

• 微生物细胞合成 •

张风丽 上海交通大学副研究员、硕士生导师。主要研究领域为微生物代谢产物的生物合成，国内外发表研究论文 60 余篇，其中 SCI 论文 50 余篇，申请国家发明专利 14 项。主持国家自然科学基金面上项目、国家自然科学基金青年基金、CNRS 中法联合项目、国家重点研发计划子课题(2 项)、国家科技重大专项子课题、上海交通大学文理交叉、上海交通大学医工交叉等多项课题；作为主要研究骨干参与多项国家自然科学基金和国家科技部科研课题。曾获上海交通大学优秀青年教师晨星二等奖。



利用酵母菌生产有机酸的研究进展

张瑞元^{1#}, 朱翊凡^{1#}, 曾杜文¹, 魏士昊¹, 樊亚超², 廖莎², 赵心清¹, 张风丽^{1*}, 张霖²

1 上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240

2 中石化(大连)石油化工研究院有限公司, 辽宁 大连 116045

张瑞元, 朱翊凡, 曾杜文, 魏士昊, 樊亚超, 廖莎, 赵心清, 张风丽, 张霖. 利用酵母菌生产有机酸的研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(6): 2231-2247.

ZHANG Ruiyuan, ZHU Yifan, ZENG Duwen, WEI Shihao, FAN Yachao, LIAO Sha, ZHAO Xinqing, ZHANG Fengli, ZHANG Lin. Advances on the production of organic acids by yeast[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(6): 2231-2247.

摘 要: 有机酸是含有一种或多种低分子量酸性基团(如羧基、磺酸基)的可生物合成的有机化合物, 广泛应用于食品、农业、医药、生物基材料工业等领域。酵母菌具有生物安全、抗逆性强、底物谱广泛、方便遗传改造, 以及大规模培养技术成熟等独特优点, 因此利用酵母菌生产有机酸的研究日益受到国内外学者的关注。目前利用酵母生产有机酸还存在浓度低、副产物多, 以及发酵效率低等缺陷。随着酵母菌代谢工程和合成生物学技术的发展, 利用酵母菌生产有机酸取得了快速进展。本文总结了利用酵母合成 11 种有机酸的研究, 包括内源和异源合成的大宗羧酸和高价值有机酸, 并对该领域的未来研究方向进行了展望。

关键词: 酵母; 有机酸; 生物合成; 生物基材料; 代谢调控

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFE0108500, 2021YFC2101300)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFE0108500, 2021YFC2101300).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: zhangfengli@sjtu.edu.cn

Received: 2023-01-16; Accepted: 2023-03-31; Published online: 2023-03-31

Advances on the production of organic acids by yeast

ZHANG Ruiyuan^{1#}, ZHU Yifan^{1#}, ZENG Duwen¹, WEI Shihao¹, FAN Yachao², LIAO Sha², ZHAO Xinqing¹, ZHANG Fengli^{1*}, ZHANG Lin²

1 State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

2 SINOPEC Dalian Research Institute of Petroleum and Petrochemicals Co., Ltd., Dalian 116045, Liaoning, China

Abstract: Organic acids are organic compounds that can be synthesized using biological systems. They often contain one or more low molecular weight acidic groups, such as carboxyl group and sulphonic group. Organic acids are widely used in food, agriculture, medicine, bio-based materials industry and other fields. Yeast has unique advantages of biosafety, strong stress resistance, wide substrate spectrum, convenient genetic transformation, and mature large-scale culture technology. Therefore, it is appealing to produce organic acids by yeast. However, challenges such as low concentration, many by-products and low fermentation efficiency still exist. With the development of yeast metabolic engineering and synthetic biology technology, rapid progress has been made in this field recently. Here we summarize the progress of biosynthesis of 11 organic acids by yeast. These organic acids include bulk carboxylic acids and high-value organic acids that can be produced naturally or heterologously. Finally, future prospects in this field were proposed.

Keywords: yeast; organic acid; biosynthesis; biodegradable plastics (biodegradable polymers); metabolic regulation

有机酸广泛应用于食品、农业、化工和医药等领域。随着石油等不可再生资源的日趋枯竭,以及全球对环境污染防治和环境保护意识的提高,可降解材料的生产和使用日益受到关注。全球生物基材料市场规模预计将从 2021 年的 107 亿美元增长至 2026 年的 297 亿美元,2021–2026 年间的复合年增长率为 22.7%^[1]。有机酸可作为多种生物基可降解材料的中间体或者重要前体,其研究对促进可降解材料的生产具有重要意义^[2-3]。根据恒州博智信息公司的统计及预测,2021 年有机酸的全球市场销售额达到 235 亿美元,预计 2028 年将达到 261 亿美元,复合年增长率为 1.1% (2022–2028 年, <https://bbs.csdn.net/topics/607684462>)。化学法合成有机酸存在使用有毒性的催化剂、中间体的产生影响生产效率及分离纯化复杂等缺

点,因此利用微生物进行有机酸的生物合成意义重大^[3-4]。多种有机酸在微生物如细菌、真菌和藻类等合成中的研究已有报道^[4-6];目前,已有柠檬酸、丁二酸、葡萄糖酸、苹果酸、衣康酸、富马酸、丙酮酸和丙酸等 20 多种有机酸采用微生物发酵法进行规模化生物制造^[6-8]。

随着有机酸生物合成研究的深入和广泛的应用,国内外学者对于微生物合成有机酸的综述论文相继发表。国际上,澳大利亚学者 Sauer 等^[7]对微生物合成的柠檬酸、乳酸和丁二酸生物合成进展进行了综述,并提出了有机酸生物合成研究的指导方针,不同菌株可利用不同碳源产生多种有机酸,菌株的代谢工程及性能改造可提高菌株的耐受性。瑞典学者 Chen 和 Nielsen^[4]对工业和商业中具有良好应用的柠檬酸、乳酸、丁二酸和

3-羟基丙酸的微生物合成进行了总结,并且讨论了微生物合成生物有机酸的不足及面临的挑战主要是原料成本及下游产品的加工,因此发掘及构建高性能菌株是解决问题的关键。德国学者 Becker 等^[9]综述了合成有机酸的菌株选育及工业方面的最新进展,重点介绍了乙醇酸、丙酮酸、乳酸、3-羟基丙酸、丁二酸、衣康酸、富马酸和己二酸的生物合成进展。利用可再生生物质生产有机酸,因其原料成本低、能源可持续利用等优点引起了关注。西班牙学者 Alonso 等^[10]综述了利用可再生材料和废物低成本发酵产生有机酸的研究进展及工业前景。同时,国内学者对有机酸的微生物发酵也发表了综述,如江南大学李江华团队^[11]综述了利用蛋白工程和代谢工程策略合成包括丙酸、丙酮酸、衣康酸、丁二酸、富马酸、苹果酸和柠檬酸等有机酸的研究进展,提出整合合成生物学、系统生物学及蛋白质工程从而建立细胞工厂的策略。南京工业大学姜岷团队^[12]综述了微生物发酵产生四碳有机酸——富马酸、苹果酸和丁二酸的研究进展,并探讨了微生物高效合成四碳有机酸的可行策略及前景展望。

与常用的细菌和霉菌产酸菌比较,酵母菌作为有机酸的产生菌一般具有更强的低 pH 耐受性,此外,酵母不存在噬菌体污染问题,而且酵母菌具有发酵技术及遗传改造技术相对成熟等独特优点,成为合成生物塑料及塑料有机酸单体的优质底盘生物。因此,近年来酵母发酵大规模工业生产的有机酸研究持续增长,并且正在呈逐步扩大的趋势^[11-14]。但是,目前国内外还没有专门对酵母生产有机酸的综述报道,以往的综述均将不同宿主的相关研究放在一起总结,没有突出酵母菌的特色和优势。酵母菌较细菌霉菌等其他微生物具有独特的优越性^[15],有必要对其相关研究进行具体深入的总结和讨论。

本文参考美国能源部提出的高附加值生物化学品有机酸的种类^[16],聚焦以酵母菌作为底盘发酵生物,对代表性的有机酸,包括丁二酸、己二酸、乙醇酸、丙二酸、3-羟基丙酸、富马酸、苹果酸、衣康酸、木糖酸、葡萄糖酸和葡萄糖醛酸的特性和酵母生物合成情况进行综述,并对未来酵母合成有机酸的发展趋势及存在的局限性进行讨论和展望,本文概括了重要有机酸的特征、主要应用及合成酵母菌等信息。

1 酵母三羧酸循环中心代谢有机酸的合成

丁二酸、苹果酸、富马酸这3种四碳酸在微生物体内主要通过3种途径合成,还原三羧酸循环途径、位于线粒体内的氧化三羧酸循环途径和乙醛酸途径^[12,17](图1),丁二酸、苹果酸、富马酸在食品、饲料和化工等领域具有比较普遍的应用价值,在酵母中生产这些内源的传统有机酸具有悠久的历史。

1.1 丁二酸(琥珀酸, succinic acid, SA)

丁二酸和丁二醇(butanediol, BD)通过缩聚可产生聚丁二酸丁二醇酯(polybutylene succinate, PBS),该材料是一种可生物降解的耐热材料。解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)是非传统酵母,具有生物安全、鲁棒性的特点,已报道有多株 *Y. lipolytica* 代谢葡萄糖合成 SA^[17-19]。

利用代谢工程改造可促进 *Y. lipolytica* 合成丁二酸的效率,其中围绕丁二酸脱氢酶基因(succinate dehydrogenase gene, SDH)的改造最为成功,阻断该酶基因表达或者削弱其活性,可以阻止丁二酸的进一步转化,从而积累丁二酸。例如, Babaei 等^[18]构建的工程菌 *Y. lipolytica* ST8578 中,SDH1 的启动子序列被截短,从而导致丁二酸脱氢酶活性降低了 77%,但不影响

菌株在葡萄糖培养基中的生长, 在 pH 值为 5 的培养基中, 丁二酸产量、产率、生产率分别为 35.3 g/L、0.26 g/g 葡萄糖、0.60 g/(L·h); 辅酶 A (coenzyme A, CoA) 转移酶基因 *Ylch* 的缺失消除了乙酸的形成并提高了丁二酸的产量和细胞生长, 来自酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的磷酸烯醇丙酮酸羧激酶 (phosphoenolpyruvate

carboxykinase, ScPCK) 基因和内源性琥珀酰辅酶 A 合成酶 (succinyl-CoA synthase beta subunit, Y1SCS2) 基因在 *Y. lipolytica* 中的超表达, 使得菌株在不控制 pH 的情况下, 丁二酸的产量和产率分别达到 110.7 g/L 和 0.53 g/g 甘油^[19], 避免了细菌生产酸过程中需要控制 pH 为中性, 碱的使用易造成发酵污染的问题。

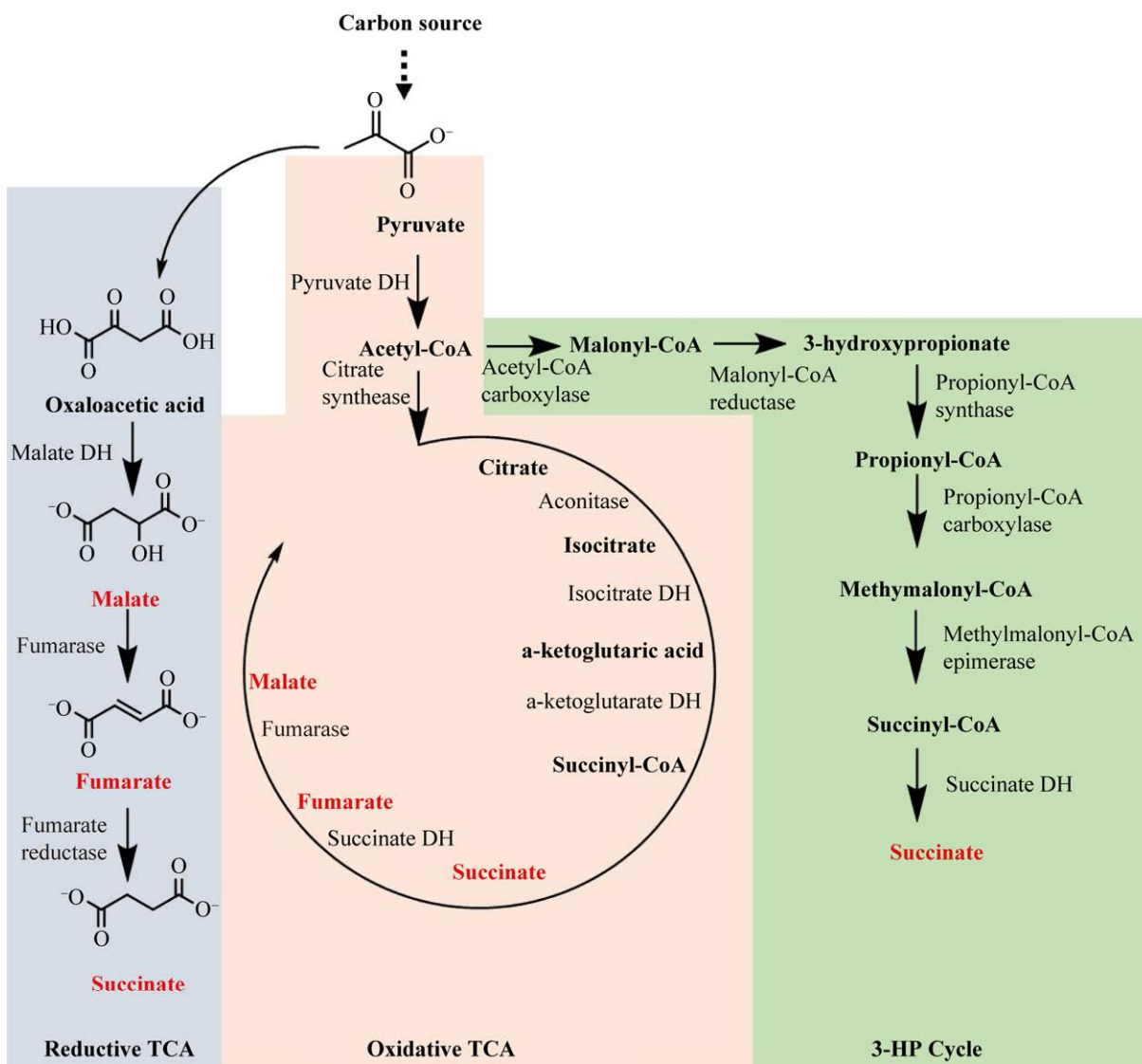


图 1 丁二酸、苹果酸和富马酸在酵母中的合成路径^[12,17]

Figure 1 Biosynthesis pathways of succinic acid, malic acid and fumaric acid in yeast^[12,17]. DH: Dehydrogenase; TCA: Tricarboxylic acid cycle; 3-HP: 3-hydroxypropionate.

Y. lipolytica 中 SDH 的失活有利于丁二酸的产生,然而菌株代谢葡萄糖能力降低从而影响了菌株的应用,虽然用甘油作为唯一碳源能解决菌株生长的问题,但葡萄糖是自然界最丰富和廉价的碳源,因此,有必要提高利用葡萄糖产丁二酸的效率。Yang 等^[20]通过自适应进化策略(adaptive evolution strategy)在丁二酸脱氢酶基因 *Ylsdh5* 缺失的工程菌株 *Y. lipolytica* PSA02004 中,葡萄糖的利用率得到提高,丁二酸产量在酵母完全培养基(yeast extract peptone dextrose medium, YPD)和食品废弃水解物培养基中分别为 65.7 g/L 和 87.9 g/L; Bondarenko 等^[21]通过对菌株 *Y. lipolytica* Y3753 的发酵优化,在 pH 为 3.65 时,丁二酸的产量和生产率分别为 55.3 g/L 和 2.6 g/(L·h)。Li 等^[22-24]通过纤维床生物反应器(*in situ* fibrous bed bioreactor, isFBB),利用农业残渣,通过优化发酵条件,*Y. lipolytica* PGC01003 合成丁二酸的产量达到了 209.7 g/L, *Y. lipolytica* PGC202 通过喂养富含葡萄糖的混合食物垃圾,在 pH 2.8 的条件下,丁二酸的产量达到 71.6 g/L,通过超表达木糖还原酶(xylose reductase, XR)、木糖醇脱氢酶(xylitol dehydrogenase, XDH)和木糖激酶(xylulose kinase, XK)基因, *Y. lipolytica* PSA02004 以木糖作为唯一碳源,合成丁二酸的产量为 22.3 g/L; Billerach 等^[25]研究发现,在氮缺乏的条件下,菌株 PGC01003 和 PGC202 丁二酸的产量提高,在 PGC01003 中,丁二酸产量、产率、生产率分别达到 19.0 g/L、0.23 g/g 甘油、0.23 g/(L·h),在 PGC202 中,丁二酸产量、产率、生产率分别达到 33.0 g/L、0.12 g/g 甘油、0.57 g/(L·h); 利用零成本的城市有机生物垃圾, *Y. lipolytica* PSA02004 的丁二酸产量、产率、生产率分别达到 54.4 g/L、0.44 g/g 葡萄糖、0.82 g/(L·h)^[26]。以上研究为利用可再生的廉价生物质资源生产有机酸提供了借鉴。

丁二酸合成后积累在细胞内,但是工业生产希望产物分泌到培养基中。线粒体载体(mitochondrial carriers)和 C4-二羧酸转运蛋白(C4-dicarboxylic acid transporters)可以提高 SA 的分泌, *Y. lipolytica* PGC62-SYF-Mae 通过表达转运子 SpMae1 和优化 SA 的生物合成路径, SA 产量、产率、生产率分别达到 101.4 g/L、0.37 g/g 葡萄糖、0.70 g/(L·h),比转运系统改造前菌株 *Y. lipolytica* ST8578 [SA 产量、产率、生产率分别为 35.3 g/L、0.26 g/g 葡萄糖、0.61 g/(L·h)]有明显提高^[27]; 重组表达乙酰辅酶 A 合成酶(acetyl-CoA synthase)的 *Y. lipolytica* PSA02004PP 可以在醋酸盐作为唯一碳源、高醋酸盐浓度条件下生产 SA^[28]。表达了来自黑曲霉(*Aspergillus niger*)的二羧酸转运蛋白(dicarboxylic acid transporter) DCT-02,酿酒酵母菌株 UBR2 CBS - DHA -SA-AnDCT-02 的 SA 产量和产率达到 10.3 g/L、0.16 g/g 甘油^[29]。在不控制 pH 值的条件下,重组 *Y. lipolytica* 分别能产生 22.3 g/L 和 46.9 g/L SA^[30-31]。

除了解脂耶氏酵母,在重组毕赤酵母(*Pichia kudriavzevii*) CY902 中,SA 的合成也有报道^[32]。但是,目前报道的最高 SA 产量(209.7 g/L)在解脂耶氏酵母中得到^[22],虽然和酿酒酵母比较,解脂耶氏酵母不产生大量乙醇,三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA)通量更高,但是该酵母的弱点是强好氧,而利用还原三羧酸循环(reductive tricarboxylic acid cycle, rTCA)途径生产丁二酸的收率不高,因此利用其他兼性厌氧酵母宿主生产丁二酸的研究还需要进一步深入。

1.2 富马酸(fumaric acid, FA)

富马酸是 C4 不饱和二元酸,广泛应用于食品、医药、化工等领域。米根霉(*Rhizopus oryzae*)是产生富马酸的主要微生物,但是根霉菌存在生长缓慢、产量低、遗传操作困难等缺点,在酿酒

酵母中异源表达米根霉菌的苹果酸脱氢酶(malate dehydrogenase)和富马酸酶,重组菌株 FMME-001 的富马酸产量仅为 3.2 g/L^[33]。来自 *R. oryzae* 的富马酸还原途径酶在可利用木糖的酵母斯氏舍弗氏菌(*Scheffersomyces stipitis*)表达,工程菌株中富马酸产量仅为 4.7 g/L,因此,改造的酵母菌株富马酸的产量与根霉菌中富马酸的最高产量(85.0 g/L)相比,要低很多^[12,34-35]。因此筛选高产富马酸天然酵母菌株至关重要,Wang 等^[36]分离到一株酵母菌出芽短梗霉(*Aureobasidium pullulans* var. *aubasidanis*) DH177,能产生微生物油和 32.3 g/L 富马酸,Wei 等^[37]研究发现鸟氨酸-尿素循环(ornithine-urea cycle)参与富马酸的生物合成,通过在菌株 DH177 中移除葡萄糖氧化酶 *GOX* 基因和 3,5-二羟基癸酸生物合成合酶基因,及超表达丙酮酸盐羧化酶的 *PYC* 基因,工程菌株能够产生(93.9±0.8) g/L 的富马酸,是原始菌株 DH177 富马酸产量的 2.9 倍,产率达到 0.63 g/g 葡萄糖,是理论产率的 49%。因此,结合优质高产原始菌株的合成生物学策略被用于优化代谢平衡必将有利于酵母菌的产酸量。

1.3 苹果酸(malic acid, MA)

MA 又名 2-羟基丁二酸,由于分子中有一个不对称碳原子,有 2 种立体异构体,主要用于食品和医药领域。鲁氏酵母(*Zygosaccharomyces rouxii*) V19 是分离自高糖发酵食品的糖耐受菌株,可以产生 74.9 g/L 苹果酸,产率为 0.39 g/g 葡萄糖^[38]。Chen 等^[39]通过在 *S. cerevisiae* 异源表达还原三羧酸循环的丙酮酸羧化酶和苹果酸脱氢酶,及四碳二羧酸转运蛋白,苹果酸产量可以达到 30.3 g/L。Zhang 等^[40]在巴斯德毕氏酵母(*Pichia pastoris*)表达还原三羧酸循环的丙酮酸羧化酶和苹果酸脱氢酶,同时可以合成 0.8 g/L 富马酸、42.3 g/L 苹果酸和 9.4 g/L 的丁二酸。通

过原位分离生物转化技术,在酵母细胞作为催化剂或者微反应器时,富马酸在渗透细胞液中富马酸酶作用下,由富马酸合成苹果酸^[41-42]。

为了提升酵母菌生产四碳有机酸的产率,首先需要筛选天然的四碳有机酸高产酵母菌株,野生型酵母菌营养需求低,发酵条件简单,野生型酵母菌株的筛选是代谢工程菌株改造的基础;其次是要降低生产成本,可通过降低发酵原料成本、优化发酵工艺等完成。

2 酵母非传统有机酸的合成

己二酸和丙二酸等有机酸通常在微生物中天然产量不高,但是具有非常重要的应用价值,因此通过代谢工程改造提高这些特殊有机酸的产量成为研究热点。

2.1 乳酸(lactic acid, 2-hydroxy propionic acid, LA)

乳酸(分子式, $C_3H_6O_3$)是合成当今最具潜力的生物可降解材料聚乳酸(polylactic acid, PLA)的单体,PLA 在生物医药、食品包装以及电子电器等领域具有广阔的应用前景。乳酸可以通过化学合成或微生物发酵途径获得。乳酸是手性分子,化学合成导致外消旋体混合物(L-乳酸和 D-乳酸),微生物发酵生产乳酸既可以解决外消旋体混合物的问题,又可以消除中间体分子产生造成的环境污染等问题,酵母菌因为自身优点,成为首选的合成宿主。乳酸是丙酮酸在乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)的作用下生成的,酵母自身不能有效产生乳酸,因此通过异源表达乳酸脱氢酶合成乳酸^[43]。已有多种不同种属酵母菌改造后能够产生 LA,如酵母属(*Saccharomyces*)^[44-46]、接合酵母属(*Zygosaccharomyces*)^[47]、假丝酵母(念珠菌属)(*Candida*)^[48]、毕赤酵母属(*Pichia*)^[49-50]、克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)^[51]等。采用降低丙酮酸旁路

代谢通量的策略, 可以达到提高乳酸产量的目的, 如对分离自葡萄皮的菌株库德里阿兹威(氏)毕赤酵母(*Pichia kudriavzevii*) NG7 进行代谢工程改造, 工程菌株 *P. kudriavzevii* DKA 用来自植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)的 *D*-LDH 代替丙酮酸脱羧酶基因 *PDC1*, 在反应器中能产生 154.0 g/L 的 *D*-LA, 是迄今 LA 产量最高的酵母菌株, *D*-LA 产率达到 0.72 g/g 葡萄糖^[50]。

2.2 己二酸(adipic acid, AA)

生物基己二酸是工业中的一种重要平台化学品, 是生产尼龙 66 的重要单体, 是当前石化路线的一种有前途的替代品。在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中, 合成生物学和代谢工程策略大大提高了 AA 产量^[52]。然而, 在酵母细胞中, 关于 AA 生物合成的研究很少。热带假丝酵母(*Candida tropicalis*) KCTC 7212 在最佳搅拌速率、pH 和底物月桂酸甲酯中缺乏脂酰辅酶 A 氧

化酶 *AOX* 基因, 获得 12.1 g/L 的己二酸, 生产率为 0.1 g/(L·h)^[53]。AA 分别由 β -酮硫酶(Tfu_0875)、3-羟基酰基-CoA 脱氢酶(Tfu_2399)、3-羟己二酸-CoA 脱氢化酶(Tfu_0067)、5-羧基-2-戊烯酰基-CoA 还原酶(Tfu_1647)和己二酸-CoA 合成酶(Tfu_2576-7)催化, 通过 5 个反应步骤由乙酰辅酶 A 和琥珀酰辅酶 A 合成 AA (图 2)^[54]。在酿酒酵母中共表达了来自褐色嗜热裂孢菌(*Thermobifida fusca*)的反己二酸降解途径(reverse adipate degradation pathway, RADP) 基因(Tfu_0875、Tfu_2399、Tfu_0067、Tfu_1647、Tfu_2576 和 Tfu_2576), 在优化条件下获得了 10.1 mg/L 的 AA^[54], 在酿酒酵母中表达 RADP 途径基因, 在 YPD 培养基中获得 3.4 mg/L 的 AA^[55]。在酿酒酵母中, 异源表达凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)的烯醇化还原酶 *ER* 基因, 可以利用可再生饲料生物合成 AA^[56]。

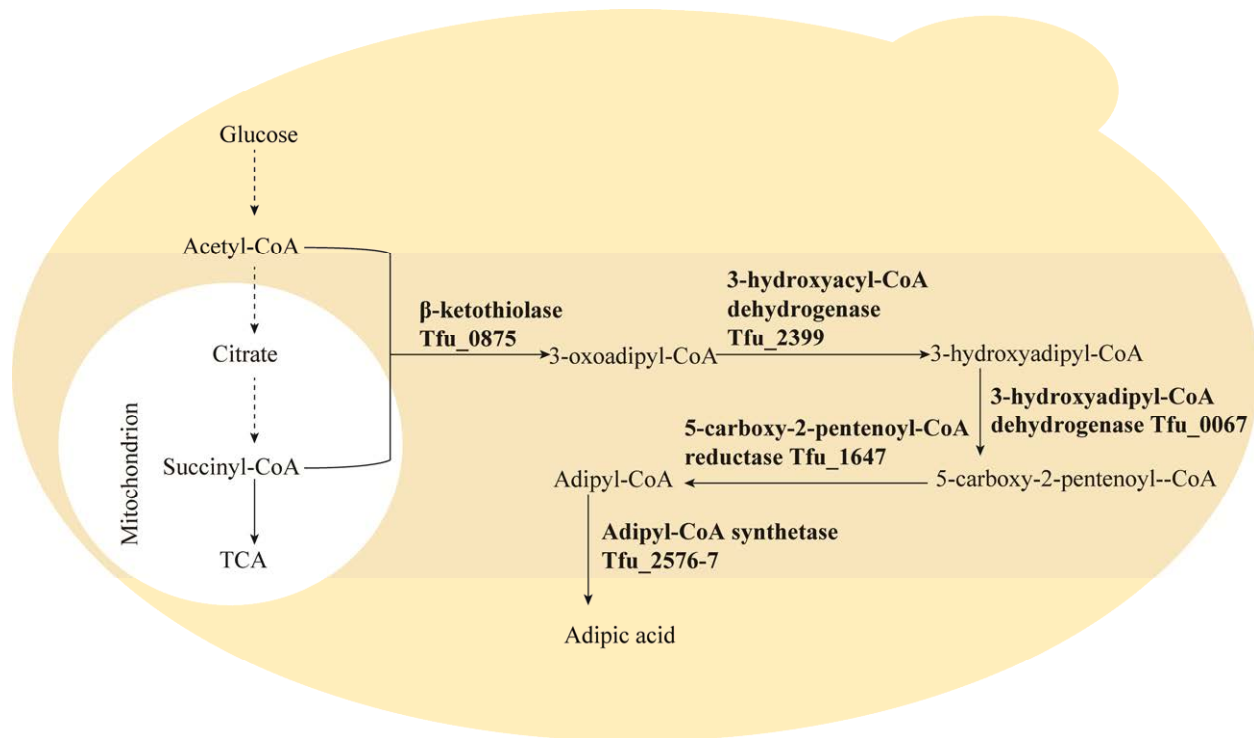


图 2 在酿酒酵母中己二酸的异源表达合成过程^[54]

Figure 2 Heterologous expression and synthesis of adipic acid in *Saccharomyces cerevisiae*^[54].

与其他有机酸类似,高浓度的己二酸会对生产菌造成毒害。有研究证明,与细菌、丝状真菌相比,酵母菌具有更高的己二酸耐受性^[57], Fletcher 等^[58]的研究发现,删除三羧酸循环的关键基因 *KGD1* 能提高菌株对己二酸及毒性前体-邻苯二酚的耐受性,因此,提高生产菌对不同有机酸和低 pH 的耐受性是改善细胞性能和提高己二酸生产效率的关键。

2.3 乙醇酸(glycolic acid, GA)

乙醇酸是一种双碳 α -羟基酸,具有醇和酸基团,应用广泛,如可作为染色剂用于纺织工业、作为防腐剂和香料用于食品工业、作为皮肤护理剂用于制药工业等^[59],预计到 2024 年,GA 市场预计将达到 4.15 亿美元 (<https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-glycolic-acid-market>)。

利用可再生木质纤维素类生物质资源生产有机酸具有良好的前景。木糖是该类生物质水解液中除了葡萄糖外的第二大丰富的可发酵糖。多种非常规酵母天然可以利用木糖,因此可以作为宿主利用木质纤维素水解液生产有机酸。例如,克鲁维酵母可以天然利用木糖,在生物反应器中,以 D-木糖和乙醇为碳源,工程酵母乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)产生 15.0 g/L 的乙醇酸,这是工程酵母首次通过乙醛酸在乙醛酸还原酶的作用下合成乙醇酸的报道^[60],实际产率达到 0.52 g/g 乙醇,是理论产率的 32%^[60]。酿酒酵母通常不具备天然利用木糖的能力,需要首先引入木糖利用途径。在工程酵母 *S. cerevisiae* 中,Salusjärvi 等^[61]通过异源表达多种酶[木糖脱氢酶(D-xylose dehydrogenase, XylB)、木糖脱水酶(D-xylonate dehydratase, XylD)、醛缩酶(aldehyde dehydrogenase, YagE 或 YjhH)、乙醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase, aldA)] (图 3),利用木糖合成了 1.0 g/L 的乙醇酸,提高木糖脱水酶的活性和优化发酵条件将有利于乙醇酸的产生。

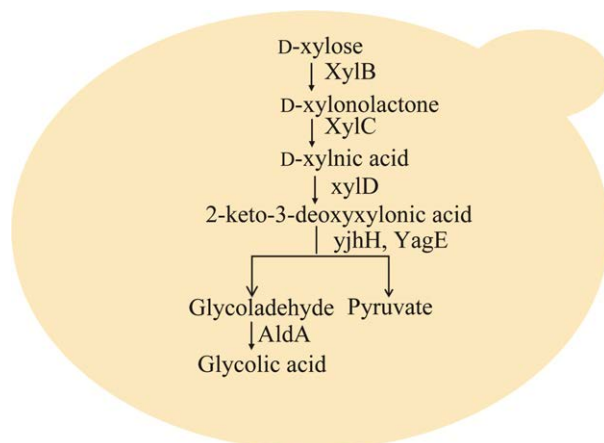


图 3 酿酒酵母中异源表达合成乙醇酸的路径^[61]

Figure 3 Heterologous expression and synthesis of glycolic acid in *Saccharomyces cerevisiae*^[61]. xylB: D-xylose dehydrogenase; xylC: Xylosidase; xylD: Dihydroxy-acid dehydratase; yjhH or YagE: Aldolase; aldA: Aldehyde dehydrogenase.

2.4 3-羟基丙酸(3-hydroxypropionic acid, 3-HP)

3-HP 末端羟基和羧基能参与多种化学反应,作为一种重要的化工原料应用广泛,生物法合成 3-HP 具有高效、绿色、可持续发展等优势,将取代化学合成方法,而成为今后研究重点^[62]。Kildegaard 等^[63]通过适应性进化提高了 *S. cerevisiae* 对 3-HP 的耐受性,并发现谷胱甘肽会增强菌株对 3-HP 的耐受性。北京化工大学的刘子鹤团队^[64]通过在酿酒酵母中重构乙酰辅酶 A 和 NADPH 再生途径实现了相较于出发菌株 24 倍的 3-HP 产量提升,产量达到 864.5 mg/L。中国科学院大连化学物理研究所周雍进团队^[65]通过在酿酒酵母中,重构丙二酰辅酶 A 还原酶,在前体物质丙二酰辅酶 A 和 NADPH 充足条件下,补料分批发酵条件下,生物反应器中 3-HP 产量达到 56.5 g/L,是迄今在工程微生物中利用葡萄糖生产 3-HP 的最高产量,产率达到 0.31 g/g 葡萄糖,是理论产率的 41.3%。作为丙烯酸及其衍生物的前体,在工程酵母菌 *S. cerevisiae* 中表达丙二酰辅酶 A 还原酶(malonyl-CoA

reductase, MCR) 合成产生 (9.8 ± 0.4) g/L 的 3-HP^[66], 在 *P. pastoris* 中, 过表达丙二酰辅酶 A 还原酶和删除产生副产物 D-阿拉伯糖醇的主要基因 D-阿拉伯糖醇脱氢酶(D-arabitol dehydrogenase)基因 *ArDH*, 在补料分批发酵生物反应器中, 3-HP 的产量提高到 37.1 g/L^[67], 因此, 降低副产物产量仍然是提高 3-HP 产量的有效手段。通过代谢工程改造酵母应用于 3-HP 的生产将为生物合成进一步替代传统的石油工业打下基础, 为工业绿色化创造可能。

2.5 衣康酸(2-甲基丁二酸, itaconic acid, IA)

衣康酸由于结构中存在一个乙烯基键和 2 个羧基, 在生物聚合物工业中有广泛的应用, 合成衣康酸的微生物主要是丝状真菌土霉菌(*Aspergillus terreus*), 产量达到 150.0 g/L^[68-70]; 除了 *A. terreus*, 黑粉菌(*Ustilago maydis*)也是一种很有前途的衣康酸生产宿主, 产量可达到 220.0 g/L^[71]。然而, 在工程化酵母中, 衣康酸产量一直很低, 不超过 10.0 g/L, 如工程酵母 *Y. lipolytica* 的产量是 4.6 g/L^[69,72], 在酵母 *P. kudriavzevii* 中, 通过突变柠檬酸脱氢酶基因和异源超表达线粒体三羧酸转运蛋白和顺式乌头酸脱羧酶, IA 在反应器中产量达到 1.2 g/L^[73], Young 等^[74]通过优化多步途径, 酿酒酵母衣康酸的合成量达到 815.0 mg/L。然而最近, 在工程菌株 *Y. lipolytic* 中, 以地沟油作为唯一碳源, 衣康酸的产量达到 54.6 g/L, 这是以工程酵母作为细胞工厂获得的最高衣康酸产量, 产率达到 0.30 g/g 地沟油^[75]。Xu 和 Li^[76]通过在酿酒酵母中超表达线粒体 ATP/ADP 转运蛋白, 从而利用酒精合成了衣康酸。由于酵母菌的耐酸特性, 在发酵过程中不需要 pH 调节, 酵母菌作为生产衣康酸的工业底盘, 具有巨大潜力。

2.6 其他高值有机酸

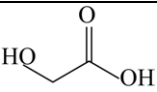
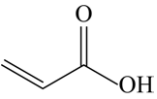
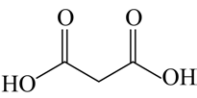
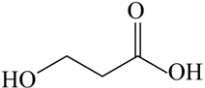
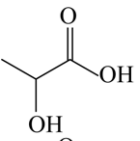
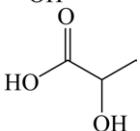
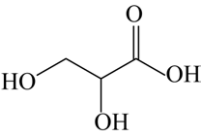
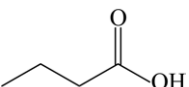
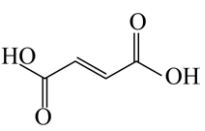
丙二酸(malonic acid)是一种平台化学品, 可以用来生产高附加值的化合物, 也可以作为聚

合物和聚酯的前体。作为一种具有高附加值的化合物, 丙二酸被应用于制药、电子和香精香料等行业, 江南大学邓禹团队^[77]在酿酒酵母中通过丙二酰-CoA 途径构建了丙二酸生物合成途径, 通过对来源于的 3-羟基异丁酰-CoA 水解酶(由 EHD3 编码)的 F121 和 E124 位点突变从而使 Ehd3 获得丙二酰-CoA 水解酶的活性, 在分批补料发酵反应器中, 丙二酸产量达到 1.6 g/L。木糖酸(xylonic acid, XA)是化合物的重要中间体, 重组酵母 *P. kudriavzevii* VTT C-79090T 在低 pH 发酵条件下, 能合成 146.0 g/L 的 D-xylonate, 产率达到 1.00 g/g D-木糖^[78]。葡萄糖酸作为一种温和有机酸, 葡萄糖酸及其衍生物得到了广泛的应用和关注, 表达葡萄糖氧化酶的酵母 *S. cerevisiae* 细胞壁作为转化平台, 可用于蔗糖转化高效转化为葡萄糖^[79]; 隐球酵母(*Cryptococcus podzolicus*) OY-1 产生 20.7 g/L 葡萄糖酸^[80]。D-葡萄糖醛酸(glucuronic acid)的游离形式不稳定, 一般以更稳定的呋喃环 3,6-内酯形式存在, Gupta 等^[81]通过在 *S. cerevisiae* 中异源表达肌醇氧化酶, 第一次实现了在工程化酵母中, 葡萄糖醛酸的从头合成; 重组酵母 *S. cerevisiae* Bga-4 异源表达透明颤菌(*Vitreoscilla*)血红蛋白, 提高了葡萄糖醛酸的合成量至 6.4 g/L^[82]。以上这些有机酸目前在酵母中的合成研究较少, 但是这些有机酸都具有一定的应用前景, 值得进一步挖掘。

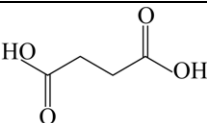
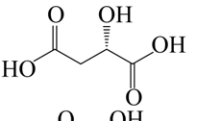
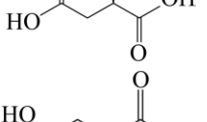
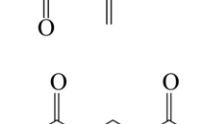
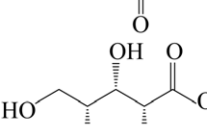
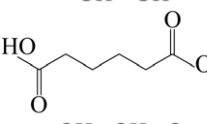
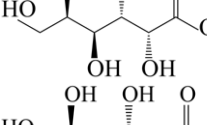
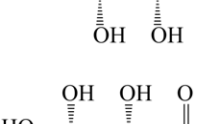
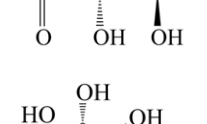
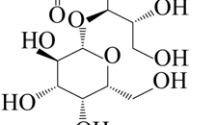
3 总结与展望

利用酵母产有机酸具有良好的优势和发展前景, 来自不同种属的酵母, 包括模式酵母 *S. cerevisiae* 和非常规酵母 *A. pullulans*、*C. sonorensis*、*C. tropicalis*、*C. podzolicus*、*K. lactis*、*S. stipitis*、*P. kudriavzevii*、*P. pastoris*、*Y. lipolytica*、*Z. bailii* 和 *Z. rouxii*, 这些酵母中既有天然酵母, 也有工程酵母(表 1)。

表 1 高价值有机酸的特性、主要用途及合成的酵母宿主^[10]Table 1 Characteristics, main application and synthetic yeast host of high-value organic acid^[10]

Organic acid	Structural formula	Molecular formula	Main applications	Substrate	Maximum production yield (g/L)*	Theoretical yield	Actual yield	Synthetic yeast host and related references
Glycolic acid		C ₂ H ₄ O ₃	Cosmetics and biopolymer precursor	Ethanol ^[60]	15.0 ^[60]	1.65 g/g ethanol ^[60]	0.52 g/g ethanol ^[60]	<i>Kluyveromyces lactis</i> ^[60] , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ^[60-61]
Acrylic acid		C ₃ H ₄ O ₂	Coating, adhesives and detergents	—	—	—	—	—
Malonic acid		C ₃ H ₄ O ₄	Polymers and polyesters Precursors	Glucose ^[77]	1.6 ^[77]	—	—	<i>S. cerevisiae</i> ^[77]
3-hydroxypropionic acid		C ₃ H ₆ O ₃	Plastics, coatings, adhesives, and chemical precursor	Glucose ^[65]	56.5 ^[65]	0.75 g/g glucose ^[65]	0.31 g/g glucose ^[65]	<i>S. cerevisiae</i> ^[63-66] , <i>Pichia pastoris</i> ^[67]
Lactic acid	 	C ₃ H ₆ O ₃	Food additives and polymer precursor	Glucose ^[50]	154.0 ^[50]	—	0.72 g/g glucose ^[37]	<i>Candida sonorensis</i> ^[48] , <i>Kluyveromyces lactis</i> ^[51] , <i>S. cerevisiae</i> ^[43-46] , <i>Pichia kudriavzevii</i> ^[50] , <i>P. pastoris</i> ^[49] , <i>Zygosaccharomyces bailii</i> ^[47]
Glyceric acid		C ₃ H ₆ O ₄	Drugs, surfactants, and polymers precursor	—	—	—	—	—
Butyric acid		C ₄ H ₈ O ₂	Food additive and feed supplement	—	—	—	—	—
Fumaric acid		C ₄ H ₄ O ₄	Polymer building block, food and feed additive	Glucose ^[37]	93.9 ^[37]	1.29 g/g glucose ^[37]	0.78 g/g glucose ^[37]	<i>Aureobasidium pullulans</i> ^[36] , <i>Scheffersomyces stipitis</i> ^[34] , <i>S. cerevisiae</i> ^[33] , <i>P. pastoris</i> ^[37]

(待续)

Organic acid	Structure	Molecular formula	Main applications	Substrate	Maximum production yield (g/L)*	Theoretical yield	Actual yield	Synthetic yeast host and related references
Succinic acid		C ₄ H ₆ O ₄	Polymer building block and chemical precursor	Crude glycerol ^[22]	209.7 ^[22]	—	—	<i>S. cerevisiae</i> ^[29] , <i>P. kudriavzevii</i> ^[32] , <i>Yarrowia lipolytica</i> ^[19-28,30-31] , <i>Z. rouxii</i> ^[38]
Malic acid		C ₄ H ₆ O ₅	Polymer intermediate and food additive	Glucose ^[38]	74.9 ^[38]	—	0.39 g/g glucose ^[38]	<i>S. cerevisiae</i> ^[39,41-42] , <i>P. pastoris</i> ^[40] , <i>Z. rouxii</i> ^[38]
Itaconic acid		C ₅ H ₆ O ₄	Coatings, detergents and polymer building block	Waste cooking oil ^[75]	54.6 ^[75]	—	0.30 g/g waste cooking oil ^[75]	<i>S. cerevisiae</i> ^[73,75] , <i>P. kudriavzevii</i> ^[72] , <i>Y. lipolytica</i> ^[71,74]
a-ketoglutaric acid		C ₅ H ₆ O ₅	Chemicals precursor	—	—	—	—	—
Xylonic acid		C ₅ H ₁₀ O ₆	Polymer precursor	D xylose ^[78]	171.0 ^[78]	—	1.00 g/g D xylose ^[78]	<i>P. kudriavzevii</i> ^[78]
Adipic acid		C ₆ H ₁₀ O ₄	Nylon and polymer precursor	Glucose ^[53]	12.1 ^[53]	—	—	<i>C. tropicalis</i> ^[53] , <i>S. cerevisiae</i> ^[54-56]
Galactonic acid		C ₆ H ₁₂ O ₇	Detergents, solvents and paints	—	—	—	—	—
Gluconic acid		C ₆ H ₁₂ O ₇	Food additive and pharmaceutical ingredient	Glucose ^[80]	20.7 ^[80]	—	—	<i>Cryptococcus podzolicus</i> ^[80] , <i>S. cerevisiae</i> ^[79]
Glucaric acid		C ₆ H ₁₀ O ₈	Detergent builder and polymer building block	Glucose ^[82]	6.4 ^[82]	—	—	<i>S. cerevisiae</i> ^[81-82]
Lactobionic acid		C ₁₂ H ₂₂ O ₁₂	Cosmetics, personal care and pharmaceutical products	—	—	—	—	—

✉: cjb@im.ac.cn

目前利用酵母菌产有机酸存在的问题是与其他微生物比较,有机酸浓度较低,副产物较多,未来可以在以下几个方面聚焦研究。

(1) 开发高效的有机酸生产底盘酵母细胞,提高非常规酵母遗传操作效率。多种非常规酵母具有天然较好的耐酸性,是良好的有机酸出发菌株,但很多非常规酵母的遗传改造效率还有待提高,未来随着精准基因组编辑技术的进展,有望快速提高酵母菌产酸效率。

(2) 深入理解酵母菌产酸的分子调控机制。目前对酵母菌产有机酸的研究多停留在途径酶和转运蛋白等研究上^[83],但是对酵母菌合成有机酸的分子调控机制还了解甚少,限制了代谢工程的高效改造。未来多组学技术的应用和酵母功能基因组学的进展将有助于进一步加深对酵母产有机酸的调控机制认识,提高代谢工程改造效率。

(3) 酵母有机酸生产目前很多停留在实验室研究,工业放大研究相关的认知还不够深入,比如,很多研究利用酵母粉蛋白胨等丰富培养基进行产酸评价,但工业生产的培养基相对贫瘠,利用木质纤维素水解液产有机酸还涉及到水解液中抑制物的影响等,因此需要进行系统性的菌种改造和工艺优化。

(4) 随着合成生物学、计算技术的应用发展,通过代谢网络计算模拟评估酵母产生有机酸的潜力,构建产酸菌株,必将有利于工业菌种的定向合成。

REFERENCES

- [1] Markets and Markets. Bioplastics & biopolymers market by type (non-biodegradable/bio-based, biodegradable), end-use industry (packaging, consumer goods, automotive & transportation, textiles, agriculture & horticulture), region-global forecast to 2025[R]. Report, 2020.
- [2] LEE JW, KIM HU, CHOI S, YI J, LEE SY. Microbial production of building block chemicals and polymers[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2011, 22(6): 758-767.
- [3] DEGLI ESPOSTI M, MORSELLI D, FAVA F, BERTIN L, CAVANI F, VIAGGI D, FABBRI P. The role of biotechnology in the transition from plastics to bioplastics: an opportunity to reconnect global growth with sustainability[J]. *FEBS Open Bio*, 2021, 11(4): 967-983.
- [4] CHEN Y, NIELSEN J. Biobased organic acids production by metabolically engineered microorganisms[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2016, 37: 165-172.
- [5] PORRO D, BRANDUARDI P. Production of organic acids by yeasts and filamentous fungi[M]//*Biotechnology of Yeasts and Filamentous Fungi*. Cham: Springer International Publishing, 2017: 205-223.
- [6] LIAUD N, GINIÉS C, NAVARRO D, FABRE N, CRAPART S, GIMBERT IH, LEVASSEUR A, RAOUCHE S, SIGOILLOT JC. Exploring fungal biodiversity: organic acid production by 66 strains of filamentous fungi[J]. *Fungal Biology and Biotechnology*, 2014, 1(1): 1-10.
- [7] SAUER M, PORRO D, MATTANOVICH D, BRANDUARDI P. Microbial production of organic acids: expanding the markets[J]. *Trends in Biotechnology*, 2008, 26(2): 100-108.
- [8] 张媛媛, 曾艳, 王钦宏. 合成生物制造进展[J]. *合成生物学*, 2021, 2(2): 145-160.
ZHANG YY, ZENG Y, WANG QH. Advances in synthetic biomanufacturing[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2021, 2(2): 145-160 (in Chinese).
- [9] BECKER J, LANGE AN, FABARIUS J, WITTMANN C. Top value platform chemicals: bio-based production of organic acids[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2015, 36: 168-175.
- [10] ALONSO S, RENDUELES M, DÍAZ M. Microbial production of specialty organic acids from renewable and waste materials[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2015, 35(4): 497-513.
- [11] LIU JJ, LI JH, SHIN HD, LIU L, DU GC, CHEN J. Protein and metabolic engineering for the production of organic acids[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 239:

- 412-421.
- [12] 王颖珊, 郭峰, 严伟, 信丰学, 章文明, 姜岷. 四碳有机酸生物合成的代谢工程研究进展[J]. 生物工程学报, 2021, 37(5): 1697-1720.
- WANG YS, GUO F, YAN W, XIN FX, ZHANG WM, JIANG M. Advances in the metabolic engineering for the production of tetracarbon organic acids[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(5): 1697-1720 (in Chinese).
- [13] 张勤, 张梁, 丁重阳, 王正祥, 石贵阳. 代谢工程改造野生耐酸酵母生产 L-乳酸[J]. 生物工程学报, 2011, 27(7): 1024-1031.
- ZHANG Q, ZHANG L, DING CY, WANG ZX, SHI GY. Metabolic engineering of wild acid-resistant yeast for L-lactic acid production[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2011, 27(7): 1024-1031 (in Chinese).
- [14] 荣兰新, 刘士琦, 朱坤, 孔婧, 苗琳, 王淑慧, 肖冬光, 于爱群. 代谢工程改造解脂耶氏酵母合成羧酸的研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(4): 1360-1372.
- RONG LX, LIU SQ, ZHU K, KONG J, MIAO L, WANG SH, XIAO DG, YU AQ. Production of carboxylic acids by metabolically engineered *Yarrowia lipolytica*: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(4): 1360-1372 (in Chinese).
- [15] 张金宏, 崔志勇, 祁庆生, 侯进. 解脂耶氏酵母表达调控工具的开发及天然产物合成的研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(2): 478-505.
- ZHANG JH, CUI ZY, QI QS, HOU J. The recent advances in developing gene editing and expression tools and the synthesis of natural products in *Yarrowia lipolytica*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(2): 478-505 (in Chinese).
- [16] WERP T, PETERSEN G. Top Value Added Chemicals from Biomass: Volume I—Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas[M], US Department of Energy, Oak Ridge, TN, USA 2004.
- [17] LIU XT, ZHAO G, SUN SJ, FAN CL, FENG XJ, XIONG P. Biosynthetic pathway and metabolic engineering of succinic acid[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2022, 10: 843887.
- [18] BABAEI M, RUEKSOMTAWIN KILDEGAARD K, NIAEI A, HOSSEINI M, EBRAHIMI S, SUDARSAN S, ANGELIDAKI I, BORODINA I. Engineering oleaginous yeast as the host for fermentative succinic acid production from glucose[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2019, 7: 361.
- [19] CUI Z, GAO C, LI J, HOU J, LIN CSK, QI Q. Engineering of unconventional yeast *Yarrowia lipolytica* for efficient succinic acid production from glycerol at low pH[J]. Metabolic Engineering, 2017, 42: 126-133.
- [20] YANG XF, WANG HM, LI C, LIN CSK. Restoring of glucose metabolism of engineered *Yarrowia lipolytica* for succinic acid production via a simple and efficient adaptive evolution strategy[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(20): 4133-4139.
- [21] BONDARENKO PY, FEDOROV AS, SINEOKY SP. Optimization of repeated-batch fermentation of a recombinant strain of the yeast *Yarrowia lipolytica* for succinic acid production at low pH[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2017, 53(9): 882-887.
- [22] LI C, GAO S, YANG X, LIN CSK. Green and sustainable succinic acid production from crude glycerol by engineered *Yarrowia lipolytica* via agricultural residue based *in situ* fibrous bed bioreactor[J]. Bioresource Technology, 2018, 249: 612-619.
- [23] LI C, ONG KL, YANG X, LIN CSK. Bio-refinery of waste streams for green and efficient succinic acid production by engineered *Yarrowia lipolytica* without pH control[J]. Chemical Engineering Journal, 2019, 371: 804-812.
- [24] LI C, YANG X, GAO S, CHUH AH, LIN CSK. Hydrolysis of fruit and vegetable waste for efficient succinic acid production with engineered *Yarrowia lipolytica*[J]. Journal of Cleaner Production, 2018, 179: 151-159.
- [25] BILLERACH G, PREZIOSI-BELLOY L, LIN CSK, FULCRAND H, DUBREUCQ E, GROUSSEAU E. Impact of nitrogen deficiency on succinic acid production by engineered strains of *Yarrowia lipolytica*[J]. Journal of Biotechnology, 2021, 336: 30-40.
- [26] STYLIANOU E, PATERAKI C, LADAKIS D, DAMALA C, VLYSIDIS A, LATORRE-SÁNCHEZ M, COLL C, LIN CSK, KOUTINAS A. Bioprocess development using organic biowaste and sustainability assessment of succinic acid production with engineered *Yarrowia lipolytica* strain[J]. Biochemical Engineering Journal, 2021, 174: 108099.

- [27] JIANG ZN, CUI ZY, ZHU ZW, LIU YH, TANG YJ, HOU J, QI QS. Engineering of *Yarrowia lipolytica* transporters for high-efficient production of biobased succinic acid from glucose[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2021, 14(1): 1-10.
- [28] NARISSETTY V, PRABHU AA, BOMMAREDDY RR, COX R, AGRAWAL D, MISRA A, ALI HAIDER M, BHATNAGAR A, PANDEY A, KUMAR V. Development of hypertolerant strain of *Yarrowia lipolytica* accumulating succinic acid using high levels of acetate[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2022, 10(33): 10858-10869.
- [29] XIBERRAS J, KLEIN M, de HULSTER E, MANS R, NEVOIGT E. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for succinic acid production from glycerol and carbon dioxide[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 566.
- [30] PRABHU AA, LEDESMA-AMARO R, LIN CSK, COULON F, THAKUR VK, KUMAR V. Bioproduction of succinic acid from xylose by engineered *Yarrowia lipolytica* without pH control[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2020, 13(1): 1-15.
- [31] 于青林, 孟令莉, 霍海亮, 高翠娟. 重组解脂酵母发酵生产琥珀酸的条件优化[J]. *食品与发酵工业*, 2018, 44(4): 119-123.
- YU QL, MENG LL, HUO HL, GAO CJ. Fermentation optimization of recombinant *Yarrowia lipolytica* for its efficient succinic acid production[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2018, 44(4): 119-123 (in Chinese).
- [32] XI YY, ZHAN T, XU HT, CHEN J, BI CH, FAN FY, ZHANG XL. Characterization of JEN family carboxylate transporters from the acid-tolerant yeast *Pichia kudriavzevii* and their applications in succinic acid production[J]. *Microbial Biotechnology*, 2021, 14(3): 1130-1147.
- [33] XU GQ, LIU LM, CHEN J. Reconstruction of cytosolic fumaric acid biosynthetic pathways in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2012, 11(1): 1-10.
- [34] WEI L, LIU J, QI H, WEN J. Engineering *Scheffersomyces stipitis* for fumaric acid production from xylose[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 187: 246-254.
- [35] CAO N, DU J, GONG CS, TSAO GT. Simultaneous production and recovery of fumaric acid from immobilized *Rhizopus oryzae* with a rotary biofilm contactor and an adsorption column[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(8): 2926-2931.
- [36] WANG GY, BAI TT, MIAO ZG, NING WG, LIANG WX. Simultaneous production of single cell oil and fumaric acid by a newly isolated yeast *Aureobasidium pullulans* var. *aubasidani* DH177[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2018, 41(11): 1707-1716.
- [37] WEI X, ZHANG M, WANG GY, LIU GL, CHI ZM, CHI Z. The ornithine-urea cycle involves fumaric acid biosynthesis in *Aureobasidium pullulans* var. *aubasidani*, a green and eco-friendly process for fumaric acid production[J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2022, 8(1): 33-45.
- [38] TAING O, TAING K. Production of malic and succinic acids by sugar-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*[J]. *European Food Research and Technology*, 2007, 224: 343-347.
- [39] CHEN XL, WANG YC, DONG XX, HU GP, LIU LM. Engineering rTCA pathway and C4-dicarboxylate transporter for L-malic acid production[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(10): 4041-4052.
- [40] ZHANG T, GE CY, DENG L, TAN TW, WANG F. C4-dicarboxylic acid production by overexpressing the reductive TCA pathway[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2015, 362(9): fmv052.
- [41] PANDURIC N, SALIC A, ZELIC B. Fully integrated biotransformation of fumaric acid by permeabilized baker's yeast cells with *in situ* separation of L-malic acid using ultrafiltration, acidification and electrodialysis[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2017, 125: 221-229.
- [42] MENEGATTI T, ŽNIDARŠIĆ-PLAZL P. Copolymeric hydrogel-based immobilization of yeast cells for continuous biotransformation of fumaric acid in a microreactor[J]. *Micromachines*, 2019, 10(12): 867.
- [43] 梁欣泉, 李宁, 任勤, 刘继栋. 代谢工程改造酿酒酵母生产 L-乳酸的研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2016, 36(2): 109-114.
- LIANG XQ, LI N, REN Q, LIU JD. Progress in the metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for L-lactic acid production[J]. *China Biotechnology*, 2016, 36(2): 109-114 (in Chinese).

- [44] BAEK SH, KWON EY, KIM YH, HAHN JS. Metabolic engineering and adaptive evolution for efficient production of D-lactic acid in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(6): 2737-2748.
- [45] JANG BK, JU YB, JEONG D, JUNG SK, KIM CK, CHUNG YS, KIM SR. L-lactic acid production using engineered *Saccharomyces cerevisiae* with improved organic acid tolerance[J]. Journal of Fungi, 2021, 7(11): 928.
- [46] WATCHARAWIPAS A, SAE-TANG K, SANSATCHANON K, SUDYING P, BOONCHOO K, TANAPONGPIPAT S, KOCHARIN K, RUNGUPHAN W. Systematic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for D-lactic acid production with near theoretical yield[J]. FEMS Yeast Research, 2021, 21(4): foab024.
- [47] KUANYISHEV N, RAO CV, DIEN B, JIN YS. Domesticating a food spoilage yeast into an organic acid-tolerant metabolic engineering host: lactic acid production by engineered *Zygosaccharomyces bailii*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2021, 118(1): 372-382.
- [48] KOIVURANTA KT, ILMÉN M, WIEBE MG, RUOHONEN L, SUOMINEN P, PENTTILÄ M. L-lactic acid production from D-xylose with *Candida sonorensis* expressing a heterologous lactate dehydrogenase encoding gene[J]. Microbial Cell Factories, 2014, 13(1): 1-14.
- [49] MELO N, MULDER K, NICOLA A, CARVALHO L, MENINO G, MULINARI E, PARACHIN N. Effect of pyruvate decarboxylase knockout on product distribution using *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) engineered for lactic acid production[J]. Bioengineering, 2018, 5(1): 17.
- [50] PARK HJ, BAE JH, KO HJ, LEE SH, SUNG BH, HAN JI, SOHN JH. Low-pH production of d-lactic acid using newly isolated acid tolerant yeast *Pichia kudriavzevii* NG7[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2018, 115(9): 2232-2242.
- [51] BIANCHI MM, BRAMBILLA L, PROTANI F, LIU CL, LIEVENSE J, PORRO D. Efficient homolactic fermentation by *Kluyveromyces lactis* strains defective in pyruvate utilization and transformed with the heterologous *LDH* gene[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(12): 5621-5625.
- [52] YU JL, XIA XX, ZHONG JJ, QIAN ZG. Direct biosynthesis of adipic acid from a synthetic pathway in recombinant *Escherichia coli*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2014, 111(12): 2580-2586.
- [53] JU JH, OH BR, HEO SY, LEE YU, SHON JH, KIM CH, KIM YM, SEO JW, HONG WK. Production of adipic acid by short- and long-chain fatty acid acyl-CoA oxidase engineered in yeast *Candida tropicalis*[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2020, 43(1): 33-43.
- [54] ZHANG X, LIU Y, WANG J, ZHAO Y, DENG Y. Biosynthesis of adipic acid in metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. The Journal of Microbiology, 2020, 58(12): 1065-1075.
- [55] 张熙, 李国辉, 周胜虎, 毛银, 赵运英, 邓禹. 酿酒酵母异源合成己二酸[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(7): 1-9.
- ZHANG X, LI GH, ZHOU SH, MAO Y, ZHAO YY, DENG Y. Production of adipic acid in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(7): 1-9 (in Chinese).
- [56] RAJ K, PARTOW S, CORREIA K, KHUSNUTDINOVA AN, YAKUNIN AF, MAHADEVAN R. Biocatalytic production of adipic acid from glucose using engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Metabolic Engineering Communications, 2018, 6: 28-32.
- [57] KARLSSON E, MAPELLI V, OLSSON L. Adipic acid tolerance screening for potential adipic acid production hosts[J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16(1): 1-17.
- [58] FLETCHER E, MERCURIO K, WALDEN EA, BAETZ K. A yeast chemogenomic screen identifies pathways that modulate adipic acid toxicity[J]. iScience, 2021, 24(4): 102327.
- [59] SALUSJÄRVI L, HAVUKAINEN S, KOIVISTOINEN O, TOIVARI M. Biotechnological production of glycolic acid and ethylene glycol: current state and perspectives[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(6): 2525-2535.
- [60] KOIVISTOINEN OM, KUIVANEN J, BARTH D, TURKIA H, PITKÄNEN JP, PENTTILÄ M, RICHARD P. Glycolic acid production in the engineered yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*[J]. Microbial Cell Factories,

- 2013, 12(1): 1-16.
- [61] SALUSJÄRVI L, TOIVARI M, VEHKOMÄKI ML, KOIVISTOINEN O, MOJZITA D, NIEMELÄ K, PENTTILÄ M, RUOHONEN L. Production of ethylene glycol or glycolic acid from D-xylose in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(22): 8151-8163.
- [62] 于新磊, 毛雨丰, 张晓霞, 陆凌雪, 王智文, 陈涛. 生物法生产 3-羟基丙酸研究进展[J]. 化工进展, 2018, 37(11): 4427-4436.
- YU XL, MAO YF, ZHANG XX, LU LX, WANG ZW, CHEN T. Recent progress in microbial production of 3-hydroxypropionic acid[J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2018, 37(11): 4427-4436 (in Chinese).
- [63] KILDEGAARD KR, HALLSTRÖM BM, BLICHER TH, SONNENSCHN N, JENSEN NB, SHERSTYK S, HARRISON SJ, MAURY J, HERRGÅRD MJ, JUNCKER AS, FORSTER J, NIELSEN J, BORODINA I. Evolution reveals a glutathione-dependent mechanism of 3-hydroxypropionic acid tolerance[J]. Metabolic Engineering, 2014, 26: 57-66.
- [64] QIN N, LI LY, JI X, LI XW, ZHANG YM, LARSSON C, CHEN Y, NIELSEN J, LIU ZH. Rewiring central carbon metabolism ensures increased provision of acetyl-CoA and NADPH required for 3-OH-propionic acid production[J]. ACS Synthetic Biology, 2020, 9(12): 3236-3244.
- [65] YU W, CAO X, GAO J, ZHOU YJ. Overproduction of 3-hydroxypropionate in a super yeast chassis[J]. Bioresource Technology, 2022, 361: 127690.
- [66] KILDEGAARD KR, JENSEN NB, SCHNEIDER K, CZARNOTTA E, ÖZDEMİR E, KLEIN T, MAURY J, EBERT BE, CHRISTENSEN HB, CHEN Y, KIM IK, HERRGÅRD MJ, BLANK LM, FORSTER J, NIELSEN J, BORODINA I. Engineering and systems-level analysis of *Saccharomyces cerevisiae* for production of 3-hydroxypropionic acid via malonyl-CoA reductase-dependent pathway[J]. Microbial Cell Factories, 2016, 15(1): 1-13.
- [67] FINA A, HEUX S, ALBIOL J, FERRER P. Combining metabolic engineering and multiplexed screening methods for 3-hydroxypropionic acid production in *Pichia pastoris*[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2022, 10: 942304.
- [68] ZHAO ML, LU XY, ZONG H, LI JY, ZHUGE B. Itaconic acid production in microorganisms[J]. Biotechnology Letters, 2018, 40(3): 455-464.
- [69] 高寅岭, 张凤娇, 赵贵众, 张宏森, 王风芹, 宋安东. 衣康酸发酵研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2021, 41(5): 105-113.
- GAO YL, ZHANG FJ, ZHAO GZ, ZHANG HS, WANG FQ, SONG AD. Research progress of itaconic acid fermentation[J]. China Biotechnology, 2021, 41(5): 105-113 (in Chinese).
- [70] KRULL S, HEVEKERL A, KUENZ A, PRÜBE U. Process development of itaconic acid production by a natural wild type strain of *Aspergillus terreus* to reach industrially relevant final titers[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(10): 4063-4072.
- [71] HOSSEINPOUR TEHRANI H, BECKER J, BATOR I, SAUR K, MEYER S, RODRIGUES LÓIA AC, BLANK LM, WIERCKX N. Integrated strain- and process design enable production of 220 gL⁻¹ itaconic acid with *Ustilago maydis*[J]. Biotechnology for Biofuels, 2019, 12(1): 1-11.
- [72] BLAZECK J, HILL A, JAMOSSI M, PAN A, MILLER J, ALPER HS. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for itaconic acid production[J]. Metabolic Engineering, 2015, 32: 66-73.
- [73] SUN W, VILA-SANTA A, LIU N, PROZOROV T, XIE DM, FARIA NT, FERREIRA FC, MIRA NP, SHAO ZY. Metabolic engineering of an acid-tolerant yeast strain *Pichia kudriavzevii* for itaconic acid production[J]. Metabolic Engineering Communications, 2020, 10: e00124.
- [74] YOUNG EM, ZHAO Z, GIELESEN BEM, WU L, BENJAMIN GORDON D, ROUBOS JA, VOIGT CA. Iterative algorithm-guided design of massive strain libraries, applied to itaconic acid production in yeast[J]. Metabolic Engineering, 2018, 48: 33-43.
- [75] RONG LX, MIAO L, WANG SH, WANG YP, LIU SQ, LU ZH, ZHAO BX, ZHANG CY, XIAO DG, PUSHANATHAN K, WONG A, YU AQ. Engineering *Yarrowia lipolytica* to produce itaconic acid from waste cooking oil[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2022, 10: 888869.
- [76] XU YY, LI ZM. Utilization of ethanol for itaconic acid

- biosynthesis by engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. FEMS Yeast Research, 2021, 21(6): foab043.
- [77] LI S, FU W, SU R, ZHAO Y, DENG Y. Metabolic engineering of the malonyl-CoA pathway to efficiently produce malonate in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Metabolic Engineering, 2022, 73: 1-10.
- [78] TOIVARI M, VEHKOMÄKI ML, NYGÅRD Y, PENTTILÄ M, RUOHONEN L, WIEBE MG. Low pH D-xylonate production with *Pichia kudriavzevii*[J]. Bioresource Technology, 2013, 133: 555-562.
- [79] KOVACEVIC G, ELGAHWASH R, BLAZIC M, PANTIĆ N. Production of fructose and gluconic acid from sucrose with cross-linked yeast cell walls expressing glucose oxidase on the surface[J]. Molecular Catalysis, 2022, 522: 112215.
- [80] 信丰学, 章文明, 钱秀娟, 周大伟, 董维亮, 周杰, 姜岷. 一株联产油脂与葡萄糖酸的产油酵母菌及其应用: CN112760242A[P]. 2021-05-07.
- XIN FX, ZHANG WM, QIAN XJ, ZHOU DW, DONG WL, ZHOU J, JIANG M. Oleaginous saccharomycetes for co-production of grease and gluconic acid and application thereof: CN112760242A[P]. 2021-05-07 (in Chinese).
- [81] GUPTA A, HICKS MA, MANCHESTER SP, PRATHER KLJ. Porting the synthetic D-glucaric acid pathway from *Escherichia coli* to *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnology Journal, 2016, 11(9): 1201-1208.
- [82] ZHANG X, XU C, LIU YL, WANG J, ZHAO YY, DENG Y. Enhancement of glucaric acid production in *Saccharomyces cerevisiae* by expressing *Vitreoscilla hemoglobin*[J]. Biotechnology Letters, 2020, 42(11): 2169-2178.
- [83] ZHANG M, ZHANG K, MEHMOOD MA, ZHAO ZK, BAI F, ZHAO X. Deletion of acetate transporter gene *ADY2* improved tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* against multiple stresses and enhanced ethanol production in the presence of acetic acid[J]. Bioresource Technology, 2017, 245: 1461-1468.

(本文责编 陈宏宇)