

· 有机酸生物合成 ·

祁庆生 山东大学微生物技术国家重点实验室教授、博士生导师。德国明斯特大学微生物学博士毕业后，2001年至2003年在德国开姆尼茨工业大学生物工程系从事博士后研究，2004年起任山东大学教授。担任中国生物工程学会工业与环境专业委员会、糖工程专业委员会、合成生物学专业委员会等学术机构的理事和委员。担任 *Applied Environmental Microbiology* 等国际杂志的编委。主持国家重点研发计划、国家自然科学基金国际合作重大项目、国家自然科学基金重点项目等10余项。发表学术论文200余篇，被引用7000余次，多项成果实现转化。目前从事合成生物学理论与方法、微生物代谢工程与废弃物资源化等方面的研究，主要研究方向为：(1) 开发合成生物学和基因组编辑的方法用于微生物代谢控制和改造；(2) 利用代谢工程生产化工产品、健康产品和酶类；(3) 废弃塑料的微生物降解及生物可降解塑料的合成。



利用酵母细胞工厂合成丁二酸的研究进展

钟驭涛¹, 尚长宇¹, 王言东², 李建华², 刘成才², 崔志勇¹, 祁庆生^{1*}

1 山东大学 微生物技术国家重点实验室, 山东 青岛 266237

2 齐齐哈尔龙江阜丰生物科技有限公司, 黑龙江 齐齐哈尔 161031

钟驭涛, 尚长宇, 王言东, 李建华, 刘成才, 崔志勇, 祁庆生. 利用酵母细胞工厂合成丁二酸的研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(8): 2644-2665.

ZHONG Yutao, SHANG Changyu, WANG Yandong, LI Jianhua, LIU Chengcai, CUI Zhiyong, QI Qingsheng. Advances in synthesis of succinic acid using yeast cell factories[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(8): 2644-2665.

摘要: 丁二酸(又称琥珀酸)是一种重要的 C4 平台化合物, 可作为 1,4-丁二醇、四氢呋喃以及生物可降解塑料聚丁二酸丁二酯(polybutylene succinate, PBS)的生产原料。与传统的以顺酐为原料的石化基路线相比, 采用微生物发酵法生产丁二酸不仅具有更高的经济可持续性, 同时也展现出更佳的环境友好性。酵母具有良好的耐酸性, 能够实现丁二酸的低 pH 发酵, 从而大幅降低产物提取成本。因此, 通过代谢工程改造构建高产丁二酸酵母菌株受到越来越多的关注。本文系统介绍了丁二酸的应用价值及其市场规模, 总结了微生物中参与丁二酸合成的途径及其关键酶, 详细阐述了利用酵母细胞工厂合成丁二酸的最新研究进展, 同时还展示了酵母工程菌株以甘油、乙酸、木质纤维

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2100500); 国家自然科学基金(32200081)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2100500) and the National Natural Science Foundation of China (32200081).

*Corresponding author. E-mail: qiqingsheng@sdu.edu.cn

Received: 2024-04-26; Accepted: 2024-06-13; Published online: 2024-06-17

素水解液等非粮原料为底物进行丁二酸合成的现状,最后对基于酵母细胞工厂的低 pH 丁二酸生物制造进行了展望。

关键词: 丁二酸; 酵母; 代谢工程; 细胞工厂; 低 pH 生物制造

Advances in synthesis of succinic acid using yeast cell factories

ZHONG Yutao¹, SHANG Changyu¹, WANG Yandong², LI Jianhua², LIU Chengcai², CUI Zhiyong¹, QI Qingsheng^{1*}

¹ State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Qingdao 266237, Shandong, China

² Qiqihar Longjiang Fufeng Biotechnology Co., Ltd., Qiqihar 161031, Heilongjiang, China

Abstract: Succinic acid is an important C4 platform compound that serves as a raw material for the production of 1,4-butanediol, tetrahydrofuran, and biodegradable plastics such as polybutylene succinate (PBS). Compared to the traditional petrochemical-based route that uses maleic anhydride as a raw material, the microbial fermentation method for producing succinic acid offers more sustainable economic value and environmental friendliness. Yeasts with good acid tolerance can achieve low-pH fermentation of succinic acid, significantly reducing the cost of product extraction. Therefore, constructing high-yield succinic acid yeast strains through metabolic engineering has garnered increasing attention. This paper systematically introduced the application value and market size of succinic acid, summarized the pathways and key enzymes involved in succinic acid synthesis in microorganisms, and elaborated on the latest research progress in the synthesis of succinic acid using yeast cell factories. It also presented the current status of succinic acid synthesis using non-food raw materials such as glycerol, acetic acid, lignocellulosic hydrolysate, and others as substrates by engineered yeast strains. Finally, the paper provided a prospect for low-pH succinic acid biomanufacturing based on yeast cell factories.

Keywords: succinic acid; yeast; metabolic engineering; cell factory; low-pH biomanufacturing

丁二酸(succinic acid, SA), 又名琥珀酸, 是一种重要的二元羧酸, 可用于 1,4-丁二醇、 γ -丁内酯、四氢呋喃等 C4 化合物的生产, 广泛应用于生产清洁剂、表面活性剂和食品添加剂等, 并被美国能源部选为 12 种最具商业价值的生物基平台化合物之首^[1-2]。其中, 1,4-丁二醇(1,4-butanediol, BDO)是大宗化工原料,

2022 年全球 BDO 行业需求量约为 207 万 t, 同比增长 18.29% (<https://baijiahao.baidu.com/s?id=1771727993994473547&wfr=spider&for=pc>)。

丁二酸和 BDO 聚合可以产生丁二酸丁二醇酯(polybutylene succinate, PBS)、聚己二酸/丁二酸丁二酯, 这是具备良好材料性能的可生物降解聚合物^[3]。据 ChemAnalyst 发布的相关报告显

示, 2022 年全球对丁二酸的需求量为 7 万 t, 预计 2032 年将达到 13.5 万 t, 复合年增长率为 6.4% (<https://www.chemanalyst.com/industry-report/succinic-acid-market-2899>)。传统的丁二酸生产工艺是以顺丁烯二酸酐(简称顺酐)为原料, 通过化学催化加氢获得终产物, 该过程存在能耗高、依赖石化资源等缺点^[4-5]。相比之下, 利用微生物细胞工厂, 以可再生生物质作为原料进行丁二酸生物制造, 具有绿色、高效、可持续等优点, 已逐渐成为主要的丁二酸合成工艺路线之一^[5-6]。

丁二酸直接参与生命体物质和能量代谢过程, 可以通过微生物发酵的方式进行合成。最初, 人们发现从反刍动物瘤胃中分离出来的一些细菌菌株能够天然发酵生产丁二酸, 例如产琥珀酸放线杆菌(*Actinobacillus succinogenes*)^[7]、产琥珀酸曼氏芽孢杆菌(*Mannheimia succiniciproducens*)^[8]等。随着现代生物技术的发展, 研究人员可以对大肠杆菌(*Escherichia coli*)、谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)等模式细菌进行遗传修饰, 来进一步提高其丁二酸合成能力^[2]。2008 年以来, Myriant、BioAmber、山东兰典生物科技股份有限公司等国内外公司相继开发工程化大肠杆菌等细菌细胞工厂用于丁二酸发酵, 建成多条万吨级生物基丁二酸生产线^[9]。然而, 由于没有环保政策的支持, 这些早期的丁二酸产业化项目发展得并不顺利。

细菌宿主具有天然的还原三羧酸(tricarboxylic acid, TCA)循环, 因此丁二酸合成效率较高, 但是存在诸如专性厌氧、潜在的致病性、噬菌体污染和耐酸性差等问题。更为重要的是, 细菌对酸和渗透压力的耐受性差, 发酵过程需要添加大量碱以维持中性 pH^[10-11]。在中性 pH 下发酵得到的终产物是丁二酸盐, 提

取步骤需要加强酸将其转化为游离丁二酸, 并且会产生 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 Na_2SO_4 、 CaSO_4 等副产物^[12]。据统计, 每生产 1 t 丁二酸大约需要 0.5 t 碱, 之后将消耗 1 t 硫酸以获得游离丁二酸。而酵母宿主的酸耐受性强, 可以通过低 pH 发酵直接把葡萄糖等底物转化为丁二酸, 下游处理步骤相对于细菌发酵更为简单。因此, 从长远来看, 酵母更适宜于丁二酸的生物制造^[13]。近年来, 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、东方伊萨酵母(*Issatchenkia orientalis*)、解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)等酵母菌株已被改造用于丁二酸的生产, 展现出极大的应用潜力^[14-16]。2011 年, BioAmber 公司取得美国嘉吉公司库德里阿兹威毕赤酵母低 pH 发酵技术授权, 用此技术替代原有大肠杆菌发酵技术生产丁二酸。2012 年, 荷兰皇家帝斯曼集团与法国罗盖特公司合资成立的 Reverdia 公司首次利用工程化酿酒酵母菌株开发低 pH 值发酵技术, 并在意大利卡萨诺斯皮诺拉建设了年产能为 1 万 t 的生物基丁二酸工厂 (<http://www.prf.cn/Reverdia/REVPR002/zh-CN>)。2015 年, BioAmber 公司与日本三井(Mitsui)合作, 在加拿大萨尼亚地区建成世界上最大的生物基丁二酸生产线, 产能约 1.7 万 t/年^[17]。2021 年, 李长荣化学工业股份有限公司宣布收购 BioAmber 公司, 再次扩增了 1 万 t 生物基丁二酸产能, 同时宣布将在 2023 年提升至 3 万 t/年的规模(<https://baijiahao.baidu.com/s?id=1722187308180978305&wfr=spider&for=pc>)。

本文从丁二酸生物合成途径出发, 系统回顾高产丁二酸酵母工程菌株的构建和代谢调控策略, 介绍以非粮原料为碳源的丁二酸合成进展, 探讨进一步改良酵母细胞工厂和降低丁二酸生产成本的对策。

1 丁二酸的生物合成途径

丁二酸是三羧酸(tricarboxylic acid, TCA)循环的中间代谢产物之一,同时也是多种兼性厌氧菌和严格厌氧菌的末端代谢产物,微生物可以利用可再生的碳水化合物资源生产丁二酸^[9]。以葡萄糖代谢为例,1分子葡萄糖通过糖酵解途径分解为2分子丙酮酸,并产生2分子NADH。丙酮酸在丙酮酸脱氢酶(pyruvate dehydrogenase, Pdh)的作用下脱羧产生乙酰辅酶A、NADH和CO₂。此外,丙酮酸还可以经丙酮酸羧化酶(pyruvate carboxylase, Pyc)固定CO₂产生草酰乙酸。乙酰辅酶A和草酰乙酸将作为前体物质进入TCA循环,参与丁二酸的生物合成^[18]。丁二酸的天然生物合成途径包括氧化TCA途径、还原TCA途径、乙醛酸支路和3-羟基丙酸循环(图1)^[19]。在实际应用中,这些途径可以协同参与丁二酸的生产。

丁二酸在TCA循环中一般不会过量产生,而是被进一步代谢形成延胡索酸。当琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase, Sdh)失活时,丁二酸作为氧化TCA循环的终产物大量积累。氧化TCA途径(oxidative TCA pathway)每合成1分子丁二酸伴随形成2分子NADH和2分子CO₂。在高溶氧条件下,氧化TCA途径通过与氧化磷酸化耦合表现出较快的丁二酸合成速率,但是最大理论转化率仅为1 mol/mol葡萄糖或0.65 g/g葡萄糖^[16]。

还原TCA途径(reductive TCA pathway)可以看作是TCA循环的逆反应,草酰乙酸在苹果酸脱氢酶、延胡索酸酶和延胡索酸还原酶(fumarate reductase, Frd)的催化下形成丁二酸。其中,延胡索酸还原酶是还原TCA途径的关键酶,大多存在于厌氧微生物中。理论上1分子

葡萄糖经糖酵解和还原TCA途径可以生成2分子丁二酸,但是该过程净消耗2分子NADH(丁二酸还原反应消耗4分子NADH,而糖酵解途径仅提供2分子NADH)。因此,还原TCA途径通常需要与丙酮酸脱氢酶、乙醛酸支路、氧化TCA循环等协同作用,以维持细胞氧化还原平衡。还原TCA途径的最大理论转化率约为1.71 mol/mol或1.12 g/g葡萄糖^[16]。

乙醛酸支路(glyoxylate shunt)在大多数微生物中的代谢通量较低,其关键酶是异柠檬酸裂解酶(isocitrate lyase, Icl)和苹果酸合酶(malate synthase, Mls)。该支路一般是作为丁二酸合成的辅助途径,与还原TCA途径相结合可以提供必需的还原力,与氧化TCA途径耦合生产丁二酸也可减少碳损失^[20]。由于不存在碳原子的丢失或者增加,乙醛酸支路的理论转化率为1.25 mol/mol葡萄糖,介于氧化和还原TCA途径之间。

3-羟基丙酸循环(3-hydroxypropionic acid cycle, 3-HP cycle)是一种在光合绿色非硫细菌中普遍存在的需氧CO₂固定途径。这一生物化学过程相当复杂,它由13种不同的酶催化,涉及16个连续的酶促反应步骤^[21]。对3-羟基丙酸循环进行优化,可以显著提高其固定CO₂的效率。在该途径中,1 mol乙酰辅酶A可以转化为1 mol丁二酸,同时固定2 mol CO₂^[22]。与依赖于磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase, Pck)或丙酮酸羧化酶(pyruvate carboxylase, Pyc)的还原TCA途径相比,3-羟基丙酸途径展现出更高的CO₂固定效率。在这一途径中,乙酰辅酶A羧化酶(acetyl-CoA carboxylase, Acc)和丙酮酸羧化酶(propionyl-CoA carboxylase, Pcc)是CO₂固定和反应速率限制的关键酶。在该途径

中，1 分子乙酰辅酶 A 转化为 1 分子丁二酸的过程需要消耗 3 分子的 ATP 和 3 分子的 NADH，所以尽管 3-羟基丙酸途径在固定和利用 CO₂ 方面具有优势，但其复杂的反应步骤以及对高能量和还原力的需求限制了其实际应用。

综上所述，在所有丁二酸生物合成代谢途径中，还原 TCA 途径可以羧化固定 CO₂ 分子用于丁二酸生产，其理论碳转化率更高。目前绝大多数高产丁二酸细菌菌株均采用还原 TCA 途径，使丁二酸产量和转化率达到较高水平。例如，中国科学院天津工业生物技术研究所的张学礼团队通过失活竞争性途径和增加能量供

给的策略，并使用代谢驯化的方法将大肠杆菌丁二酸高产与细胞生长相偶联，同时激活丙酮酸脱氢酶以及磷酸戊糖途径和转氢酶使得丁二酸转化率由 1.12 mol/mol 提高到 1.50 mol/mol (达到理论转化率的88%)^[11]。由于缺乏天然的延胡索酸还原酶，包括酵母在内的绝大多数真核微生物宿主不能进行还原性丁二酸发酵。通过代谢工程策略能够在酵母细胞中构建异源还原 TCA 循环，但是丁二酸生产仍然受到延胡索酸还原酶活性、胞内 NADH 供应、丁二酸胞外分泌等因素的限制。因此，引入高效的还原 TCA 途径是创制高产丁二酸酵母细胞工厂的关键。

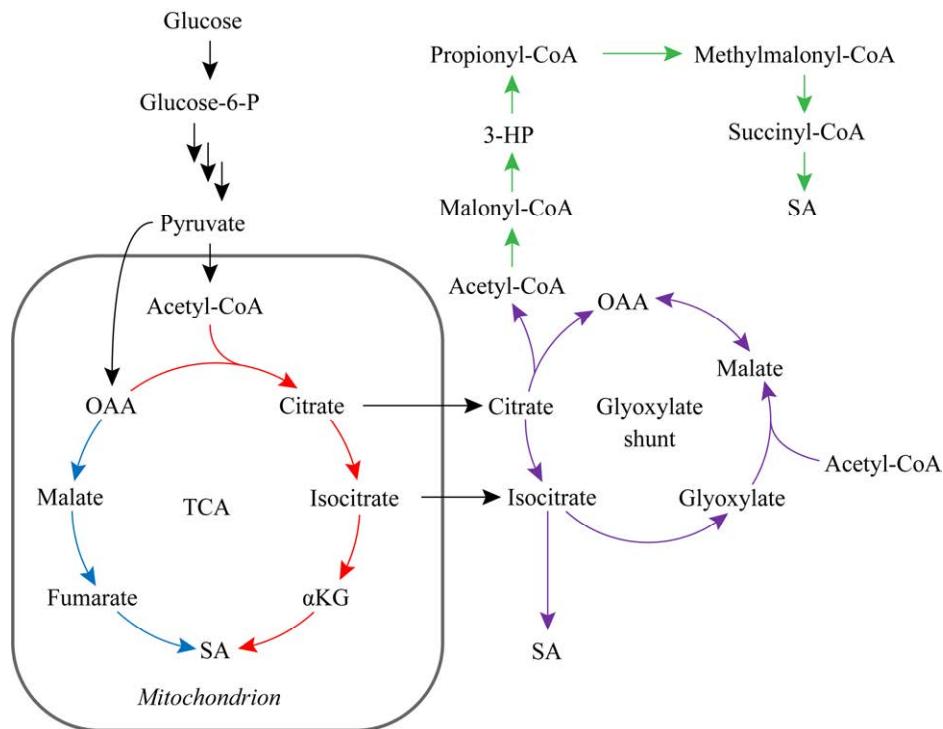


图 1 丁二酸的生物合成途径 红色箭头代表氧化 TCA 途径；蓝色箭头代表还原 TCA 途径；紫色箭头代表乙醛酸支路；绿色箭头代表 3-HP 循环

Figure 1 The biosynthetic pathway of succinic acid. OAA: Oxaloacetate; α KG: α -ketoglutaric acid; SA: Succinic acid; 3-HP: 3-hydroxypropionic acid. The red arrow represents the oxidative TCA pathway; The blue arrow represents the reductive TCA pathway; The purple arrow represents the glyoxylate shunt; The green arrow represents the 3-HP cycle.

2 酵母细胞工厂合成丁二酸的特点

相比细菌宿主,采用酵母细胞工厂合成丁二酸具有显著优势,尤其是酵母菌株具有较强的耐酸性,即使在低 pH 条件下也能保持细胞的活力,这是高效生产丁二酸所必需的特性。本文将从操作成本、原料成本以及分离纯化成本多个角度深入探讨这些优势,同时也分析了酵母对低 pH 的耐受机制。

酵母通常被广泛认为是安全的生物(generally recognized as safe, GRAS),这一点对于其在工业生产中的应用及其操作至关重要,确保了使用的安全性和可靠性。得益于多种遗传工具和表达系统的开发,酵母细胞的遗传操作变得更加简便,通过基因工程改造的酵母菌株能够实现高底物转化率,将更多的底物转化为目标产品丁二酸,并减少副产物的生成。此外,酵母细胞对环境压力,如高渗透压和温度变化等苛刻条件表现出良好的耐受性,这有助于维持发酵过程的稳定性,并且易于在工业规模放大。

在原料成本方面,酵母的发酵能力不仅限于单一碳源,它们能够利用多种碳源,如葡萄糖、甘油等,这为原料的选择提供了极大的灵活性。同时,酵母发酵过程产生的副产物较少,且能够利用可再生资源,如木质纤维素水解液作为底物,这有助于实现更加可持续的生产。

从产物纯化的角度来看,酵母细胞在酸性环境中展现出卓越的生长能力,这使得它们能够在无须额外 pH 调节的情况下直接合成丁二酸,这确保了发酵过程中丁二酸以游离酸的形式存在,减少了中和剂 NH_4OH 、 NaOH 等的使用,简化

了后续的提取和纯化步骤,减少了化学物质对环境的污染,有效降低了生产成本和操作的复杂性(图 2)。

酵母对低 pH 的耐受机制涉及多个层面,包括调节细胞内外环境、增强抗氧化能力、改变代谢途径以及信号传导途径的调节。这些机制共同作用,使酵母能够在低 pH 环境中生存和繁殖,为酵母在工业生物过程中的应用提供了理论基础。

(1) 调节细胞内外环境。在低 pH 条件下,酵母通过调节细胞内 pH 来保护细胞免受损害。例如,通过降低细胞内 pH,酵母能够防止细胞内毒性物质积累,从而维持细胞的生存和功能^[23]。此外,酵母还能通过调节膜透过性来适应低 pH 环境,如 ESBP6 转运蛋白的过表达可以增加对芳香酸的耐受性,这不仅有助于芳香酸的排出,还能改善酵母在工业应用中的鲁棒性^[24]。

(2) 增强抗氧化能力。低 pH 环境会导致细胞产生更多的活性氧种类,进而引发氧化应激。酵母通过增强其抗氧化系统来应对这一挑战。例如,某些酵母菌株在低 pH 胁迫下表现出更高的过氧化氢酶活性,这有助于清除活性氧种类,减轻氧化应激^[25]。

(3) 改变代谢途径。为了适应低 pH 环境,酵母可能需要调整其代谢途径。例如,通过过表达特定基因,如 *elo1* 和 *ole1*,可以增强酵母对低 pH 的耐受能力,这主要是通过增加长链脂肪酸和不饱和脂肪酸的含量,从而提高细胞膜的完整性和耐受能力^[26]。此外, *CYB2* 基因的敲除也被发现可以提高 *S. cerevisiae* 在低 pH 条件下的 L-乳酸产量,这表明通过调整代谢途径可以改善酵母在低 pH 环境下的生长和代谢性能^[27]。

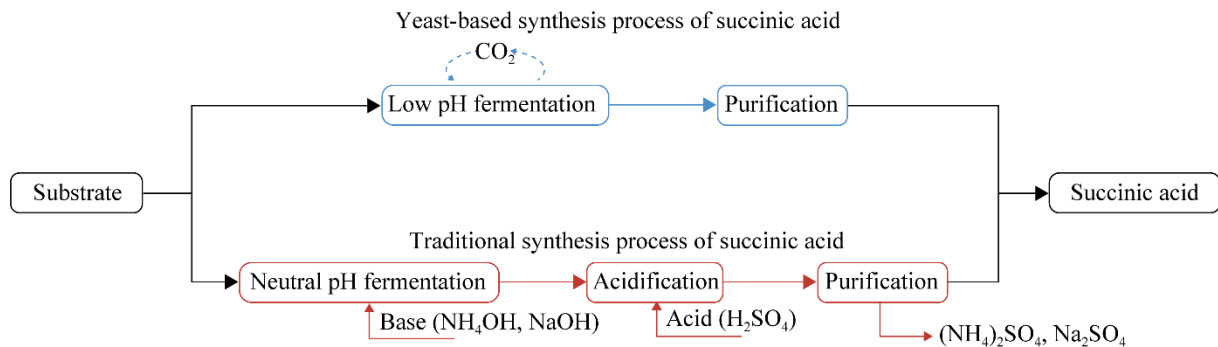


图2 基于酵母的低 pH 丁二酸合成工艺与传统丁二酸合成工艺的比较

Figure 2 Comparison between yeast-based low pH succinic acid synthesis process and the traditional succinic acid synthesis process.

(4) 信号传导途径的调节。酵母对低 pH 的响应涉及多个信号传导途径。例如, HOG/MAPK 途径在酵母对弱有机酸胁迫的应激机制中起着重要作用^[28]。此外, Rim101 途径作为酵母的一种感应机制, 利用 ESCRT 复合体激活关键转录因子 Rim101, 以响应环境 pH 的变化^[29]。

因此, 综合考虑原料成本、操作成本和分离纯化成本, 利用酵母细胞工厂进行低 pH 丁二酸发酵具有显著的成本效益, 在生物制造领域展现出巨大潜力, 有望成为未来工业生物技术的关键平台。

3 酵母丁二酸细胞工厂的研究进展

如前文所述, 酵母的耐酸属性对于丁二酸的高效生产至关重要。除此之外, 酵母能够代谢的底物较为广泛, 这对于利用可再生资源生产具有成本效益的丁二酸来说具有极大吸引力^[30]。并且, 随着酵母遗传和合成生物学工具的开发, 研究人员可以对其代谢途径进行精确操作, 从而提高丁二酸的生产效率^[31]。在此背景下, 本文总结了几种高产丁二酸酵母细胞工厂构建的最新研究进展(表 1)。

3.1 酿酒酵母

酿酒酵母作为重要的模式微生物之一, 其基因组已经完成测序, 遗传背景清晰, 并且其基因组编辑工具也已经成熟, 易于进行基因编辑和表达调控^[32]。酿酒酵母具有兼性厌氧的特性, 这使得研究人员可以通过调控呼吸作用和发酵作用的平衡, 来操纵细胞内的能量状态和代谢中间体的流向, 进而提升目标产物的产量。得益于这些显著优势, 酿酒酵母成为了最初在丁二酸合成研究中被选择的酵母宿主。

丁二酸是 TCA 循环的中间体, 天然存在于酿酒酵母中。丁二酸积累的主要策略是通过失活琥珀酸脱氢酶亚基(Sdh1、Sdh2、Sdh3 和 Sdh4)来阻断氧化 TCA 循环, 从而避免丁二酸的消耗, 来增加有氧条件下丁二酸的产量^[33]。Raab 等^[34]的研究表明, 通过敲除 *Sdh1* 和 *Sdh2* 以及异柠檬酸脱氢酶的同工酶编码基因 *Idh1* 和 *Idp1*, 将碳通量重新定向到乙醛酸循环, 使最终工程菌株能够利用葡萄糖生产 3.62 g/L 的丁二酸, 产量比野生型菌株增加了 4.8 倍。在另一项研究中, 瑞典查尔姆斯理工大学的 Jens Nielsen 团队采用定向进化策略, 同时敲除 *Sdh3*

基因, 过表达天然异柠檬酸裂解酶的编码基因 *Icl1*, 缺失编码 3-磷酸甘油酸脱氢酶(Ser3p/Ser33p)的两种同工酶的基因, 阻断了糖酵解途径中 L-丝氨酸的合成; L-丝氨酸是生物质形成所必需的, 也可以由 L-甘氨酸合成, L-甘氨酸通过乙醛酸途径与丁二酸生产偶联; 反过来, 乙醛酸是由异柠檬酸通过异柠檬酸裂解酶作用产生的, 同时还会产生等摩尔量的丁二酸; 因此, 随着生物质的增加, 菌株对 L-甘氨酸和 L-丝氨酸的需求也随之增加, 这个过程将生物质的合成与丁二酸的生产过程偶联起来, 最终构建得到的菌株与野生型菌株相比, 丁二酸的产量提高了 30 倍, 转化率也提高了 43 倍^[31]。此外, Ito 等^[35]除了敲除 *Sdh1* 和 *Sdh2* 基因外, 还敲除了工程菌株的乙醇生物合成途径(敲除 *Adh1* 到 *Adh5* 基因), 促进了细胞内丁二酸的积累; 通过异源表达苹果酸转运蛋白的编码基因 *Mae1* 来增强丁二酸向细胞外的转运能力, 最终丁二酸转化率达到 2.4% (mol 丁二酸/mol 葡萄糖)。

研究人员还对酿酒酵母利用还原 TCA 途径生产丁二酸的可行性进行了探究^[14, 36-39]。酿酒酵母存在 Crabtree 效应, 会经过丙酮酸脱羧酶 *Pdc* 途径积累大量副产物乙醇。中国科学院过程工程研究所邢建民团队通过敲除酿酒酵母 *Pdc* 基因, 成功阻断了乙醇产生, 并引导碳通量进入 TCA 循环; 随后, 通过敲除延胡索酸酶编码基因 *Fum1* 和 3-磷酸甘油脱氢酶编码基因 *Gpd1*, 分别避免苹果酸和甘油的产生; 最后, 优化表达还原 TCA 途径相关基因以促进从丙酮酸生产丁二酸, 使工程菌株在生物反应器中产生 12.97 g/L 的丁二酸, 转化率为 0.13 g/g 葡萄糖^[14]。Xiberras 等^[36]还报道了利用甘油生产丁二酸的研究, 为了充分利用甘油较高的还原能力, 对先前设计的菌株(天然的 L-甘油 3-磷酸

代谢途径已被 NAD 依赖型的二羟丙酮途径所替代, 以增强甘油的分解代谢能力)进行了进一步改造; 在改造过程中, 首先过表达了内源性的过氧化物酶体苹果酸脱氢酶, 该酶负责将草酰乙酸还原; 其次, 引入了来自米根霉的胞质延胡索酸酶, 以促进苹果酸向延胡索酸的转化; 再次, 异源表达了布氏锥虫来源的过氧化物酶体延胡索酸还原酶, 用于还原延胡索酸; 此外, 还表达了来自黑曲霉的二羧酸转运蛋白 DCT-02, 以增强丁二酸的转运效率; 这一系列的代谢工程改造显著提升了菌株的丁二酸生产能力, 在摇瓶发酵条件下实现了 10.70 g/L 的丁二酸最大产量, 以及 0.22 g/g 甘油的转化率^[37]。在最新的研究中, 研究人员通过改造酵母的线粒体膜转运蛋白, 提高了利用甘油合成丁二酸的产量; 研究表明, 删除线粒体丙酮酸载体 *Mpc3* 基因可以减少丙酮酸进入线粒体, 并将更多碳流向细胞质中的还原性 TCA 途径, 从而提高丁二酸产量; 此外, 删除 *Sdh1* 基因可以阻止线粒体内丁二酸转化为延胡索酸, 从而增加丁二酸的积累; 同时删除 *Mpc3* 和 *Sdh1* 基因可以进一步提高丁二酸的产量和转化率, 达到 45.50 g/L 和 0.66 g/g 甘油的最高水平; 因此, 调控线粒体膜转运蛋白可能是提高酵母菌株丁二酸产量的有效策略^[38]。最近, 江南大学刘立明团队从骆驼瘤胃中筛选得到一株天然丁二酸生产酿酒酵母, 随后经过诱变适应性进化获得耐受低 pH (pH≤3.0) 并高产丁二酸的突变菌株 FMME-SuA912, 在 pH 3.5 的条件下丁二酸产量达到 41.80 g/L^[39]。

综上所述, 通过阻断氧化 TCA 循环, 酿酒酵母可以实现丁二酸的生产, 而引入还原 TCA 途径则可以进一步提高丁二酸的产量和转化率。然而, 在酿酒酵母中丁二酸的合成与细菌宿主相比仍存在较大差距。因此, 未来需要进

一步优化酿酒酵母细胞工厂, 以实现丁二酸的高效合成。

3.2 东方伊萨酵母

近年来, 由于其广泛的底物利用谱、独特的生理代谢优势和良好的环境耐受性, 解脂耶氏酵母、东方伊萨酵母、巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)等非常规酵母(non-conventional yeasts)受到越来越多的关注。随着合成生物学技术的快速发展, 研究人员已在多种非常规酵母中建立了高效遗传操作和代谢改造方法, 能够满足酵母细胞工厂快速构建的需要。

东方伊萨酵母(*I. orientalis*, 又名 *Pichia kudriavzevii* 或 *Candida krusei*)是一种 Crabtree 效应阳性酵母, 因其对多重环境压力, 包括低 pH 值在内的耐受性而闻名, 已被证明可以作为有机酸的生产宿主。许多研究表明还原 TCA 途径是丁二酸高效合成的有效途径之一, 该途径同样可以在东方伊萨酵母中发挥作用。Ahn 等^[9]在丁二酸耐受 *P. kudriavzevii* 菌株中引入还原性 TCA 循环, 同时敲除副产物乙醇合成基因, 成功构建了 *P. kudriavzevii* 13723 菌株, 能够在低 pH 条件下生产 48.20 g/L 丁二酸, 丁二酸转化率和生产力分别达到 0.45 g/g 葡萄糖和 0.97 g/(L·h)。在 2015 年公开的一份专利信息中, 美国嘉吉公司在过表达完整还原 TCA 途径的基础上探究了不同来源转氢酶对 *I. orientalis* 工程菌株丁二酸生产的影响, 结果表明, 大肠杆菌来源的转氢酶 SthA 的过表达有助于维持细胞氧化还原平衡, 使丁二酸产量由 57.60 g/L 提高至 89.00 g/L, 生产力约为 0.93 g/(L·h)^[40]。此外, 伊利诺伊州立大学香槟分校的赵惠民团队对 *I. orientalis* 在丁二酸生产中的潜力进行了深入研究; 经过基因组整合表达 4 个还原 TCA 途径基因(*Pyc*、

Mdh、*Fum*、*Frd*)后, 工程菌株 *I. orientalis* SD108 在分批培养中生产了 11.63 g/L 的丁二酸, 转化率为 0.12 g/g, 生产力为 0.11 g/(L·h)^[41]。在该工作的基础上, 赵惠民团队进一步对耐酸酵母 *I. orientalis* 进行代谢工程改造, 以促进丁二酸生产; 通过表达粟酒裂殖酵母来源的丁二酸转运蛋白 SpMae1 增强丁二酸的外排, 敲除 *Pdc* 和 *Gpd* 以减少乙醇和甘油副产物的积累, 进一步敲除了参与丁二酸向内摄取的羧酸转运蛋白 PkJen2-1 以及线粒体 NADH 脱氢酶 Nde 增加了用于丁二酸生产的胞质 NADH 供应, 成功构建了高产丁二酸的工程菌株(图 3); 在 pH 3.0 的糖基培养基中进行补料分批发酵获得了丁二酸的最高产量, 即在基本培养基中产生了 109.50 g/L 的丁二酸, 在甘蔗汁培养基中产生了 104.60 g/L 的丁二酸; 并在中试规模放大 300 倍的发酵罐中进一步使用甘蔗汁培养基进行分批发酵, 获得了 63.10 g/L 的丁二酸, 其可以以 64.0% 的产率直接结晶, 而无需进一步酸化发酵液; 最后, 该工作模拟了一个端到端(end-to-end)的低 pH 丁二酸生产管线, 技术经济分析和生命周期评估表明, 该工艺是可行的, 相对于化石生产工艺, 可以减少 34%–90% 的温室气体排放^[15]。可以看出, *I. orientalis* 菌株已经具备出色的生产性能, 并能够被用于丁二酸的大规模生产。

3.3 解脂耶氏酵母

解脂耶氏酵母作为一种非常规酵母, 属于专性好氧微生物, Crabtree 效应阴性, 并且其全基因组序列已经测定完成, 是被美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)认证为安全的微生物(GRAS), 这使得其在工业应用中更具优势。解脂耶氏酵母还具有广泛的碳源利用能力, 可将烷烃类或疏水性物质作为

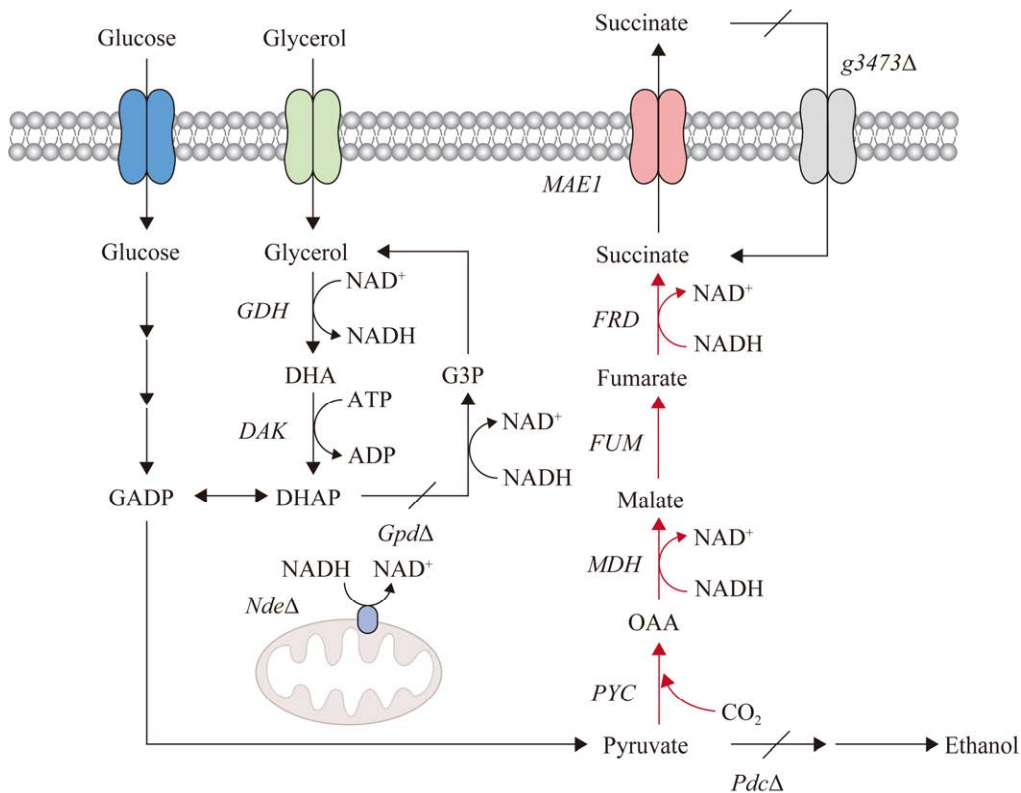


图3 代谢工程改造东方伊萨酵母生产丁二酸^[15] 红色箭头代表还原 TCA 途径, Δ 代表基因敲除

Figure 3 Metabolic engineering of *Issatchenkia orientalis* for succinic acid production^[15]. G6P: Glucose 6-phosphate; GADP: Glycerinaldehyde 3-phosphate; DHAP: Dihydroxyacetone phosphate; DHA: Dihydroxyacetone; G3P: Glycerol 3-phosphate; OAA: Oxaloacetate; NDE: External NADH dehydrogenase; GPD: Glycerol-3-phosphate dehydrogenase; PDC: Pyruvate decarboxylase; PYC: Pyruvate carboxylase; MDH: Malate dehydrogenase; FUM: Fumarase; FRD: Fumarate reductase; MAE1: Dicarboxylic acid transporter; GDH: Glycerol dehydrogenase; DAK: Dihydroxyacetone kinase; g3473: Dicarboxylic acid importer. The red arrow represents the reductive TCA pathway and Δ represents gene knockout.

碳源利用,适用于高密度发酵^[42]。目前,解脂耶氏酵母作为柠檬酸^[43]、异柠檬酸^[44]和 α -酮戊二酸^[45]等有机酸的天然过量生产者已被广泛研究。近些年来的一系列研究表明解脂耶氏酵母具有丁二酸合成的潜力,有望成为丁二酸工业化生产菌株^[16,46-62]。Kamzolova 等^[46]首次报道了以解脂耶氏酵母为宿主,通过 α -酮戊二酸氧化生产丁二酸的方法,其产量达到了 64.30 g/L;继这一发现之后,该研究团队进一步利用这种酵母能够分泌高浓度 α -酮戊二酸的特性,开发

出一种两步法的丁二酸生产方法。他们首先构建了 α -酮戊二酸的高产菌株 VKMY-2412,该菌株能生产 88.70 g/L 的 α -酮戊二酸;随后,在 H_2O_2 存在的条件下进行化学脱羧反应,将 α -酮戊二酸转化为丁二酸^[47-48]。这一方法的产量远远超过了经过复杂基因修饰的酿酒酵母所能达到的丁二酸产量。自此,解脂耶氏酵母作为丁二酸生产的有力候选者,受到了科研界的广泛关注和深入研究。

目前已有大量研究致力于通过代谢工程技

术直接提升解脂耶氏酵母合成丁二酸的能力,从而减少对化学方法的依赖。在这些研究中,提升丁二酸产量的策略主要集中在对氧化 TCA 途径的改造上,主要是通过降低琥珀酸脱氢酶的活性来减少丁二酸在 TCA 循环中向延胡索酸的转化。此外,增强乙醛酸旁路途径也被视为一种有效的策略。在解脂耶氏酵母中,琥珀酸脱氢酶由 5 个不同的亚基组成: 黄素蛋白亚基 YALI0D11374g (*Sdh1*)、铁硫亚基 YALI0D23397g (*Sdh2*)、细胞色素 b560 亚基 YALI0E29667g (*Sdh3*)、膜锚定亚基 YALI0A14784g (*Sdh4*)、琥珀酸脱氢酶组装因子 2 YALI0F11957g (*Sdh5*)。通过精确调控这些亚基的表达和活性,科学家们希望能够进一步优化解脂耶氏酵母的代谢途径,以实现更高效地生产丁二酸。

俄罗斯国家工业微生物保藏中心的 Yuzbashev 等^[49]早期的研究表明 *Sdh2* 基因的缺失会妨碍解脂耶氏酵母 Y-3314 对葡萄糖的利用,但它可以消耗甘油作为碳源,最终在摇瓶中生产了 17.40 g/L 的丁二酸。*Sdh* 基因的缺失会抑制丁二酸向延胡索酸的转化从而破坏了 TCA 循环,导致还原当量(FADH_2)再生不足,从而导致酵母细胞中通过氧化磷酸化产生的 ATP 合成减少;此外,丁二酸的输出是一种能量依赖性过程,会加剧 *Sdh* 缺失突变体中 ATP 的消耗;因此,ATP 的不足被认为是导致这些突变体在葡萄糖上生长受阻的主要原因;另一方面,将碳源从葡萄糖转换为甘油时,甘油代谢途径比葡萄糖多产生 3 个 ATP 分子,这不仅支持了细胞的生长,也使得低 pH 条件下的丁二酸生产成为可能^[50]。*Sdh* 直接参与氧化磷酸化和 TCA 循环,它的失活通常会造成解脂耶氏酵母的生长和代谢障碍,显著降低其对葡萄糖的利用能力;因此,该团队对菌株 Y-3314 进行

了化学诱变和筛选,并结合代谢进化的策略恢复了菌株的葡萄糖利用能力,鉴定出性能更好的突变体 Y-4215,该突变体在葡萄糖上能够产生 50.20 g/L 的丁二酸^[51]。Bondarenko 等^[52]进一步优化了解脂耶氏酵母 VKPM Y3753 在生物反应器中的培养条件,发现通过重复补料分批发酵的代谢进化,丁二酸产量显著增加;在不进行 pH 控制的葡萄糖矿物培养基中,48 h 内能够产生 55.30 g/L 的丁二酸,最大生产力达到 2.60 g/(L·h),发酵结束后的 pH 值降低至 3.6。Jost 等^[53]通过将 *Sdh2* 基因的内源启动子替换为解脂耶氏酵母的 3-酮脂酰辅酶 A 硫解酶编码基因(*Pot1*)的诱导型启动子,构建了一个 *Sdh* 活性降低 64% 的解脂耶氏酵母菌株 H222-AZ2;在氧限制条件下的生物反应器中发酵时,该菌株能够产生 25.00 g/L 的丁二酸,转化率为 0.26 g/g 甘油,生产率为 0.15 g/(L·h)。此外,Babaei 等^[54]证明了在截短 *Sdh1* 启动子的解脂耶氏酵母中,其 *Sdh* 活性降低 77%,但仍保留了在葡萄糖上生长的能力;同时通过过表达乙醛酸途径和氧化 TCA 途径的基因,进一步提高了丁二酸的产量;在 pH 5.0 的矿物培养基中的分批补料生物反应器中,该菌株能够产生 35.30 g/L 的丁二酸,转化率为 0.26 g/g 葡萄糖。

香港城市大学的 Carol Sze Ki Lin 团队与本课题组合作,成功敲除了 *Po1f* 菌株(W29 的衍生菌)中的 *Sdh5* 基因,得到了菌株 PGC01003^[55];在含甘油的复合培养基上,该菌株在 pH 控制在 6.0 的原位纤维床生物反应器(*is*FBB)中展现出显著的生长优势,其细胞总生物量急剧增加,发酵滞后时间显著缩短;这一优化的培养条件使得该菌株能够高效生产丁二酸,产量高达 198.20 g/L,转化率达到了 0.42 g/g 甘油^[56-57]。研究人员还发现菌株 PGC01003 的葡萄糖代谢

受到了损害；即使在摇瓶中经过 120 h 的培养，该菌株也仅能消耗不超过 6.00 g/L 的葡萄糖；然而，采用补料分批发酵，以粗甘油为碳源能够生产最高 160.00 g/L 的丁二酸^[55]。为了克服这一代谢障碍，Yang 等^[58]对菌株 PGC01003 在葡萄糖上进行了为期 21 d 的适应性实验室进化，得到了葡萄糖代谢恢复的菌株 PSA02004，该菌株在含有葡萄糖的复杂培养基 YPD (pH 6.0) 中产生了 65.70 g/L 的丁二酸；该菌株在 *isFBB* 中进一步进行了约 60 d 的酸耐受性进化，得到了菌株 PSA3.0；在葡萄糖为碳源的补料分批发酵过程中，该菌株能够在 pH 3.0 的条件下产生 76.80 g/L 的丁二酸^[59]。

上述研究主要弱化了参与氧化 TCA 途径的琥珀酸脱氢酶亚基的活性，造成丁二酸的溢出，但转化率仍然偏低。本团队创新性地在严格好氧的解脂耶氏酵母中引入了还原 TCA 途径，同时偶联氧化 TCA 途径进行丁二酸合成，提高了丁二酸的产量和转化率。研究人员首先注意到在丁二酸生产过程中会积累大量的乙酸副产物，并发现琥珀酸/乙酰辅酶 A 转移酶 Ach1 的存在是造成乙酸溢流的主要原因；基于这一发现，本团队对 *Sdh5* 敲除菌株 PGC01003 进行了进一步的遗传改造：敲除乙酰辅酶 A 水解酶 (Ach1) 并表达酿酒酵母来源的磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (Pck) 以及内源性的琥珀酰辅酶 A 合成酶 β 亚基 (Scs2)；改造后的菌株 PGC202 在含甘油的复杂培养基中产生了 110.70 g/L 的丁二酸，并且无须调节 pH；此外，由于乙酸途径的消除，该菌株表现出了对低 pH 环境很强的耐受性，不过并未说明该菌株是否恢复了利用葡萄糖的能力^[60]。但 Yu 等^[61]的研究显示，通过敲除 Ach1，菌株 PGC202 能够有效利用葡萄糖进行丁二酸生产，最后在含有复杂培养基的生物反应器中产生了 53.60 g/L 的丁二酸，转化率为

0.61 g/g 葡萄糖。据此，推测乙酸过量积累可能是导致 *Sdh* 缺陷型菌株葡萄糖代谢障碍的原因之一。本团队还发现，通过过表达粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 来源的二羧酸转运蛋白 SpMac，可以增强丁二酸的分泌能力；在以葡萄糖作为碳源，发酵 pH 控制在 5.5 的条件下，丁二酸产量可以提高至 101.40 g/L，但是转化率仅为 0.37 g/g 葡萄糖^[62]。对于大宗化学品的商业化发酵生产，通常需要实现 100.00–150.00 g/L 以上的产量，因此上述报道中大部分解脂耶氏酵母菌株仍未达到这一标准，难以满足工业化生产的需求。在最近的一项研究中，本团队提出了一种高效的丁二酸生产策略；通过在琥珀酸脱氢酶亚基 *Sdh5* 失活的解脂耶氏酵母菌株中构建线粒体定位的还原性 TCA 途径，并偶联氧化型和还原型 TCA 循环实现 NADH 的再生；在不调节 pH 的情况下，中试规模的丁二酸产量达到了 111.90 g/L，转化率为 0.79 g/g 葡萄糖 (图 4)；同时，通过简单的过滤、蒸馏和结晶步骤，成功从酸性发酵液中提取并纯化出丁二酸晶体^[16]。该解脂耶氏酵母工程菌株有望用于丁二酸的工业化生产。

综上所述，还原 TCA 途径对于解脂耶氏酵母的丁二酸生产起到了关键作用。我们可以通过深入分析酵母菌株的代谢网络，识别并强化丁二酸生物合成的关键途径。例如，通过过表达或敲除特定基因，增强还原 TCA 途径的活性，从而提高丁二酸的产量。同时，通过蛋白质工程或计算生物学方法，对丁二酸合成途径中的关键酶进行定向进化，以提高其催化效率和稳定性，减少副产物的生成，提高产物的收率。此外，还可以通过实验室适应性进化，筛选出耐受高浓度丁二酸的酵母菌株，这些菌株可能具有更高的底物转化率和产物耐受性。

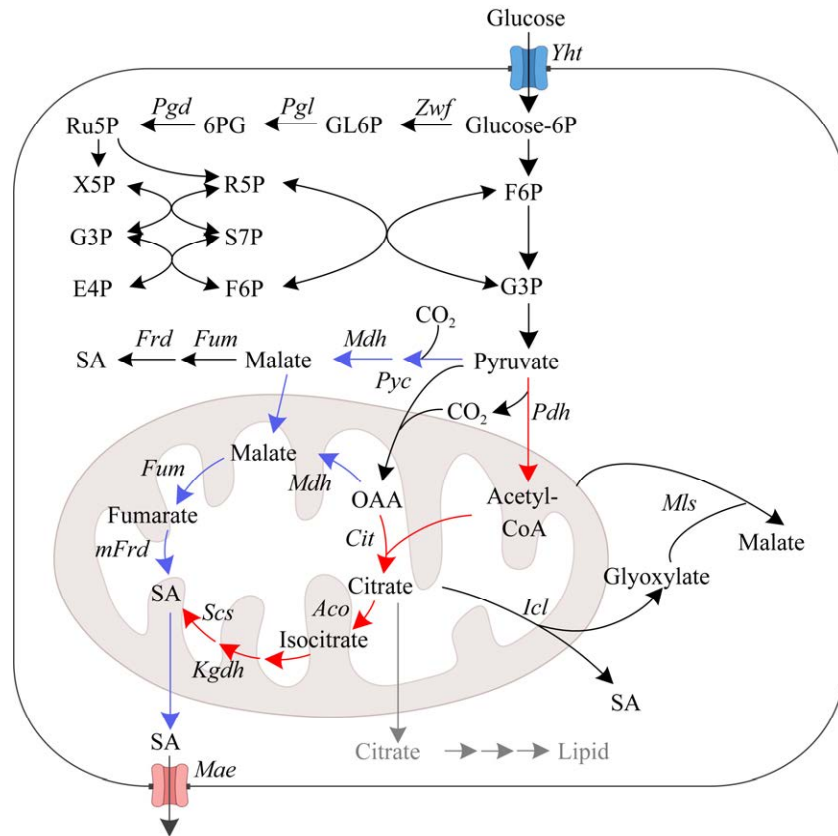


图4 解脂耶氏酵母中线粒体还原 TCA 途径的构建实现丁二酸的高效合成

Figure 4 Construction of mitochondrial reductive TCA pathway in *Yarrowia lipolytica* to achieve efficient synthesis of succinic acid. Zwf: Glucose 6-phosphate dehydrogenase; Pgl: 6-phospho-gluconolactonase; Pgd: Gluconate 6-phospho dehydrogenase; F6P: Fructose 6-phosphate; X5P: Xylulose 5-phosphate; S7P: Sedoheptulose 7-phosphate; GL6P: Gluconolactone 6-phospho; 6PG: Gluconate 6-phospho; Ru5P: Ribulose 5-phosphate; R5P: Ribose 5-phosphate; G3P: Glyceraldehyde 3-phosphate; E4P: Erythrose 4-phosphate; Yht: Glucose transport protein; Mae: Succinic acid transporter; Pdh: Pyruvate dehydrogenase; Pyc: Pyruvate carboxylase; Cit: Citrate synthase; Aco: Aconitase; Kgdh: α -Ketoglutarate dehydrogenase; Scs: Succinyl-CoA synthetase; Mdh: Malate dehydrogenase; Fum: Fumarase; Frd: Fumarate reductase; mFRD: Mitochondrial localization of fumarate reductase; Icl: Isocitrate lyase; Mls: Malate synthase; SA: Succinic acid.

4 酵母利用非粮原料合成丁二酸的探索

利用酵母发酵大规模生产丁二酸的经济效益与原料成本密切相关。目前，大多数酵母发酵生产丁二酸的首选碳源还是葡萄糖，这可能会增加生产成本并对粮食供应造成压力。随着不可再生资源的日益消耗以及环境问题的显

现，探索以非粮原料为底物的酵母丁二酸生产工艺将有助于降低整体的生产成本并获得额外的可持续性效益。

4.1 木糖

木糖是木质纤维素生物质的半纤维素部分中最普遍的糖类物质，木糖的有效利用对绿色经济的发展具有重要意义^[63]。解脂耶氏酵母能够代谢多种底物，包括亲水性和疏水性碳源，

然而该酵母缺乏有效的木糖摄取代谢途径，而且关于木糖利用的研究信息相对匮乏^[64]。为了实现酵母利用廉价的甘蔗渣水解物生产丁二酸，Ong 等^[65]探究了 PSA02004 菌株共同利用葡萄糖和木糖发酵生产丁二酸的可行性；研究

表明，尽管木糖消耗速率较慢，但解脂耶氏酵母工程菌株能够吸收甘蔗渣水解物中的葡萄糖和木糖，丁二酸产量、转化率和生产速率分别为 33.20 g/L、0.58 g/g 和 0.33 g/(L·h)。尽管如此，丁二酸生产菌株仍无法在木糖为唯一碳源

表 1 不同酵母宿主的丁二酸生产性能对比

Table 1 Comparison of succinic acid production performance among different yeast hosts

Yeast hosts	Substrates	Fermentation mode	pH	Titer (g/L)	Yield (g/g)	Productivity (g/(L·h))	References
<i>S. cerevisiae</i> AH22ura3	Glucose	Shake flasks for 168 h	Not mentioned	3.62	0.07	0.02	[34]
<i>S. cerevisiae</i> 8D Evolved with pICL1	Glucose	Shake flasks	5.0	0.90	0.05	N/A	[31]
<i>S. cerevisiae</i> S149sdh12	Glucose	Shake flasks for 72 h	Not mentioned	N/A	0.02	N/A	[35]
<i>S. cerevisiae</i> PMCFfg	Glucose	Bioreactors for 120 h	3.8	12.97	0.13	N/A	[14]
<i>S. cerevisiae</i> UBR2CBS-DHA-SA-AnDCT-02	Glycerol	Shake flasks for 168 h	5.0	10.70	0.22	N/A	[36]
<i>S. cerevisiae</i> <i>PYC2oe-mpc3Δ</i> <i>sdh1Δ</i>	Glycerol	Shake flasks for 144 h	6.0	45.50	0.66	N/A	[38]
<i>P. kudriavzevii</i> 13723	Glucose	Aerobic batch fermentation	3.0	48.20	0.45	0.97	[9]
<i>I. orientalis</i> 257	Glucose	Shake flasks for 96 h	Not mentioned	89.00	N/A	0.93	[40]
<i>I. orientalis</i> SD108	Glucose	Shake flasks	Initial pH 5.6	11.63	0.12	0.11	[41]
<i>I. orientalis</i>	Sugarcane juice	Pilot scale	3.0	63.10	0.50	0.66	[15]
<i>Y. lipolytica</i> Y-3314	Glycerol	Shake flasks for 7 d	3.5	17.40	N/A	N/A	[49]
<i>Y. lipolytica</i> Y-4215	Glucose	Bioreactors for 54 h	Without pH control	50.20	0.43	N/A	[51]
<i>Y. lipolytica</i> VKPM Y3753	Glucose	Bioreactors for 48 h	Without pH control	55.30	0.34	2.60	[52]
<i>Y. lipolytica</i> H222-AZ2	Glycerol	Bioreactors for 165 h	5.0	25.00	0.26	0.15	[53]
<i>Y. lipolytica</i> PGC01003	Glycerol	<i>is</i> FBB for 238 h	6.0	198.20	0.42	0.84	[56]
<i>Y. lipolytica</i> PGC01003	Glycerol	Bioreactors for 400 h	6.0	160.20	0.40	0.40	[55]
<i>Y. lipolytica</i> PSA02004	Glucose	Bioreactors for 96 h	6.0	65.70	0.50	0.30	[58]
<i>Y. lipolytica</i> PSA3.0	Glucose	<i>is</i> FBB for 324 h	3.0	76.80	0.20	0.24	[59]
<i>Y. lipolytica</i> PGC202	Glycerol	Bioreactors for 138 h	Without pH control	110.70	0.53	0.80	[60]
<i>Y. lipolytica</i> PGC202	Glucose	Bioreactors for 110 h	Without pH control	53.60	0.61	0.52	[61]
<i>Y. lipolytica</i> ST8578	Glucose	Bioreactors for 58 h	5.0	35.30	0.26	0.60	[54]
<i>Y. lipolytica</i> PGC62-SYF-Mae	Glucose	Bioreactors for 144 h	5.5	101.40	0.37	0.70	[62]
<i>Y. lipolytica</i> Hi-SA2	Glucose	A 50-L bioreactor for 62 h	Without pH control	111.90	0.79	1.79	[16]

的培养基中生长。为了解决这一问题, Prabhu 等^[66]在解脂耶氏酵母 PSA02004 菌株中引入了一条完整的木糖代谢途径, 包含木糖还原酶(xylose reductase, Xr)、木糖醇脱氢酶(xylitol dehydrogenase, Xdh)和木酮糖激酶(xylulose kinase, Xk), 成功实现了重组菌株在木糖培养基中的强劲生长并积累了大量丁二酸; 在分批补料发酵过程中, 该重组菌株利用甘蔗渣水解物获得了 11.80 g/L 的生物质浓度($OD_{600}=56.1$)和 22.30 g/L 的丁二酸产量, 并且在发酵过程中 pH 逐渐降低至 4.0 以下。

尽管丁二酸的生产技术得到了一定的发展, 但酵母对于木质纤维素生物质利用的瓶颈依然存在, 目前面临的挑战包括木质纤维素水解产物中的可发酵糖浓度相对较低, 以及存在较多的抑制物。

4.2 甘油

甘油是一种丰富而廉价的碳源。生物柴油作为最有前景的可再生燃料之一, 其生产过程会伴随着大量粗甘油副产物的产生。据估算, 每生产 9 kg 的生物柴油, 就会形成约 1 kg 的粗甘油副产物^[67-68]。与葡萄糖相比, 甘油是一种还原性更强的碳源, 1 mol 甘油转化为丙酮酸会产生 2 mol NADH。由于其较高的还原度, 利用甘油作为底物的发酵过程将有利于产生更多的还原产物, 如丁二酸, 从而缓解以葡萄糖为底物时还原当量不足的问题^[69]。本课题组先前的研究表明, 随着 Sdh5 在解脂耶氏酵母中的失活, 所得菌株在分批发酵中利用粗甘油产生了 43.00 g/L 的丁二酸, 并通过补料分批发酵产生了 160.00 g/L 的丁二酸^[55]。此外, 在原位纤维床生物反应器中, 以粗甘油为底物的补料分批发酵中最高产生了 209.70 g/L 的丁二酸^[57]。研究人员为了进一步提高菌株的甘油摄取能力, 在解脂耶氏酵母菌株 PGC01003 中过表达了甘

油激酶编码基因 *Gut1*, 所得菌株 RIY420 的甘油摄取量比亲本菌株提高了 13.5%, 在补料分批发酵过程中丁二酸产量提高了 11.0%^[70]。这表明粗甘油是一种极具工业应用潜力的碳源, 可用于丁二酸的大规模生产。

4.3 乙酸

乙酸通常由石化路线生产, 然而随着市场对生物基产品需求的激增, 由微生物发酵和厌氧消化等生物过程产生的乙酸已成为一种备受关注的原料, 价格比葡萄糖更低^[71]。此外, 乙酸也是生物质水解产物和工业废水的重要组成部分, 这些物质中存在着大量的乙酸。因此, 乙酸和含乙酸的废弃物可作为一种低成本的碳源, 通过微生物代谢途径合成化学品、燃料、塑料单体等^[72-73]。近期, 英国克兰菲尔德大学和印度理工学院的研究人员在解脂耶氏酵母 PSA0204PP 中表达了乙酰辅酶 A 合酶, 重组菌株能以乙酸为唯一碳源生长, 并积累了丁二酸; 由于乙酸对微生物具有一定的毒性, 研究人员进一步对重组菌株进行了适应性实验室进化以提高菌株对乙酸的耐受性; 在高浓度乙酸下, 进化菌株 ACS5.0 能快速生长并积累脂质和丁二酸; 在补料分批发酵过程中, 该菌株能够产生 6.50 g/L 的丁二酸和 1.50 g/L 的脂质, 乙酸的摄取速率为 0.20 g/(L·h), 比亲本菌株提高了约 2.86 倍; 乙酸和葡萄糖的共发酵显著提高了丁二酸产量和脂质积累, 分别达到了 12.20 g/L 和 1.80 g/L^[74]。这项研究展示了一种将富含糖和高浓度乙酸的生物质水解产物直接转化为丁二酸的潜在途径。

4.4 甲醇

甲醇是一种富含能量的 C1 液体化合物, 因其储量丰富、成本低、可利用性高等优点被认为是生物制造过程中理想的可再生原料^[75-76]。甲醇可以以二氧化碳为原料通过光催化或电还

原制备,这有助于减少碳足迹,实现国家“碳中和”的目标^[77-79]。与葡萄糖和甘油等传统碳源相比,甲醇还原性更强、能量更高,这将有利于细胞生长和生物合成^[80-81]。生物催化过程具有选择性高、反应条件温和等特点,通过设计微生物细胞工厂进行甲醇生物转化,可以用于高附加值化学品的生产^[75]。近期,南京工业大学的章文明、姜岷团队工程化改造解脂耶氏酵母以实现甲醇的高效利用和丁二酸的生产;当协同使用甲醇和木糖作为碳源时,人工构建的甲基营养型解脂耶氏酵母表现出 3.40 g/L 的甲醇消耗;研究人员进一步对过氧化物酶体 Xu5P 循环途径进行重新布线以改善前体供应,重组菌株表现出增强的细胞生长和甲醇利用率;此外,研究人员还发现热休克蛋白 70 (Hsp70)可以使重组菌株有效地利用甲醇进行细胞生长和代谢;在琥珀酸脱氢酶亚基 5 (Sdh5)失活后,工程菌株可以利用甲醇合成 0.92 g/L 的丁二酸^[82]。这项研究证明了将甲醇生物转化为有价值化学品的巨大潜力。

5 总结与展望

基于酵母的微生物发酵生产丁二酸具有以下几个优点:首先,酵母是一种研究广泛的微生物,因其易于操作的特性,成为生产丁二酸的理想宿主。采用基因工程手段可以引入特定的代谢途径并强化参与丁二酸合成的关键酶;其次,酵母对酸性条件有很高的耐受性,这有利于低 pH 下丁二酸的生产,这种特性同时也减少了发酵过程中 pH 调节的需要,简化了生产过程并降低了成本;此外,酵母还可以利用广泛的碳源,包括可再生原料,如木质纤维素生物质和粗甘油。这种对于低成本和可持续原料的利用特性使酵母成为了有吸引力的丁二酸生产微生物宿主。

尽管有上述优势,目前生物基丁二酸的生产成本仍然较高,这限制了其在市场上的竞争力,难以实现下游 1,4-丁二醇和 PBS 的石化基替代。参考黑曲霉通过发酵工艺高效生产柠檬酸的案例,其产量可达 190.00 g/L,转化率高达 1.00 g/g 葡萄糖,且生产速率为 3.00 g/(L·h),因此当前丁二酸生产酵母菌株仍然有较大提升空间。与细菌宿主相比,酵母菌株在丁二酸的合成效率上可能存在差距,需要进一步提高产量和原料转化率。在某些情况下,酵母菌株可能会积累乙醇等副产物,这不仅影响丁二酸的产量,还可能增加下游分离纯化的复杂性。由于缺乏天然的延胡索酸还原酶等关键酶,酵母菌株不能进行还原性丁二酸发酵,需要通过代谢工程手段引入异源途径。尽管酵母具有一定的耐酸性,但在高产物浓度下保持稳定生长的能力仍需增强,以应对工业规模生产的需求。虽然酵母可以利用非粮原料,但原料的供应稳定性和成本仍然是限制大规模生产的关键因素。相比于已经工业化的细菌发酵过程,基于酵母的丁二酸生产技术在某些方面可能尚未完全成熟,需要进一步地研究和开发。

为实现生物基丁二酸的经济高效生产,未来还可以关注以下几个关键研究方向以改善丁二酸生产酵母菌株的性能。

(1) 菌株的遗传改良。深入挖掘巴斯德毕赤酵母、多形汉逊酵母等其他酵母底盘在丁二酸生物合成方面的潜力。采用精准的基因编辑工具,比如 CRISPR-Cas9 系统,可以系统地改造酵母菌株的代谢网络,以增强特定酶的活性,降低副产物形成,提高丁二酸的产量及原料转化效率。此外,通过增强工程菌株的抗逆性,可以使其在较高产物浓度下保持稳定生长,从而提高整体产量。

(2) 发酵过程的优化。通过精细控制发酵参

数,如温度、pH值和溶氧水平等,以优化工程菌株的生长和产物合成,采用连续或半连续发酵模式有助于提升生产效率和生产速率。

(3) 原料策略的多样化。探索和利用成本更低、广泛可得的非食用生物质原料作为碳源,如农业废弃物,不仅能降低原料成本,同样减轻对食用资源的依赖。

(4) 下游处理技术的创新。开发更加高效和经济的提纯和分离技术,以降低产品的综合生产成本。

(5) 合成生物学的应用。利用合成生物学工具,如动态调控的启动子、合成调控网络等,进一步优化酵母菌株的生产性能。

(6) 系统生物学与计算模型。运用系统生物学方法和计算模型来预测和指导代谢工程,提高丁二酸的生产效率。

(7) 环境影响评估。对基于酵母的丁二酸生产过程进行全面的环境影响评估,确保其可持续性。

(8) 市场与政策支持。研究市场需求,制定相应的政策支持,提升生物基丁二酸在市场上的接受度。

总之,酿酒酵母、东方伊萨酵母和解脂耶氏酵母等种类的酵母在生产丁二酸方面取得了重大的进展。这些酵母菌株不仅在利用多样化碳源、如糖、木质纤维素和甘油等方面显示出了卓越的能力,而且因其易于遗传操作、高度的耐酸性和对不利环境条件的适应性,已成为工业规模丁二酸生产有前景的候选者。随着工艺优化、产量提高以及成本的进一步降低,基于酵母细胞工厂的丁二酸微生物发酵法将在未来的生物化工产业中发挥越来越重要的作用,促进可持续化学品的生产。

REFERENCES

- [1] CHOI S, SONG CW, SHIN JH, LEE SY. Biorefineries for the production of top building block chemicals and their derivatives[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 28: 223-239.
- [2] JIANG M, MA JF, WU MK, LIU RM, LIANG LY, XIN FX, ZHANG WM, JIA HH, DONG WL. Progress of succinic acid production from renewable resources: metabolic and fermentative strategies[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 245(Pt B): 1710-1717.
- [3] JAMBUNATHAN P, ZHANG KC. Engineered biosynthesis of biodegradable polymers[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2016, 43(8): 1037-1058.
- [4] JANSEN MLA, van GULIK WM. Towards large scale fermentative production of succinic acid[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2014, 30: 190-197.
- [5] 万屹东, 高有军, 马江锋. 生物法制备丁二酸的研究及产业化进展[J]. *生物加工过程*, 2020, 18(5): 583-591, 630.
WAN YD, GAO YJ, MA JF. Progress in industrialization on succinic acid production by fermentation[J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2020, 18(5): 583-591, 630 (in Chinese).
- [6] 刘嵘明, 梁丽亚, 吴明科, 姜岷. 微生物发酵生产丁二酸研究进展[J]. *生物工程学报*, 2013, 29(10): 1386-1397.
LIU RM, LIANG LY, WU MK, JIANG M. Progress in microbial production of succinic acid[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2013, 29(10): 1386-1397 (in Chinese).
- [7] GUETTLER MV, RUMLER D, JAIN MK. *Actinobacillus succinogenes* sp. nov., a novel succinic-acid-producing strain from the bovine rumen[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1999, 49(1): 207-216.
- [8] LEE P, LEE S, HONG S, CHANG H. Isolation and characterization of a new succinic acid-producing bacterium, *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E, from bovine rumen[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 58(5):

- 663-668.
- [9] AHN JH, JANG YS, LEE SY. Production of succinic acid by metabolically engineered microorganisms[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2016, 42: 54-66.
- [10] OREOLUWA JOKODOLA E, NARISSETTY V, CASTRO E, DURGAPAL S, COULON F, SINDHU R, BINOD P, RAJESH BANU J, KUMAR G, KUMAR V. Process optimisation for production and recovery of succinic acid using xylose-rich hydrolysates by *Actinobacillus succinogenes*[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 344(Pt B): 126224.
- [11] ZHU XN, TAN ZG, XU HT, CHEN J, TANG JL, ZHANG XL. Metabolic evolution of two reducing equivalent-conserving pathways for high-yield succinate production in *Escherichia coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2014, 24: 87-96.
- [12] KUMAR R, BASAK B, JEON BH. Sustainable production and purification of succinic acid: a review of membrane-integrated green approach[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2020, 277: 123954.
- [13] LI C, ONG KL, CUI ZY, SANG ZY, LI XT, PATRIA RD, QI QS, FICKERS P, YAN JB, LIN CSK. Promising advancement in fermentative succinic acid production by yeast hosts[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 401: 123414.
- [14] YAN DJ, WANG CX, ZHOU JM, LIU YL, YANG MH, XING JM. Construction of reductive pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for effective succinic acid fermentation at low pH value[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 156: 232-239.
- [15] TRAN VG, MISHRA S, BHAGWAT SS, SHAFAEI S, SHEN YH, ALLEN JL, CROSLY BA, TAN SI, FATMA Z, RABINOWITZ JD, GUEST JS, SINGH V, ZHAO HM. An end-to-end pipeline for succinic acid production at an industrially relevant scale using *Issatchenkia orientalis*[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 6152.
- [16] CUI ZY, ZHONG YT, SUN ZJ, JIANG ZN, DENG JY, WANG Q, NIELSEN J, HOU J, QI QS. Reconfiguration of the reductive TCA cycle enables high-level succinic acid production by *Yarrowia lipolytica*[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 8480.
- [17] 于建荣, 毛开云, 陈大明, 江宏波. 生物基丁二酸产业化发展及态势分析[J]. *生物产业技术*, 2014(1): 42-46.
- YU JR, MAO KY, CHEN DM, JIANG HB. Industrial development and trend analysis of bio-based succinic acid[J]. *Biotechnology & Business*, 2014(1): 42-46 (in Chinese).
- [18] VUORISTO KS, MARS AE, SANDERS JPM, EGGINK G, WEUSTHUIS RA. Metabolic engineering of TCA cycle for production of chemicals[J]. *Trends in Biotechnology*, 2016, 34(3): 191-197.
- [19] CHENG KK, ZHAO XB, ZENG J, ZHANG JA. Biotechnological production of succinic acid: current state and perspectives[J]. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2012, 6(3): 302-318.
- [20] LIN H, BENNETT GN, SAN KY. Genetic reconstruction of the aerobic central metabolism in *Escherichia coli* for the absolute aerobic production of succinate[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2005, 89(2): 148-156.
- [21] GONG FY, CAI Z, LI Y. Synthetic biology for CO₂ fixation[J]. *Science China Life Sciences*, 2016, 59(11): 1106-1114.
- [22] LIU XT, FENG XJ, DING YM, GAO WJ, XIAN M, WANG JC, ZHAO G. Characterization and directed evolution of propionyl-CoA carboxylase and its application in succinate biosynthetic pathway with two CO₂ fixation reactions[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 62: 42-50.
- [23] LUCENA RM, DOLZ-EDO L, BRUL S, de MORAIS MA Jr, SMITS G. Extreme low cytosolic pH is a signal for cell survival in acid stressed yeast[J]. *Genes*, 2020, 11(6): 656.
- [24] PEREIRA R, MOHAMED ET, RADI MS, HERRGÅRD MJ, FEIST AM, NIELSEN J, CHEN Y. Elucidating aromatic acid tolerance at low pH in *Saccharomyces cerevisiae* using adaptive laboratory evolution[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(45): 27954-27961.
- [25] 徐伟, 柴丽娜, 傅徐阳, 马婷婷, 付大伟, 王薇. 耐低 pH 酵母菌的分离及其对酸胁迫环境的适应性[J].

- 食品工业科技, 2019, 40(16): 112-117.
- XU W, CHAI LN, FU XY, MA TT, FU DW, WANG W. Isolation of low pH resistant yeast and its adaptability to acid stress environment[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(16): 112-117 (in Chinese).
- [26] 齐艳利, 刘晖, 周配, 高聪, 刘立明. 过表达基因 *elo1* 和 *ole1* 增强光滑球拟酵母 Δ med15B 菌株的低 pH 耐受能力[J]. 微生物学报, 2021, 61(5): 1359-1369.
- QI YL, LIU H, ZHOU P, GAO C, LIU LM. Enhancing low pH tolerance of *Candida glabrata* Δ med15B by overexpressing genes *Elo1* and *ole1*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(5): 1359-1369 (in Chinese).
- [27] OOKUBO A, HIRASAWA T, YOSHIKAWA K, NAGAHISA K, FURUSAWA C, SHIMIZU H. Improvement of L-lactate production by *CYB2* gene disruption in a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain under low pH condition[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2008, 72(11): 3063-3066.
- [28] 刘兴艳, 贾博, 赵芳, 王成, 李静媛, 战吉晟, 黄卫东. 酿酒酵母对弱有机酸胁迫的应激机制研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(6): 125-129.
- LIU XY, JIA B, ZHAO F, WANG C, LI JY, ZHAN JC, HUANG WD. Research progress on weak organic acid stress mechanism of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Food and Fermentation Industries, 2013, 39(6): 125-129 (in Chinese).
- [29] MAEDA T. The signaling mechanism of ambient pH sensing and adaptation in yeast and fungi[J]. The FEBS Journal, 2012, 279(8): 1407-1413.
- [30] ABBOTT DA, ZELLE RM, PRONK JT, van MARIS AJA. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of carboxylic acids: current status and challenges[J]. FEMS Yeast Research, 2009, 9(8): 1123-1136.
- [31] OTERO JM, CIMINI D, PATIL KR, POULSEN SG, OLSSON L, NIELSEN J. Industrial systems biology of *Saccharomyces cerevisiae* enables novel succinic acid cell factory[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e54144.
- [32] GOFFEAU A. Four years of post-genomic life with 6, 000 yeast genes[J]. FEBS Letters, 2000, 480(1): 37-41.
- [33] KUBO Y, TAKAGI H, NAKAMORI S. Effect of gene disruption of succinate dehydrogenase on succinate production in a sake yeast strain[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2000, 90(6): 619-624.
- [34] RAAB AM, GEBHARDT G, BOLOTINA N, WEUSTER-BOTZ D, LANG C. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the biotechnological production of succinic acid[J]. Metabolic Engineering, 2010, 12(6): 518-525.
- [35] ITO Y, HIRASAWA T, SHIMIZU H. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* to improve succinic acid production based on metabolic profiling[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2014, 78(1): 151-159.
- [36] 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.
- [37] KLEIN M, CARRILLO M, XIBERRAS J, ISLAM ZU, SWINNEN S, NEVOIGT E. Towards the exploitation of glycerol's high reducing power in *Saccharomyces cerevisiae*-based bioprocesses[J]. Metabolic Engineering, 2016, 38: 464-472.
- [38] RENDULIĆ T, PERPELEA A, ORTIZ JPR, CASAL M, NEVOIGT E. Mitochondrial membrane transporters as attractive targets for the fermentative production of succinic acid from glycerol in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. FEMS Yeast Research, 2024, 24: foae009.
- [39] 刘立明, 刘佳, 陈修来, 高聪, 王学明, 吴静, 宋伟, 魏婉清. 一株产丁二酸的酿酒酵母及其应用: CN116144516B[P]. 2023-08-08.
- LIU LM, LIU J, CHEN XL, GAO C, WANG XM, WU J, SONG W, WEI WQ. A *Saccharomyces cerevisiae* for succinic acid production and its application: CN116144516B[P]. 2023-08-08 (in Chinese).
- [40] RUSH BRIAN J, WATTS KEVIN T, MCINTOSH JR. VERNON L, FOSMER ARLENE M, POYNTER GREGORY M, MCMULLIN THOMAS W. Yeast cells having reductive *tca* pathway from pyruvate to succinate and overexpressing an exogenous NAD(P)⁺

- transhydrogenase enzyme: United States Patent Application 20180100170[P]. 2018-04-12.
- [41] XIAO H, SHAO ZY, JIANG Y, DOLE S, ZHAO HM. Exploiting *Issatchenkia orientalis* SD108 for succinic acid production[J]. Microbial Cell Factories, 2014, 13: 121.
- [42] LIU HH, JI XJ, HUANG H. Biotechnological applications of *Yarrowia lipolytica*: past, present and future[J]. Biotechnology Advances, 2015, 33(8): 1522-1546.
- [43] CAVALLO E, CHARREAU H, CERRUTTI P, FORESTI ML. *Yarrowia lipolytica*: a model yeast for citric acid production[J]. FEMS Yeast Research, 2017, 17(8): fox084.
- [44] KAMZOLOVA SV, DEDYUKHINA EG, SAMOILENKO VA, LUNINA JN, PUNTUS IF, ALLAYAROV RL, CHIGLINTSEVA MN, MIRONOV AA, MORGUNOV IG. Isocitric acid production from rapeseed oil by *Yarrowia lipolytica* yeast[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(20): 9133-9144.
- [45] GUO HW, SU SJ, MADZAK C, ZHOU JW, CHEN HW, CHEN G. Applying pathway engineering to enhance production of alpha-ketoglutarate in *Yarrowia lipolytica*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(23): 9875-9884.
- [46] KAMZOLOVA SV, YUSUPOVA AI, VINOKUROVA NG, FEDOTCHEVA NI, KONDRASHOVA MN, FINOGENOVA TV, MORGUNOV IG. Chemically assisted microbial production of succinic acid by the yeast *Yarrowia lipolytica* grown on ethanol[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 83(6): 1027-1034.
- [47] KAMZOLOVA SV, VINOKUROVA NG, SHEMSHURA ON, BEKMAKHANOVA NE, LUNINA JN, SAMOILENKO VA, MORGUNOV IG. The production of succinic acid by yeast *Yarrowia lipolytica* through a two-step process[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(18): 7959-7969.
- [48] KAMZOLOVA SV, VINOKUROVA NG, DEDYUKHINA EG, SAMOILENKO VA, LUNINA JN, MIRONOV AA, ALLAYAROV RK, MORGUNOV IG. The peculiarities of succinic acid production from rapeseed oil by *Yarrowia lipolytica* yeast[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(9): 4149-4157.
- [49] YUZBASHEV TV, YUZBASHEVA EY, SOBOLEVSKAYA TI, LAPTEV IA, VYBORNAYA TV, LARINA AS, MATSUI K, FUKUI K, SINEOKY SP. Production of succinic acid at low pH by a recombinant strain of the aerobic yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2010, 107(4): 673-682.
- [50] YUZBASHEV TV, YUZBASHEVA EY, LAPTEV IA, SOBOLEVSKAYA TI, VYBORNAYA TV, LARINA AS, GVILAVA IT, ANTONOVA SV, SINEOKY SP. Is it possible to produce succinic acid at a low pH?[J]. Bioengineered Bugs, 2011, 2(2): 115-119.
- [51] YUZBASHEV TV, BONDARENKO PY, SOBOLEVSKAYA TI, YUZBASHEVA EY, LAPTEV IA, KACHALA VV, FEDOROV AS, VYBORNAYA TV, LARINA AS, SINEOKY SP. Metabolic evolution and ¹³C flux analysis of a succinate dehydrogenase deficient strain of *Yarrowia lipolytica*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2016, 113(11): 2425-2432.
- [52] 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.
- [53] JOST B, HOLZ M, AURICH A, BARTH G, BLEY T, MÜLLER RA. The influence of oxygen limitation for the production of succinic acid with recombinant strains of *Yarrowia lipolytica*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(4): 1675-1686.
- [54] 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.
- [55] GAO CJ, YANG XF, WANG HM, RIVERO CP, LI C,

- CUI ZY, QI QS, LIN CSK. Robust succinic acid production from crude glycerol using engineered *Yarrowia lipolytica*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9(1): 179.
- [56] LI C, YANG XF, GAO S, WANG HM, LIN CSK. High efficiency succinic acid production from glycerol via *in situ* fibrous bed bioreactor with an engineered *Yarrowia lipolytica*[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 225: 9-16.
- [57] LI C, GAO S, YANG XF, 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.
- [58] 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.
- [59] LI C, GAO S, LI XT, YANG XF, LIN CSK. Efficient metabolic evolution of engineered *Yarrowia lipolytica* for succinic acid production using a glucose-based medium in an *in situ* fibrous bioreactor under low-pH condition[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11: 236.
- [60] CUI ZY, GAO CJ, LI JJ, HOU J, LIN CSK, QI QS. Engineering of unconventional yeast *Yarrowia lipolytica* for efficient succinic acid production from glycerol at low pH[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 42: 126-133.
- [61] YU QL, CUI ZY, ZHENG YQ, HUO HL, MENG LL, XU JJ, GAO CJ. Exploring succinic acid production by engineered *Yarrowia lipolytica* strains using glucose at low pH[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2018, 139: 51-56.
- [62] 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): 145.
- [63] JAGTAP SS, RAO CV. Microbial conversion of xylose into useful bioproducts[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(21): 9015-9036.
- [64] RODRIGUEZ GM, HUSSAIN MS, GAMBILL L, GAO DF, YAGUCHI A, BLENNER M. Engineering xylose utilization in *Yarrowia lipolytica* by understanding its cryptic xylose pathway[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9(1): 149.
- [65] ONG KL, LI C, LI XT, ZHANG Y, XU JL, LIN CSK. Co-fermentation of glucose and xylose from sugarcane bagasse into succinic acid by *Yarrowia lipolytica*[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2019, 148: 108-115.
- [66] 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: 113.
- [67] DASARI MA, KIATSIMKUL PP, SUTTERLIN WR, SUPPES GJ. Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol[J]. *Applied Catalysis A: General*, 2005, 281(1/2): 225-231.
- [68] YANG FX, HANNA MA, SUN RC. Value-added uses for crude glycerol: a byproduct of biodiesel production[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2012, 5: 13.
- [69] LI Q, WU H, LI ZM, YE Q. Enhanced succinate production from glycerol by engineered *Escherichia coli* strains[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 218: 217-223.
- [70] ONG KL, FICKERS P, LIN CSK. Enhancing succinic acid productivity in the yeast *Yarrowia lipolytica* with improved glycerol uptake rate[J]. *The Science of the Total Environment*, 2020, 702: 134911.
- [71] MUTYALA S, KIM JR. Recent advances and challenges in the bioconversion of acetate to value-added chemicals[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 364: 128064.
- [72] KIEFER D, MERKEL M, LILGE L, HENKEL M, HAUSMANN R. From acetate to bio-based products: underexploited potential for industrial biotechnology[J]. *Trends in Biotechnology*, 2021, 39(4): 397-411.
- [73] KIM Y, LAMA SM, AGRAWAL D, KUMAR V, PARK S. Acetate as a potential feedstock for the production

- of value-added chemicals: metabolism and applications[J]. *Biotechnology Advances*, 2021, 49: 107736.
- [74] NARISSETTY V, PRABHU AA, BOMMAREDDY RR, COX R, AGRAWAL D, MISRA A, HAIDER MA, 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.
- [75] COTTON CA, CLAASSENS NJ, BENITO-VAQUERIZO S, BAR-EVEN A. Renewable methanol and formate as microbial feedstocks[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2020, 62: 168-180.
- [76] HAYNES CA, GONZALEZ R. Rethinking biological activation of methane and conversion to liquid fuels[J]. *Nature Chemical Biology*, 2014, 10: 331-339.
- [77] LI HZ, QIU CL, REN SJ, DONG QB, ZHANG SX, ZHOU FL, LIANG XH, WANG JG, LI SG, YU M. Na⁺-gated water-conducting nanochannels for boosting CO₂ conversion to liquid fuels[J]. *Science*, 2020, 367(6478): 667-671.
- [78] KATTEL S, RAMÍREZ PJ, CHEN JG, RODRIGUEZ JA, LIU P. Active sites for CO₂ hydrogenation to methanol on Cu/ZnO catalysts[J]. *Science*, 2017, 355(6331): 1296-1299.
- [79] GRACIANI J, MUDIYANSELAGE K, XU F, BABER AE, EVANS J, SENANAYAKE SD, STACCHIOLA DJ, LIU P, HRBEK J, FERNÁNDEZ SANZ J, RODRIGUEZ JA. Highly active copper-ceria and copper-ceria-titania catalysts for methanol synthesis from CO₂[J]. *Science*, 2014, 345(6196): 546-550.
- [80] GREGORY GJ, BENNETT RK, PAPOUTSAKIS ET. Recent advances toward the bioconversion of methane and methanol in synthetic methylotrophs[J]. *Metabolic Engineering*, 2022, 71: 99-116.
- [81] ANTONIEWICZ MR. Synthetic methylotrophy: strategies to assimilate methanol for growth and chemicals production[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2019, 59: 165-174.
- [82] ZHANG SJ, GUO F, YANG Q, JIANG YJ, YANG SH, MA JF, XIN FX, HASUNUMA T, KONDO A, ZHANG WM, JIANG M. Improving methanol assimilation in *Yarrowia lipolytica* via systematic metabolic engineering combined with compartmentalization[J]. *Green Chemistry*, 2023, 25(1): 183-195.

(本文责编 陈宏宇)