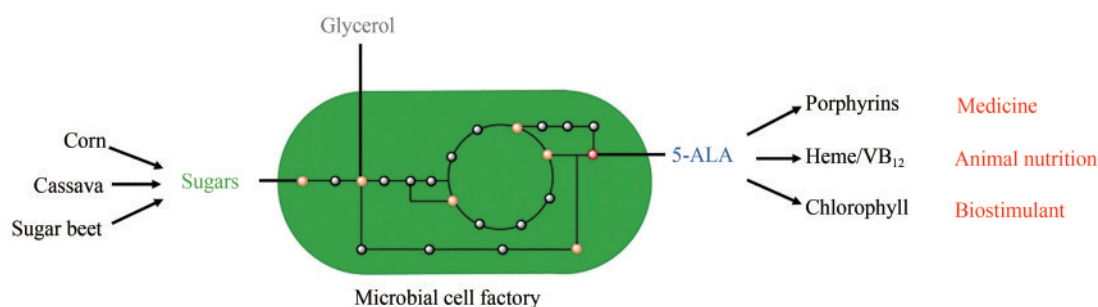
收稿日期: 2021-01-24 修回日期: 2021-03-30

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFA0901400); 国家自然科学基金 (32000023)。

引用本文: 陈久洲, 王钰, 蒲伟, 郑平, 孙际宾. 5-氨基乙酰丙酸生物合成技术的发展及展望[J]. 合成生物学, 2021, 2(6): 1000-1016

Citation: CHEN Jiuzhou, WANG Yu, PU Wei, ZHENG Ping, SUN Jibin. Advances and perspective on bioproduction of 5-aminolevulinic acid[J]. Synthetic Biology Journal, 2021, 2(6): 1000-1016

great promise to simplify the production process and lower the production cost, and thus has received increasing attentions worldwide. Although some algae and photosynthetic bacteria are capable of synthesizing 5-ALA naturally, the production levels cannot meet the requirement of industrialization and commercialization. Moreover, these microorganisms are usually difficult to engineer due to lack of advanced genome editing tools. With the development of systems biology and synthetic biology approaches, intensive studies have focused on engineering platform microorganisms such as *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for 5-ALA bioproduction. Despite many successes in engineering synthetic 5-ALA producing strains, challenges remain in improving the production indices (titer, yield, and productivity) to levels as high as those for some proteinogenic amino acids, such as lysine and glutamate. In this paper, we review the development history of 5-ALA bioproduction technologies in the last half century and summarize the three key strategies for strain development and improvement, including mutagenesis and screening of natural strains, production by *Escherichia coli* expressing heterogenous 5-aminolevulinic acid synthases, and microbial cell factories constructed by metabolic engineering strategies. Recent advances on engineering synthetic 5-ALA producers using metabolic engineering and synthetic biotechnology are focused in this review. Furthermore, the bottlenecks of 5-ALA biosynthesis, such as the complex regulation of heme biosynthesis and the combined supply of multiple substrates, are also discussed in this review. Finally, the future development of 5-ALA biosynthesis technology in the era of synthetic biology is prospected from the perspectives of new gene targets, more suitable platform microorganisms and novel technical strategies.



Keywords: 5-aminolevulinic acid; biosynthesis; metabolic engineering; synthetic biology; microbial cell factory

5-氨基乙酰丙酸 (5-aminolevulinic acid, 5-ALA) 是一种非蛋白质氨基酸, 在生命中广泛存在, 是血红素、叶绿素、维生素 B₁₂ 等四吡咯化合物生物合成的必需前体。由于在生物体内所处的关键代谢节点及其下游代谢物的重要生理功能, 5-ALA 在医药、保健、动物健康和植物营养等方面具有重要的应用价值和广阔的应用前景^[1]。作为第二代光敏剂, 5-ALA 从 20 世纪 90 年代就开始用于皮肤类疾病的光动力学治疗以及癌症的光动力学诊断和辅助切除^[2-3]。基于血红素和维生素 B₁₂ 在动物能量和物质代谢中的重要作用, 外源补充 5-ALA 可以促进人体和畜禽的新陈代谢, 增强机体活力和免疫力^[4]。由于具有生物可降解和无毒无残留

的特性, 5-ALA 还被用作绿色安全的植物生长调节剂, 用于促进作物在逆境条件下的生长以及果实着色等^[5]。广阔的应用前景也吸引了研究人员不断尝试开发并改进 5-ALA 的合成技术。目前, 5-ALA 主要通过化学合成法生产, 然而化学合成工艺的高复杂性和高污染限制了其工业化生产的规模, 目前国内甚至没有企业能够一次性提供百公斤规模的产品; 多步催化反应以及低产物收率也进一步推高了产品的生产成本, 从而限制了其在各领域中的大规模应用推广^[6]。

生物体内有两条 5-ALA 生物合成途径, 即 C₄ 途径和 C₃ 途径, 分别以琥珀酰辅酶 A 和甘氨酸、谷氨酸为底物, 通过一步或三步酶促反应

合成 5-ALA, 然后再经过多步酶促反应生产血红素等终产物 (图 1)^[7]。血红素是胞内电子传递的载体以及多种酶的辅酶, 对于细胞能量代谢至关重要, 生物体进化出多种调控方式, 以维持胞内血红素的稳态^[8]。由于 5-ALA 是血红素生物合成的必需前体, 其生物合成也受血红素的严紧调控。因此, 尽管 5-ALA 生物合成技术的研究几乎与化学合成技术同时开始, 但早期生物合成技术的水平很低, 无法满足产业化生产的要求。伴随着生物技术的多轮重大变革, 5-ALA 生物合成技术也不断发展, 技术水平得到了显著的提升^[9-14]。5-ALA 生物合成技术替代传统化学合成技术, 降低生产成本, 并在农业和畜牧等领域大规模推广应用已经是大势所趋。本文以技术发展为主线, 综述了 5-ALA 生物合成技术的发展历程, 详细介绍了近年来系统代谢工程和合成生物技术对 5-ALA 生物合成的重要推动作用, 并展望了在合成生物技术时代 5-ALA 的生物合成策略的发展方向。

1 天然菌株诱变筛选

从 20 世纪 70 年代开始, 研究者从自然界中筛选能够天然高产 5-ALA 的微生物, 单细胞的藻类和光合细菌是主要的菌株种类。1970 年, Beale 等^[15] 筛选到一株小球藻 (*Chlorella*), 可以利用 CO₂ 积累 ALA, 开启了 5-ALA 生物合成研究的序幕。1987—1998 年, Sasaki 等^[6, 16-17] 筛选到一株类球红细菌 (*Rhodobacter sphaeroides*), 通过大量发酵条件优化后, 以琥珀酸和甘氨酸为底物合成 5-ALA 的最高产量达到 2.1 g/L。由于胞内严紧调控和自身代谢能力的限制, 自然选育获得的菌种产量普遍较低, 且一般培养过程需要光照, 工艺过程复杂, 对装备要求较高, 产业化生产受限。

为了进一步提升菌种合成能力, 诱变育种技术逐步用于 ALA 高产菌株的筛选。1999—2002 年, Nishikawa 等^[18-19] 对前期自然选育获得的类球红细菌进行连续诱变育种, 最终筛选得到一株高产 ALA 菌株 CR-702, 在好氧和无光条件下发酵 74 h,

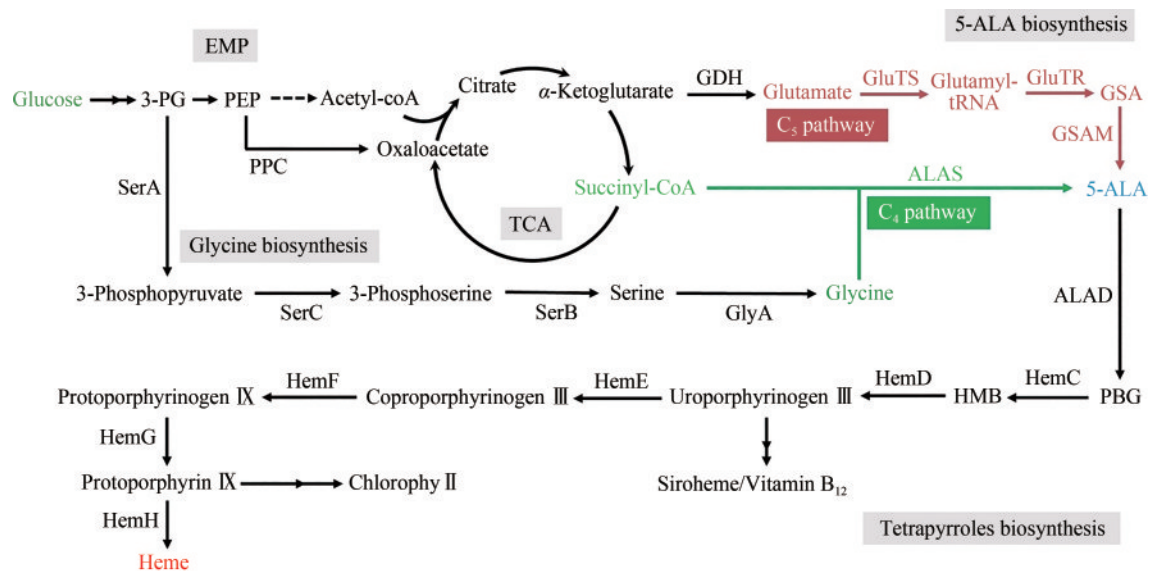


图 1 5-ALA 及四吡咯化合物生物合成途径

Fig. 1 Biosynthesis of 5-ALA and tetrapyrrole compounds

3-PG—3-phosphoglycerate; PEP—phosphoenolpyruvate; GSA—glutamate-1-semialdehyde; 5-ALA—5-aminolevulinic acid; PBG—porphobilinogen; HMB—hydroxymethylbilane; PPC—phosphoenolpyruvate carboxylase; SerA—3-phosphoglycerate dehydrogenase; SerC—phosphoserine aminotransferase; SerB—phosphoserine phosphatase; GlyA—serine hydroxymethyltransferase; GDH—glutamate dehydrogenase; GluTS—glutamyl-tRNA synthetase; GluTR—glutamyl-tRNA reductase; GSAM—glutamate-1-semialdehyde aminotransferase; ALAS—5-aminolevulinate synthase; ALAD—5-aminolevulinic acid dehydratase; HemC—porphobilinogen deaminase; HemD—uroporphyrinogen III synthase; HemE—uroporphyrinogen decarboxylase; HemF—coproporphyrinogen III oxidase; HemG—protoporphyrin oxidase; HemH—ferrochelatase

5-ALA产量达到了7.2 g/L。日本科斯莫石油公司利用上述菌种开发了工业化规模生产工艺,在5 t/a设施中5-ALA产量为10 g/L,并将生产成本降至化学合成法的1/10^[20]。

尽管利用基于天然菌株诱变筛选的生物合成技术已经实现了5-ALA的产业化,但是由于发酵周期较长,技术水平也相对较低,使得5-ALA生产成本仍然较高,难以满足农业和畜牧等低附加值领域的推广应用。此外,诱变育种技术的自身限制也使得5-ALA产量继续提升的难度较大,随着基因工程技术的出现和快速发展,这种传统的微生物育种技术也逐渐被新兴技术所取代。

2 利用重组外源C₄途径的*E. coli*催化合成5-ALA

20世纪90年代以来,随着基因测序和克隆表达技术的快速发展,异源酶在模式微生物中的表达技术日渐成熟。1996年, van der Werf等^[21]首次将来源于类球红细菌的5-ALA合成酶(5-aminolevulinic acid synthase, ALAS)编码基因在大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH1中克隆表达,开创了5-ALA异源生物转化的先河。通过外源添加前体物质琥珀酸和甘氨酸,利用表达异源ALAS的大肠杆菌合成5-ALA,也成为了这一时期5-ALA生物合成的主要研究方向和常用技术手段。由于只涉及一步酶催化反应,ALAS的表达是这一技术策略的核心要素。因此,在之后的近20年间,大量不同来源的ALAS被挖掘以期获得更高的生产水平^[22-28]。其中,浙江大学林建平研究团队^[26, 29-33]通过不同来源ALAS的筛选和表达优化,结合下游代谢抑制剂的添加和溶氧控制等发酵工艺优化,将基因工程菌株生产5-ALA的最高产量提高到了9.4 g/L,而发酵周期只需要22 h。

利用重组外源C₄途径的菌株可以在更短的生产周期内,将5-ALA的产量积累到10 g/L左右,与前一阶段的光合细菌相比具有显著的优势,展现了基因工程菌株的强大竞争力。然而,该技术策略前期只是关注天然酶源的挖掘和过表达,未能从调控层面解决酶受血红素反馈抑制等问题,

导致技术水平难以继续提升。近年来,一些新的策略开始用于上述重组菌株的优化提升。Yu等^[34]利用TrxA融合标签,结合伴侣蛋白GroELS的共表达,提高了可溶性蛋白的比例,5-ALA产量从1.21 g/L提高到了3.67 g/L,进一步优化发酵工艺后5-ALA产量达到了5.66 g/L。针对ALAS的酶学性质,本文作者团队首次关注并挖掘鉴定了新型抗血红素反馈抑制的ALAS——沼泽红假单胞菌(*Rhodopseudomonas palustris*)来源的HemO,在野生型大肠杆菌MG1655中表达后5-ALA产量达到了6.3 g/L,与其他ALAS相比具有明显的优势^[35];进一步解除产物毒性的限制因素以后,5-ALA产量达到了11.5 g/L,突破了长期以来10 g/L左右的产量限制^[36]。

尽管利用重组外源C₄途径的*E. coli*催化合成5-ALA的技术已经取得了一定的研究进展,然而基于该技术的5-ALA产业化生产规模还非常有限,原因主要在于其菌种水平仍然较低,底物琥珀酸和甘氨酸以及乙酰丙酸等下游代谢抑制剂的同时添加也使得该技术成本较高,工业放大稳定性差,难以大规模工业化应用。未来基于蛋白结构的ALAS酶学性质的改造提升或将有助于进一步突破现有技术屏障,实现技术指标的继续提升。

3 基于代谢工程的5-ALA生物合成技术

1991年,代谢工程概念的提出将基因工程技术的发展带入了一个新阶段,在此后的30年间,系统代谢工程技术不断完善,并实现了一大批生物能源和精细化学品的生物合成^[37-38]。代谢工程技术在5-ALA生物合成中的应用起步相对较晚,主要使用的菌种是大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*),特别是大肠杆菌因为遗传背景相对清晰,分子操作手段和工具相对完善,成为该时期分子改造的主力菌种。2007年,Shin等^[39]在引入异源C₄途径的大肠杆菌中共表达苹果酸酶,厌氧条件下通过TCA还原臂以葡萄糖为底物提供琥珀酰辅

酶A, 5-ALA的产量比出发菌株提高了50%, 开创了基于代谢工程的5-ALA生物合成新纪元。系统代谢工程技术强调途径的整合构建以及细胞生理的系统分析和迭代改造, 从细胞整体层面解析产物高产的限制, 提升菌种的发酵性能。

具体到5-ALA高产菌株的构建, 技术层面涵盖了改造提升关键酶、重构优化合成途径、强化前体供给、控制下游代谢、加速产物外排以及整体调控代谢通路等系统代谢工程的常用改造策略, 构建了一系列菌种(表1)。

表1 利用代谢工程改造的大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌合成5-ALA

Tab. 1 Bioproduction of 5-ALA by metabolically engineered *E. coli* and *C. glutamicum*

| Strategies | Strains | Main substrates | Titer /(g/L) | References |
|---|----------------------|---------------------------------|--------------|------------|
| <i>C₄</i> pathway | | | | |
| Overexpression of ALAS from <i>R. sphaeroides</i> and <i>maeB</i> , anaerobic conditions | <i>E. coli</i> | Glucose | 0.05 | [39] |
| Overexpression of ALAS from <i>R. sphaeroides</i> in the succinate production strain QZ1111 | <i>E. coli</i> | Glucose | 0.44 | [40] |
| Overexpression of ALAS from <i>R. palustris</i> ATCC 17001, deletion of <i>sdhAB</i> | <i>E. coli</i> | Glucose, glycine | 6.38 | [41] |
| Moderate overexpression of ALAS from <i>R. palustris</i> ATCC 17001 and native <i>ppc</i> , deletion of <i>pck</i> | <i>E. coli</i> | Glucose, glycine | 4.84 | [42] |
| Overexpression of ALAS from <i>R. palustris</i> ATCC 17001 and native <i>ppc</i> , <i>coaA</i> , addition calcium pantothenate | <i>E. coli</i> | Glucose, glycine | 4.12 | [43] |
| Overexpression of ALAS from <i>R. palustris</i> ATCC 17001 and native <i>ppc</i> , deletion of <i>sdhAB</i> , weakening ALAD by site mutation | <i>E. coli</i> | Glucose, glycine | 7.17 | [44] |
| Overexpression of ALAS from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> controlled via the auto-induced expression approach and the antibiotic-free stabilized plasmid, expressing synthesis pathways of PHB | <i>E. coli</i> | Glucose, succinic acid, glycine | 3.60 | [45] |
| Overexpression of ALAS from <i>R. capsulatus</i> , pathway optimization for CoA and precursor biosynthesis, downregulation of <i>hemB</i> by substituting the start codon ATG to GTG | <i>E. coli</i> | Glucose | 2.81 | [46] |
| Overexpression of ALAS from <i>R. sphaeroides</i> , <i>agxT</i> from <i>Homo sapiens</i> and <i>aceA</i> | <i>E. coli</i> | Glucose | 0.52 | [47] |
| Moderate overexpression of ALAS from <i>R. palustris</i> ATCC 17001 and native <i>ppc</i> and <i>eamA</i> , deletion of <i>aceA</i> | <i>E. coli</i> | Glucose, glycine | 4.47 | [48] |
| Overexpression of ALAS from <i>R. sphaeroides</i> , <i>aceA</i> and <i>agxT</i> from <i>Homo sapiens</i> , downregulation of <i>hemB</i> by synthetic glycine-OFF riboswitches | <i>E. coli</i> | Glucose | 0.24 | [49] |
| Overexpression of ALAS from <i>R. palustris</i> ATCC 17001, reinforcing the antioxidant defense system by expression KatE and SodB | <i>E. coli</i> | Glucose, glycine | 11.5 | [36] |
| Dynamic upregulation of ALAS from <i>R. sphaeroides</i> and dynamic downregulation of <i>hemB</i> by quorum sensing-based dual-function switch | <i>E. coli</i> | Glucose, succinic acid, glycine | 2.50 | [50] |
| Overexpression of ALAS from <i>R. sphaeroides</i> DSM158, deletion of <i>ldhA</i> , <i>sdhA</i> and <i>iclR</i> , downregulation of <i>hemB</i> by CRISPRi, aerobic condition | <i>E. coli</i> | glycerol | 6.93 | [51] |
| Overexpression of ALAS from <i>R. sphaeroides</i> DSM158, deletion of <i>ldhA</i> and <i>sdhA</i> , downregulation of <i>hemB</i> by CRISPRi, microaerobic condition | <i>E. coli</i> | glycerol | 5.95 | |
| Overexpression of ALAS from <i>R. sphaeroides</i> , native <i>ppc</i> and <i>rhtA</i> from <i>E. coli</i> , deletion of <i>ldhA</i> , <i>pqo</i> , <i>cat</i> , <i>pta</i> , <i>ackA</i> and <i>pbp1b</i> | <i>C. glutamicum</i> | Glucose, glycine | 7.53 | [52] |
| Overexpression of ALAS from <i>R. capsulatus</i> SB1003, deletion of <i>sucCD</i> | <i>C. glutamicum</i> | Glucose, glycine | 7.60 | [53] |
| Overexpression of ALAS from <i>R. capsulatus</i> SB1003 and <i>rhtA</i> from <i>E. coli</i> , deletion of <i>sucCD</i> , two-stage fermentation | <i>C. glutamicum</i> | Glucose, glycine | 14.70 | |
| Overexpression of ALAS from <i>R. sphaeroides</i> , <i>serA</i> ^{Δ197} , <i>serB</i> , <i>serC</i> and <i>glyA</i> | <i>C. glutamicum</i> | Glucose, glycine | 3.40 | [54] |
| Moderate overexpression of ALAS from <i>R. palustris</i> ATCC 17001 and native <i>ppc</i> to balance 5-ALA biosynthetic and anaplerotic pathways | <i>C. glutamicum</i> | Glucose, glycine | 16.30 | [55] |

续表

| Strategies | Strains | Main substrates | Titer /(g/L) | References |
|---|----------------------|--------------------------------------|--------------|------------|
| Moderate overexpression of ALAS from <i>R. palustris</i> ATCC 17001 and native <i>ppc</i> to balance 5-ALA biosynthetic and anaplerotic pathways <i>C₅</i> pathway | <i>C. glutamicum</i> | Cassava bagasse hydrolysate, glycine | 18.50 | |
| Overexpression of mutated GluTR from <i>Salmonella arizona</i> , GSAM and RhtA | <i>E. coli</i> | Glucose | 4.13 | [56] |
| Overexpression of mutated GluTR from <i>S. arizona</i> , GSAM, RhtA and RytB | <i>E. coli</i> | Glucose | 1.78 | [57] |
| Overexpression of mutated GluTR from <i>S. arizona</i> , GSAM, HemD and HemF | <i>E. coli</i> | Glucose | 3.25 | [58] |
| Overexpression of mutated GluTR from <i>S. arizona</i> , GSAM, HemD and HemF, optimization of the <i>in vitro</i> iron concentration | <i>E. coli</i> | Glucose | 4.05 | [59] |
| Overexpression of mutated GluTR from <i>Salmonella typhimurium</i> , GSAM and AceA with different promoters, deletion of <i>sucA</i> | <i>E. coli</i> | Glucose | 3.40 | [60] |
| Overexpression of mutated GluTR from <i>S. arizona</i> , GSAM and RhtA in multiplexed PHB operon chromosomally integrated strain | <i>E. coli</i> | Glucose | 3.60 | [61] |
| High gene copy expression of mutated GluTR from <i>S. arizona</i> and GSAM in the chromosome, deletion of <i>recA</i> | <i>E. coli</i> | Glucose | 4.55 | [62] |
| Overexpression of mutated GluTR and GBP from <i>Arabidopsis thaliana</i> in <i>E. coli</i> Transetta (DE3) | <i>E. coli</i> | Glucose, glutamate | 7.64 | [63] |
| Optimization of the <i>C₅</i> pathway with RBS engineering, downregulation of <i>hemB</i> by <i>fliC</i> promoter in the stationary phase, enhancement of the PLP biosynthesis, deletion of <i>recA</i> and <i>endA</i> improved the plasmid stability | <i>E. coli</i> | Glucose | 5.25 | [64] |
| Overexpression of mutated GluTR from <i>S. arizona</i> and GSAM from <i>E. coli</i> | <i>C. glutamicum</i> | Glucose | 1.79 | [65] |
| Overexpression of mutated GluTR from <i>S. typhimurium</i> and GSAM from <i>E. coli</i> | <i>C. glutamicum</i> | Glucose | 2.20 | [66] |
| Overexpression of mutated GluTR from <i>S. typhimurium</i> , GSAM and RhtA from <i>E. coli</i> , deletion <i>ncg11221</i> , <i>putP</i> and <i>lysE</i> , downregulation of <i>hemB</i> by a relatively weak RBS replacement | <i>C. glutamicum</i> | Glucose | 0.90 | [67] |
| Overexpression of mutated GluTR from <i>S. typhimurium</i> , GSAM and RhtA from <i>E. coli</i> , OdhI (T14A/T15A), addition ethambutol | <i>C. glutamicum</i> | Glucose | 2.90 | [63] |
| Overexpression of mutated GluTR from <i>S. arizona</i> and GSAM from <i>E. coli</i> , PPC, GltA, PckA, GapA, Cgl0788 and Cgl0789, downregulation of <i>odhA</i> by growth-regulated promoter P_{CP_2836} , dynamic upregulation of <i>rhtA</i> by the two-component system HrrSA | <i>C. glutamicum</i> | Glucose | 3.16 | [68] |

3.1 5-ALA合成途径关键酶的性能提升

合成途径的关键酶具有良好的酶学性质和胞内活性，可以快速催化底物转化为目标产物，并将代谢流持续引入产物的合成途径，这是高效细胞工厂构建的关键。*C₄*和*C₅*途径的关键酶ALAS和谷氨酰 tRNA 还原酶（glutamyl-tRNA reductase, GluTR）不仅受到血红素的反馈抑制，同时也存在蛋白不稳定的问题^[8]。因此，上述两种酶催化性质的提升和活性的维持也就成为5-ALA细胞工厂构建需要解决的第1个关键问题。

尽管ALAS的蛋白结构很早就已经被解析并报道^[69]，但目前针对5-ALA合成途径关键酶改造的研究相对较少。作者团队^[70]基于本实验室挖掘并

解析的ALAS蛋白结构，借助计算机辅助的蛋白理性设计，对氨基酸序列中所有可能与血红素相互作用的组氨酸残基进行保守性分析和突变氨基酸预测，并通过定点突变和酶活检测筛选获得了热稳定性明显提高，且抗血红素反馈抑制的新型ALAS突变体，在工程菌株中应用后5-ALA产量比对照菌株提高了22%。针对GluTR受血红素反馈调控的问题，前期研究发现N末端结构域对沙门菌（*Salmonella arizona*）来源的GluTR稳定性具有重要的作用，而在第2位苏氨酸残基后引入两个带正电的赖氨酸残基可以明显提高蛋白的稳定性，并表现出抗血红素反馈调控的作用^[71-72]。山东大学祁庆生团队^[56]首次在大肠杆菌中利用上述突变体重构了*C₅*途径，重组菌株5-ALA产量是表达内源

GluTR 菌株的4倍。Zhang等^[73]进一步研究了插入不同数量的阳离子氨基酸残基(赖氨酸和精氨酸)对GluTR蛋白稳定性和活性的影响,发现插入两个精氨酸残基的突变酶效果最好,表达上述突变酶的菌株5-ALA产量比对照菌株提高了76.8%。

3.2 5-ALA下游代谢调控

5-ALA脱水酶(ALAD)是ALA下游代谢的第1个关键酶,控制着下游的整体代谢通量,因此其编码基因*hemB*成为下游代谢控制的主要靶点。前期的基因工程技术中5-ALA的下游代谢控制主要通过添加ALAD的抑制剂,成本高且增加工艺控制复杂度。进入代谢工程发展阶段以后,通过调控*hemB*基因的表达或改变其酶活性降低5-ALA的下游代谢,逐渐成为主流技术手段。最直接的策略是完全阻断5-ALA的下游代谢,导致5-ALA积累。作者团队^[74-75]利用无痕敲除技术获得了大肠杆菌*hemB*敲除菌株,但也带来了菌株生长变弱的问题,研究人员对上述菌株进行紫外诱变,获得了可以利用外源血红素正常生长的突变菌株,引入异源ALAS后,建立了一条血红素依赖型的5-ALA的生物合成路线。另一个策略是弱化ALAD的表达或降低酶活性,减少5-ALA的下游代谢。作者团队^[44]通过随机突变和生长筛选获得酶活下降的ALAD突变体,将其回补*hemB*敲除后菌株生长基本恢复正常,5-ALA产量也得到了明显提升。随着基因工程技术的不断发展,研究人员进一步通过在ALAD的C末端添加蛋白降解标签^[65]、替换更弱的起始密码子^[46]或核糖体结合位点(RBS)^[67]等方式,下调了ALAD的表达量,提高了5-ALA产量。

此外,血红素合成模块的整体调控也被深入研究,以探寻提高5-ALA产量的新靶点。Yu等^[76]利用转录组测序技术,研究发现5-ALA的过量合成会上调TCA循环、磷酸戊糖途径以及血红素合成途径相关基因的表达,并启动内源血红素响应和调控机制,以降低中间代谢物以及血红素的过量积累,这预示着下游代谢对5-ALA的合成存在更复杂的调控作用。Zhang等^[58]在大肠杆菌中系统研究了血红素合成途径相关基因的表达对

5-ALA合成的影响,发现尿卟啉原Ⅲ合成酶(*hemD*基因编码)过表达可以上调5-ALA及血红素合成途径多个基因的表达,而粪卟啉原Ⅲ氧化酶(*hemF*基因编码)过表达产生的原卟啉原Ⅸ则反馈抑制ALAD的酶活,*hemD*和*hemF*共表达后5-ALA产量从1.82 g/L提高到了3.25 g/L。在此基础上,研究人员通过优化外源铁离子的添加量,组合调控了5-ALA的合成及下游代谢,5-ALA产量进一步提高到了4.05 g/L^[59]。

3.3 基于C₅途径的代谢工程改造

鉴于大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌通过内源的C₅途径合成5-ALA,因此基于C₅途径的代谢工程改造首先被关注。2011年,山东大学祁庆生团队^[56]首次在大肠杆菌中对C₅途径进行改造和优化,通过共表达沙门菌(*Salmonella arizona*)来源的GluTR和内源GSAM,强化谷氨酸到5-ALA合成的代谢流,实现了以葡萄糖为碳源的5-ALA生物合成,进一步研究发现过表达RhtA可以促进5-ALA外排,5-ALA产量达到了4.13 g/L。2015年,利用谷氨酸棒杆菌为宿主通过强化C₅途径合成5-ALA的技术也被成功开发,通过组合表达不同来源的GluTR和GSAM,构建获得的工程菌株最高产量达到了2.2 g/L^[65-66]。

由于谷氨酸是C₅途径合成ALA的直接前体,因此有研究者借鉴或者直接利用谷氨酸高产菌株和工艺控制,尝试通过提高谷氨酸的积累量促进5-ALA的合成。Zhang等^[67]通过敲除谷氨酸高产菌株S914中的谷氨酸外排蛋白NCgl1221、精氨酸外排蛋白LysE和脯氨酸外排蛋白PutP,减少了胞内谷氨酸的消耗,有效提高5-ALA的产量。Ko等^[77]将 α -酮戊二酸脱氢酶抑制蛋白OdhI的第14位和15位苏氨酸突变为丙氨酸,通过阻止其磷酸化以保持对 α -酮戊二酸脱氢酶的抑制作用,过表达后使碳流更多地从TCA循环进入谷氨酸合成途径,提高了5-ALA产量和转化率。此外,上述两项研究也证明在培养基中添加青霉素G、吐温40或乙胺丁醇等提高谷氨酸合成的策略同样可以提高5-ALA的产量。

提高中心代谢进入谷氨酸合成途径的代谢通

量也是尝试的策略之一。Li等^[57]发现在大肠杆菌中过表达一种铁代谢调控相关的sRNA——*ryhB*,可以下调*sdhCDAB*（琥珀酸脱氢酶编码基因）、*hemB*和*hemH*（亚铁螯合酶编码基因）的转录水平,同时上调*gltX*（谷氨酰tRNA合成酶编码基因）的转录,提高了5-ALA的产量,并降低血红素的积累。Noh等^[60]在过表达GluTR和GSAM的大肠杆菌中敲除 α -酮戊二酸脱氢酶编码基因*sucA*,提高了碳流进入谷氨酸合成途径的通量,进一步通过异柠檬酸裂解酶(*aceA*基因编码)表达的精细调控强化乙醛酸循环,平衡了菌体生长和产物合成的代谢流,降低了乙酸的积累,5-ALA产量达到了3.4 g/L,葡萄糖转化率达到0.28 g/g。

在上述策略的基础上,江南大学康振团队^[64]以大肠杆菌为宿主对C₅途径进行系统代谢工程改造,组合GluTR和GSAM的精细表达调控策略、强化内源PLP合成途径的辅因子工程策略、基于生长时期调控的5-ALA下游代谢弱化策略以及基于*recA*和*endA*缺失菌株的质粒稳定性改造策略,获得的工程菌株在3 L发酵罐中5-ALA产量达到了5.25 g/L。Zhang等^[68]以谷氨酸棒杆菌为宿主,通过C₅途径构建和优化、ATP、NADPH、PLP等辅因子合成途径强化、TCA循环弱化以及表达RhtA,将利用谷氨酸棒杆菌C₅途径合成5-ALA产量提高到了3.16 g/L。Zhao等^[63]在大肠杆菌中引入拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)来源的GluTR及其激活蛋白GBP,搭建了外源C₅合成途径;通过优化宿主菌株,确定了补充6个稀有密码子tRNA的Transetta(DE3)菌株作为宿主5-ALA产量最高,在培养基中添加前体谷氨酸后5-ALA产量提高到了7.64 g/L。

3.4 基于C₄途径的代谢工程改造

虽然C₄途径合成5-ALA的步骤简单,然而由于涉及两种底物的共同参与,因此基于C₄途径的代谢工程改造需要平衡多条代谢途径,以确保琥珀酰CoA和甘氨酸的有效供给。甘氨酸在生物体内存在多条生物合成途径,具备通过代谢改造实现甘氨酸内源供给的可能性。2017年,江南大学康振团队^[46]和Zou等^[54]分别在大肠杆菌和谷氨酸

棒杆菌中尝试了通过强化常规的丝氨酸生物合成途径以及丝氨酸到甘氨酸的转化,希望达到部分或完全替代甘氨酸外源添加的目的。然而,上述改造获得的菌株在不添加甘氨酸的条件下5-ALA整体产量较低(<3 g/L),也说明了利用内源甘氨酸合成和代谢调控的复杂性。因此,目前基于C₄途径合成5-ALA的技术主要还是以外源添加甘氨酸为主。

琥珀酰辅酶A是TCA循环的中间代谢物,处于TCA循环和5-ALA合成的分支节点,强化琥珀酰辅酶A的供给可以通过ALAS将更多的代谢流引入5-ALA合成途径,并实现葡萄糖对琥珀酸的底物替代,因此大量研究关注如何提高琥珀酰辅酶A的合成通量。Kang等^[40]在一株好氧条件下高产琥珀酸的代谢工程菌株中引入外源ALAS,实现了5-ALA的合成。作者团队^[41]通过在大肠杆菌中敲除*sucCD*（琥珀酰辅酶A合成酶编码基因）或*sdhAB*,阻断TCA循环并增加琥珀酰-CoA的供应,在不添加琥珀酸的条件下将5-ALA的产量提高到了6.38 g/L;进一步研究发现在大肠杆菌中强化辅酶A生物合成或弱化乙醛酸循环途径,同样可以提高琥珀酰辅酶A的供给能力,有利于5-ALA的生物合成^[43, 48]。Miscovic等^[51]对ALAD弱化菌株的TCA循环进行代谢改造,在好氧条件下敲除*sdhA*,厌氧条件下敲除*sdhA*和*iclR*（乙醛酸循环抑制蛋白）,增加前体琥珀酰辅酶A的积累以及进入5-ALA合成途径的代谢通量,以甘油为底物在微氧和好氧条件下5-ALA的产量分别达到了5.95 g/L和6.93 g/L。山东大学祁庆生团队^[53]在谷氨酸棒杆菌中通过敲除*sucCD*强化了琥珀酰辅酶A胞内供给,补料分批发酵5-ALA产量达到了7.6 g/L;进一步过表达RhtA强化5-ALA外排,并利用“生长-产酸”两阶段发酵工艺将5-ALA的产量提高到了14.7 g/L。

增加碳流从EMP途径进入TCA循环的代谢通量,同时弱化乙酸等支路代谢途径,对于提高以TCA循环代谢物及其衍生物的产量至关重要^[78-79]。作者团队^[42]首先关注了四碳回补途径在5-ALA合成中的应用,发现过表达*ppc*或*pyc*可以大幅提高5-ALA的产量。天津大学王智文团队^[52]在谷氨酸棒杆菌中引入C₄合成途径,通过敲除乳酸和乙酸

合成途径, 强化四碳回补途径, 提高了 5-ALA 的合成能力; 进一步敲除与细胞壁合成相关的青霉素结合蛋白, 同时过表达 5-ALA 外排蛋白 RhtA, 通过增加细胞壁的通透性, 降低了产物在胞内的消耗, 5 L 发酵罐中补料分批发酵 5-ALA 的产量达到了 7.53 g/L。作者团队^[80]对谷氨酸棒杆菌利用 C₄途径合成 5-ALA 的发酵工艺进行了全面优化, 在 5 L 发酵罐中通过补料分批发酵将 5-ALA 的产量提高到了 10.1 g/L; 进一步对在谷氨酸棒杆菌中引入的外源 ALAS 以及内源磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (*ppc* 基因编码) 的表达进行精细调控, 实现了外源途径与底盘代谢的“精准匹配”以及前体供给枢纽节点代谢流的“精准分配”, 优化后 5-ALA 产量比出发菌株提高了 45%, 5 L 发酵罐中以葡萄糖为碳源 5-ALA 产量达到了 16.3 g/L; 最后, 研究人员进一步测试了木薯渣水解液、糖蜜等廉价粗原料的应用效果, 发现木薯渣水解液的使用对 5-ALA 合成有明显的促进作用, 产量提高到了 18.5 g/L, 为目前已报道的 5-ALA 生物合成的最高产量^[55]。

3.5 5-ALA 与其他化合物的联产

通过代谢途径搭建, 利用单个细胞同时合成两种化合物, 是一种有效降低生产成本的生物合成策略^[81]。Li 等^[45]在大肠杆菌中引入酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 来源的 ALAS, 通过密码子优化、表达强化、最适宿主筛选以及自诱导系统和质粒稳定系统改造, 提高了 5-ALA 合成能力; 在此基础上, 研究者过表达聚羟基丁酸酯 (poly-3-hydroxybutyrate, PHB) 合成途径的基因, 实现了胞外 5-ALA (1.6 g/L) 和胞内 PHB (43%) 的联产。Zhang 等^[61]利用类似策略在大肠杆菌中组合 C₃途径和聚羟基脂肪酸合成途径, 同样实现了 5-ALA (3.2 g/L) 与 PHB (38.2%) 的协同生产。在上述体系中, PHB 途径的引入可以降低 5-ALA 合成的主要副产物乙酸的积累, 并提高菌株的环境适应能力, 而 5-ALA 积累引起的高血红素浓度可以强化呼吸链, 提高能量合成和中心碳代谢的流量, 促进 PHB 的合成。5-ALA 与 PHB 等胞内代谢物的协同生产可以进一步提高碳源利用率, 降低产品综合生产成本。

相对于基因工程技术中主要依赖于 ALAS 过表达的技术策略, 基于系统代谢工程的多策略组合具有明显的技术优势, 5-ALA 生物合成的障碍也逐步被发现和解除。经过大量的研究和菌种改造, 5-ALA 的产量指标不仅提升到了近 20 g/L 的水平^[55], 发酵工艺和底物也大幅简化, 避免了琥珀酸和抑制剂的添加, 部分高水平技术体系已经具备了产业化生产的条件, 为 5-ALA 在农业等领域的大规模应用推广奠定了重要的工作基础。

4 合成生物元件和技术在 5-ALA 生物合成中的应用

近年来, 合成生物技术与代谢工程的深度融合为生物合成提供了强大的工具支持。2017 年以来, 大量新元件和新技术在 5-ALA 生物合成中成功应用, 为 5-ALA 生物合成技术的发展增加了新的动力。

4.1 新途径设计

目前基于 C₄途径的 5-ALA 生物合成的技术水平具有明显优势, 如果能够避免甘氨酸的外源添加将进一步降低生产成本, 然而内源供给甘氨酸的前期尝试尚未能有效解决该问题^[46, 54]。人工途径设计可以突破自然进化的限制, 规避内源途径的代谢调控, 是合成生物学的重要研究领域之一, 并已经在多种重要化合物的合成中成功应用^[82]。Ren 等^[47]根据化学结构的分解和重排, 设计了从乙醛酸到甘氨酸的新型合成途径, 由于不涉及碳原子的损失, 新途径相对于内源甘氨酸合成途径具有更高的原子经济性 (100 vs 67); 研究者通过评价不同来源丙氨酸:乙醛酸氨基转移酶的效果, 确定了最适酶源, 将上述途径引入表达异源 ALAS 的大肠杆菌, 同时强化 *aceA* 基因的表达, 搭建了以葡萄糖为唯一碳源的新型前体供给途径, 5-ALA 产量比出发菌株提高了 38%, 达到 521 mg/L。虽然现有研究中人工途径的合成能力还相对有限, 但未来更多新酶设计并组合多水平调控元件的应用将会逐步展开, 以更好地匹配 5-ALA 的合成速度。

4.2 基因表达调控技术在5-ALA合成中的应用

关键基因表达的精细调控优化需要强度适宜的启动子或RBS等调控元件，或者借助CRISPRi (clustered regularly interspaced short palindromic repeats interference) 等新型调控工具实现。挖掘或设计改造元件库、开发调控工具也是合成生物技术重要的研究内容^[83]。目前这些策略已经在5-ALA的生产菌株改造中广泛使用。

调控元件方面，Noh等^[60]利用不同强度启动子，在*sucA*敲除菌株中精细调控了*aceA*的表达，获得了乙醛酸循环的最适强度，提高了菌体的生长及5-ALA的产量。江南大学康振团队^[46, 64]利用RBS工程策略，分别对ALAS以及C₅途径基因的RBS进行随机突变和筛选，获得了最优表达元件，进一步按照“高-中-低”的方式对不同基因的RBS元件进行随机组合，获得了最适于5-ALA合成的组合。Chen等^[55]利用不同强度的RBS元件对ALAS和磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶的表达进行了精细调控，获得了产物合成与中心代谢最优平衡菌株。

调控工具方面，基于CRISPRi和sRNA (small RNA) 的基因表达调控技术的开发为基因表达调控提供了一种快速高效的工具，尤其是对生长必需基因的表达调控^[84-85]。在5-ALA的生物合成中，Su等^[86]首先利用CRISPRi技术，通

过靶基因内部及调控区不同结合位点的gRNA的设计，梯度弱化了大肠杆菌*hemB*基因的表达，转录水平下调为对照菌株的27%~82%，5-ALA产量最高提高了5倍；该团队进一步将血红素响应和调控元件与CRISPRi工具组合，通过ALAD表达的动态调控平衡了5-ALA合成和菌体生长^[87]。Miscevic等^[51]利用四环素诱导型启动子控制的CRISPRi系统，采用上述类似的策略，通过不同gRNA设计调控了*hemB*的弱化程度，发现40%~67%的转录水平最利于5-ALA合成，产量比对照菌株提高了4~5倍。基于调控工具的基因表达调控不涉及基因组操作，可以更便捷地进行多水平的调控，并且更容易与其他调控元件组合，实现对目标基因更精细的表达调控。未来基于CRISPR-dCpf1的多基因表达调控工具^[88]也可以更方便地对多个基因靶点同时调控，以快速优化胞内复杂的代谢网络。

4.3 动态调控技术在5-ALA生物合成中的应用

动态调控可以根据菌体生长及代谢的需求对胞内代谢流量进行精确的重新分配^[89]。基于代谢物响应、群体感应、环境因素响应的动态调控策略已经日趋成熟，并用于平衡菌体生长和5-ALA的合成(图2)。

代谢物响应元件通常包括响应特定代谢物的

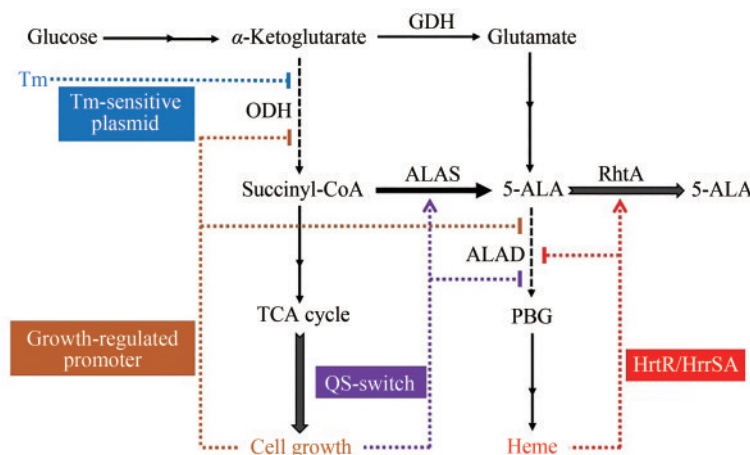


图2 动态调控在5-ALA生物合成中的应用

Fig. 2 Application of dynamic regulation in 5-ALA biosynthesis

5-ALA—5-aminolevulinic acid; PBG—porphobilinogen; ODH—oxoglutarate dehydrogenase; GDH—glutamate dehydrogenase; ALAS—5-aminolevulinic acid synthase; ALAD—5-aminolevulinic acid dehydratase; Tm—temperature; QS—quorum sensing;

····> upregulation; ·····| downregulation

转录调控因子-启动子和核糖开关。目前,上述两种元件在 ALA 生物合成中均已经被开发和使用。Zhou 等^[49]在巴氏梭菌 (*Clostridium pasteurianum*) 中鉴定了一种甘氨酸激活型核糖开关,并通过配体结合区功能分析和改造筛选,将其改造成为一种高效的甘氨酸抑制型核糖开关;利用上述元件在整合异源甘氨酸和 C₄ 途径的大肠杆菌中调控 ALAD 的表达,构建了响应前体甘氨酸的动态调控回路,实现了 5-ALA 产量 11% 的提升。Zhang 等^[87]基于乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*) 来源的血红素响应转录调控因子 HrtR 及其操纵区序列 *hrtO*, 开发了特异性响应胞内血红素的生物传感器;通过 HrtR 与血红素亲和力的半理性设计和改造,获得了不同响应范围和灵敏度的元件;利用上述元件在 C₅ 途径强化的大肠杆菌中通过 CRISPRi 工具调控了 ALAD 的表达 (图 2), 实现了胞内血红素的稳态控制, 5-ALA 产量最高达到了 5.35 g/L, 是组成型调控策略的 2.2 倍。

群体感应系统 (quorum sensing, QS) 主要通过感应细胞密度变化来调控基因的表达。近年来,基于 QS 系统的合成生物学基因调控回路的构建和应用研究已经成为动态调控领域的新热点^[90]。在 5-ALA 的生物合成方面,Gu 等^[50]利用同时具有激活和抑制双重调控功能的 Eas-QS 系统,通过控制小分子感应物的合成速度并组合不同诱导启动子,构建了一系列在不同生长时期启动的双功能动态调控开关,可以在不同时间和间隔同步调控不同基因的上调和下调;研究人员将上述调控开关用于 ALAS 和 ALAD 的动态表达调控 (图 2), 确定了最优元件组合,实现了前期菌体快速生长 (上调 ALAD, 下调 ALAS), 而后期快速积累产物 (上调 ALAS, 下调 ALAD), ALA 产量比静态调控的组合提高了 12 倍。

此外,生长时期调控型启动子作为一种动态调控元件也已经用于 5-ALA 合成途径的优化。江南大学康振团队^[64]在大肠杆菌中利用一种稳定期下调的自诱导启动子 P_{mic}, 替换了 *hemB* 基因的原始启动子,实现了 ALAD 在菌体生长阶段的高表达以及进入稳定期后的快速下调 (图 2), 降低了发酵中后期 5-ALA 下游途径的代谢通量,促进了 5-ALA 在发酵中后期的快速积累。Zhang 等^[68]分

别利用温度敏感质粒和生长时期调控型启动子 P_{CP_2836} 调控了 α -酮戊二酸脱氢酶的表达,通过温度的变化或生长时期的自诱导作用,动态调控了 TCA 循环进入谷氨酸合成的通量;同时借助谷氨酸棒杆菌内源血红素响应和调控系统 HrrSA, 在高血红素浓度条件下自动上调 RhtA 的表达 (图 2), 实现了 5-ALA 外排速度的动态调控,获得了目前最优的基于 C₅ 途径的谷氨酸棒杆菌 5-ALA 高产菌株。

动态调控作为合成生物学的一项重要使能技术,比静态调控和基于外源诱导剂的诱导型元件具有显著的技术优势和细胞经济性。5-ALA 及其前体均处于菌体生长代谢的关键节点,因此高产菌株需要严格平衡菌体的生长和产物合成,未来动态调控在多靶点多水平的综合应用将为 5-ALA 生物合成技术的发展提供强大的技术支持。

4.4 抗逆元件挖掘和应用

稳定高效的生物合成体系除了需要平衡高产菌株胞内代谢以外,还需要关注发酵过程中产物或有毒中间代谢物积累对菌体生理活性的影响。5-ALA 化学性质不稳定,中性或碱性 pH 条件下容易两分子缩合,产生环状化学物和活性氧分子^[91-93]。同时,发酵过程中 5-ALA 下游代谢产生的卟啉类物质具有较强的光敏活性,过量积累也可能对菌体造成严重的氧化损伤。作者团队^[36]通过大肠杆菌对高浓度 5-ALA 耐受的机制研究,明确了活性氧是高浓度 5-ALA 细胞毒性的主要物质;研究发现胞内抗氧化系统在高浓度 5-ALA 胁迫条件下明显上调,是菌体耐受高浓度 5-ALA 的主要防御系统;通过功能基因元件筛选和验证,确定了强化菌株的抗氧化系统可以有效提高工程菌 5-ALA 的产量,其中组合表达过氧化氢酶 KatE 和超氧化物歧化酶 SodB 的菌株 5-ALA 产量提高了 117%,为 5-ALA 高效生物技术的开发提供了新策略和新元件。

4.5 非理性进化和快速检测技术的开发

基于合成生物学元件的非理性进化和筛选技术可以在机制尚不清晰的情况下,快速提高产物

产量, 对新菌株的解析也有助于发现高产新机制。目前非理性策略在 5-ALA 生物合成中的研究和应用还相对较少。

Cui 等^[62] 利用化学诱导的染色体进化技术 (chemically induced chromosomal evolution, CICH), 将 *GluTR* 和 *GSAM* 编码基因在大肠杆菌基因组上随机多拷贝整合, 获得了不依赖于质粒的目标基因多拷贝表达菌株, 结合 *recA* 敲除和菌株适应性进化, 获得的菌株 ALA 产量达到了 4.55 g/L。Tan 等^[94] 利用 CRISPRi 技术弱化大肠杆菌碳酸酐酶编码基因 *can*, 构建了一种响应 1%~5% 浓度 CO₂ 的生物传感器, 并以此为基础开发了一种针对 CO₂ 代谢相关酶的进化和检测系统 (direct enzymatic performance evaluation & determination system, DEPEND), 利用上述系统可以快速识别具有更高 ALAS 活性的菌株, 为 ALAS 的非理性进化筛选提供了重要的检测技术。此外, 该研究团队还尝试开发基于荧光蛋白的发酵过程 5-ALA 快速定量检测技术, 研究人员利用相同启动子在两个质粒上分别表达 ALAS 与绿色荧光蛋白 GFP, 通过检测 GFP 的荧光值确定体系中 5-ALA 的产量水平^[95]。这也是首次利用活细胞生物传感器原位在线检测 5-ALA 生物合成的尝试, 尽管该工具在使用过程中还受到 pH 等因素的干扰, 检测时限也相对较短, 但该研究为未来相关工具的开发和非理性进化筛选策略的实施提供了重要的参考。

近年来, 合成生物技术的快速发展为 5-ALA 生物合成技术的开发提供了大量的新策略和新工具, 尽管目前多数技术尚处于概念验证及测试阶段, 但合成生物技术以其强大的颠覆性和创新性, 未来必将有力地推动 5-ALA 生物合成水平的快速提升。

5 总结与展望

5-ALA 是一种极具开发价值的生物基化学品, 在动植物营养与健康等多方面具有重要的应用价值, 未来市场潜力巨大, 产业发展前景广阔。然而, 由于目前 5-ALA 的工业化生产主要依赖于化学合成技术, 成本高污染重, 导致现有生产规模有限, 产品价格昂贵, 严重限制了其在各领域中

的推广应用。经过近 50 年的发展, 5-ALA 生物合成技术从最初利用自然筛选获得的天然菌株, 逐步过渡到了集成多种改造策略和合成生物学元件的高效人工细胞工厂, 产量水平也从不足 1 g/L 提高到了近 20 g/L。部分高效菌种和成熟工艺已经或即将进入工业化生产, 国内百公斤级规模的生产线也已经初步建立, 大大降低了产品的生产成本和工艺的复杂性, 为其在农业和畜牧业等领域的应用推广奠定了重要基础。然而, 目前 5-ALA 生物合成技术的产量水平与谷氨酸、琥珀酸等相关代谢物的生产水平相比还有较大的差距, 未来 5-ALA 生物合成技术的发展仍将面临较大的挑战。

首先, 5-ALA 合成水平的提升仍然需要持续解析诸多限制因素和复杂的调控机制, 其中特别需要关注的是生物体内血红素的稳态平衡和严紧调控, 涉及关键酶的反馈调控、细胞基础代谢的平衡以及底盘菌株的应激响应等多个方面, 这也是限制 5-ALA 合成的核心要素。未来综合运用多种代谢工程策略、系统生物学分析手段和合成生物学工具, 从理性设计和非理性进化筛选等不同维度突破 5-ALA 合成和代谢的限制, 才有可能实现 5-ALA 生产水平的跨越式提升。

其次, 目前高水平的菌种和工艺都是基于 C₄ 途径开发, 且都依赖于甘氨酸的胞外添加, 限制了产品成本的下降空间, 甘氨酸高效胞内供给途径的设计和创建是 C₄ 途径未来研究的重点和难点; 同时, 尽管目前基于 C₅ 途径技术水平仍然较低, 但与 C₄ 途径相比, C₅ 途径具有明显的底物供给优势, 如何突破谷氨酸到 5-ALA 的催化限制是 C₅ 途径后续关注的重点。

此外, 近年来 CRISPR 等基因编辑技术的快速发展为基因组规模靶点的快速筛选和细胞工厂的快速构建提供了新型高效的技术手段, 利用上述技术构建基因组规模菌株库, 结合菌株表型筛选技术的开发, 也可以快速突破现有知识的认知^[96-98], 发现新的有利于 5-ALA 生物合成的潜在靶点, 助力菌种水平的进一步提升。

最后, 尽管目前大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌是用于 5-ALA 合成的主流底盘菌株, 具有不同生理特性的其他模式微生物或极端微生物, 如酿酒酵母、盐单胞菌 (*Halomonas* spp.) 等也已经陆续用

于5-ALA生物合成的研究^[45, 99-101]。同时,随着体外合成生物技术的快速发展^[102],利用不依赖于细胞的体外多酶复合体系催化合成5-ALA的研究也逐步开展^[103-104]。

随着系统生物学分析技术以及合成生物学使能技术的不断发展,相信未来会有更多的新策略用于5-ALA高产菌株的开发创建,低成本的绿色生物制造路线最终将助推5-ALA在不同领域的大范围推广应用。

参 考 文 献

- [1] KANG Z, DING W W, GONG X, et al. Recent advances in production of 5-aminolevulinic acid using biological strategies[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2017, 33(11): 200.
- [2] INOUE K. 5-Aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy for bladder cancer[J]. International Journal of Urology, 2017, 24(2): 97-101.
- [3] SHI L, LIU P, LIU J, et al. Application of 5-aminolevulinic acid-photodynamic therapy in common skin diseases[J]. Translational Biophotonics, 2020, 2(1/2): e201900028.
- [4] HENDAWY A O, KHATTAB M S, SUGIMURA S, et al. Effects of 5-aminolevulinic acid as a supplement on animal performance, iron status, and immune response in farm animals: a review[J]. Animals, 2020, 10(8): 1352.
- [5] WU Y, LIAO W B, DAWUDA M M, et al. 5-Aminolevulinic acid (ALA) biosynthetic and metabolic pathways and its role in higher plants: a review[J]. Plant Growth Regulation, 2019, 87(2): 357-374.
- [6] SASAKI K, WATANABE M, TANAKA T, et al. Biosynthesis, biotechnological production and applications of 5-aminolevulinic acid[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 58(1): 23-29.
- [7] FRANKENBERG N, MOSER J, JAHN D. Bacterial heme biosynthesis and its biotechnological application[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 63(2): 115-127.
- [8] SCHOBERT M, JAHN D. Regulation of heme biosynthesis in non-phototrophic bacteria[J]. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2002, 4(3): 287-294.
- [9] KANG Z, ZHANG J L, ZHOU J W, et al. Recent advances in microbial production of δ -aminolevulinic acid and vitamin B₁₂[J]. Biotechnology Advances, 2012, 30(6): 1533-1542.
- [10] LIU S L, ZHANG G M, LI X K, et al. Microbial production and applications of 5-aminolevulinic acid[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(17): 7349-7357.
- [11] 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[J]. 生物工程学报, 2013, 29(9): 1214-1222.
- [12] KANG Z, ZHANG J L, YANG S, et al. Advances in microbial production of 5-aminolevulinic acid[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2013, 29(9): 1214-1222.
- [12] 李智祥, 赵磊, 梁云龙, 等. 生物法合成5-氨基乙酰丙酸的研究进展[J]. 发酵科技通讯, 2017, 46(3): 178-182.
- [13] LI Z X, ZHAO L, LIANG Y L, et al. Advance on biosynthesis of 5-aminolevulinic acid[J]. Fajiao Keji Tongxun, 2017, 46(3): 178-182.
- [13] 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[J]. 生物加工过程, 2017, 15(5): 65-70.
- [14] ZHANG S H, ZOU Y L, SONG X, et al. Advances in 5-aminolevulinic acid microbial production[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2017, 15(5): 65-70.
- [14] 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[J]. 中国科学(生命科学), 2020, 50(12): 1405-1417.
- [15] 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[J]. SCIENTIA SINICA Vitae, 2020, 50(12): 1405-1417.
- [15] BEALE S I. The biosynthesis of delta-aminolevulinic acid in *Chlorella*[J]. Plant Physiology, 1970, 45(4): 504-506.
- [16] SASAKI K, IKEDA S, NISHIZAWA Y, et al. Production of 5-aminolevulinic acid by photosynthetic bacteria[J]. Journal of Fermentation Technology, 1987, 65(5): 511-515.
- [17] SASAKI K, TANAKA T, NISHIO N, et al. Effect of culture pH on the extracellular production of 5-aminolevulinic acid by *Rhodobacter sphaeroides* from volatile fatty acids[J]. Biotechnology Letters, 1993, 15(8): 859-864.
- [18] NISHIKAWA S, WATANABE K, TANAKA T, et al. *Rhodobacter sphaeroides* mutants which accumulate 5-aminolevulinic acid under aerobic and dark conditions[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 1999, 87(6): 798-804.
- [19] NISHIKAWA S, TANAKA T, KAMINAGA T, et al. Microorganisms producing 5-aminolevulinic acid and processes for producing 5-aminolevulinic acid by using the same: US6342377[P]. 2002-01-29.
- [20] 生产5-氨基乙酰丙酸的生物技术法[J]. 现代化工, 2004, 24(9): 69.
- [20] 5-Aminolevulinic acid production by biotechnology[J]. Modern Chemical Industry, 2004, 24(9): 69.
- [21] VAN DER WERF M J, ZEIKUS J G. 5-Aminolevulinic acid production by *Escherichia coli* containing the *Rhodobacter sphaeroides hema* gene[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(10): 3560-3566.
- [22] XIE L, HALL D, EITEMAN M A, et al. Optimization of recombinant aminolevulinic acid synthase production in *Escherichia coli* using factorial design[J]. Applied Microbiology and Bio-

- technology, 2003, 63(3): 267-273.
- [23] 张德咏, 成飞雪, 程菊娥, 等. 光合细菌嗜酸柏拉红菌 5-氨基乙酰丙酸合成酶基因的克隆与原核表达[J]. 微生物学报, 2007(4): 639-644.
ZHANG D Y, CHENG F X, CHENG J E, et al. Cloning and prokaryotic expression of *Rhodoblastus acidophilus* 5-aminolevulinic acid synthase gene[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2007, 47(4): 639-644.
- [24] CHOI H P, HONG J W, RHEE K H, et al. Cloning, expression, and characterization of 5-aminolevulinic acid synthase from *Rhodospseudomonas palustris* KUGB306[J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 236(2): 175-181.
- [25] CHOI C, HONG B S, SUNG H C, et al. Optimization of extracellular 5-aminolevulinic acid production from *Escherichia coli* transformed with ALA synthase gene of *Bradyrhizobium japonicum*[J]. Biotechnology Letters, 1999, 21(6): 551-554.
- [26] FU W Q, LIN J P, CEN P L. Expression of a *hemA* gene from *Agrobacterium radiobacter* in a rare codon optimizing *Escherichia coli* for improving 5-aminolevulinic acid production[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010, 160(2): 456-466.
- [27] LOU J W, ZHU L, WU M B, et al. High-level soluble expression of the *hemA* gene from *Rhodobacter capsulatus* and comparative study of its enzymatic properties[J]. Journal of Zhejiang University-Science B, 2014, 15(5): 491-499.
- [28] MENG Q L, ZHANG Y F, MA C L, et al. Purification and functional characterization of thermostable 5-aminolevulinic acid synthases[J]. Biotechnology Letters, 2015, 37(11): 2247-2253.
- [29] FU W Q, LIN J P, CEN P L. 5-Aminolevulinic acid production with recombinant *Escherichia coli* using a rare codon optimizer host strain[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 75(4): 777-782.
- [30] FU W Q, LIN H P, CEN P L. Enhancement of 5-aminolevulinic acid production with recombinant *Escherichia coli* using batch and fed-batch culture system[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(11): 4864-4870.
- [31] LIN J P, FU W Q, CEN P L. 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[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(7): 2293-2297.
- [32] LIU X X, WANG L, WANG Y J, et al. D-glucose enhanced 5-aminolevulinic acid production in recombinant *Escherichia coli* culture[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010, 160(3): 822-830.
- [33] YANG J, ZHU L, FU W Q, et al. Improved 5-aminolevulinic acid production with recombinant *Escherichia coli* by a short-term dissolved oxygen shock in fed-batch fermentation[J]. Chinese Journal of Chemical Engineering, 2013, 21(11): 1291-1295.
- [34] YU T H, YI Y C, SHIH I T, et al. Enhanced 5-aminolevulinic acid production by co-expression of codon-optimized *hemA* gene with chaperone in genetic engineered *Escherichia coli*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2020, 191(1): 299-312.
- [35] ZHANG L L, CHEN J Z, CHEN N, et al. Cloning of two 5-aminolevulinic acid synthase isozymes HemA and HemO from *Rhodospseudomonas palustris* with favorable characteristics for 5-aminolevulinic acid production[J]. Biotechnology Letters, 2013, 35(5): 763-768.
- [36] ZHU C C, CHEN J Z, WANG Y, et al. Enhancing 5-aminolevulinic acid tolerance and production by engineering the antioxidant defense system of *Escherichia coli*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2019, 116(8): 2018-2028.
- [37] BAILEY J E. Toward a science of metabolic engineering[J]. Science, 1991, 252(5013): 1668-1675.
- [38] LEE S Y, KIM H U. Systems strategies for developing industrial microbial strains[J]. Nature Biotechnology, 2015, 33(10): 1061-1072.
- [39] SHIN J-A, KWON Y-D, KWON O-H, et al. 5-Aminolevulinic acid biosynthesis in *Escherichia coli* coexpressing NADP-dependent malic enzyme and 5-aminolevulinic acid synthase[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007, 17(9): 1579-1584.
- [40] KANG Z, WANG Y, WANG Q, et al. Metabolic engineering to improve 5-aminolevulinic acid production[J]. Bioengineered Bugs, 2011, 2(6): 342-345.
- [41] 蒲伟, 陈久洲, 孙村民, 等. 琥珀酸脱氢酶或琥珀酰辅酶 A 合成酶缺失促进大肠杆菌积累 5-氨基乙酰丙酸[J]. 生物工程学报, 2013, 29(10): 1494-1503.
PU W, CHEN J Z, SUN C M, et al. Deficiency of succinic dehydrogenase or succinyl-CoA synthetase enhances the production of 5-aminolevulinic acid in recombinant *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2013, 29(10): 1494-1503.
- [42] 郑平, 陈久洲, 蒲伟, 等. 5-氨基乙酰丙酸高产菌株及其制备方法和应用: WO2014121724[P]. 2014-08-14.
ZHENG P, CHEN J Z, PU W, et al. 5-Aminolevulinic acid high-yield bacterial strain, preparation method and use thereof: WO2014121724[P]. 2014-08-14.
- [43] 郑平, 陈久洲, 蒲伟, 等. 一种 5-氨基乙酰丙酸产生菌株及其制备方法与应用: CN103710374A[P]. 2014-04-09.
ZHENG P, CHEN J Z, PU W, et al. Bacterial strain produced by 5-aminolevulinic acid as well as preparation method and application thereof: CN103710374A[P]. 2014-04-09.
- [44] 郑平, 陈久洲, 潘丹丹, 等. 通过弱化 5-氨基乙酰丙酸脱水酶活性获得 5-氨基乙酰丙酸高产菌株及其应用: CN103695364 A[P]. 2014-04-02.

- ZHENG P, CHEN J Z, PAN D D, et al. 5-aminolevulinic acid high-producing strain obtained by weakening activity of 5-aminolevulinic acid dehydratase and application of strain: CN103695364A[P]. 2014-04-02.
- [45] LI T, GUO Y Y, QIAO G Q, et al. Microbial synthesis of 5-aminolevulinic acid and its coproduction with polyhydroxybutyrate[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2016, 5(11): 1264-1274.
- [46] DING W W, WENG H J, DU G C, et al. 5-Aminolevulinic acid production from inexpensive glucose by engineering the C₄ pathway in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2017, 44(8): 1127-1135.
- [47] REN J, ZHOU L B, WANG C, et al. An unnatural pathway for efficient 5-aminolevulinic acid biosynthesis with glycine from glyoxylate based on retrobiosynthetic design[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(12): 2750-2757.
- [48] 郑平, 陈久洲, 孙际宾, 等. 5-氨基乙酰丙酸高产菌株及其制备方法和应用: CN108517327A[P]. 2018-09-11.
- ZHENG P, CHEN J Z, SUN J B, et al. 5-aminolevulinic acid high-producing bacterial strain, preparation method and application thereof: CN108517327A[P]. 2018-09-11.
- [49] ZHOU L B, REN J, LI Z D, 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*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(10): 2327-2335.
- [50] GU F, JIANG W, MU Y L, et al. Quorum sensing-based dual-function switch and its application in solving two key metabolic engineering problems[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(2): 209-217.
- [51] MISCEVIC D, MAO J Y, KEFALE T, et al. Strain engineering for high-level 5-aminolevulinic acid production in *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2021, 118(1): 30-42.
- [52] FENG L L, ZHANG Y, FU J, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for efficient production of 5-aminolevulinic acid[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2016, 113(6): 1284-1293.
- [53] YANG P, LIU W J, CHENG X L, et al. A new strategy for production of 5-aminolevulinic acid in recombinant *Corynebacterium glutamicum* with high yield[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(9): 2709-2717.
- [54] ZOU Y L, CHEN T, FENG L L, et al. Enhancement of 5-aminolevulinic acid production by metabolic engineering of the glycine biosynthesis pathway in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Biotechnology Letters*, 2017, 39(9): 1369-1374.
- [55] CHEN J Z, WANG Y, GUO X, et al. Efficient bioproduction of 5-aminolevulinic acid, a promising biostimulant and nutrient, from renewable bioresources by engineered *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2020, 13(1): 41.
- [56] KANG Z, WANG Y, GU P F, et al. Engineering *Escherichia coli* for efficient production of 5-aminolevulinic acid from glucose[J]. *Metabolic Engineering*, 2011, 13(5): 492-498.
- [57] LI F 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*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2014, 350(2): 209-215.
- [58] ZHANG J L, KANG Z, CHEN J, et al. Optimization of the heme biosynthesis pathway for the production of 5-aminolevulinic acid in *Escherichia coli*[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 8584.
- [59] ZHANG J L, KANG Z, DING W W, et al. Integrated optimization of the *in vivo* heme biosynthesis pathway and the *in vitro* iron concentration for 5-aminolevulinic acid production[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2016, 178(6): 1252-1262.
- [60] NOH M H, LIM H G, PARK S, et al. Precise flux redistribution to glyoxylate cycle for 5-aminolevulinic acid production in *Escherichia coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 43: 1-8.
- [61] ZHANG X, ZHANG J, XU J S, et al. Engineering *Escherichia coli* for efficient coproduction of polyhydroxyalkanoates and 5-aminolevulinic acid[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2018, 45(1): 43-51.
- [62] CUI Z Y, JIANG Z N, ZHANG J H, et al. Stable and efficient biosynthesis of 5-aminolevulinic acid using plasmid-free *Escherichia coli*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(5): 1478-1483.
- [63] ZHAO A G, ZHAI M Z. Production of 5-aminolevulinic acid from glutamate by overexpressing *HemA1* and *pgr7* from *Arabidopsis thaliana* in *Escherichia coli*[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2019, 35(11): 175.
- [64] ZHANG J L, WENG H J, ZHOU Z X, et al. Engineering of multiple modular pathways for high-yield production of 5-aminolevulinic acid in *Escherichia coli*[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 274: 353-360.
- [65] YU X L, JIN H Y, LIU W J, et al. Engineering *Corynebacterium glutamicum* to produce 5-aminolevulinic acid from glucose[J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14: 183.
- [66] RAMZI A B, HYEON J E, KIM S W, et al. 5-Aminolevulinic acid production in engineered *Corynebacterium glutamicum* via C₅ biosynthesis pathway[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2015, 81: 1-7.
- [67] ZHANG B, YE B C. Pathway engineering in *Corynebacterium glutamicum* S9114 for 5-aminolevulinic acid production[J]. *3 Biotech*, 2018, 8(5): 247.
- [68] ZHANG C L, LI Y J, ZHU F Z, et al. Metabolic engineering of an auto-regulated *Corynebacterium glutamicum* chassis for biosynthesis of 5-aminolevulinic acid[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 318: 124064.

- [69] ASTNER I, SCHULZE J O, VAN DEN HEUVEL J, et al. Crystal structure of 5-aminolevulinic acid synthase, the first enzyme of heme biosynthesis, and its link to XLSA in humans[J]. *EMBO Journal*, 2005, 24(18): 3166-3177.
- [70] TAN Z J, ZHAO J, CHEN J Z, et al. Enhancing thermostability and removing heme inhibition of *Rhodopseudomonas palustris* 5-aminolevulinic acid synthase by computer-aided rational design[J]. *Biotechnology Letters*, 2019, 41(1): 181-191.
- [71] WANG L Y, WILSON S, ELLIOTT T. A mutant HemA protein with positive charge close to the N terminus is stabilized against heme-regulated proteolysis in *Salmonella typhimurium*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(19): 6033-6041.
- [72] JONES A M, ELLIOTT T. A purified mutant HemA protein from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium lacks bound heme and is defective for heme-mediated regulation *in vivo*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2010, 307(1): 41-47.
- [73] ZHANG J L, WENG H J, DING W W, et al. N-terminal engineering of glutamyl-tRNA reductase with positive charge arginine to increase 5-aminolevulinic acid biosynthesis[J]. *Bioengineered*, 2017, 8(4): 424-427.
- [74] 尚柯, 郭小飞, 王艳萍, 等. 5-氨基乙酰丙酸脱水酶缺失对大肠杆菌生长的影响[J]. *现代食品科技*, 2011, 27(7): 742-746.
- SHANG K, GUO X F, WANG Y P, et al. Influence of 5-aminolevulinic acid dehydratase deletion on *E. coli* growth[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2011, 27(7): 742-746.
- [75] 郭小飞, 陈久洲, 张莉露, 等. 利用5-氨基乙酰丙酸脱水酶缺失的重组大肠杆菌合成5-氨基乙酰丙酸[J]. *天津科技大学学报*, 2012, 27(4): 1-6.
- GUO X F, CHEN J Z, ZHANG L L, et al. Production of 5-aminolevulinic acid with 5-aminolevulinic acid dehydratase deficient *Escherichia coli* mutant[J]. *Journal of Tianjin University of Science & Technology*, 2012, 27(4): 1-6.
- [76] YU X L, JIN H Y, CHENG X L, et al. Transcriptomic analysis for elucidating the physiological effects of 5-aminolevulinic acid accumulation on *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Microbiological Research*, 2016, 192: 292-299.
- [77] 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*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2019, 24(6): 915-923.
- [78] LIN H, SAN K Y, BENNETT G N. Effect of *Sorghum vulgare* phosphoenolpyruvate carboxylase and *Lactococcus lactis* pyruvate carboxylase coexpression on succinate production in mutant strains of *Escherichia coli*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 67(4): 515-523.
- [79] ZHANG R Z, YANG T W, RAO Z M, et al. Efficient one-step preparation of γ -aminobutyric acid from glucose without an exogenous cofactor by the designed *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Green Chemistry*, 2014, 16(9): 4190-4197.
- [80] 饶德明, 张良程, 陈久洲, 等. 谷氨酸棒状杆菌合成5-氨基乙酰丙酸的途径构建与发酵优化[J]. *生物技术通报*, 2017, 33(1): 148-156.
- 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*[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2017, 33(1): 148-156.
- [81] LIANG Q F, QI Q S. From a co-production design to an integrated single-cell biorefinery[J]. *Biotechnology Advances*, 2014, 32(7): 1328-1335.
- [82] LU X Y, LIU Y W, YANG Y Q, et al. Constructing a synthetic pathway for acetyl-coenzyme A from one-carbon through enzyme design[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 1378.
- [83] KENT R, DIXON N. Contemporary tools for regulating gene expression in bacteria[J]. *Trends in Biotechnology*, 2020, 38(3): 316-333.
- [84] QI L S, LARSON M H, GILBERT L A, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression[J]. *Cell*, 2013, 152(5): 1173-1183.
- [85] NA D, YOO S M, CHUNG H, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* using synthetic small regulatory RNAs[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(2): 170-174.
- [86] SU T Y, GUO Q, ZHENG Y, et al. Fine-tuning of *hemB* using CRISPRi for increasing 5-aminolevulinic acid production in *Escherichia coli*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1731.
- [87] ZHANG J, WANG Z G, SU T Y, et al. Tuning the binding affinity of heme-responsive biosensor for precise and dynamic pathway regulation[J]. *iScience*, 2020, 23(5): 101067.
- [88] LI M Y, CHEN J Z, WANG Y, et al. Efficient multiplex gene repression by CRISPR-dCpf1 in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 357.
- [89] TAN S Z, PRATHER K L. Dynamic pathway regulation: recent advances and methods of construction[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2017, 41: 28-35.
- [90] 李晓萌, 姜威, 梁泉峰, 等. 细菌群体感应系统在细胞间通讯中的应用及其合成生物学研究进展[J]. *合成生物学*, 2020, 1(5): 540-555.
- LI X M, JIANG W, LIANG Q F, et al. Application of bacterial quorum sensing system in intercellular communication and its progress in synthetic biology[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2020, 1(5): 540-555.
- [91] HUNTER G A, RIVERA E, FERREIRA G C. Supraphysiological concentrations of 5-aminolevulinic acid dimerize in solution to produce superoxide radical anions *via* a protonated dihydro-pyrazine intermediate[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2005, 437(2): 128-137.
- [92] ELFSSON B, WALLIN I, EKSBORG S, et al. Stability of 5-aminolevulinic acid in aqueous solution[J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1999, 7(2): 87-91.

- [93] BECHARA E J, DUTRA F, CARDOSO V E, et al. The dual face of endogenous alpha-aminoketones: pro-oxidizing metabolic weapons[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Toxicology & Pharmacology*, 2007, 146(1/2): 88-110.
- [94] TAN S I, YU P J, NG I S. CRISPRi-mediated programming essential gene can as a Direct Enzymatic Performance Evaluation & Determination (DEPEND) system[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020, 117(9): 2842-2851.
- [95] TAN S I, YOU S C, SHIH I T, et al. Quantification, regulation and production of 5-aminolevulinic acid by green fluorescent protein in recombinant *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2020, 129(4): 387-394.
- [96] WANG Y, LIU Y, LIU J, et al. MACBETH: multiplex automated *Corynebacterium glutamicum* base editing method[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 47: 200-210.
- [97] WANG T, GUAN C, GUO J, et al. Pooled CRISPR interference screening enables genome-scale functional genomics study in bacteria with superior performance[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 2475.
- [98] YAO L, SHABESTARY K, BJÖRK S M, et al. Pooled CRISPRi screening of the cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803 for enhanced industrial phenotypes[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 1666.
- [99] HARA K Y, SAITO M, KATO H, et al. 5-Aminolevulinic acid fermentation using engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1): 194.
- [100] MAO Y, CHEN Z, LU L, et al. Efficient solid-state fermentation for the production of 5-aminolevulinic acid enriched feed using recombinant *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2020, 322: 29-32.
- [101] 张俊丽, 康振, 钱晟东, 等. 产 5-氨基乙酰丙酸酿酒酵母工程菌株的构建[J]. *食品与生物技术学报*, 2018, 37(3): 232-239.
- ZHANG J L, KANG Z, QIAN S D, et al. Construction of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* for production of 5-aminolevulinic acid[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2018, 37(3): 232-239.
- [102] YOU C, ZHANG Y H P. Biomufacturing by *in vitro* biosystems containing complex enzyme mixtures[J]. *Process Biochemistry*, 2017, 52: 106-114.
- [103] MENG Q L, ZHANG Y F, JU X Z, et al. Production of 5-aminolevulinic acid by cell free multi-enzyme catalysis[J]. *Journal of Biotechnology*, 2016, 226: 8-13.
- [104] ZHAO A G, DING R W, ZHAI M Z. Multi-enzymatic recycling of ATP and NADPH for the synthesis of 5-aminolevulinic acid using a semipermeable reaction system[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2019, 83(12): 2213-2219.



通讯作者: 郑平(1972—), 女, 博士, 研究员, 博士生导师。研究方向为代谢工程、系统生物学、合成生物学。
E-mail: zheng_p@tib.cas.cn



第一作者: 陈久洲(1986—), 男, 硕士, 高级工程师。研究方向为代谢工程、合成生物学。
E-mail: chen_jz@tib.cas.cn