

• 综 述 •

## 代谢工程改造解脂耶氏酵母合成羧酸的研究进展

荣兰新, 刘士琦, 朱坤, 孔婧, 苗琳, 王淑慧, 肖冬光, 于爱群

天津科技大学 生物工程学院 食品营养与安全国家重点实验室 工业发酵微生物教育部重点实验室,  
天津 300457

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. 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. Chin J Biotech, 2022, 38(4): 1360-1372.

**摘 要:** 解脂耶氏酵母是一种具有独特生理代谢特征的非常规酵母。它具有可以利用多种廉价碳源、低 pH 值耐受性好、分泌能力强等优点, 因此非常适合用于各种工业产品的微生物发酵。目前, 解脂耶氏酵母已被证实具有高效生产多种 (同源或异源) 有机羧酸的能力。本文对近年来利用代谢工程及合成生物学技术改造解脂耶氏酵母生产羧酸的实例进行了总结, 并重点介绍了所用的代谢工程策略。最后, 本文讨论了目前使用解脂耶氏酵母生产羧酸的瓶颈及解决方法, 期望为后续相关研究提供有价值的参考。

**关键词:** 解脂耶氏酵母; 非常规酵母; 羧酸; 代谢工程; 合成生物学

## Production of carboxylic acids by metabolically engineered *Yarrowia lipolytica*: a review

RONG Lanxin, LIU Shiqi, ZHU Kun, KONG Jing, MIAO Lin, WANG Shuhui,  
XIAO Dongguang, YU Aiqun

Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology of the Ministry of Education, State Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

**Abstract:** *Yarrowia lipolytica* is a non-conventional yeast with unique physiological and metabolic

**Received:** August 18, 2021; **Accepted:** October 8, 2021; **Published online:** November 9, 2021

**Supported by:** Natural Science Foundation of Tianjin, China (17JCYBJC40800); Research Foundation of Tianjin Municipal Education Commission, China (2017ZD03)

**Corresponding author:** YU Aiqun. Tel: +86-22-60602723; E-mail: yuaiqun@tust.edu.cn

**基金项目:** 天津市自然科学基金 (17JCYBJC40800); 天津市教委科研计划项目 (2017ZD03)

characteristics. It is suitable for production of various products due to its natural ability to utilize a variety of inexpensive carbon sources, excellent tolerance to low pH, and strong ability to secrete metabolites. Currently, *Y. lipolytica* has been demonstrated to produce a wide range of carboxylic acids with high efficiency. This article summarized the progress in engineering *Y. lipolytica* to produce various carboxylic acids by using metabolic engineering and synthetic biology approaches. The current bottlenecks and solutions for high-level production of carboxylic acids by engineered *Y. lipolytica* were also discussed, with the aim to provide useful information for relevant studies in this field.

**Keywords:** *Yarrowia lipolytica*; non-conventional yeast; carboxylic acid; metabolic engineering; synthetic biology

解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 是一种已被广泛研究的非常规酵母。该酵母为严格好氧的二态生长菌,且通常存在于富含烷烃和脂质等疏水性底物的环境中,例如乳制品、受油脂污染的土壤、含油废水等<sup>[1-2]</sup>。和酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 一样,解脂耶氏酵母也属于一般公认安全 (generally regarded as safe, GRAS) 的工业微生物<sup>[3]</sup>。但与酿酒酵母等其他酵母菌相比,它具有多种更独特的生理和代谢优势。这些优势主要表现在以下几个方面:(1) 它对低温、高盐、酸性 pH 等多种环境胁迫条件均有着很高的耐受性<sup>[4]</sup>;(2) 它可以利用多种底物进行生长,既可以利用葡萄糖、甘油、乙醇等常规碳源,也可以利用烃类、酸类等非常规碳源,还能利用废弃食用油等廉价可再生底物<sup>[5]</sup>;(3) 它是一种产油酵母,细胞内有多条合成乙酰辅酶 A 的代谢途径,所以乙酰辅酶 A 供应充足<sup>[6]</sup>;(4) 它具有天然高效产生和积累油脂、蛋白质和有机酸等化合物的能力<sup>[7-8]</sup>。随着对该酵母基因组测序和注释的完成和对其生理生化代谢及调控的广泛研究<sup>[9]</sup>,目前该非常规酵母在真菌发育和生物合成等微生物基础和应用研究方面均显示出了巨大潜能<sup>[10]</sup>。此外,由于解脂耶氏酵母具有蛋白质表达稳定、安全性好、对低酸碱度及发酵抑制剂的耐受性高、可进行高密度发酵的特性,因此非常适合大规模

工业化发酵生产。目前,该酵母也成为生产各种生化产品的首选微生物细胞工厂之一<sup>[11-12]</sup>。

羧酸是仅由烃基和羧基组成的一类有机酸。它是目前世界范围内通过生物技术方法生产得到的第 3 大类工业产品,产量仅次于抗生素和氨基酸。有机羧酸的应用范围很广,在化工、食品、医药及农药等行业都能够看到它们的身影,市场需求量巨大。目前,大多数有机羧酸的工业化生产主要依赖化学合成,但是利用化学方法生产有机羧酸存在诸多弊端,比如催化剂价格昂贵、反应条件苛刻、生产成本低、污染环境等<sup>[13]</sup>。与化学合成法相比,能够利用可再生生物质材料的微生物合成法具有操作简单、成本低、效率高等优点。而且,很多有机羧酸是微生物的天然产物,它们是一些已知代谢通路中的中间产物或最终产物,因此通过利用先进生物学技术对相关代谢途径进行一系列改造就有可能实现目标羧酸产量的最大化并达到工业化生产水平。总之,微生物合成法正在成为工业生产有机羧酸最具发展潜力的方法。

利用微生物生产羧酸的历史最早可以追溯到 1823 年。此后,随着羧酸市场需求量的不断增长,利用微生物合成法生产各种羧酸慢慢地成为了一种流行趋势<sup>[14]</sup>。进入 21 世纪,随着代谢工程和合成生物学的飞速发展,对微生物的代谢途径进行理性改造不仅能实现对可再生生

物质的有效转变,也可以为羧酸的工业化生产提供更多的技术支持。本文综述了近年来利用代谢工程及合成生物学技术改造羧酸合成的理想微生物底盘细胞——解脂耶氏酵母高效合成部分代表性羧酸的成果。我们所选择介绍的目标产物包括三羧酸循环 (tricarboxylic acid cycle, TCA cycle) 中间产物——柠檬酸、异柠檬酸、 $\alpha$ -酮戊二酸、琥珀酸, TCA 循环中间体衍生物——衣康酸以及完全异源合成途径产物——巴豆酸。其中, TCA 循环中间体可以由解脂耶氏酵母自身代谢产生,因此代谢工程改造过程中所需要进行的遗传操作步骤较少,而且相对来说菌株对它们的耐受性更强。而在解脂耶氏酵母中构建异源途径来生产 TCA 循环中间体衍生物等其他羧酸难度更高、更具挑战性,但目前所获成果已为其大规模工业化生产提供了一个新的微生物宿主来源及可能的生产方式。同时,本文对目前使用解脂耶氏酵母生产羧酸存在的瓶颈及解决对策进行了探讨,期望为后续相关研究提供一定的参考与借鉴。

## 1 柠檬酸

柠檬酸 (citric acid, CA) 被称为天然酸性物质,是一种毒性低且具有不可替代性的多功能酸味剂。它广泛存在于各种柑橘类水果等植物、微生物和动物组织中,在生命体的新陈代谢中起着重要作用<sup>[15]</sup>。柠檬酸的应用范围很广,也是全球市场需求量及产销量最大的有机羧酸。尤其是由于它具有令人愉悦的强烈酸味,因此作为添加剂已在食品、药品、化妆品及日化用品中得到了广泛应用<sup>[16]</sup>。柠檬酸也是利用微生物合成法工业生产羧酸中的首个成功案例,其中,黑曲霉就是被用来大规模生产柠檬酸的工业微生物菌种。但是利用这种丝状真菌

发酵生产柠檬酸存在对生长底物要求高、利用率低的问题,同时利用糖蜜发酵的实际生产过程中还会积累大量的固体和液体废物,造成了一定程度的环境污染问题<sup>[17]</sup>。解脂耶氏酵母也具有生物合成大量柠檬酸的天然代谢能力;而且与黑曲霉相比,利用解脂耶氏酵母来发酵生产柠檬酸具有以下几个优点:对碳质生长底物的选择范围更广,对重金属的敏感性较低,生物安全性更高,因此正在成为该领域的研究热点<sup>[18-19]</sup>。例如,2010年,中国海洋大学的 Liu 等首次利用菊粉培养解脂耶氏酵母成功发酵生产出了柠檬酸<sup>[20]</sup>。菊粉是一种特殊的储藏性碳水化合物,天然存在于菊芋、菊苣、大丽花和雪莲果等植物的根和块茎中<sup>[21]</sup>,经过外菊粉酶的催化可以产生主要产物果糖和次要产物葡萄糖<sup>[22]</sup>。首先,他们将来自马克斯克鲁维酵母的外菊粉酶 (inulinase) 编码基因 *INUI* 连接到表面展示质粒上,并成功实现了该基因在解脂耶氏酵母底盘中的功能性表达 (图 1)。随后,对菊粉作为生长底物培养解脂耶氏酵母的温度、pH 等发酵条件做了优化,最终柠檬酸的摇瓶发酵产量达到了 77.9 g/L<sup>[20]</sup>。2019年,俄罗斯的 Yuzbasheva 等对解脂耶氏酵母线粒体中的柠檬酸转运蛋白做了一系列研究 (图 1)<sup>[23]</sup>。首先,他们敲除了两个解脂耶氏酵母内源编码三羧酸线粒体转运蛋白的基因 *CTP1* 和 *YHM2*,结果表明 *yhm2Δ* 菌株不能在含有柠檬酸的培养基中生长,在含有葡萄糖、脂质的培养基中也不再能产生柠檬酸,且异柠檬酸和脂质的产量减少;而 *ctp1Δ* 菌株与野生型菌株并没有明显表型差异。之后,向 *yhm2Δ* 菌株中重新引入内源的 *YHM2* 基因或是来自黑曲霉的 *YHM2* 基因,两个菌株均能在含有柠檬酸的培养基中恢复正常生长,且黑曲霉 *YHM2* 基因的引入将柠檬酸

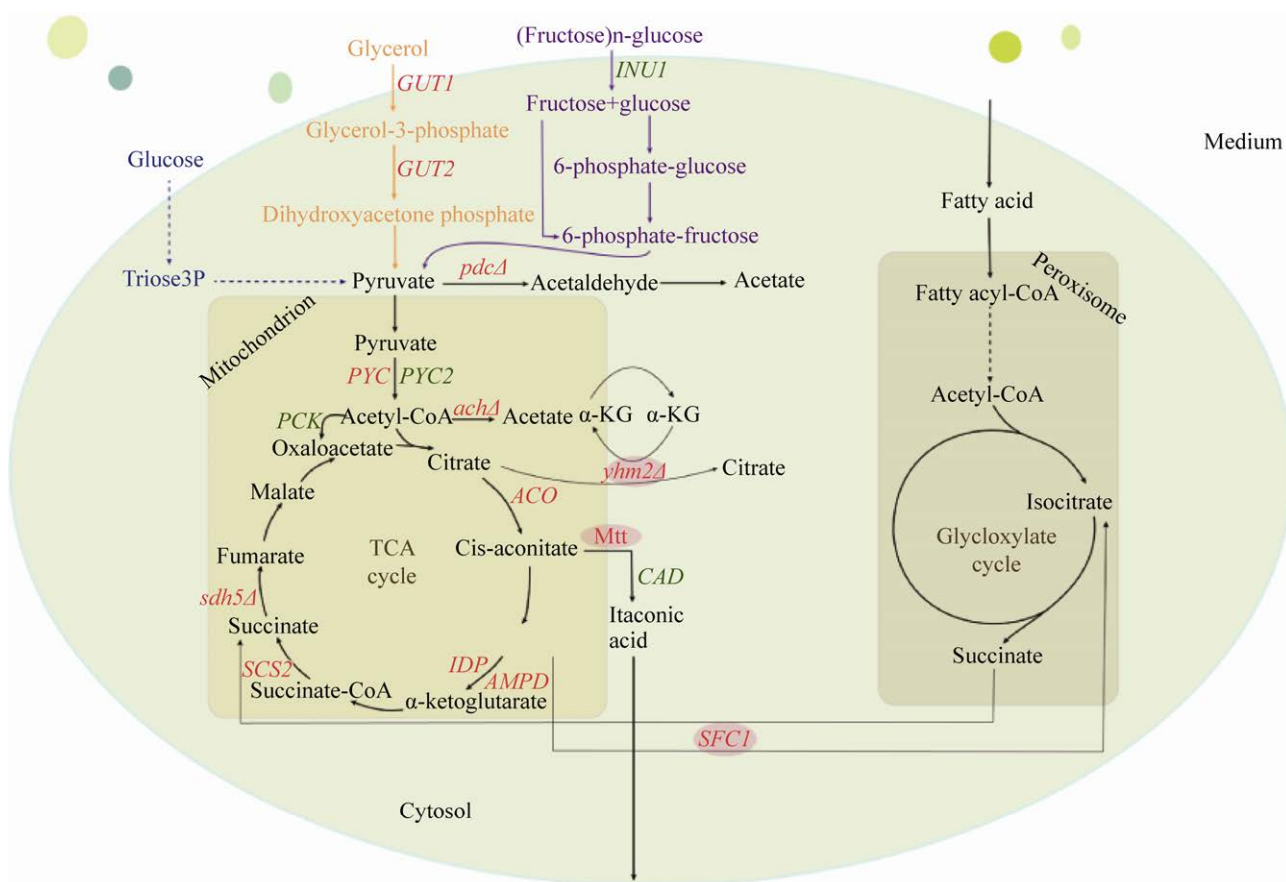


图1 解脂耶氏酵母中有机羧酸合成路径的构建与优化

Figure 1 Engineering the biosynthesis of carboxylic acids in *Y. lipolytica*.

的产量提高了45%。这些结果说明 *YHM2* 基因所编码的蛋白质在解脂耶氏酵母中能够行使转运及积累柠檬酸的功能。进一步研究表明,过表达解脂耶氏酵母的磷酸脱氢酶 (adenosine monophosphate deaminase) 编码基因 *AMPD* 能够导致细胞内 AMP 水平出现下降,而 AMP 是激活异柠檬酸脱氢酶 (isocitrate dehydrogenase) 活性所必需的一种物质,因此 *AMPD* 基因的过表达导致了异柠檬酸无法转化为其下游产物  $\alpha$ -酮戊二酸,这样就增加了柠檬酸和其他 TCA 循环中间体的积累。最终,共表达内源 *YHM2* 与 *AMPD* 基因的解脂耶氏酵母工程菌株经过分批补料发酵产生了 97.1 g/L 的柠檬酸<sup>[23]</sup>。这一研究首次通过改变线粒体转运蛋白编码基因来

优化解脂耶氏酵母 TCA 循环中间产物——柠檬酸的合成,为利用解脂耶氏酵母的 TCA 循环生产其他高价值工业产品提供了新思路。

柠檬酸作为工业上最重要的有机羧酸之一,因其需求量极大,因此继续寻求低成本、高效率、无污染的生产方式和途径就显得尤为重要。近年来,研究者们纷纷利用代谢工程及合成生物学的方法在不同微生物底盘中对柠檬酸的合成进行了优化。其中,解脂耶氏酵母被证明是有望替代黑曲霉工业生产柠檬酸的最为理想的底盘细胞之一。上述研究也已经证实,利用代谢工程和合成生物学策略改造解脂耶氏酵母可以实现利用不同底物大量发酵生产柠檬酸的结果。我们认为,寻找类似 *YHM2*

这种参与柠檬酸转运或者 *AMPD* 这种抑制柠檬酸下游代谢的靶基因对于进一步提高解脂耶氏酵母生产柠檬酸的产量是非常重要且具有潜力的。

## 2 异柠檬酸

异柠檬酸 (isocitric acid, ICA) 存在 4 种同分异构体<sup>[24]</sup>, 其中, 我们日常提到的天然化合物异柠檬酸是右旋苏-异柠檬酸。异柠檬酸最早是从某些景天科植物 (如黑莓、黑醋栗等) 的叶、茎、果实和浆果中提取到的<sup>[25]</sup>, 它具有显著的抗缺氧活性<sup>[26]</sup>, 也可以作为添加剂用于食品、化妆品和工业洗涤剂的生产<sup>[27]</sup>。利用化学法合成的异柠檬酸以 4 种同分异构体的混合物形式存在, 相互分离非常困难; 因此, 利用微生物细胞内的生化反应制备光学纯异柠檬酸就具有很大的优势 (图 1)。其中, 解脂耶氏酵母被证明是目前生产异柠檬酸非常有前途的底盘生物。例如, 2019 年, 波兰的 Rzechonek 等利用粗甘油为底物成功转化生产了异柠檬酸<sup>[28]</sup>。而在此之前, 他们在解脂耶氏酵母菌株中过表达了两个编码甘油同化酶的基因, 即甘油激酶 (glycerol kinase) 编码基因 *GUT1* 和甘油-3-磷酸脱氢酶 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase) 编码基因 *GUT2*。结果证实了这两个基因的共表达可以在低 pH 条件下显著增加异柠檬酸的产量<sup>[29-30]</sup>。当以粗甘油为底物时, 该菌株在 pH 为 3.0 的条件下, 异柠檬酸的产量达到了 42.5 g/L<sup>[28]</sup>, 这是世界上首例在低 pH 条件下发酵粗甘油原料生产羧酸的报道。该研究成果具有很高的工业应用价值, 因为低 pH 值可以减少工业发酵过程中的细菌污染问题; 而粗甘油的使用则可以大大降低生产成本。2020 年, 美国的 Yuzbasheva 等尝试利用解脂耶氏酵母转化橄榄油原料生产异柠檬酸并取得了较好的结果<sup>[23]</sup>。

而此前, 该研究团队也证明了 *yhm2Δ* 菌株在 YPD 培养基中几乎不产生游离的柠檬酸; 而在含橄榄油的培养基中培养该基因缺失株时, 柠檬酸的产量很少, 而异柠檬酸的产量得以增加。紧接着, 在 *yhm2Δ* 菌株中过表达 *AMPD* 基因, 将得到的解脂耶氏酵母工程菌株进行橄榄油发酵后, 异柠檬酸的产量明显增加<sup>[23]</sup>。在酿酒酵母细胞中, *SFC1* 基因所编码的蛋白质就被认为是其线粒体中琥珀酸盐和延胡索酸盐的转运蛋白/载体<sup>[31]</sup>。2020 年, 巴西的 Brito 等证明了拟南芥的 *SFC1* 基因编码蛋白转运三羧酸盐的效力要高于琥珀酸盐和延胡索酸盐<sup>[32]</sup>。通过实验进一步证实, 解脂耶氏酵母中的 *SFC1* 基因编码蛋白是通过反交换机制在解脂耶氏酵母细胞中高效转运异柠檬酸盐的, *SFC1* 基因的过表达也被证明可以提高解脂耶氏酵母工程菌株中异柠檬酸的产量。最终, 将敲除 *YHM2* 基因和同时过表达内源 *AMPD* 与 *SFC1* 基因的解脂耶氏酵母工程菌株进行发酵, 异柠檬酸产量达到了 136.7 g/L<sup>[33]</sup>, 这也是迄今利用微生物发酵法生产异柠檬酸所报道的最高产量。

与柠檬酸一样, 异柠檬酸也是工业生产中不可或缺的一种羧酸。但与柠檬酸相比, 利用代谢工程及合成生物学技术改造微生物底盘生产异柠檬酸的实例相对较少。如前文所述, 通过代谢工程改造解脂耶氏酵母已经成功实现了将粗甘油和橄榄油这些廉价原料转化生成高附加值工业产品——异柠檬酸。值得注意的是, 通过修饰解脂耶氏酵母细胞器间的异柠檬酸转运系统可以获得高效生产异柠檬酸的微生物细胞工厂, 这一方法也为利用解脂耶氏酵母生产其他羧酸及其他高附加值化合物提供了有价值的参考。我们也相信, 解脂耶氏酵母有望成为利用微生物合成法工业生产异柠檬酸的工业菌种。

### 3 $\alpha$ -酮戊二酸

与柠檬酸和异柠檬酸一样,  $\alpha$ -酮戊二酸( $\alpha$ -ketoglutaric acid,  $\alpha$ -KG)也是生物体 TCA 循环中的关键中间体,同时也是蛋白质和氨基酸代谢中的重要前体和中间体之一<sup>[34]</sup>,在大多数微生物的碳氮代谢平衡调节中起着重要作用<sup>[35]</sup>。该羧酸在食品、医药、化工、饲料等领域中均有着广泛的工业应用<sup>[36]</sup>。目前,以丁二酸、草酸二乙酯为起点的多步化学合成路线是工业生产  $\alpha$ -酮戊二酸的最主要方法<sup>[37]</sup>。然而,这些化学路线存在许多缺点,如底物选择性低、生成副产物多、使用有毒前体和催化剂等<sup>[38]</sup>。与使用有毒有机溶剂和重金属催化剂的化学路线相比,利用微生物法生产  $\alpha$ -酮戊二酸的生物技术路线具有绿色、生态、环保和可持续的特点,因此更为可取<sup>[39]</sup>。其中,解脂耶氏酵母因其具有可用底物广、TCA 循环活性高、羧酸分泌能力强和已具有高效遗传操作体系等优点而成为微生物合成  $\alpha$ -酮戊二酸研究中应用最广泛的非常规酵母底盘之一<sup>[40]</sup>。例如,2012 年,江南大学 Yin 等首次证明了解脂耶氏酵母中的丙酮酸羧化作用与  $\alpha$ -酮戊二酸合成之间的关系<sup>[41]</sup>。由于解脂耶氏酵母(菌株 WSH-Z06)中的丙酮酸羧化酶(pyruvate carboxylase)活性不高,因此研究人员将来自酿酒酵母和米曲霉的丙酮酸羧化酶编码基因 *PYC1* 和 *PYC2* 分别引入到该解脂耶氏酵母出发菌株中以构建新的工程菌株(图 1)。结果表明,两个工程菌株中  $\alpha$ -酮戊二酸的产量分别提升了 24.5%和 35.3%,副产物丙酮酸的产量也大幅下降。同时,细胞内关键酶活性和表达水平的变化结果也表明了丙酮酸羧化途径的增强成功地将碳通量从丙酮酸重新分配到了  $\alpha$ -酮戊二酸。对携带 *PYC2* 基因的解脂耶氏酵母工程菌株进行发酵优化,最终

得到了 62.5 g/L 的  $\alpha$ -酮戊二酸<sup>[41]</sup>。2014 年,德国的 Yovkova 等<sup>[42]</sup>利用构建的解脂耶氏酵母工程菌株发酵粗甘油也成功生产出了  $\alpha$ -酮戊二酸,并成功降低了副产物丙酮酸等的产生<sup>[42]</sup>。首先,他们通过基因比对在解脂耶氏酵母基因组中找到了与酿酒酵母中  $\text{NADP}^+$  依赖型异柠檬酸脱氢酶编码基因 *IDP* 和丙酮酸羧化酶编码基因 *PYC* 同源的內源基因。随后,通过分别过表达这两个內源基因以及共表达两个內源基因来研究是否能够提高  $\alpha$ -酮戊二酸的产量(图 1),实验结果表明,共表达基因 *IDP* 和 *PYC* 对  $\alpha$ -酮戊二酸产量的增加作用最强, $\alpha$ -酮戊二酸的产量达到 186 g/L<sup>[42]</sup>。该研究的主要成果包括:第一,首次报道了 *IDP* 和 *PYC* 的共表达能够显著提高解脂耶氏酵母內源生产  $\alpha$ -酮戊二酸的能力;第二,实现了  $\alpha$ -酮戊二酸的低成本发酵生产。

$\alpha$ -酮戊二酸的市场价格显著高于柠檬酸,因此使用微生物法生产  $\alpha$ -酮戊二酸的方法就具有更加显著的工业应用潜力。下一步,利用代谢工程和合成生物学技术进行更广泛的遗传修饰以进一步提高解脂耶氏酵母底盘转化低值原料生成该羧酸的能力将是一项研究重点。

### 4 琥珀酸

琥珀酸(succinic acid, SA)是一种典型的二羧酸。它也是一种重要的化工原料,是合成  $\gamma$ -丁内酯、1,4-丁二酸、四氢呋喃等化工产品的前体物质,也可用于生产其他各种高附加值化合物,在农业、食品、医药、塑料、化妆品等领域均有着广泛的应用<sup>[43-44]</sup>,它被美国能源部认定为生物质的 12 大增值化学品之一<sup>[45]</sup>。在微生物中,琥珀酸是 TCA 循环的中间代谢物之一,可由细胞正常代谢产生<sup>[46]</sup>。目前生产琥珀酸能力较强的微生物主要集中在产琥珀酸放线杆菌、产琥珀酸厌氧菌、大肠杆菌和谷氨酸棒

状杆菌等原核生物中。虽然培养这些原核微生物来生产琥珀酸可以获得较高的产量,但这些微生物的培养过程通常需要厌氧以及中性的 pH 条件。为了维持中性条件,碱的添加增加了培养过程中杂菌污染的可能性,并导致了较为复杂的下游工业处理步骤<sup>[47]</sup>。解脂耶氏酵母是耐酸性的微生物,在低 pH 值的产品生产方面具有极大优势,因此近年来人们开始利用解脂耶氏酵母作为底盘细胞来尝试优化琥珀酸的生产情况。例如,2016 年,我国香港城市大学的 Gao 等实现了解脂耶氏酵母利用粗甘油底物来发酵生产琥珀酸<sup>[48]</sup>(图 1)。由于琥珀酸是 TCA 循环的中间产物,野生型解脂耶氏酵母菌株并不具备大量累积琥珀酸的能力,因此他们尝试敲除解脂耶氏酵母中琥珀酸脱氢酶复合物(succinate dehydrogenase complex, Sdh)的亚单位编码基因 *SDH5* 来阻断琥珀酸的代谢。Sdh 也称为复合物 II 或琥珀酸-泛醌氧化还原酶,参与电子传递链和三羧酸循环,可将琥珀酸氧化为富马酸,同时将可移动电子载体泛醌还原为泛醇,其中 *SDH5* 所编码的蛋白质是 Sdh 复合体中高度保守的线粒体蛋白,也是维持 Sdh 活性和稳定性所必需的<sup>[49]</sup>。之后,研究人员通过对发酵培养基和发酵条件的优化,使得解脂耶氏酵母 *sdh5Δ* 菌株中琥珀酸的摇瓶产量达到了 43 g/L,最后在 2.5 L 的发酵罐中进行发酵培养,目标产物产量高达 160 g/L<sup>[48]</sup>。这一结果成功证明了解脂耶氏酵母在琥珀酸生产方面也具有相当大的优势,展现出了巨大的工业潜力。2017 年, Cui 等也尝试利用代谢工程策略来改造解脂耶氏酵母以提高琥珀酸的产量<sup>[50]</sup>,如图 1 所示,研究人员首先敲除了该酵母中的丙酮酸脱羧酶(pyruvate decarboxylase)编码基因 *PDC* 和 CoA-转移酶(CoA-transferase)编码基因 *ACH*;随后,为了减少细胞中的乙酸积累,研究人员

过表达了来自酿酒酵母的磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase)编码基因 *PCK* 和内源性琥珀酰辅酶 A 合成酶亚基(succinyl-CoA synthase beta subunit)编码基因 *SCS2*,再经过发酵条件优化,得到了 110.7 g/L 的琥珀酸产量<sup>[50]</sup>。

上述这些研究结果证明,解脂耶氏酵母能够基于低成本原料高效生产琥珀酸,且与原核微生物底盘相比,该微生物底盘的使用既避免了发酵过程中可能出现的污染问题,还解决了成本问题,所以在琥珀酸的工业化生产中展现出了较好的竞争力。

## 5 衣康酸

衣康酸(itaconic acid, IA)是一种不饱和的二羧酸,在酸性、中性和中等碱性条件下均具有较好的稳定性。其应用广泛,可用于树脂、纤维、洗涤剂、清洁剂和各种生物活性成分等工业产品的合成。2004 年,衣康酸也被美国能源部认定为生物质的 12 大增值化学品之一。目前,衣康酸的工业生产有化学合成和生物合成两种方式,化学合成主要是利用化工方法从石油化工产品中制备,然而这种方法存在原料利用率低和产品不易分离纯化的问题,使其在大规模工业化生产中受到了限制。衣康酸的生物合成方法是指通过对微生物代谢途径的遗传修饰来完成目标产物的制备。其中,土曲霉、玉米黑粉菌、念珠菌属、毕赤酵母等真菌天然生产衣康酸的能力较强。目前的研究结果表明丝状真菌玉米黑粉菌发酵生产衣康酸的产量最高,可达到 220 g/L<sup>[51]</sup>。解脂耶氏酵母本身并不能产生衣康酸,但它对衣康酸具有较高的耐受性。因此近年来,利用代谢工程及合成生物学改造解脂耶氏酵母异源生产衣康酸成为了相关研究的热点。例如,2015 年,美国 Blazeck 等



首次和解脂耶氏酵母底盘中实现了衣康酸的异源生产,具体见图 1<sup>[52]</sup>。在解脂耶氏酵母细胞内,葡萄糖通过糖酵解途径可转化为乙酰辅酶 A,乙酰辅酶 A 随后进入 TCA 循环合成中间产物顺乌头酸。他们尝试将外源顺乌头酸脱羧酶(cis-aconitic acid decarboxylase) 编码基因 *CAD* 引入到解脂耶氏酵母底盘中,结果表明顺乌头酸可以在顺乌头酸脱羧酶的作用下产生衣康酸。随后,共过表达 *CAD* 和顺乌头酸酶(aconitase) 编码基因 *ACO* 并没有引起衣康酸产量的显著增加,这可能是由于 *ACO* 所编码的顺乌头酸酶本身定位于线粒体中,而转入的 *CAD* 所编码的顺乌头酸脱羧酶则定位于细胞质中。为了实现这两个基因空间定位的匹配,对 *ACO* 基因的线粒体锚定序列进行了删除。最终,在细胞质中同时过表达 *ACO* (去除信号肽序列) 与 *CAD* 的解脂耶氏酵母工程菌株经过发酵优化得到了 4.6 g/L 的衣康酸<sup>[52]</sup>。另外,2019 年,齐鲁工业大学的 Zhao 等通过代谢工程改造获得的解脂耶氏酵母工程菌株发酵葡萄糖生产衣康酸,并获得了较高产量<sup>[53]</sup> (图 1)。他们主要通过引入来自土曲霉的 *CAD* 基因来生产衣康酸。之后,研究人员对整条代谢途径上的相关基因进行了过表达操作,并证明了内源的顺乌头酸线粒体转运蛋白 (mitochondrial cis-aconitate transporter, Mtt) 对于提高解脂耶氏酵母工程菌株异源生产衣康酸的产量是相当有效的。这是因为 Mtt 可以将顺乌头酸从线粒体转运到胞质中,从而促进了衣康酸的合成。最终,共表达 Mtt 编码基因与 *CAD* 的解脂耶氏酵母工程菌株经过分批补料发酵生产得到了 22.03 g/L 的衣康酸,这也是迄今为止在曲霉属以外的工业微生物底盘中报道的衣康酸最高产量,显示出了极好的发展和应用前景<sup>[53]</sup>。

综上,非常规酵母底盘——解脂耶氏酵母

在异源生产衣康酸方面表现出了非常大的发展与应用潜力。虽然目前获得的产量仍然较低,但我们认为,若将上述已应用的代谢工程改造策略与其他先进的合成生物学技术进一步融合使用,将有助于提高解脂耶氏酵母在生产衣康酸方面的工业竞争力,也很有希望缩小与土曲霉和玉米黑粉菌等天然高产菌种在衣康酸产量方面的差距。

## 6 巴豆酸

巴豆酸 (crotonic acid) 又被称为 (2E)-丁二烯酸,是一种 C4 短链不饱和羧酸,在各个领域都具有广泛的应用。例如,巴豆酸最重要的衍生物是巴豆酸-醋酸乙烯酯聚合物,通常用于化妆品和头发定型产品中,具有提高光泽感或固定头发形状的功效<sup>[54]</sup>。此外,巴豆酸衍生物也可应用于涂料、油漆、纺织品、粘合剂、陶瓷等工业产品的生产中<sup>[55]</sup>。另外,巴豆酸及其酯类衍生物还具有抗菌特性,常用于除臭剂的制备<sup>[56]</sup>。目前,巴豆酸最主要的生产方式是通过化学方法直接从石油中进行提取。随着石油等化石资源的过度消耗以及化石资源价格的不断上涨,人们更加认识到可持续资源和可再生产品的重要性,因此,从可持续发展和节约能源方面考虑,研究者们近年来开始探索利用微生物法来生产巴豆酸。其中,最早的研究主要集中在通过代谢工程策略改造大肠杆菌底盘的  $\beta$ -氧化途径来生产巴豆酸<sup>[57]</sup>。目前,也有研究者开始关注解脂耶氏酵母底盘异源生产巴豆酸的能力。例如,2019 年,湖北工业大学的 Wang 等通过在解脂耶氏酵母中构建了一条丁醇生物合成途径并成功实现了巴豆酸的异源生产<sup>[58]</sup> (图 2)。为了在解脂耶氏酵母中构建丁醇合成途径,研究人员首先将来自贝氏梭菌的巴豆酶 (crotonase)



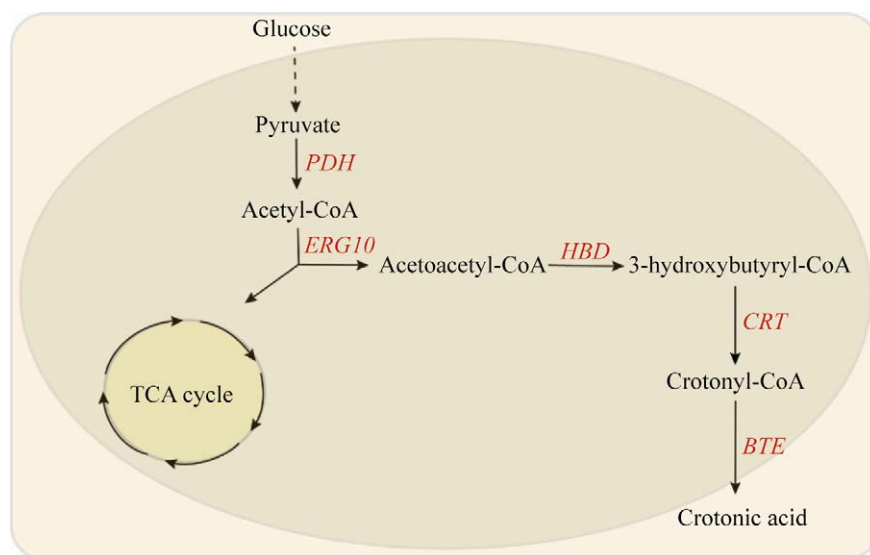


图2 解脂耶氏酵母中巴豆酸合成路径的构建与优化

Figure 2 Engineering the biosynthesis of crotonic acid in *Y. lipolytica*.

编码基因 *CRT* 和 3-羟基丁酰-辅酶 A 脱氢酶 (3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase) 编码基因 *HBD* 引入到解脂耶氏酵母底盘中, 以提供巴豆酸前体巴豆酰辅酶 A。然后, 再将来自多形芽孢杆菌的硫酯酶 (thioesterase) 编码基因 *BTE* 引入到胞内与上述基因进行共表达, 以最终实现从巴豆酰辅酶 A 到巴豆酸的生化反应, 最终解脂耶氏酵母工程菌株中巴豆酸的产量为 62.3 mg/L。在解脂耶氏酵母中, 乙酰辅酶 A 乙酰转移酶 (acetyl-CoA acetyltransferase) 负责催化乙酰辅酶 A 形成乙酰乙酰辅酶 A, 这也是丁醇合成途径的第一步<sup>[59]</sup>。为了进一步提高解脂耶氏酵母中巴豆酸的产量, 又将酿酒酵母中编码乙酰辅酶 A 乙酰转移酶的基因 *ERG10* 导入解脂耶氏酵母中, 结果显示巴豆酸的产量比引入前增加了 2 倍。有实验证明, 在酿酒酵母中异源表达大肠杆菌的丙酮酸脱氢酶 (pyruvate dehydrogenase) 编码基因 *PDH* 将丙酮酸直接催化产生乙酰辅酶 A, 导致丁醇的产量提高了 3 倍。因此, 他们又进一步把 *PDH* 基因引入到

解脂耶氏酵母中, 最终所构建的工程菌株中巴豆酸的产量达到了 0.22 g/L<sup>[58]</sup>。这项研究为利用微生物法合成巴豆酸提供了新的微生物底盘和新的代谢途径, 展现出了较好的研究价值。

由上可见, 利用解脂耶氏酵母底盘生产巴豆酸已经成为了可能。但目前目标产物的产量是比较低的, 这就需要研究者一方面进一步对  $\beta$ -氧化途径和丁醇合成途径中的限速环节进行深入探索; 另一方面继续寻找  $\beta$ -氧化途径和丁醇合成途径之外更高效的巴豆酸合成途径。

## 7 总结与展望

目前, 大部分有机羧酸的工业生产主要依赖化学反应, 因此不可避免地会产生一些问题, 比如产品难分离、污染环境、成本高等。解脂耶氏酵母底盘因其自身具有的生理和代谢优势, 在生产同源或异源有机羧酸方面显示出了巨大的应用潜力, 也受到了研究者们越来越多的关注。在过去的十几年里, 微生物代谢工程和合成生物学的快速发展更为以解脂耶氏酵母

为底盘高效生产各种羧酸产品提供了很大的可能性<sup>[60-61]</sup>。

然而,目前利用代谢工程及合成生物学技术改造解脂耶氏酵母底盘直接发酵生产各类羧酸的研究还存在着很多不足。第一,目前已有报道大部分是围绕葡萄糖等糖类作为碳源,很难满足平台化合物产业化生产低成本的经济性要求。因此开发以木质纤维素、废油脂等廉价原料高效生产羧酸的解脂耶氏酵母细胞工厂将会是未来研究的主要方向。第二,通过改造后

得到的多数羧酸产量和得率仍然较低,尚未达到工业化生产的要求或者形成对传统化学合成方法的明显经济竞争力,例如衣康酸与巴豆酸的合成产量仅为 g/L 的水平,距离工业化发酵生产水平 (>100 g/L) 的差距仍然较大 (表 1)。因此急需利用先进的生物学技术来深入探究影响该微生物底盘高效生产特定目标羧酸的限制瓶颈及核心问题。例如筛选更高效的功能基因、扩大现有代谢途径的代谢流、寻找或者人工构建更高效的羧酸合成通路等。第三,目前在改

表 1 解脂耶氏酵母工程菌株生产有机羧酸的代表性实例

Table 1 Production of representative carboxylic acids by engineered *Y. lipolytica* strains

Parent strain	Product	Engineering strategy	Titer (g/L)	Theoretical yield (%)	Actual yield (%)	Substrate	Fermentation condition	References
<i>Y. lipolytica</i> SWJ-1b	Citric acid	<i>INU1</i> ↑	77.9	118.2	66.7	Inulin	Batch shake flask	[22]
<i>Y. lipolytica</i> W29	Citric acid	<i>YHM2</i> ↑ <i>AMPD</i> ↑	97.1	106.7	50.0	Glucose	Fed-batch bioreactor	[23]
<i>Y. lipolytica</i> AJD pADUTGut1/2	Isocitric acid	<i>GUT1</i> ↑ <i>GUT2</i> ↑	42.5	104.3	28.0	Crude glycerol	Fed-batch bioreactor	[28]
<i>Y. lipolytica</i> W29	Isocitric acid	<i>yhm2</i> Δ <i>AMPD</i> ↑ <i>SFC1</i> ↑	136.7	204.3	74.0	Olive oil	Fed-batch bioreactor	[33]
<i>Y. lipolytica</i> WSH-Z06	α-ketoglutaric acid	<i>PYC2</i> ↑	62.5	97.3	52.1	Glucose	Fed-batch bioreactor	[41]
<i>Y. lipolytica</i> H355A	α-ketoglutaric acid	<i>IDP</i> ↑ <i>PYC</i> ↑	186.0	95.2	36.0	Glycerol	Fed-batch bioreactor	[42]
<i>Y. lipolytica</i> PGC01003	Succinic acid	<i>sdh5</i> Δ	160.0	62.4	40.0	Crude glycerol	bioreactor	[48]
<i>Y. lipolytica</i> PGC01003	Succinic acid	<i>pdh</i> Δ <i>ach</i> Δ <i>PCK</i> ↑ <i>SCS2</i> ↑	110.7	62.4	53.0	Glycerol	Fed-batch bioreactor	[50]
<i>Y. lipolytica</i> Po1f	Itaconic acid	<i>ACO</i> ↑ <i>CAD</i> ↑	4.6	86.7	5.8	Glucose	Fed-batch bioreactor	[52]
<i>Y. lipolytica</i> Po1f	Itaconic acid	<i>CAD</i> ↑ <i>Mtt</i> ↑	22.03	86.7	5.6	Glucose	Fed-batch bioreactor	[53]
<i>Y. lipolytica</i> LZJ004	Crotonic acid	<i>CRT</i> ↑ <i>HBD</i> ↑ <i>BTE</i> ↑ <i>ERG10</i> ↑ <i>PDH</i> ↑	0.22	108.3	1.1	Glucose	Batch shake flask	[58]

Note: ↑ gene overexpression; Δ gene knockout.

造解脂耶氏酵母底盘生产羧酸的研究中,所进行的遗传操作仍然相对较少,大多数研究仍是针对代谢途径上的基因进行常规改造,并没有关注到酵母基因组进化工程的方法和技术,因此需要利用代谢工程和合成生物学等策略和技术在系统水平上对解脂耶氏酵母底盘进行更理性、更广泛、更大幅度地定向遗传改造。例如采用多基因组合调控代谢通路、基因组进化工程等方法来提高解脂耶氏酵母对目的羧酸的耐受性、减轻代谢负担和发酵生产目的羧酸的能力等<sup>[62]</sup>。第四,利用代谢工程和合成生物学技术改造包括解脂耶氏酵母在内的各种微生物底盘合成各种高附加值产品的研究中所取得的经验和成效尚未在解脂耶氏酵母生产羧酸的研究中得以验证,因此需要将相关理论和方法进行进一步的应用以及延伸。例如利用体内亚细胞定位 (*in vivo* compartmentalization) 等技术来提高解脂耶氏酵母工程菌株生产目标羧酸的能力。我们相信,通过对上述研究的进一步开展,解脂耶氏酵母在生产羧酸方面必定会扮演越来越重要的角色,最终成为工业生产羧酸的最佳微生物细胞工厂。

## REFERENCES

- [1] Zinjarde S, Apte M, Mohite P, et al. *Yarrowia lipolytica* and pollutants: interactions and applications. *Biotechnol Adv*, 2014, 32(5): 920-933.
- [2] Zhao YK, Zhu K, Li J, et al. High-efficiency production of bisabolene from waste cooking oil by metabolically engineered *Yarrowia lipolytica*. *Microb Biotechnol*, 2021, 14(6): 2497-2513.
- [3] Groenewald M, Boekhout T, Neuvéglise C, et al. *Yarrowia lipolytica*: safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. *Crit Rev Microbiol*, 2014, 40(3): 187-206.
- [4] Gonçalves FAG, Colen G, Takahashi JA. *Yarrowia lipolytica* and its multiple applications in the biotechnological industry. *Sci World J*, 2014, 2014: 476207.
- [5] Zinjarde SS. Food-related applications of *Yarrowia lipolytica*. *Food Chem*, 2014, 152: 1-10.
- [6] Ng TK, Yu AQ, Ling H, et al. Engineering *Yarrowia lipolytica* towards food waste bioremediation: production of fatty acid ethyl esters from vegetable cooking oil. *J Biosci Bioeng*, 2020, 129(1): 31-40.
- [7] 孔婧, 朱坤, 刘士琦, 等. 代谢工程改造解脂耶氏酵母合成植物萜类化合物的研究进展. *微生物学通报*, 2021, 48(4): 1302-1313.  
Kong J, Zhu K, Liu SQ, et al. Advances in metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* to synthesize plant-derived terpenoids. *Microbiol China*, 2021, 48(4): 1302-1313 (in Chinese).
- [8] Wang J, Ledesma-Amaro R, Wei Y, et al. Metabolic engineering for increased lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*-a review. *Bioresour Technol*, 2020, 313: 123707.
- [9] Yu AQ, Zhao Y, Li J, et al. Sustainable production of FAEE biodiesel using the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Microbiol Open*, 2020, 9(7): e1051.
- [10] Pang YR, Zhao YK, Li SL, et al. Engineering the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* to produce limonene from waste cooking oil. *Biotechnol Biofuels*, 2019, 12: 241.
- [11] Yu AQ, Juwono NKP, Ng TK, et al. Genetic engineering of an unconventional yeast for renewable biofuel and biochemical production. *Jove-J Vis Exp*, 2016, 115: e54371.
- [12] 赵禹, 赵雅坤, 刘士琦, 等. 非常规酵母的分子遗传学及合成生物学研究进展. *微生物学报*, 2020, 60(8): 1574-1591.  
Zhao Y, Zhao YK, Liu SQ, et al. Advances in molecular genetics and synthetic biology tools in unconventional yeasts. *Acta Microbiol Sin*, 2020, 60(8): 1574-1591 (in Chinese).
- [13] Li J, Rong LX, Zhao Y, et al. Next-generation metabolic engineering of non-conventional microbial cell factories for carboxylic acid platform chemicals. *Biotechnol Adv*, 2020, 43: 107605.
- [14] Liu HH, Ji XJ, Huang H. Biotechnological applications of *Yarrowia lipolytica*: past, present and future. *Biotechnol Adv*, 2015, 33(8): 1522-1546.
- [15] Becker J, Lange A, Fabarius J, et al. Top value platform chemicals: bio-based production of organic acids. *Curr Opin Biotechnol*, 2015, 36: 168-175.
- [16] Anastassiadis S, Morgunov IG, Kamzolova SV, et al. Citric acid production patent review. *Recent Pat Biotechnol*, 2008, 2(2): 107-123.

- [17] Nubel R, Fitts R, Findlay G. Fermentation process for the production of citric acid: US, 4155811. 1979-02-20.
- [18] Goldberg I, Rokem JS, Pines O. Organic acids: old metabolites, new themes. *J Chem Technol Biotechnol*, 2006, 81(10): 1601-1611.
- [19] Moeller L, Zehnsdorf A, Aurich A, et al. Substrate utilization by recombinant *Yarrowia lipolytica* growing on sucrose. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 93(4): 1695-1702.
- [20] Liu XY, Chi Z, Liu GL, et al. Inulin hydrolysis and citric acid production from inulin using the surface-engineered *Yarrowia lipolytica* displaying inulinase. *Metab Eng*, 2010, 12(5): 469-476.
- [21] Pandey A, Soccol CR, Selvakumar P, et al. Recent developments in microbial inulinases: its production, properties, and industrial applications. *Appl Biochem Biotechnol*, 1999, 81(1): 35-52.
- [22] Chi ZM, Chi Z, Zhang T, et al. Inulinase-expressing microorganisms and applications of inulinases. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 82(2): 211-220.
- [23] Yuzbasheva EY, Agrimi G, Yuzbashev TV, et al. The mitochondrial citrate carrier in *Yarrowia lipolytica*: its identification, characterization and functional significance for the production of citric acid. *Metab Eng*, 2019, 54: 264-274.
- [24] Vickery HB. A suggested new nomenclature for the isomers of isocitric acid. *J Biol Chem*, 1962, 237: 1739-1741.
- [25] Holz M, Förster A, Mauersberger S, et al. Aconitase overexpression changes the product ratio of citric acid production by *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 81(6): 1087-1096.
- [26] Kamzolova SV, Allayarov RK, Lunina JN, et al. The effect of oxalic and itaconic acids on threo-Ds-isocitric acid production from rapeseed oil by *Yarrowia lipolytica*. *Bioresour Technol*, 2016, 206: 128-133.
- [27] Kamzolova SV, Dedyukhina EG, Samoilenko VA, et al. Isocitric acid production from rapeseed oil by *Yarrowia lipolytica* yeast. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(20): 9133-9144.
- [28] Rzechonek DA, Dobrowolski A, Rymowicz W, et al. Aseptic production of citric and isocitric acid from crude glycerol by genetically modified *Yarrowia lipolytica*. *Bioresour Technol*, 2019, 271: 340-344.
- [29] Heretsch P, Thomas F, Aurich A, et al. Syntheses with a chiral building block from the citric acid cycle: (2R,3S)-isocitric acid by fermentation of sunflower oil. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2008, 47(10): 1958-1960.
- [30] Mirończuk AM, Rzechonek DA, Biegalska A, et al. A novel strain of *Yarrowia lipolytica* as a platform for value-added product synthesis from glycerol. *Biotechnol Biofuels*, 2016, 9: 180.
- [31] Palmieri L, Lasorsa FM, De Palma A, et al. Identification of the yeast *ACR1* gene product as a succinate-fumarate transporter essential for growth on ethanol or acetate. *FEBS Lett*, 1997, 417(1): 114-118.
- [32] Brito DS, Agrimi G, Charton L, et al. Biochemical and functional characterization of a mitochondrial citrate carrier in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem J*, 2020, 477(9): 1759-1777.
- [33] Yuzbasheva EY, Scarcia P, Yuzbashev TV, et al. Engineering *Yarrowia lipolytica* for the selective and high-level production of isocitric acid through manipulation of mitochondrial dicarboxylate-tricarboxylate carriers. *Metab Eng*, 2021, 65: 156-166.
- [34] Zhou JW, Zhou HY, Du GC, et al. Screening of a thiamine-auxotrophic yeast for alpha-ketoglutaric acid overproduction. *Lett Appl Microbiol*, 2010, 51(3): 264-271.
- [35] Zhou JW, Yin XX, Madzak C, et al. Enhanced  $\alpha$ -ketoglutarate production in *Yarrowia lipolytica* WSH-Z06 by alteration of the acetyl-CoA metabolism. *J Biotechnol*, 2012, 161(3): 257-264.
- [36] Otto C, Yovkova V, Barth G. Overproduction and secretion of  $\alpha$ -ketoglutaric acid by microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 92(4): 689-695.
- [37] Stottmeister U, Aurich A, Wilde H, et al. White biotechnology for green chemistry: fermentative 2-oxocarboxylic acids as novel building blocks for subsequent chemical syntheses. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2005, 32(11-12): 651-664.
- [38] Otto C, Yovkova V, Aurich A, et al. Variation of the by-product spectrum during  $\alpha$ -ketoglutaric acid production from raw glycerol by overexpression of fumarase and pyruvate carboxylase genes in *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 95(4): 905-917.
- [39] Finogenova TV, Morgunov IG, Kamzolova SV, et al. Organic acid production by the yeast *Yarrowia lipolytica* (a review). *Prikl Biokhim Mikrobiol*, 2005, 41(5): 478-486.
- [40] Mirbagheri M, Nahvi I, Emtiazi G, et al. Enhanced production of citric acid in *Yarrowia lipolytica* by triton X-100. *Appl Biochem Biotechnol*, 2011, 165(3/4): 1068-1074.
- [41] Yin XX, Madzak C, Du GC, et al. Enhanced

- alpha-ketoglutaric acid production in *Yarrowia lipolytica* WSH-Z06 by regulation of the pyruvate carboxylation pathway. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 96(6): 1527-1537.
- [42] Yovkova V, Otto C, Aurich A, et al. Engineering the  $\alpha$ -ketoglutarate overproduction from raw glycerol by overexpression of the genes encoding NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase and pyruvate carboxylase in *Yarrowia lipolytica*. Appl Microbiol Biotechnol, 2014, 98(5): 2003-2013.
- [43] McKinlay JB, Vieille C, Zeikus JG. Prospects for a bio-based succinate industry. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 76(4): 727-740.
- [44] Zeikus JG, Jain MK, Elankovan P. Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. Appl Microbiol Biotechnol, 1999, 51(5): 545-552.
- [45] Li C, Ong KL, Yang XF, et al. Bio-refinery of waste streams for green and efficient succinic acid production by engineered *Yarrowia lipolytica* without pH control. Chem Eng J, 2019, 371: 804-812.
- [46] Vuoristo KS, Mars AE, Sanders JPM, et al. Metabolic engineering of TCA cycle for production of chemicals. Trends Biotechnol, 2016, 34(3): 191-197.
- [47] Liu YP, Zheng P, Sun ZH, et al. Strategies of pH control and glucose-fed batch fermentation for production of succinic acid by *Actinobacillus succinogenes* CGMCC1593. J Chem Technol Biotechnol, 2008, 83(5): 722-729.
- [48] Gao CJ, Yang XF, Wang HM, et al. Robust succinic acid production from crude glycerol using engineered *Yarrowia lipolytica*. Biotechnol Biofuels, 2016, 9: 179.
- [49] Hao HX, Khalimonchuk O, Schraders M, et al. *SDH5*, a gene required for flavination of succinate dehydrogenase, is mutated in paraganglioma. Science, 2009, 325(5944): 1139-1142.
- [50] Cui ZY, Gao CJ, Li JJ, et al. Engineering of unconventional yeast *Yarrowia lipolytica* for efficient succinic acid production from glycerol at low pH. Metab Eng, 2017, 42: 126-133.
- [51] Tehrani HH, Becker J, Bator I, et al. Integrated strain and process design enable production of 220 g/L itaconic acid with *Ustilago maydis*. Biotechnol Biofuels, 2019, 12: 263.
- [52] Blazeck J, Hill A, Jamoussi M, et al. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for itaconic acid production. Metab Eng, 2015, 32: 66-73.
- [53] Zhao C, Cui ZY, Zhao XY, et al. Enhanced itaconic acid production in *Yarrowia lipolytica* via heterologous expression of a mitochondrial transporter MTT. Appl Microbiol Biotechnol, 2019, 103(5): 2181-2192.
- [54] Rollat-Corvol I, Samain H, L'Oreal. Reshapable hair styling composition comprising (meth) acrylic copolymers of four or more monomers: US, 7122175. 2006-10-17.
- [55] Mamat MRZ, Ariffin H, Hassan MA, et al. Bio-based production of crotonic acid by pyrolysis of poly(3-hydroxybutyrate) inclusions. J Clean Prod, 2014, 83(15): 463-472.
- [56] Walsem JV, Anderson E, Licata J, et al. Process for producing a monomer component from a genetically modified polyhydroxyalkanoate biomass: US, 0315681. 2012-12-13.
- [57] Dellomonaco C, Clomburg JM, Miller EN, et al. Engineered reversal of the  $\beta$ -oxidation cycle for the synthesis of fuels and chemicals. Nature, 2011, 476(7360): 355-359.
- [58] Wang L, Zong Z, Liu YL, et al. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for the biosynthesis of crotonic acid. Bioresour Technol, 2019, 287: 121484.
- [59] Yu AQ, Zhao YK, Pang YR, et al. An oleaginous yeast platform for renewable 1-butanol synthesis based on a heterologous CoA-dependent pathway and an endogenous pathway. Microb Cell Fact, 2018, 17: 166.
- [60] Li J, Zhu K, Miao L, et al. Simultaneous improvement of limonene production and tolerance in *Yarrowia lipolytica* through tolerance engineering and evolutionary engineering. ACS Synth Biol, 2021, 10(4): 884-896.
- [61] Yu AQ, Juwono NKP, Foo JL, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the overproduction of short branched-chain fatty acids. Metab Eng, 2016, 34: 36-43.
- [62] 李建, 孔婧, 李圣龙, 等. 适应性实验室进化技术在微生物育种中的应用进展. 生物工程学报, 2021, 37(1): 130-141.
- Li J, Kong J, Li SL, et al. Advances in adaptive laboratory evolutionary engineering to microbial breeding. Chin J Biotech, 2021, 37(1): 130-141 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)