

## 特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2024-023

## 一碳生物转化合成有机酸的研究进展

禹伟<sup>1,2</sup>, 高教琪<sup>1,2</sup>, 周雍进<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup> 中国科学院大连化学物理研究所, 生物技术研究部, 辽宁 大连 116023; <sup>2</sup> 大连市能源生物技术重点实验室, 辽宁 大连 116023)

**摘要:** 有机酸在食品、医药、化工、农业等领域有着广泛的应用。目前有机酸的生产主要以微生物发酵法为主, 采用糖类为原料, 然而长此以往可能面临“与人争粮”的困境。CO、CO<sub>2</sub>、甲烷、甲醇和甲酸等含有一个碳原子的物质被称为一碳 (one carbon, C<sub>1</sub>) 资源, 其来源广泛且价格低廉, 有望成为生物制造的替代原料, 且 C<sub>1</sub> 原料生物转化有助于缓解温室效应、助力“碳中和”目标。本文总结了近年来 CO<sub>2</sub>、甲烷和甲醇生物合成 3 种重要有机酸 (3-羟基丙酸、乳酸、琥珀酸) 的研究进展, 主要论述了 C<sub>1</sub> 生物利用途径、有机酸的生物合成途径以及代谢工程策略, 也讨论了 C<sub>1</sub> 合成有机酸的挑战及应对措施, 并展望了有机酸产业化新路线, 尤其是化学催化与生物转化耦合以 CO<sub>2</sub> 为原料合成有机酸。本综述对于 C<sub>1</sub> 生物炼制以及有机酸产业升级具有一定的参考意义。

**关键词:** C<sub>1</sub> 生物炼制; 代谢工程; 3-羟基丙酸; 乳酸; 琥珀酸

中图分类号: Q81 文献标志码: A

## Bioconversion of one carbon feedstocks for producing organic acids

YU Wei<sup>1,2</sup>, GAO Jiaoqi<sup>1,2</sup>, ZHOU Yongjin<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup> Division of Biotechnology, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, Liaoning, China; <sup>2</sup> Dalian Key Laboratory of Energy Biotechnology, Dalian 116023, Liaoning, China)

**Abstract:** Organic acids, as important platform chemicals, have been widely used in food, pharmaceutical, chemical industries and agriculture. Currently, microbial production of organic acids relies primarily on sugars as feedstocks, which may suffer from the competition with food and arable lands. One carbon (C<sub>1</sub>) molecules such as CO, CO<sub>2</sub>, methane, methanol and formic acid are widespread and inexpensive, which are considered as ideal feedstocks for future bio-manufacturing. Bioconversion of C<sub>1</sub> feedstocks toward the production of organic acids helps mitigate greenhouse effect and realize carbon neutrality. Therefore C<sub>1</sub> sources have been regarded as raw materials of third generation biorefinery, and natural C<sub>1</sub> utilizing microbes attracted increasing attention. Although some microorganisms have native biosynthetic pathway of organic acids, the production efficiency is usually lower than expected. This review summarizes the recent progress on the biosynthesis of organic acids (3-hydroxypropionic acid, lactic acid and succinic

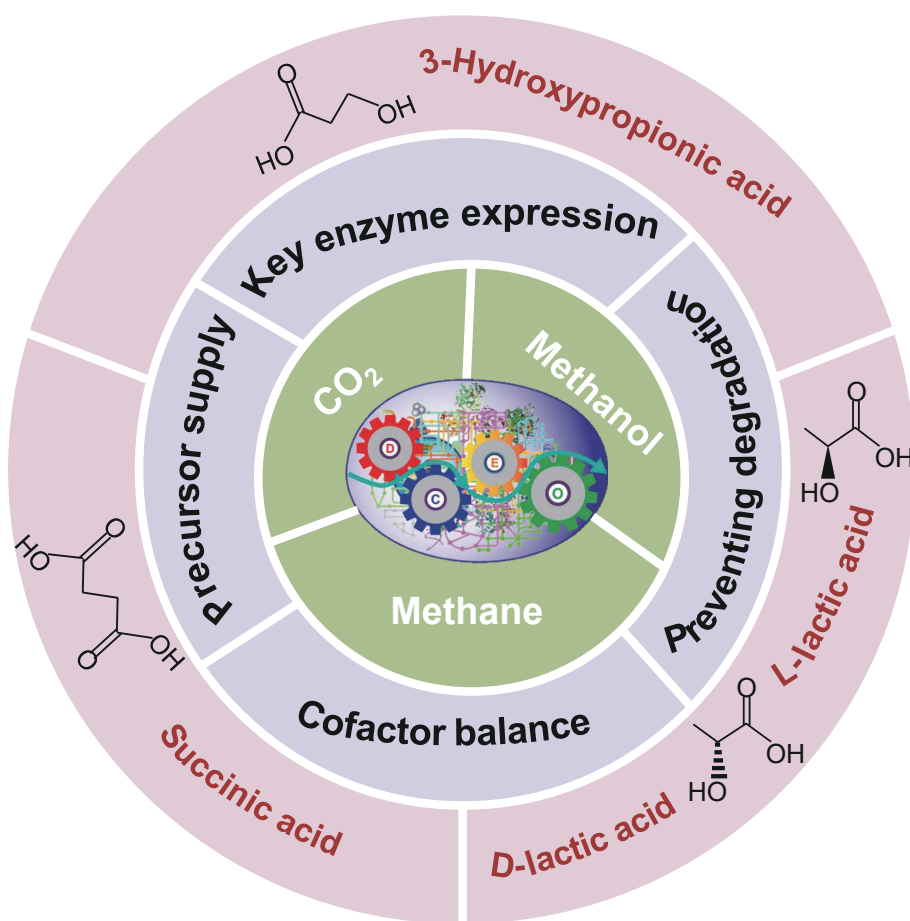
收稿日期: 2024-03-19 修回日期: 2024-06-04

基金项目: 国家重点研发计划 (2022YFC2105900); 国家自然科学基金 (22308351); 国家资助博士后研究人员计划 (GZB20230727)

引用本文: 禹伟, 高教琪, 周雍进. 一碳生物转化合成有机酸的研究进展[J]. 合成生物学, 2024, 5(5): 1169-1188

Citation: YU Wei, GAO Jiaoqi, ZHOU Yongjin. Bioconversion of one carbon feedstocks for producing organic acids[J]. Synthetic Biology Journal, 2024, 5(5): 1169-1188

acid) from  $C_1$  feedstocks using synthetic biology methods. First, the native  $C_1$  utilizing pathways are summarized, including  $CO_2$ , CO, methane, methanol and formic acid. Then the metabolic engineering strategies to improve organic acids production were systematically reviewed, including the optimization of rate-limiting enzymes expression, enhancement of the supply of precursor and cofactor, cofactor engineering, and inhibition of the product degradation. In addition, the challenges, solutions, and prospects of  $C_1$  bioconversion to organic acids are also discussed, and coupling chemical catalysis and biological transformation may provide a promising industrial route for organic acids production. In particular, methanol is an ideal  $C_1$  feedstock with many advantages like convenient storage and transportation, high liquid-to-liquid mass transfer efficiency, and it can also be massively produced from  $CO_2$  by “liquid sunshine” technology. Therefore constructing high efficient methanol cell factory may enable organic acids production from  $CO_2$ , a carbon neutral production manner. This review may provide a guidance for  $C_1$  biorefinery and industrial bioproduction of organic acids.



**Keywords:**  $C_1$  biorefinery; metabolic engineering; 3-hydroxypropionic acid; lactic acid; succinic acid

有机酸是重要的大宗化学品，也是很多精细化学品合成的前体，广泛应用于食品、医药、化工、农业等领域。美国能源部于2004年将12种化学品列为最具价值的生物基化学品<sup>[1]</sup>，2010年重

新调整为10种<sup>[2]</sup>，其中有4种是有机酸，分别为3-羟基丙酸（3-HP）、乳酸、琥珀酸和乙酰丙酸。根据相关预测，2028年全球有机酸市场将达到261亿美元<sup>[3]</sup>。此外，有机酸也是许多生物可降解

塑料的单体, 例如乳酸体外聚合形成聚乳酸 (PLA), 琥珀酸与1,4-丁二醇聚合形成聚丁二酸丁二醇酯 (PBS), 3-HP体内聚合形成聚3-HP (一种聚羟基脂肪酸酯, 简称PHA, 作为天然生物高分子材料广泛用于可降解塑料的生产)<sup>[4]</sup>。由于传统的石油基塑料难以降解, 随着环境污染的日益加剧以及全球能源不断消耗, 生物可降解塑料需求也越来越大, 进一步扩大了有机酸市场。

由于某些微生物能够积累特定的有机酸, 因此可以利用微生物发酵法生产有机酸, 目前已有丙酮酸、乳酸、柠檬酸、苹果酸、琥珀酸等20多种有机酸实现了发酵法生产<sup>[5]</sup>。微生物高效合成有机酸主要分为两种类型:

①微生物自身代谢特性导致。例如细菌在厌氧条件下经糖酵解途径形成的辅因子NADH无法进入呼吸链氧化而积累, 为了维持氧化还原平衡, 乳酸脱氢酶 (Ldh) 氧化NADH的同时催化丙酮酸大量形成乳酸, 得率可达0.8 g/g<sup>[6]</sup>; 营养缺陷型的光滑球拟酵母 (*Torulopsis glabrata*) 在丙酮酸脱氢酶系、丙酮酸脱羧酶、丙酮酸羧化酶和丙酮酸转氨酶的辅因子硫胺素、生物素、烟酸和吡哆醇适量的条件下, 丙酮酸难以进一步代谢, 因此大量积累, 其得率高达0.8 g/g<sup>[7]</sup>。

②代谢工程改造微生物使代谢流导向目标产物。例如加强3-HP的前体乙酰-CoA和辅因子NADPH的供应, 显著提高3-HP的产量和得率, 得率可达0.31 g/g葡萄糖<sup>[8]</sup>。

然而, 以上研究都是以葡萄糖为原料合成有机酸, 作为大宗化学品, 如果长期以糖为原料进行工业化生产, 可能出现“与人争粮”的困境。因此, 寻找廉价、清洁、可持续的原料, 对于有机酸产业的长期稳定发展具有重要意义。

C<sub>1</sub>资源 (包括CO、CO<sub>2</sub>、甲烷、甲醇和甲酸等) 来源广泛, 被认为是生物炼制的新型可持续原料<sup>[9]</sup>。CO、CO<sub>2</sub>和甲烷是温室气体, 而甲醇和甲酸可由CO、CO<sub>2</sub>制备而来。C<sub>1</sub>资源被称为第3代生物炼制原料, 其特点是来源极其丰富且价格低廉, 相较于以糖为原料的第1代生物炼制, C<sub>1</sub>资源不与人争粮; 相较于以木质纤维素为原料的第2代生物炼制, C<sub>1</sub>资源不需要复杂的预处理工艺。如果C<sub>1</sub>原料能够大量用于生物炼制, 不仅有望降低

原料成本、缓解温室效应, 而且有助于实现国家“碳达峰碳中和”目标。本综述聚焦C<sub>1</sub>原料生物转化合成有机酸 (3-HP、乳酸、琥珀酸) 的研究进展, 主要关注C<sub>1</sub>生物利用途径、有机酸的合成途径及代谢工程策略, 并讨论了C<sub>1</sub>原料生物合成有机酸所面临的挑战和应对策略, 展望了太阳能等可再生能源制甲醇以及甲醇生物合成有机酸的化学-生物耦合路线。

## 1 C<sub>1</sub>生物利用途径

### 1.1 CO<sub>2</sub>生物利用

碳是构成有机生命体所必需的元素。自然界中自养生物通过碳固定将无机碳转化为生物质, 作为有机物的主要来源。目前, 已有7种天然固碳途径被解析, 分别是Calvin循环 (也称CBB循环)、Wood-Ljungdahl (WL) 途径、还原三羧酸 (rTCA) 循环、3-HP循环、3-羟基丙酸/4-羟基丁酸 (HP/HB) 循环、二羧酸/4-羟基丁酸 (DC/HB) 循环以及还原甘氨酸 (rGly) 途径<sup>[10]</sup>。由于CO<sub>2</sub>为高度氧化分子, 生物转化必须先赋予其能量, 自然界中能够为碳固定提供能量的形式主要有光能和化学能 (如氢、硫和亚硫酸盐等)。CBB循环是光能自养生物 (如蓝细菌 *Synechocystis* sp. 等) 和部分化能自养生物固定CO<sub>2</sub>的主要途径, 也是自然界中最丰富的固碳途径, 3分子CO<sub>2</sub>通过CBB循环形成1分子甘油醛-3-磷酸 (G3P), 从而进入中心代谢。蓝细菌和微藻具有易于培养和光能自养等优点, 越来越多地被用于生物制造<sup>[11-12]</sup>, 不过其产业化发展仍然受限于光反应器的设计, 例如高密度培养的光照透过性、光照强度和波长的优化等<sup>[13]</sup>。

除了天然CO<sub>2</sub>利用途径, 近年来也有不少研究报告人工CO<sub>2</sub>固定和利用途径, 例如C<sub>4</sub>-乙醛酸循环<sup>[14]</sup>、巴豆酰-CoA/乙基丙二酰-CoA/羟基丁酰-CoA (CETCH) 循环<sup>[15]</sup>、4-羟基-2-氧代丁酸 (HOB)<sup>[16]</sup>途径以及还原TCA支路/4-羟基丁酰-CoA/乙基丙二酰-CoA/乙酰-CoA (THETA) 循环<sup>[17]</sup>。然而, 目前这些人工CO<sub>2</sub>固定和利用途径大多数是在体外验证, 而在体内应用的很少。

## 1.2 甲醇生物利用

甲醇具有能量密度高、便于储存和运输、生物发酵过程液-液传质效率高等优点,被认为是生物炼制的理想原料<sup>[9]</sup>。自然界中存在能够以甲醇为唯一碳源和能源进行生长代谢的微生物,包括甲醇酵母和甲醇细菌,甲醇利用途径主要有甲醇酵母的木酮糖单磷酸(XuMP)循环以及甲醇细菌的核酮糖单磷酸(RuMP)循环和丝氨酸循环,6分子甲醇通过XuMP循环、RuMP循环和丝氨酸循环分别形成2分子G3P、1分子果糖-6-磷酸(F6P)和2分子丙酮酸,从而进入中心代谢<sup>[18]</sup>。此外,甲醇酵母和甲醇细菌在甲醇代谢第一步——甲醇活化步骤存在差异,甲醇酵母利用甲醇氧化酶(Aox)催化甲醇形成甲醛和过氧化氢,过氧化氢再转化为水和氧气,来源于甲醇的氢原子并未进入细胞内形成还原力;而甲醇细菌利用甲醇脱氢酶(Mdh)催化甲醇和NAD<sup>+</sup>形成甲醛和NADH,来源于甲醇的氢原子转移到NADH中,为细胞氧化还原反应提供还原力,因此甲醇细菌利用甲醇的原子经济性更高,但是Mdh的催化效率远远低于Aox<sup>[19]</sup>。并且,甲醇酵母的甲醇氧化过程发生在过氧化物酶体<sup>[20]</sup>,其有助于减少中间代谢物甲醛泄漏以减少细胞毒性,而且甲醇酵母对低pH和高温的耐受性更强,可能更适合有机酸的生产。

## 1.3 甲烷生物利用

甲烷作为天然气和沼气的主要成分,含量丰富,也有望成为下一代生物炼制的原料之一。自然界中存在能够利用甲烷进行生长代谢的细菌,称为甲烷细菌,其利用甲烷的一个关键酶是甲烷单加氧酶(MMO),催化甲烷氧化为甲醇,MMO分为两种:可溶性MMO(sMMO),只存在于少数甲烷细菌中;膜结合MMO(pMMO),存在于所有已知的甲烷细菌中。两种MMO都是双功能氧化酶,催化时O<sub>2</sub>的一个氧原子进入甲醇分子中,另一个氧原子进入水分子中,同时需要2个电子和2个质子<sup>[21]</sup>。sMMO使用NADH作为电子供体,而pMMO的电子供体仍然未知。根据甲醇代谢途径的差异,将甲烷细菌分为三类:Ⅰ类,γ-变形菌;Ⅱ类,α-变形菌;Ⅲ类,疣微菌。三类菌分别

通过RuMP途径、丝氨酸循环和CBB循环代谢甲醇<sup>[22]</sup>。

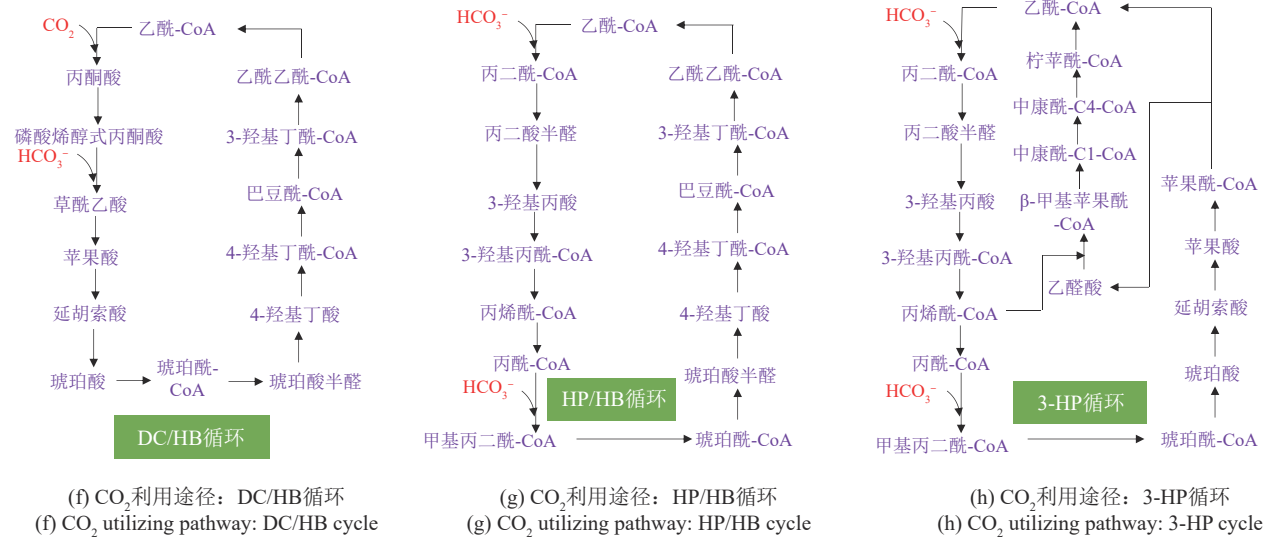
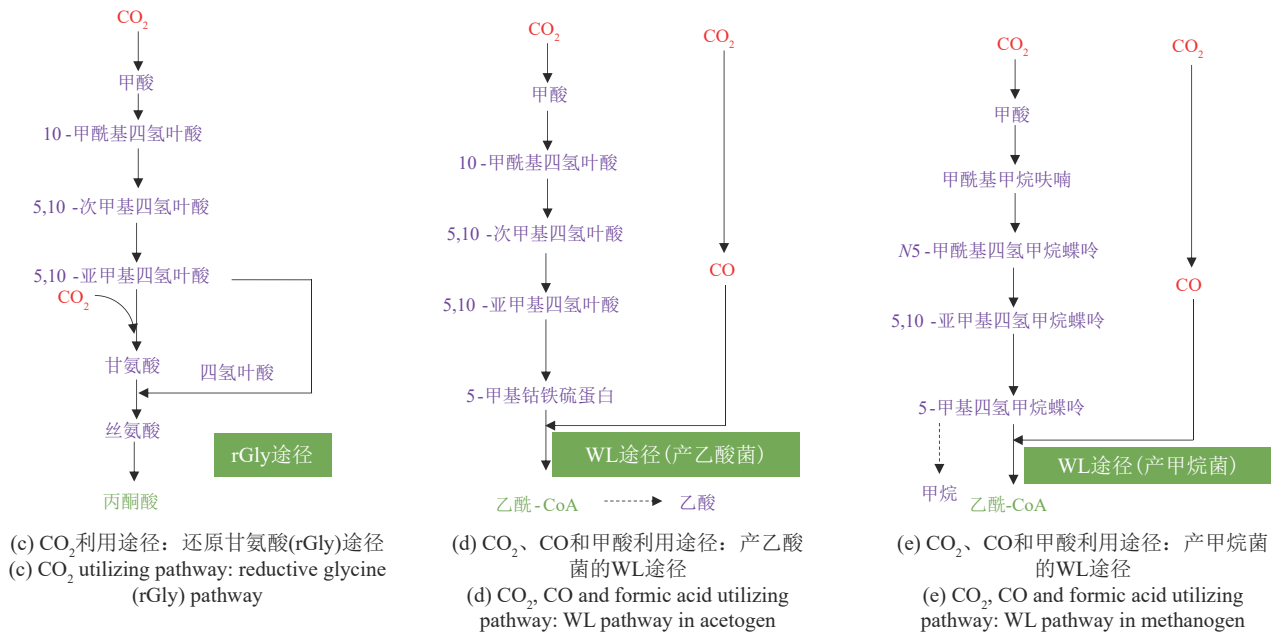
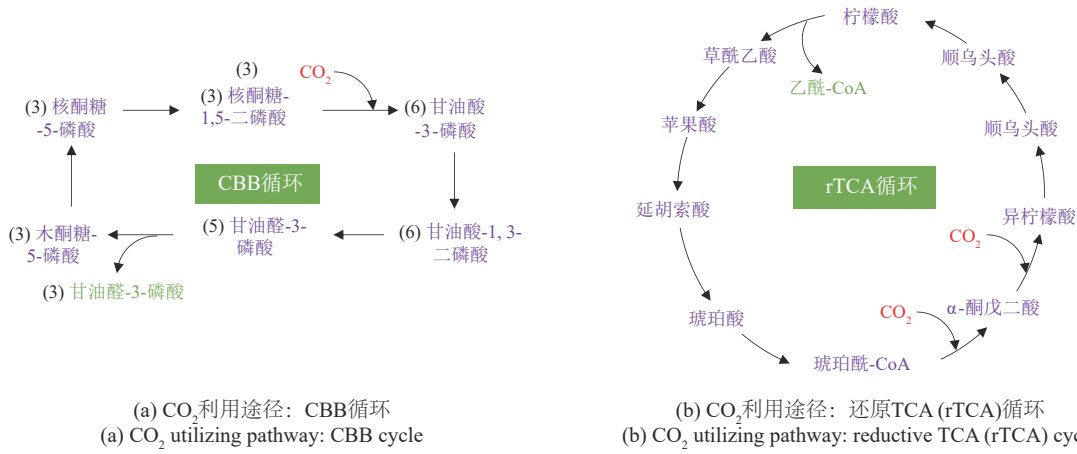
## 1.4 CO生物利用

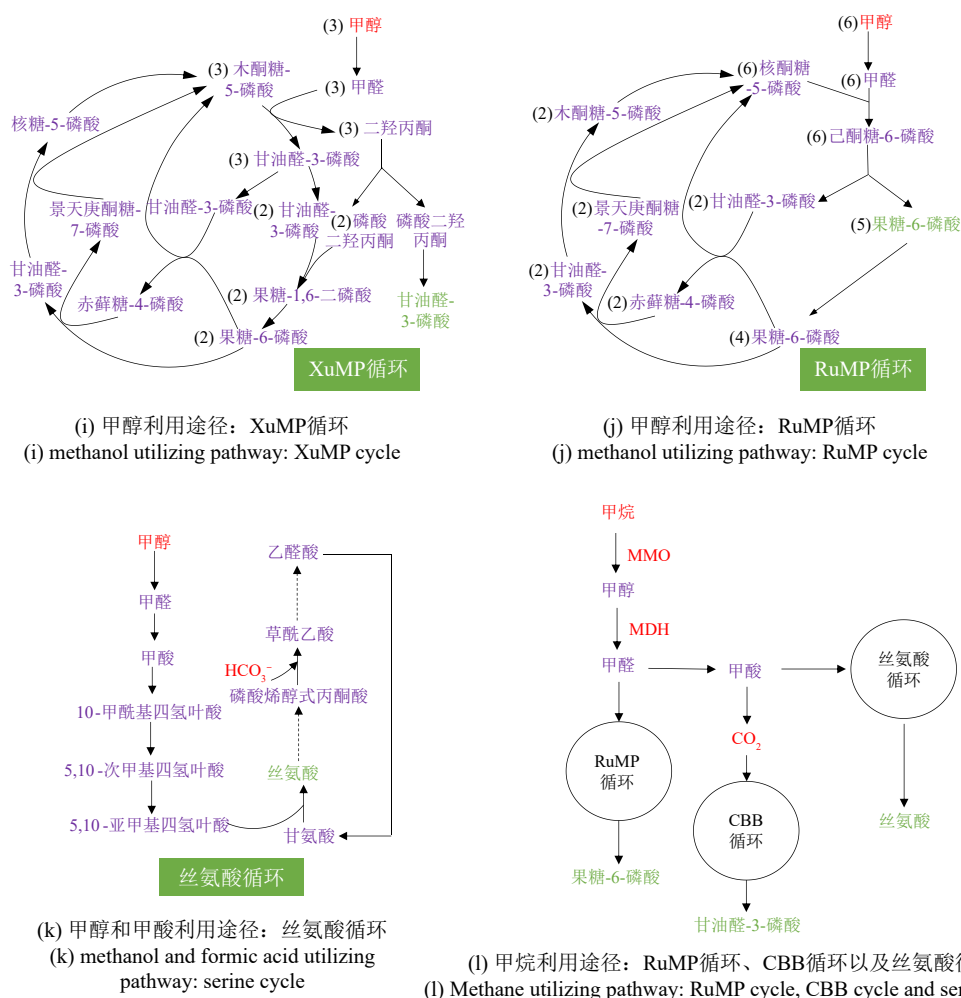
CO主要来源于煤、石油气化所产生的合成气。自然界中存在一类能够利用CO的微生物,早在1988年Barik等<sup>[23]</sup>就报道了一株能够利用合成气中的CO生产乙醇和乙酸的梭菌,后来合成气发酵的研究越来越多,常见的发酵合成气的微生物有:永达尔梭菌(*Clostridium ljungdahlii*)<sup>[23]</sup>、自产乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*)<sup>[24]</sup>、食一氧化碳梭菌(*Clostridium carboxidivorans*)<sup>[25]</sup>等,其利用CO合成乙醇、丁醇和乙酸;伍氏醋酸杆菌(*Acetobacterium woodii*)<sup>[26]</sup>和食甲基丁酸杆菌(*Butyribacterium methylotrophicum*)<sup>[27]</sup>等,其利用CO分别合成乙酸和丁酸。这些微生物利用CO的途径是WL途径(产乙酸菌),由CO脱氢酶(Codh)和乙酰-CoA合成酶(Acs)催化CO和5-甲基钴铁硫蛋白中的甲基形成乙酰-CoA,从而进入中心代谢。

## 1.5 甲酸生物利用

甲酸也是重要的一碳资源,其液液传质效率高且安全性高于甲醇。自然界中存在多种甲酸利用微生物,通过不同途径以甲酸为能源或碳源进行生长代谢,包括产乙酸菌,如永达尔梭菌和伍氏醋酸杆菌,通过WL途径将甲酸转化为乙酸<sup>[28]</sup>;产甲烷菌,如海沼甲烷球菌(*Methanococcus maripaludis*),通过WL途径将甲酸转化为甲烷<sup>[29]</sup>;硫酸盐还原菌,如普通脱硫弧菌(*Desulfovibrio vulgaris*),通过WL以甲酸为电子供体,以硫酸盐或亚硫酸盐作为电子受体形成硫化氢<sup>[30]</sup>。甲基杆菌,如扭脱甲基杆菌(*Methylobacterium extorquens*)AM1,通过丝氨酸循环将甲酸转化为丝氨酸<sup>[31]</sup>;钩虫贪铜菌(*Cupriavidus necator*)H16,以甲酸脱氢酶(Fdh)催化甲酸形成CO<sub>2</sub>和还原力NADH,CO<sub>2</sub>和NADH通过CBB循环形成G3P供细胞生长<sup>[32]</sup>。

CO<sub>2</sub>、甲醇、甲烷、CO以及甲酸的天然代谢途径详见图1。



图1 C<sub>1</sub>资源生物利用途径Fig. 1 The utilization pathways of C<sub>1</sub> sources

除了天然的C<sub>1</sub>利用微生物,也有研究报道合成的C<sub>1</sub>利用微生物,例如在大肠杆菌和毕赤酵母中引入CO<sub>2</sub>利用途径CBB循环的相关基因,并通过长期的实验室进化,已经能够实现CO<sub>2</sub>利用,尽管效率依然较低<sup>[33-34]</sup>;需钠弧菌已实现较为高效的甲酸利用,72 h利用了165.3 g/L甲酸,并合成29.0 g/L靛蓝素<sup>[35]</sup>。合成的C<sub>1</sub>利用微生物为C<sub>1</sub>原料的生物利用开辟了新的方向。

## 2 C<sub>1</sub>生物合成有机酸及代谢工程策略

### 2.1 C<sub>1</sub>生物合成3-HP

3-HP是重要的平台化学品,不仅作为可降解塑料的单体,也可用于丙烯酸、1,3-丙二醇(1,3-

PDO)的合成<sup>[36-37]</sup>,甚至可以作为杀虫剂用于农业生产<sup>[38]</sup>。3-HP有5种合成途径:丙二酰-CoA途径<sup>[39]</sup>、甘油途径<sup>[40]</sup>、β-丙氨酸途径<sup>[41]</sup>、1,3-PDO途径<sup>[42]</sup>和草酰乙酸途径<sup>[43]</sup>。甘油途径和1,3-PDO途径是以原料命名,虽然其3-HP产量都突破100 g/L<sup>[42, 44]</sup>,但C<sub>1</sub>原料转化为甘油和1,3-PDO存在挑战,例如Wang等<sup>[45]</sup>以甲醇为碳源合成1,3-PDO的产量仅32.7 mg/L,推测可能与多元醇合成需要较强的还原力以及C<sub>1</sub>营养型微生物对多元醇的耐受性不足有关,因此这两种途径并不适合C<sub>1</sub>生物合成3-HP。丙二酰-CoA途径、草酰乙酸途径和β-丙氨酸途径是以前体命名,这3种前体都可以链接C<sub>1</sub>代谢过程。目前,丙二酰-CoA途径是合成3-HP使用最多的途径,其最高产量可达79.6 g/L<sup>[46]</sup>。目前,C<sub>1</sub>原料合成3-HP皆采用丙二酰-CoA途径,以CO<sub>2</sub>、甲

烷和甲醇为原料, 利用丙二酰-CoA途径合成3-HP的最高产量分别达到0.84 g/L、0.06 g/L和48.2 g/L<sup>[47-49]</sup>(表1)。C<sub>1</sub>原料基于丙二酰-CoA途径生物合成3-HP的代谢工程策略包括: 优化关键酶表达、增强前体和辅因子供应、阻断降解途径以及增强宿主耐酸性能等(图2)。

### 2.1.1 优化关键酶丙二酰-CoA还原酶(Mcr)表达

丙二酰-CoA途径的关键酶Mcr来源于光合细

菌 *Chloroflexus aurantiacus* 的CO<sub>2</sub>固定途径(3-HP循环), Mcr包含两个催化结构域, Mcr-C(醛脱氢酶, 550~1219位氨基酸)和Mcr-N(醇脱氢酶, 1~549位氨基酸), 其中Mcr-C为限速酶<sup>[65]</sup>。在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中通过定向进化发现, 3个关键氨基酸的突变(N940V, K1106W和S1114R)能够显著提高Mcr-C酶活力, 通过质粒过表达MCR-C和基因组整合MCR-N, 工程菌以葡

表1 C<sub>1</sub>原料合成有机酸

Table 1 Bio-production of organic acids from C<sub>1</sub> feedstocks

产物	宿主	底物	培养条件	产量/(g/L)	得率/%	生产强度/[g/(L·d)]	参考文献
3-HP	蓝细菌	CO <sub>2</sub>	MM, 摇瓶, 50 mL 发酵体积	0.67	2.6	0.07	[50]
	蓝细菌	CO <sub>2</sub>	MM, 摇瓶, 20 mL 发酵体积	0.84	8.0	0.14	[47]
	甲基弯菌	甲烷	MM, 发酵罐, 50 mL 发酵体积	0.06	2.4	0.03	[48]
	扭脱甲基杆菌	甲醇	MM, 摇瓶, 50 mL 发酵体积	0.07	2.0	0.04	[51]
	扭脱甲基杆菌	甲醇	MM, 发酵罐, 1.8 L 发酵体积	0.86	3.1	0.21	[52]
	多形汉逊酵母	甲醇	MM, 摇瓶, 50 mL 发酵体积	7.10	14.2	1.20	[53]
	巴斯德毕赤酵母	甲醇	MM, 发酵罐, 300 mL 发酵体积	48.20	23.0	3.70	[49]
L-乳酸	蓝细菌	CO <sub>2</sub>	MM, 摇瓶, 80 mL 发酵体积	1.00	N.A.	0.03	[54]
	甲烷氧化菌	甲烷	MM, 摇瓶, 2 mL 发酵体积	0.60	N.A.	0.15	[55]
	多形汉逊酵母	甲醇	MM, 摇瓶, 50 mL 发酵体积	3.80	8.0	0.69	[56]
D-乳酸	蓝细菌	CO <sub>2</sub>	MM, 发酵罐, 100 mL 发酵体积	1.30	N.A.	0.13	[57]
	甲基单胞菌	甲烷	MM, 摇瓶, 12.5 mL 发酵体积	1.20	24.5	0.20	[58]
	巴斯德毕赤酵母	甲醇	CM, 摇瓶, 5 mL 发酵体积	3.50	22.0	0.87	[59]
琥珀酸	蓝细菌	CO <sub>2</sub>	MM, 发酵罐, 发酵体积未知	0.93	N.A.	0.19	[60]
	蓝细菌	CO <sub>2</sub>	MM, 摇瓶, 40 mL 发酵体积	0.63	N.A.	0.32	[61]
	蓝细菌	CO <sub>2</sub>	MM, 摇瓶, 发酵体积未知	1.80	N.A.	0.60	[62]
	蓝细菌	CO <sub>2</sub>	MM, 发酵罐, 1 L 发酵体积	2.50	N.A.	0.23	[63]
	甲基单胞菌	甲烷	MM, 发酵罐, 3.2 L 发酵体积	0.20	7.9	0.04	[64]

注: MM—基础培养基; CM—丰富培养基; N.A.—无数据

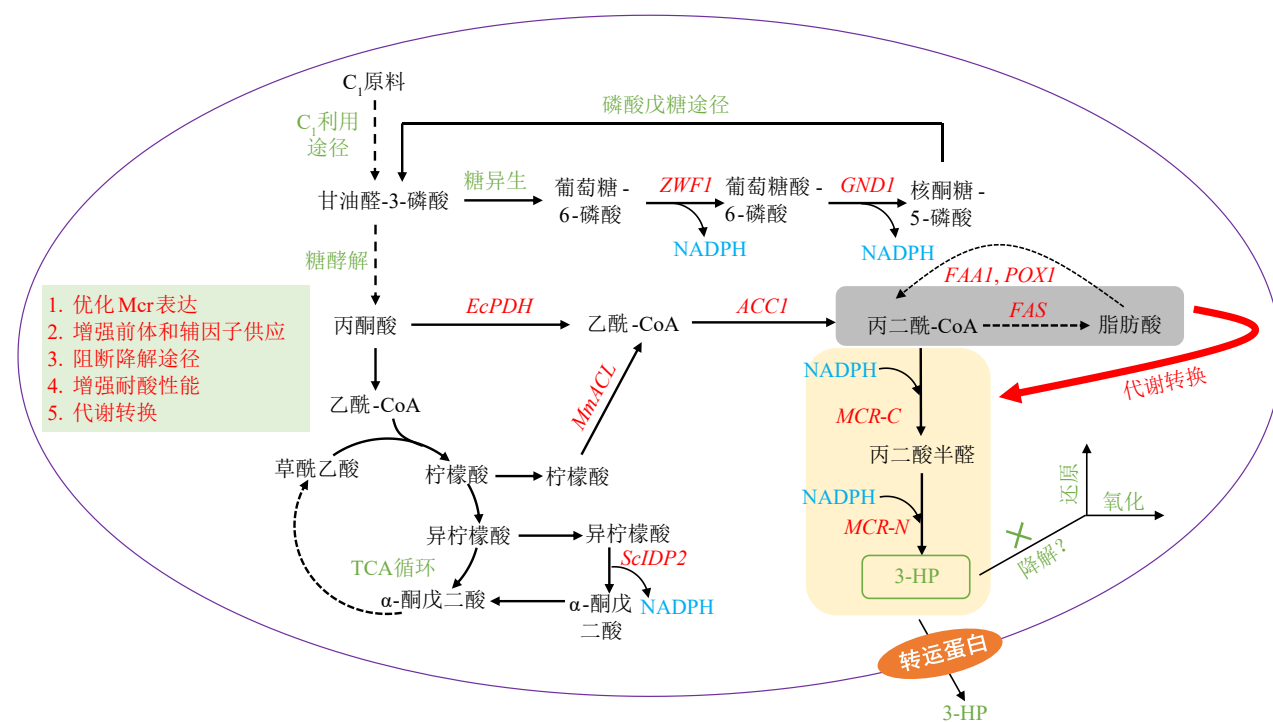


图2  $C_1$ 原料合成3-HP的代谢途径及其改造策略

*ZWF1*—葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因; *GND1*—葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因; *EcPDH*—大肠杆菌的丙酮酸脱氢酶系基因; *ACCI*—乙酰-CoA 羧化酶基因; *FAAI*—脂酰-CoA 合成酶基因; *POXI*—脂酰-CoA 氧化酶基因; *FAS*—脂肪酸合成酶基因; *MmACL*—小鼠的ATP-柠檬酸裂解酶基因; *ScIDP2*—酿酒酵母的异柠檬酸脱氢酶基因; *MCR-C*—丙二酰-CoA 还原酶C端基因; *MCR-N*—丙二酰-CoA 还原酶N端基因

Fig. 2 Biosynthetic pathway and engineering strategies for 3-HP production from  $C_1$  feedstocks

*ZWF1*—Glucose-6-phosphate dehydrogenase gene; *GND1*—6-Phosphogluconate dehydrogenase gene; *EcPDH*—*Escherichia coli* pyruvate dehydrogenase complex gene; *ACCI*—Acetyl-CoA carboxylase gene; *FAAI*—Fatty acyl-CoA synthetase gene; *POXI*—Fatty acyl-CoA oxidase gene; *FAS*—Fatty acid synthase gene; *MmACL*—Mouse ATP-citrate lyase gene; *ScIDP2*—*Saccharomyces cerevisiae* isocitrate dehydrogenase gene; *MCR-C*—Malonyl-CoA reductase C-terminal gene; *MCR-N*—Malonyl-CoA reductase N-terminal gene

葡萄糖为底物, 发酵罐补料分批发酵, 3-HP产量达到40.6 g/L<sup>[66]</sup>。同样, 在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中, 通过Mcr拆分表达也能够促进3-HP, 产量达到56.5 g/L<sup>[8]</sup>。然而, 当Mcr表达优化策略应用于甲醇生物合成3-HP时, 与葡萄糖为原料时结果完全不同, 在巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 和多形汉逊酵母 (*Ogataea polymorpha*) 中均发现Mcr融合表达促进3-HP合成<sup>[49, 53]</sup>, 具体原因未知, 推测由于Mcr催化形成的中间代谢产物丙二酸半醛 (MSA) 与甲醛结构类似, MSA竞争甲醇利用途径关键酶二羟丙酮合酶 (Das), 从而抑制甲醇利用。

### 2.1.2 增强前体和辅因子供应

丙二酰-CoA途径合成1分子3-HP, 需要1分子丙二酰-CoA作为前体和2分子NADPH作为辅因子, 因此强化前体和辅因子的供应对于3-HP合成

至关重要。丙二酰-CoA是乙酰-CoA经乙酰-CoA羧化酶 (Accl) 催化形成, 因此过表达*ACCI*以及提高细胞质乙酰-CoA代谢流, 例如将线粒体柠檬酸转运到细胞质并通过ATP-柠檬酸裂解酶 (Acl) 分解为乙酰-CoA<sup>[67-68]</sup>, 对于甲醇和甲烷合成3-HP都有促进作用<sup>[48-49, 53]</sup>。氧化磷酸途径Zwf1和Gnd1催化的反应是细胞中NADPH的主要来源, 而NAD<sup>+</sup>激酶 (Utr1) 催化NAD<sup>+</sup>转化为NADP<sup>+</sup>, 转氢酶PntAB催化NADH和NADPH的双向转化, 因此过表达*ZWF1+GND1*、*UTR1*和*PntAB*都有利于增强辅因子NADPH供应, 使甲醇和CO<sub>2</sub>合成3-HP产量分别提高30%、13%和109%<sup>[47, 49, 53]</sup>。值得一提的是, 由于乙酰-CoA和NADPH也是脂肪酸合成的前体和辅因子, 因此可以将系统改造中心代谢强化了前体和辅因子供应的脂肪酸高产菌株用于3-HP的合成, 只需要简单地回补脂肪酸降

解途径基因 *F4AI* 和 *POXI*, 并引入 3-HP 合成途径关键酶 *MCR*, 即可实现脂肪酸到 3-HP 的代谢转换, 快速构建 3-HP 高产菌株 (图 2)<sup>[8, 46]</sup>。代谢转换的策略不仅适用于糖代谢, 也适用于甲醇代谢, 通过恢复脂肪酸高产菌株  $\beta$ -氧化途径基因 *F4AI* 并过表达 *MCR*, 获得的工程菌与野生型菌株过表达 *MCR* 相比, 3-HP 产量提高 28.8%<sup>[49]</sup>。

### 2.1.3 阻断降解途径

对于绝大多数微生物而言, 3-HP 并非自身代谢物, 微生物并不能代谢 3-HP, 但是由于 3-HP 具有一定的细胞毒性, 少数微生物可通过特定的代谢途径降解 3-HP 实现解毒。研究表明, 3-HP 降解分为两条主要途径: 氧化和还原途径。例如在类球红细菌 (*Rhodobacter sphaeroides*) 中, 3-HP 先活化为 3-HP-CoA, 后者还原为丙酰-CoA 进入中心代谢<sup>[69]</sup>; 而在脱氮假单胞菌 (*Pseudomonas denitrificans*) 中, 3-HP 先氧化为 MSA, 后者脱羧形成乙酰-CoA 进入中心代谢<sup>[70]</sup>。此外, 在圆红冬孢酵母 (*Rhodospiridium toruloides*) 中, 通过基因组、转录组和代谢组分析, 鉴定出一个推定的 MSA 脱氢酶, 负责 3-HP 氧化降解, 敲除其编码基因使葡萄糖合成 3-HP 的产量提高 1 倍多。类似地, 在扭脱甲基杆菌 AM1 中, 通过代谢组学分析确定菌株通过还原途径降解 3-HP, 敲除一个推测的丙酰-CoA 还原酶基因, 减缓了 3-HP 降解速率, 以甲醇合成 3-HP 时产物从完全降解变为积累 15 mg/L。因此, 在  $C_1$  合成 3-HP 的过程中, 需要关注宿主能否降解 3-HP, 如果存在则需要鉴定并敲除相关降解基因。

### 2.1.4 增强耐酸性能

对于有机酸的合成, 宿主的耐酸性能是一个重要指标。虽然 3-HP 是弱酸, 但浓度较高时也会产生细胞毒性, 400 mmol/L 的 3-HP 可导致大肠杆菌在基础培养基中无法生长, 而 500 mmol/L 3-HP 也会导致肺炎链球菌无法生长<sup>[71-72]</sup>。实际上, 3-HP 的细胞毒性显著高于其同分异构体——乳酸, 在发酵后期 3-HP 的毒性会严重抑制细胞生长和产物合成。其具体毒性机制尚不清楚, 推测与 3-HP 解离产物 ( $H^+$  和  $COO^-$ )、细胞膜 pH 变化以及中和剂的添加导致渗透压增高等因素有关<sup>[73]</sup>。解决细胞毒性的策略包括传统策略和代谢工程策略, 传

统策略包括适应性实验室进化 (ALE)、基因组重排 (genome shuffling)、化学或物理诱变等<sup>[74-76]</sup>。代谢工程策略包括转运蛋白工程和转录因子工程等<sup>[77-78]</sup>。提高压力胁迫耐受的最有效策略是 ALE, 通过菌株在胁迫条件下连续传代使其适应环境, 然后通过基因组、转录组分析结合反向代谢工程, 阐述菌株耐受性提高的分子机制<sup>[79]</sup>。通过 ALE 策略使大肠杆菌 3-HP 耐受性提高到 800 mmol/L, 基因组测序鉴定出一个全局转录因子 *yieP* 与 3-HP 耐受性相关, 敲除 *yieP* 可提高 3-HP 耐受性<sup>[72]</sup>。转运蛋白工程也是提高 3-HP 耐受性的有效策略, 通过鉴定并过表达 3-HP 外排蛋白基因, 使 3-HP 转运到胞外, 从而降低 3-HP 的细胞毒性。目前在多种微生物中鉴定出 3-HP 转运蛋白 YohJK, 包括大肠杆菌、肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、脱氮假单胞菌 (*Pseudomonas denitrificans*) 和亚洲假单胞菌 (*Pseudomonas asiatica*), 过表达 *yohJK* 显著提高肺炎克雷伯氏菌对 3-HP 耐受性及产量<sup>[71, 80]</sup>。此外, 在假土曲霉 (*Aspergillus pseudoterreus*) 中也鉴定出一个 3-HP 转运蛋白 g2945, 在圆红冬孢酵母中过表达该转运蛋白基因, 3-HP 积累量提高 70.4%<sup>[81]</sup>。以甲醇或甲烷为原料合成 3-HP, 由于中间代谢物甲醛具有很强的细胞毒性, 底物和产物双重毒性影响 3-HP 的高效合成, 因此提高宿主对 3-HP 的耐酸性能, 有利于缓解细胞压力, 促进目标产物积累。

## 2.2 $C_1$ 生物合成乳酸

乳酸, 又称 2-羟基丙酸, 根据羟基空间构型不同分为 L-乳酸和 D-乳酸, 其中 L-乳酸能够被人体代谢吸收。乳酸用途广泛, 既可以直接用于食品、饲料、护肤品中, 也可以作为原料合成可降解塑料 PLA<sup>[82]</sup>。乳酸生物合成途径较为简单, 通过 Ldh 催化中心代谢物丙酮酸还原生成乳酸。Ldh 分为 L-Ldh 和 D-Ldh, 其高选择性使微生物能够定向合成光学纯的 L-乳酸或 D-乳酸, 这也是生物法合成乳酸的优势所在<sup>[83]</sup>。目前乳酸工业化生产都是以葡萄糖为原料, 若能实现  $C_1$  原料代替葡萄糖合成乳酸, 有助于实现“碳中和”以及缓解“白色污染”。目前  $CO_2$ 、甲烷和甲醇生物合成乳酸的

最高产量达到 1.3 g/L、1.2 g/L 和 3.8 g/L<sup>[56-58]</sup> (表1)。C<sub>1</sub>原料基于Ldh途径合成乳酸的代谢工程策略包括：筛选和优化Ldh表达，缓解竞争途径，阻断降解途径以及辅因子工程等 (图3)。

### 2.2.1 筛选和优化Ldh表达

乳酸菌天然高产乳酸的一个重要原因是具有高效Ldh，而大多数天然C<sub>1</sub>利用微生物并没有乳酸合成途径，因此需要异源表达来源于乳酸菌的L-LDH或D-LDH，使宿主利用C<sub>1</sub>原料定向合成L-乳酸或D-乳酸<sup>[84]</sup>。例如，Yamada等<sup>[59]</sup>在巴斯德毕赤酵母的多拷贝核糖体DNA (rDNA)位点整合来源于肠膜明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*)的D-LDH基因，以甲醇诱导型强启动子P<sub>AOX</sub>控制基因表达，在含有30 g/L甲醇的YPM (酵母粉-蛋白胨-甲醇)丰富培养基中，工程菌D-乳酸产量达到3.48 g/L，并且发现虽然不同工程菌的D-LDH拷贝

数相差1倍多 (4个拷贝和9个拷贝)，但乳酸产量几乎相同，说明当LDH的拷贝数达到一定数量，表达量便不再成为乳酸合成的限速步骤。Wefelmeier等<sup>[56]</sup>在多形汉逊酵母的组氨酸缺陷型HIS2基因位点整合4种不同来源 (*Bos taurus*、*Leuconostoc mesenteroides*、*Lactobacillus helveticus*和*Lactiplantibacillus plantarum*)的LDH基因，也采用P<sub>AOX</sub>控制基因表达，然而在毕赤酵母中表现最好的D-LDH基因却在汉逊酵母中没有产物合成。最好的Lh-LDH使得汉逊酵母在含有20 g/L甲醇的基础培养基中合成了0.5 g/L的L-乳酸。在甲烷氧化菌 (*Methylomicrobium buryatense*)中通过游离质粒筛选了3种不同来源 (*Escherichia coli*、*Bifidobacterium longum*和*Lactobacillus helveticus*)的LDH基因，同样Lh-LDH效果最好，在基础培养基中通过甲烷补料使乳酸产量达到0.8 g/L<sup>[85]</sup>。由

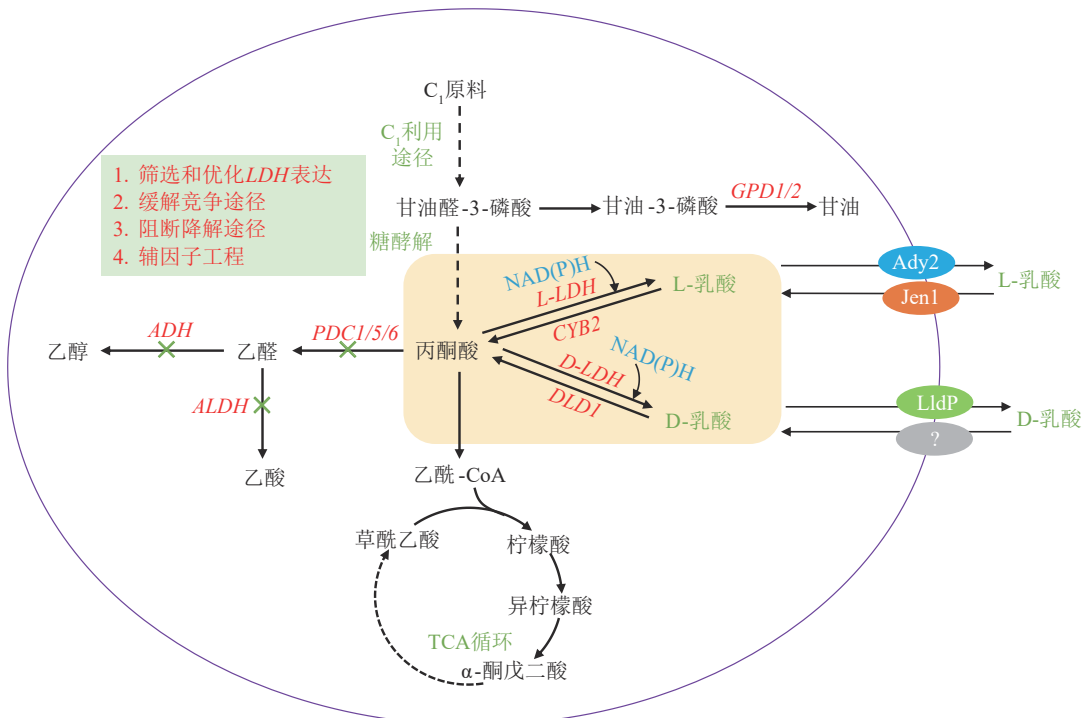


图3 C<sub>1</sub>原料合成乳酸的代谢途径及其改造策略

GPD1/2—甘油-3-磷酸脱氢酶 1/2 基因；ADH—乙醇脱氢酶基因；PDC1/5/6—丙酮酸脱羧酶 1/5/6 基因；ALDH—乙醛脱氢酶基因；L-LDH—L-乳酸脱氢酶基因；D-LDH—D-乳酸脱氢酶基因；CYB2—L-乳酸脱氢酶 (细胞色素) 基因；DLD1—D-乳酸脱氢酶基因；Ady2—乙酸转运蛋白；Jen1—单羧酸/H<sup>+</sup>同向转运蛋白；LldP—D-乳酸转运蛋白

Fig. 3 Biosynthetic pathway and engineering strategies for lactic acid production from C<sub>1</sub> feedstocks

GPD1/2—Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1/2 genes; ADH—Alcohol dehydrogenase gene; PDC1/5/6—Pyruvate decarboxylase 1/5/6 genes; ALDH—Aldehyde dehydrogenase gene; L-LDH—l-lactate dehydrogenase gene; D-LDH—D-lactate dehydrogenase gene; CYB2—L-lactate dehydrogenase (cytochrome) gene; DLD1—D-lactate dehydrogenase gene; Ady2—Acetate transporter; Jen1—Monocarboxylate/H<sup>+</sup> symporter; LldP—D-lactate transporter

此可见, 针对宿主选择合适的 *LDH* 并优化基因拷贝数对于乳酸高效生物合成非常重要。虽然质粒表达比基因组整合的拷贝数高, 但是质粒容易丢失的特性并不适合工业化生产<sup>[8]</sup>, 而基因组整合位点除了 rDNA 和营养缺陷型位点外, 在汉逊酵母、毕赤酵母和蓝细菌中也有很多中性位点可供使用, 从而精确控制拷贝数<sup>[86-88]</sup>。

### 2.2.2 缓解竞争途径

由于丙酮酸是乳酸合成的前体, 因此提高丙酮酸积累是强化乳酸合成的重要策略。丙酮酸作为糖酵解和 TCA 循环的连接点, 具有多条代谢途径, 因此有必要抑制丙酮酸的分支代谢途径, 例如合成乙醇(酵母中)和乙酸(细菌中)、丙酮酸进入 TCA 循环以及磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)羧化生成草酰乙酸(丙酮酸旁路)。乙醇合成途径关键酶是丙酮酸脱羧酶(Pdc), 在乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)中表达 *L-LDH*, 敲除 *PDC* 阻断乙醇合成, 葡萄糖合成 L-乳酸的得率提高 171%<sup>[89]</sup>。乙酸合成途径关键酶是乙酸激酶(AckA), 在蓝细菌中表达 *D-LDH*, 通过敲除 *ACKA* 基因并过表达苹果酸酶基因 *ME*, 以 CO<sub>2</sub> 为碳源合成 D-乳酸的产量提高约 60%, 乙酸积累量降低约 75%<sup>[90]</sup>。丙酮酸经 Pdh 进入 TCA 循环是丙酮酸消耗的主要途径, 在光滑球拟酵母中构建四种辅因子的营养缺陷型突变株, 通过调控辅因子水平满足菌株基本生长需求并降低 Pdh 活性, 使丙酮酸大量积累<sup>[7]</sup>。而在乳酸克鲁维酵母中表达 *L-LDH*, 敲除 Pdh 复合体中的脱氢酶亚基 Pda1 编码基因, 菌株生长不受影响, 葡萄糖合成 L-乳酸的得率提高 47%<sup>[91]</sup>。在蓝细菌中表达 *L-LDH*, 以 CO<sub>2</sub> 为原料合成 L-乳酸, 通过弱化 PEP 羧化酶基因 *PPC*, 虽然菌株生长受到一定影响, 但乳酸得率提高约 2 倍<sup>[92]</sup>。除丙酮酸直接代谢之外, G3P 合成甘油也会间接减少丙酮酸的积累, 甘油合成途径关键酶是 3-磷酸甘油脱氢酶(Gpd1/2), 在表达 *D-LDH* 的酿酒酵母中敲除 *GPD1/2* 基因阻断了甘油积累, 葡萄糖合成 D-乳酸的产量提高 50%<sup>[93]</sup>。由此可见, 抑制丙酮酸分支代谢有助于增强乳酸合成, 虽然部分研究是以糖为原料, 但鉴于丙酮酸代谢的保守性, 这些策略也可用于 C<sub>1</sub> 原料合成乳酸。

### 2.2.3 阻断降解途径

当碳源充足时, 微生物还原丙酮酸生成乳酸, 并通过外排蛋白转运到胞外; 而当碳源匮乏时, 微生物又将胞外乳酸经内排蛋白吸收至胞内, 氧化乳酸生成丙酮酸, 丙酮酸通过糖异生形成葡萄糖, 为细胞提供物质与能量。目前已经鉴定出酿酒酵母中的乙酸跨膜转运蛋白 *Ady2* 负责乳酸外排, 而羧酸转运蛋白 *Jen1* 负责乳酸吸收<sup>[94-95]</sup>。此外, 细胞色素 c 氧化酶(Cyb2)催化 L-乳酸氧化为丙酮酸<sup>[96]</sup>, 而 D-乳酸脱氢酶(*Dld1*)催化 D-乳酸氧化为丙酮酸<sup>[97]</sup>。*Baumschabl* 等<sup>[98]</sup> 在毕赤酵母中构建 CBB 循环实现了 CO<sub>2</sub> 自养, 过表达 *L-LDH* 基因以 CO<sub>2</sub> 为原料合成 L-乳酸, 并发现毕赤酵母能够利用 L-乳酸, 而敲除 *CYB2* 基因使 L-乳酸产量提高 150%。然而, 同为甲醇酵母的多形汉逊酵母, 天然并不能利用 L-乳酸, 而表达了酿酒酵母的 *Jen1* 则能消耗 L-乳酸<sup>[56]</sup>, 说明不同种属的 C<sub>1</sub> 利用微生物在乳酸代谢模式上存在较大差异。在表达 *D-LDH* 的蓝细菌中, 通过表达来源于大肠杆菌的非特异性乳酸转运蛋白基因 *LldP*, CO<sub>2</sub> 合成 D-乳酸的产量提高 1.8 倍, 证明 *LldP* 促进 D-乳酸外排, 避免 D-乳酸在胞内代谢分解<sup>[57]</sup>。

### 2.2.4 辅因子工程

辅因子供应不足和能量不平衡是产物合成的重要限制因素, 因此通过辅因子工程有望强化产物生物合成效率。辅因子工程包括增强辅因子供应、循环和改变辅因子偏好性<sup>[99]</sup>。增强 NADH 的供应可以通过减少 NADH 消耗和 NADPH 转氢来实现, 例如在表达 *L-LDH* 基因的酿酒酵母中, 敲除 NADH 脱氢酶基因 *Nde1/2*, 葡萄糖合成 L-乳酸产量提高 32.6%<sup>[100]</sup>; 而在酿酒酵母和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)中过表达来源于大肠杆菌的转氢酶 *UdhA* 可将 NADPH 转化为 NADH<sup>[101-102]</sup>。值得注意的是, 蓝细菌将吸收的光能用于合成 NADPH, 为多个代谢过程提供还原力<sup>[103]</sup>, 因此蓝细菌光合作用时 NADPH 比 NADH 丰富, 以蓝细菌为宿主利用 CO<sub>2</sub> 合成乳酸, 通过改造 L-Ldh 和 D-Ldh 使辅因子偏好性由 NADH 变为 NADPH, 分别使 L-乳酸和 D-乳酸产量提高 1.5 倍和 3.6 倍<sup>[57, 92]</sup>, 这些结果充分表明辅因子平衡对乳酸高效合成极其重要。

### 2.3 C<sub>1</sub>生物合成琥珀酸

琥珀酸，又称丁二酸，广泛应用于食品、医药和可降解塑料行业<sup>[104]</sup>。琥珀酸是TCA循环的中间代谢物，许多微生物可以积累琥珀酸，琥珀酸生产菌株可以分为两类：天然琥珀酸生产菌，例如产琥珀酸放线杆菌 (*Actinobacillus succinogenes*)<sup>[105]</sup>、产琥珀酸曼氏杆菌 (*Mannheimia succiniciproducens*)<sup>[106]</sup>、产琥珀酸厌氧螺菌 (*Anaerobiospirillum succiniciproducens*)<sup>[107]</sup>、产琥珀酸巴斯夫菌 (*Basfia succiniciproducens*)<sup>[108]</sup>；代谢工程琥珀酸生产菌，例如大肠杆菌<sup>[109]</sup>、谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*)<sup>[110]</sup>、解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*)<sup>[111]</sup>等，其中以产琥珀酸放线杆菌和大肠杆菌研究最多。琥珀酸有6种合成途径，分别是与TCA循环还原支路相关的

PEP羧化酶 (rTCA-PPC) 途径、PCP羧化激酶 (rTCA-PCK) 途径、丙酮酸羧化酶 (rTCA-PYC) 途径、苹果酸酶 (MAE) 途径、乙醛酸支路途径、TCA循环氧化支路 (oTCA) 途径。由于rTCA途径固定CO<sub>2</sub>，理论碳得率大于100%，因此成为葡萄糖生产琥珀酸的主要途径。然而，rTCA途径是厌氧途径，甲醇和甲烷的生物利用都需要氧气，可能难以适配rTCA途径，而oTCA途径和乙醛酸支路途径可能更适合甲醇和甲烷合成琥珀酸；对于CO<sub>2</sub>生物合成琥珀酸而言，以上途径都能适配。目前CO<sub>2</sub>和甲烷生物合成琥珀酸的最高产量分别达到2.5 g/L和0.2 g/L<sup>[63-64]</sup> (表1)，而甲醇生物合成琥珀酸尚未见报道。C<sub>1</sub>原料合成琥珀酸的代谢工程策略包括：调节碳代谢流、强化羧化反应、平衡辅因子等 (图4)。

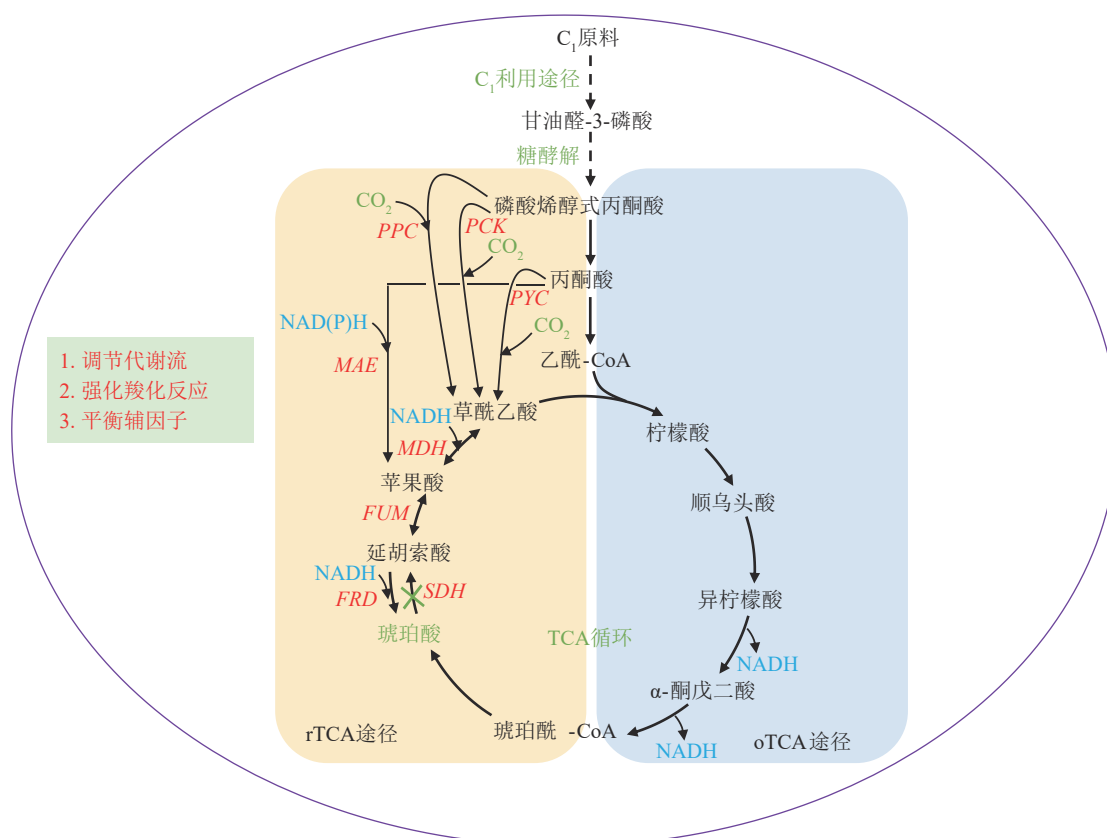


图4 C<sub>1</sub>原料合成琥珀酸的代谢途径及其改造策略

PYC—丙酮酸羧化酶基因；PPC—磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因；PCK—磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶基因；MAE—苹果酸酶基因；MDH—苹果酸脱氢酶基因；FUM—延胡索酸酶基因；FRD—延胡索酸还原酶基因；SDH—琥珀酸脱氢酶基因

Fig. 4 Biosynthetic pathway and engineering strategies for succinic acid production from C<sub>1</sub> feedstocks

PYC—Pyruvate carboxylase gene; PPC—Phosphoenolpyruvate carboxylase gene; PCK—Phosphoenolpyruvate carboxykinase gene; MAE—Malic enzyme gene; MDH—Malate dehydrogenase gene; FUM—Fumarase gene; FRD—Fumarate reductase gene; SDH—Succinate dehydrogenase gene

### 2.3.1 调节碳代谢流

琥珀酸作为TCA循环中间代谢物,通过琥珀酸脱氢酶(Sdh)催化琥珀酸生成延胡索酸,因此敲除或抑制SDH基因有利于琥珀酸积累。例如,改造甲烷氧化菌(*Methylomonas* sp.)以甲烷为碳源合成琥珀酸,敲除SDH基因使产量由9.5 mg/L提高到95.0 mg/L<sup>[64]</sup>;而改造蓝细菌以CO<sub>2</sub>为碳源合成琥珀酸,敲除和抑制SDH基因使产量分别提高10%和50%<sup>[60, 112]</sup>。为了强化碳源到目标产物琥珀酸的代谢流,需要过表达琥珀酸合成途径关键基因。对于rTCA途径而言,羧化酶和苹果酸脱氢酶(Mdh)都是限速酶,在蓝细菌中过表达PPC基因,CO<sub>2</sub>合成琥珀酸的产量提高了60%<sup>[113]</sup>;而过表达MDH基因,琥珀酸产量也提高了65%<sup>[63]</sup>。Lan等<sup>[114]</sup>强化了蓝细菌本身由 $\alpha$ -酮戊二酸生成琥珀酸的途径,即过表达 $\alpha$ -酮戊二酸脱羧酶(kgd)和琥珀酸半醛脱氢酶(gabD)基因,菌株能够合成120 mg/L琥珀酸,而继续过表达PPC基因和柠檬酸合酶基因GltA,琥珀酸产量达到430 mg/L。由此可见,阻断琥珀酸降解以及强化碳流向琥珀酸是提高琥珀酸产量的重要策略。

### 2.3.2 强化羧化反应

在琥珀酸合成中,CO<sub>2</sub>(HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>)是羧化反应的前体,在细胞培养过程中,CO<sub>2</sub>气体溶于液体培养基,先通过被动扩散透过细胞膜,然后在细胞质中转化为HCO<sub>3</sub><sup>-</sup><sup>[115]</sup>。虽然CO<sub>2</sub>和HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>都可以作为Pck的羧化底物,但Pck对于CO<sub>2</sub>的催化活力高于HCO<sub>3</sub><sup>-</sup><sup>[116]</sup>,羧酶体中的碳酸酐酶(Ca)高效转化HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>为CO<sub>2</sub>,因此在大肠杆菌中过表达来源于蓝细菌PCC7002的CA基因,Pck羧化速率提高59%,琥珀酸产量也提高20%<sup>[117]</sup>。HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>作为主要的羧化底物,其被动扩散的跨膜转运速率较低,而表达HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>转运蛋白有助于增加胞内HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>浓度。BicA和SbtA分别在蓝细菌PCC7002和PCC6803中被鉴定为HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>转运蛋白,两者依赖于Na<sup>+</sup><sup>[118-119]</sup>。在大肠杆菌中过表达BicA使琥珀酸产量提高22%<sup>[117]</sup>。然而,在大肠杆菌中共表达BicA和SbtA虽然增加了CO<sub>2</sub>吸收,却降低了琥珀酸合成,反而单独表达SbtA使琥珀酸产量提高13%<sup>[120]</sup>。而通过弱启动子控制BicA和SbtA表达以及强启动子控制PCK表达,琥珀酸产量提高37%。

虽然上述研究是基于葡萄糖合成琥珀酸,但证明了强化羧化反应促进琥珀酸合成,因此在C<sub>1</sub>合成琥珀酸中值得借鉴。

### 2.3.3 平衡辅因子

在琥珀酸合成途径中,乙醛酸循环不需要辅因子,而rTCA途径合成1分子琥珀酸需要2分子NADH作为辅因子,辅因子供应也是琥珀酸合成的一个限制因素。为了缓解辅因子NADH供应不足,在蓝细菌中表达来源于大肠杆菌乙醛酸循环的异柠檬酸裂解酶基因ICL,为琥珀酸合成提供一条不需要NADH的途径,从而促进了CO<sub>2</sub>到琥珀酸合成<sup>[121]</sup>。由于蓝细菌光合作用高效合成NADPH<sup>[103]</sup>,过表达转氢酶(PntAB、UdhA)基因将NADPH转化为NADH<sup>[47, 102]</sup>,将有助于平衡辅因子,促进琥珀酸合成。

总结以上工作,目前C<sub>1</sub>原料合成有机酸的研究主要集中于关键酶的优化、辅因子的平衡、代谢途径的改造、转运蛋白的鉴定以及耐酸性能的改善等,这些策略对于其他有机酸的生物合成也具有参考意义。此外,需要结合C<sub>1</sub>原料的特性开发针对性改造策略,例如蓝细菌光合作用时NADPH更加丰富,可以改造合成酶的辅因子偏好性由NADH转变为NADPH,或者通过转氢酶将NADPH转化为NADH,可能更有利于产物合成。然而,目前的工作多集中于合成途径的改造与优化,对于如何提高C<sub>1</sub>原料利用率以及C<sub>1</sub>原料利用与有机酸合成的适配性,还有待深入研究。

## 3 机遇、挑战以及展望

### 3.1 机遇、挑战

随着国家“碳达峰碳中和”目标的提出,C<sub>1</sub>资源高效利用迅速成为前沿研究热点。C<sub>1</sub>资源生物转化合成有机酸不仅有助于减少碳排放,而且能够缓解我国粮食不足和耕地紧张等问题。虽然目前C<sub>1</sub>原料生物合成有机酸的效率(产量、得率和生产强度)与葡萄糖发酵相比还有较大的差距,然而代谢工程与合成生物学的发展将有望显著提升C<sub>1</sub>原料生物转化效率(表1)。从目前的价格来看,葡萄糖的价格约4000元/吨,而甲醇的价格约

2400元/吨，以乳酸为例，葡萄糖生物合成乳酸的得率约0.9 g/g，如果甲醇生物合成乳酸的得率达到0.5 g/g，那么甲醇就可以代替葡萄糖用于生产乳酸；并且，考虑到“碳税”以及环境因素， $C_1$ 原料生物炼制优势将不断凸显，有望用于有机酸工业化生产。以 $C_1$ 为原料合成有机酸，主要挑战来源于四点：①原料的储存、运输和传质效率；② $C_1$ 利用微生物的遗传操作难度；③微生物的代谢特性与产物合成的适配性；④底物的耐受性和利用率。

### 3.1.1 原料的储存、运输和传质效率

$C_1$ 气体 $CO_2$ 和甲烷储存和运输困难，且在发酵过程中如何提高气-液传质效率存在技术挑战；而 $C_1$ 液体原料如甲醇的液-液传质效率比气-液传质效率高得多。因此，甲醇是 $C_1$ 资源中最理想的生物炼制原料，且 $CO_2$ 和甲烷可以通过化学催化转化为甲醇，结合甲醇生物转化过程可以大幅提高底物利用效率和产物合成效率。

### 3.1.2 $C_1$ 利用微生物的遗传操作难度

一般来说， $C_1$ 利用微生物属于非传统微生物，其遗传背景和生理代谢特性不甚清楚，遗传操作工具相对缺乏，然而随着合成生物学、系统生物学以及基因编辑技术的发展，科研工作者有望将“非传统微生物”开发为“模式微生物”。例如在甲醇细菌中建立CRISPR-Cas9基因编辑系统、CRISPRi基因下调系统等遗传操作工具<sup>[122-124]</sup>，在甲醇酵母中建立CRISPR-Cas9遗传操作平台、鉴定启动子和中性位点等<sup>[86-87, 125-126]</sup>，都为甲醇生物转化合成有机酸提供了极大便利<sup>[49, 53]</sup>。

### 3.1.3 微生物的代谢特性与产物合成的适配性

有机酸的高效合成得益于物质和能量高效流向目标产物，物质流的改变可以通过构建与优化代谢途径、提高限速酶的活性以及阻断或抑制竞争途径等实现，而能量流的改变可以通过强化辅因子供应、平衡辅因子分配以及关键酶辅因子偏好性改造等实现，而以上改造需要多轮“设计-构建-测试-学习”（DBTL）循环<sup>[127]</sup>。除此之外，借助多组学数据（基因组、转录组、蛋白质组和代谢组），构建 $C_1$ 利用微生物的基因组尺度代谢模型<sup>[128]</sup>，解析细胞代谢特性，可预测代谢工程改造靶点，从而缩短改造周期，减少试错成本<sup>[129]</sup>。

### 3.1.4 底物的耐受性和利用率

$C_1$ 原料如甲醇、甲酸等对细胞毒性较大，特别是高浓度甲醇会造成细胞内甲醛积累，进而抑制细胞生长和代谢<sup>[20]</sup>。细胞通过甲醛异化途径将甲醛转化为 $CO_2$ ，不仅用于甲醛解毒，同时也为细胞提供辅因子NADH，对于细胞而言非常重要，然而对于产物合成而言，异化途径造成严重的碳损失。敲除异化途径关键基因 $FLD$ 和 $FDH$ 阻断异化途径，并结合ALE恢复菌株在甲醇中正常生长代谢，有望提高甲醇到目标产物的得率。另外，甲醇的挥发也是造成甲醇利用率低的重要原因，而且挥发的甲醇也给发酵车间防爆性提出很高的要求，因此在发酵罐的设计上需要增加多级冷凝回流装置，尽量减少甲醇挥发，不仅能够提高甲醇利用率，还能增加安全性。

## 3.2 展望

$C_1$ 生物炼制非常契合我国粮食和耕地紧张的现状以及“碳达峰碳中和”目标，随着学术界和产业界持续的科研投入， $C_1$ 资源将逐渐成为重要的生物炼制原料，推动第3代生物炼制的发展与产业化落地。为了发展 $C_1$ 生物转化合成有机酸或其他大宗化学品，需要加大对新质生产力的政策引导与财政支持。随着生产效率的提高和原料价格的降低，未来 $C_1$ 生物转化将在成本上不断接近甚至低于糖类生物转化。

$C_1$ 生物利用需要面向大工业、大体量，甚至与化学工业直接竞争。从工业应用角度来讲，目前能产业化的很少，关键原因是葡萄糖生产有机酸的技术相当成熟，而 $C_1$ 生物转化的研究处于起步阶段，目前的产量和得率很难与葡萄糖发酵竞争。此外，相比化工制造，生物制造生产有机酸的成本会有所提高，不过优势在于绿色可持续，且对于一些特定的光学异构体有机酸（如L-乳酸和D-乳酸），化学法生产难以获得光学纯的产物，而生物法依靠酶的光学选择性很容易生产光学纯的产物；而且化工制造需要严苛的反应条件和高标准的反应装置等，生物制造则条件温和且反应器设计要求稍低。

甲醇可以通过太阳能等可再生能源催化 $CO_2$ 还

原大量制备,有望实现太阳能利用和CO<sub>2</sub>捕获,对双碳目标具有重要意义。例如,中国科学院大连化学物理研究所李灿院士团队<sup>[130]</sup>建立“液态阳光”路线——利用太阳能光伏发电、电解水制H<sub>2</sub>、CO<sub>2</sub>加氢制备甲醇,有望成为未来解决二氧化碳排放、实现碳中和的重要途径之一。2020年10月15日,全球首套千吨级“液态阳光燃料合成示范项目”在兰州新区通过了成果鉴定,为“液态阳光”制甲醇产业化打下了坚实基础。2023年,中煤鄂尔多斯能源化工有限公司10万吨/年液态阳光——二氧化碳加绿氢制甲醇技术示

范项目已经完成风险评估,准备进入建设阶段。目前其最主要限制因素在于水解制氢成本过高,如何进一步提高太阳能利用效率以及水解制氢效率是未来的努力方向。随着甲醇细胞工厂的优化与改进,甲醇生物合成有机酸的水平(产量、得率和生产强度)也将不断提高,由此设想未来有机酸生产新路线,CO<sub>2</sub>通过“液态阳光”路线制备甲醇,甲醇通过细胞工厂合成有机酸,实现有机酸的“负碳”生产,促进有机酸产业转型升级(图5)。总之,化学催化与生物转化的结合,是C<sub>1</sub>生物合成的最优解。

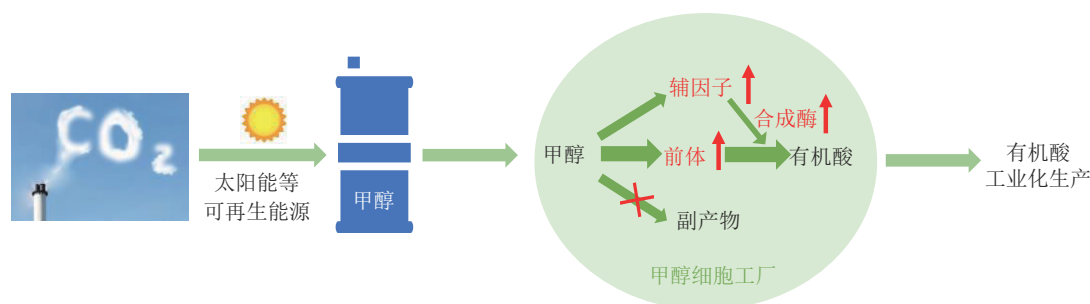


图5 可再生能源催化CO<sub>2</sub>还原制备甲醇结合甲醇生物转化合成有机酸是未来有机酸生产的潜力路径

Fig. 5 Combination of CO<sub>2</sub> reduction and methanol bioconversion is a potential approach for industrial production of organic acids

## 参 考 文 献

- [1] WERP Y T, PETERSEN G. Top value added Chemicals from Biomass—Volume I : results of screening for potential candidates from sugars and synthesis Gas[R/OL]. Pacific Northwest National Laboratory National Renewable Energy Laboratory and Department of Energy. (2004-08-01)[2024-02-01]. <https://doi.org/10.2172/15008859>.
- [2] BOZELL J J, PETERSEN G R. Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates—the US Department of Energy’s “Top 10” revisited[J]. *Green Chemistry*, 2010, 12(4): 539-554.
- [3] 张瑞元, 朱翊凡, 曾杜文, 等. 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 R Y, ZHU Y F, ZENG D W, et al. Advances on the production of organic acids by yeast[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2023, 39(6): 2231-2247.
- [4] LOMWONGSOPON P, VARRONE C. Contribution of fermentation technology to building blocks for renewable plastics[J]. *Fermentation*, 2022, 8(2): 47.
- [5] 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 Y Y, ZENG Y, WANG Q H. Advances in synthetic biomanufacturing[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2021, 2(2): 145-160.
- [6] ZOU L H, OUYANG S P, HU Y L, et al. Efficient lactic acid production from dilute acid-pretreated lignocellulosic biomass by a synthetic consortium of engineered *Pseudomonas putida* and *Bacillus coagulans*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2021, 14(1): 227.
- [7] LI Y, HUGENHOLTZ J, CHEN J, et al. Enhancement of pyruvate production by *Torulopsis glabrata* using a two-stage oxygen supply control strategy[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 60(1-2): 101-106.
- [8] YU W, CAO X, GAO J Q, et al. Overproduction of 3-hydroxypropionate in a super yeast chassis[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 361: 127690.
- [9] ZHOU Y J, KERKHOVEN E J, NIELSEN J. Barriers and opportunities in bio-based production of hydrocarbons[J]. *Nature Energy*, 2018, 3(11): 925-935.
- [10] SANTOS CORREA S, SCHULTZ J, LAUERSEN K J, et al. Natural carbon fixation and advances in synthetic engineering for redesigning and creating new fixation pathways[J]. *Journal of Advanced Research*, 2023, 47: 75-92.
- [11] SARMA S, SHARMA S, RUDAKIYA D, et al. Valorization of microalgae biomass into bioproducts promoting circular

- bioeconomy: a holistic approach of bioremediation and biorefinery[J]. *3 Biotech*, 2021, 11(8): 378.
- [12] VEAUDOR T, BLANC-GARIN V, CHENEBAULT C, et al. Recent advances in the photoautotrophic metabolism of cyanobacteria: biotechnological implications[J]. *Life*, 2020, 10(5): 71.
- [13] STEPHENS S, MAHADEVAN R, ALLEN D G. Engineering photosynthetic bioprocesses for sustainable chemical production: a review[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021, 8: 610723.
- [14] BAR-EVEN A, NOOR E, LEWIS N E, et al. Design and analysis of synthetic carbon fixation pathways[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(19): 8889-8894.
- [15] SCHWANDER T, VON BORZYSKOWSKI L S, BURGNER S, et al. A synthetic pathway for the fixation of carbon dioxide *in vitro*[J]. *Science*, 2016, 354(6314): 900-904.
- [16] BOUZON M, PERRET A, LOREAU O, et al. A synthetic alternative to canonical one-carbon metabolism[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2017, 6(8): 1520-1533.
- [17] LUO S S, DIEHL C, HE H, et al. Construction and modular implementation of the THETA cycle for synthetic CO<sub>2</sub> fixation [J]. *Nature Catalysis*, 2023, 6(12): 1228-1240.
- [18] SARWAR A, LEE E Y. Methanol-based biomanufacturing of fuels and chemicals using native and synthetic methylotrophs [J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2023, 8(3): 396-415.
- [19] ZHAN C J, LI X W, YANG Y K, et al. Strategies and challenges with the microbial conversion of methanol to high-value chemicals[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2021, 118(10): 3655-3668.
- [20] ZHAI X X, GAO J Q, LI Y X, et al. Peroxisomal metabolic coupling improves fatty alcohol production from sole methanol in yeast[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2023, 120(12): e2220816120.
- [21] SEMRAU J D, DISPIRITO A A, YOON S. Methanotrophs and copper[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2010, 34(4): 496-531.
- [22] KALYUZHNYAYA M G, PURI A W, LIDSTROM M E. Metabolic engineering in methanotrophic bacteria[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 29: 142-152.
- [23] BARIK S, PRIETO S, HARRISON S B, et al. Biological production of alcohols from coal through indirect liquefaction [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1988, 18(1): 363-378.
- [24] KÖPKE M, MIHALCEA C, LIEW F, et al. 2,3-Butanediol production by acetogenic bacteria, an alternative route to chemical synthesis, using industrial waste gas[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(15): 5467-5475.
- [25] FERNÁNDEZ-NAVEIRA Á, ABUBACKAR H N, VEIGA M C, et al. Efficient butanol-ethanol (B-E) production from carbon monoxide fermentation by *Clostridium carboxidivorans* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(7): 3361-3370.
- [26] LITTY D, KREMP F, MÜLLER V. One substrate, many fates: different ways of methanol utilization in the acetogen *Acetobacterium woodii*[J]. *Environmental Microbiology*, 2022, 24(7): 3124-3133.
- [27] HEISKANEN H, VIRKAJÄRVI I, VIKARI L. The effect of syngas composition on the growth and product formation of *Butyribacterium methylotrophicum*[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 41(3): 362-367.
- [28] SCHUCHMANN K, MÜLLER V. Autotrophy at the thermodynamic limit of life: a model for energy conservation in acetogenic bacteria[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12(12): 809-821.
- [29] GOYAL N, ZHOU Z, KARIMI I A. Metabolic processes of *Methanococcus maripaludis* and potential applications[J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15(1): 107.
- [30] HEIDELBERG J F, SESHADRI R, HAVEMAN S A, et al. The genome sequence of the anaerobic, sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough[J]. *Nature Biotechnology*, 2004, 22(5): 554-559.
- [31] CROWTHER G J, KOSÁLY G, LIDSTROM M E. Formate as the main branch point for methylotrophic metabolism in *Methylobacterium extorquens* AM1[J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(14): 5057-5062.
- [32] CRAMM R. Genomic view of energy metabolism in *Ralstonia eutropha* H16[J]. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2009, 16(1-2): 38-52.
- [33] GLEIZER S, BEN-NISSAN R, BAR-ON Y M, et al. Conversion of *Escherichia coli* to generate all biomass carbon from CO<sub>2</sub>[J]. *Cell*, 2019, 179(6): 1255-1263.e12.
- [34] GASSLER T, SAUER M, GASSER B, et al. The industrial yeast *Pichia pastoris* is converted from a heterotroph into an autotroph capable of growth on CO<sub>2</sub>[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(2): 210-216.
- [35] TIAN J Z, DENG W, ZHANG Z W, et al. Discovery and remodeling of *Vibrio natriegens* as a microbial platform for efficient formic acid biorefinery[J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 7758.
- [36] HENRY C S, BROADBELT L J, HATZIMANIKATIS V. Discovery and analysis of novel metabolic pathways for the biosynthesis of industrial chemicals: 3-hydroxypropanoate[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2010, 106(3): 462-473.
- [37] KILDEGAARD K R, HALLSTRÖM B M, BLICHER T H, et al. Evolution reveals a glutathione-dependent mechanism of 3-hydroxypropionic acid tolerance[J]. *Metabolic Engineering*, 2014, 26: 57-66.
- [38] SCHWARZ M, KÖPCKE B, WEBER R W, et al. 3-Hydroxypropionic acid as a nematicidal principle in endophytic fungi[J]. *Phytochemistry*, 2004, 65(15): 2239-2245.

- [39] CHEN Y, BAO J C, KIM I K, et al. Coupled incremental precursor and co-factor supply improves 3-hydroxypropionic acid production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Metabolic Engineering*, 2014, 22: 104-109.
- [40] LI Y, WANG X, GE X Z, et al. High production of 3-hydroxypropionic acid in *Klebsiella pneumoniae* by systematic optimization of glycerol metabolism[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 26932.
- [41] BORODINA I, KILDEGAARD K R, JENSEN N B, et al. Establishing a synthetic pathway for high-level production of 3-hydroxypropionic acid in *Saccharomyces cerevisiae* via  $\beta$ -alanine[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 27: 57-64.
- [42] JIANG X R, YAN X, YU L P, et al. Hyperproduction of 3-hydroxypropionate by *Halomonas bluephagenesis*[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 1513.
- [43] TONG T, TAO Z Y, CHEN X L, et al. A biosynthesis pathway for 3-hydroxypropionic acid production in genetically engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Green Chemistry*, 2021, 23(12): 4502-4509.
- [44] ZHAO P, MA C L, XU L D, et al. Exploiting tandem repetitive promoters for high-level production of 3-hydroxypropionic acid [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(10): 4017-4031.
- [45] WANG C, REN J, ZHOU L B, et al. An aldolase-catalyzed new metabolic pathway for the assimilation of formaldehyde and methanol to synthesize 2-keto-4-hydroxybutyrate and 1,3-propanediol in *Escherichia coli*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(11): 2483-2493.
- [46] GAO J Q, YU W, LI Y X, et al. Engineering co-utilization of glucose and xylose for chemical overproduction from lignocellulose[J]. *Nature Chemical Biology*, 2023, 19(12): 1524-1531.
- [47] WANG Y P, SUN T, GAO X Y, et al. Biosynthesis of platform chemical 3-hydroxypropionic acid (3-HP) directly from CO<sub>2</sub> in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. *Metabolic Engineering*, 2016, 34: 60-70.
- [48] NGUYEN D T N, LEE O K, LIM C, et al. Metabolic engineering of type II methanotroph, *Methylosinus trichosporium* OB3b, for production of 3-hydroxypropionic acid from methane via a malonyl-CoA reductase-dependent pathway[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 59: 142-150.
- [49] WU X Y, CAI P, GAO L H, et al. Efficient bioproduction of 3-hydroxypropionic acid from methanol by a synthetic yeast cell factory[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2023, 11(16): 6445-6453.
- [50] LAN E I, CHUANG D S, SHEN C R, et al. Metabolic engineering of cyanobacteria for photosynthetic 3-hydroxypropionic acid production from CO<sub>2</sub> using *Synechococcus elongatus* PCC 7942[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 31: 163-170.
- [51] YANG Y M, CHEN W J, YANG J, et al. Production of 3-hydroxypropionic acid in engineered *Methylobacterium extorquens* AM1 and its reassimilation through a reductive route[J]. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16(1): 179.
- [52] YUAN X J, CHEN W J, MA Z X, et al. Rewiring the native methanol assimilation metabolism by incorporating the heterologous ribulose monophosphate cycle into *Methylorubrum extorquens*[J]. *Metabolic Engineering*, 2021, 64: 95-110.
- [53] YU W, GAO J Q, YAO L, et al. Bioconversion of methanol to 3-hydroxypropionate by engineering *Ogataea polymorpha*[J]. *Chinese Journal of Catalysis*, 2023, 46: 84-90.
- [54] SHABESTARY K, HERNÁNDEZ H P, MIAO R, et al. Cycling between growth and production phases increases cyanobacteria bioproduction of lactate[J]. *Metabolic Engineering*, 2021, 68: 131-141.
- [55] GARG S, CLOMBURG J M, GONZALEZ R. A modular approach for high-flux lactic acid production from methane in an industrial medium using engineered *Methylomicrobium buryatense* 5GB1[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2018, 45(6): 379-391.
- [56] WEFELMEIER K, SCHMITZ S, HAUT A M, et al. Engineering the methylotrophic yeast *Ogataea polymorpha* for lactate production from methanol[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2023, 11: 1223726.
- [57] LI C, TAO F, NI J, et al. Enhancing the light-driven production of D-lactate by engineering cyanobacterium using a combinational strategy[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 9777.
- [58] LEE J K, KIM S J, KIM W S, et al. Efficient production of D-lactate from methane in a lactate-tolerant strain of *Methylomonas* sp. DH-1 generated by adaptive laboratory evolution[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12: 234.
- [59] YAMADA R, OGURA K, KIMOTO Y, et al. Toward the construction of a technology platform for chemicals production from methanol: D-lactic acid production from methanol by an engineered yeast *Pichia pastoris*[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2019, 35(2): 37.
- [60] SENGUPTA S, JAISWAL D, SENGUPTA A, et al. Metabolic engineering of a fast-growing *Cyanobacterium Synechococcus elongatus* PCC 11801 for photoautotrophic production of succinic acid[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2020, 13: 89.
- [61] HUANG C H, SHEN C R, LI H, et al. CRISPR interference (CRISPRi) for gene regulation and succinate production in cyanobacterium *S. elongatus* PCC 7942[J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15(1): 196.
- [62] HASUNUMA T, MATSUDA M, KATO Y, et al. Temperature enhanced succinate production concurrent with increased central metabolism turnover in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 48: 109-120.
- [63] IJIMA H, WATANABE A, SUKIGARA H, et al. Four-carbon

- dicarboxylic acid production through the reductive branch of the open cyanobacterial tricarboxylic acid cycle in *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. *Metabolic Engineering*, 2021, 65: 88-98.
- [64] NGUYEN D T N, LEE O K, HADIYATI S, et al. Metabolic engineering of the type I methanotroph *Methylomonas* sp. DH-1 for production of succinate from methane[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 54: 170-179.
- [65] LIU C S, WANG Q, XIAN M, et al. Dissection of malonyl-coenzyme A reductase of *Chloroflexus aurantiacus* results in enzyme activity improvement[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e75554.
- [66] LIU C S, DING Y M, ZHANG R B, et al. Functional balance between enzymes in malonyl-CoA pathway for 3-hydroxypropionate biosynthesis[J]. *Metabolic Engineering*, 2016, 34: 104-111.
- [67] ZHOU Y J, BUIJS N A, ZHU Z W, et al. Production of fatty acid-derived oleochemicals and biofuels by synthetic yeast cell factories[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 11709.
- [68] YU T, ZHOU Y J, HUANG M T, et al. Reprogramming yeast metabolism from alcoholic fermentation to lipogenesis[J]. *Cell*, 2018, 174(6): 1549-1558.e14.
- [69] SCHNEIDER K, ASAO M, CARTER M S, et al. *Rhodobacter sphaeroides* uses a reductive route via propionyl coenzyme A to assimilate 3-hydroxypropionate[J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(2): 225-232.
- [70] ZHOU S F, ASHOK S, KO Y, et al. Development of a deletion mutant of *Pseudomonas denitrificans* that does not degrade 3-hydroxypropionic acid[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(10): 4389-4398.
- [71] NGUYEN-VO T P, RYU H, SAUER M, et al. Improvement of 3-hydroxypropionic acid tolerance in *Klebsiella pneumoniae* by novel transporter YohJK[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 346: 126613.
- [72] NGUYEN-VO T P, LIANG Y X, SANKARANARAYANAN M, et al. Development of 3-hydroxypropionic-acid-tolerant strain of *Escherichia coli* W and role of minor global regulator *yieP*[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 53: 48-58.
- [73] CHUN A Y, YUNXIAO L, ASHOK S, et al. Elucidation of toxicity of organic acids inhibiting growth of *Escherichia coli* W[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2014, 19(5): 858-865.
- [74] LI J, ZHU K, MIAO L, et al. Simultaneous improvement of limonene production and tolerance in *Yarrowia lipolytica* through tolerance engineering and evolutionary engineering[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(4): 884-896.
- [75] YANG M M, AN Y F, ZABED H M, et al. Random mutagenesis of *Clostridium butyricum* strain and optimization of biosynthesis process for enhanced production of 1,3-propanediol[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 284: 188-196.
- [76] ZHANG W, GENG A L. Improved ethanol production by a xylose-fermenting recombinant yeast strain constructed through a modified genome shuffling method[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2012, 5(1): 46.
- [77] ZHU Y, ZHOU C, WANG Y, et al. Transporter engineering for microbial manufacturing[J]. *Biotechnology Journal*, 2020, 15(9): e1900494.
- [78] LIN Z L, ZHANG Y, WANG J Q. Engineering of transcriptional regulators enhances microbial stress tolerance [J]. *Biotechnology Advances*, 2013, 31(6): 986-991.
- [79] CHO J S, KIM G B, EUN H M, et al. Designing microbial cell factories for the production of chemicals[J]. *JACS Au*, 2022, 2(8): 1781-1799.
- [80] NGUYEN-VO T P, KO S, RYU H, et al. Systems evaluation reveals novel transporter YohJK renders 3-hydroxypropionate tolerance in *Escherichia coli*[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 19064.
- [81] LIU D, HWANG H J, OTOUPAL P B, et al. Engineering *Rhodospiridium toruloides* for production of 3-hydroxypropionic acid from lignocellulosic hydrolysate[J]. *Metabolic Engineering*, 2023, 78: 72-83.
- [82] VINK E T H, RÁBAGO K R, GLASSNER D A, et al. Applications of life cycle assessment to NatureWorks™ polylactide (PLA) production[J]. *Polymer Degradation and Stability*, 2003, 80(3): 403-419.
- [83] DING X W, RONG J, PAN Z P, et al. *De novo* multienzyme synthetic pathways for lactic acid production[J]. *ACS Catalysis*, 2024, 14(7): 4665-4674.
- [84] UPADHYAYA B P, DEVEAUX L C, CHRISTOPHER L P. Metabolic engineering as a tool for enhanced lactic acid production[J]. *Trends in Biotechnology*, 2014, 32(12): 637-644.
- [85] HENARD C A, SMITH H, DOWE N, et al. Bioconversion of methane to lactate by an obligate methanotrophic bacterium[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 21585.
- [86] YU W, GAO J Q, ZHAI X X, et al. Screening neutral sites for metabolic engineering of methylotrophic yeast *Ogataea polymorpha*[J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2021, 6(2): 63-68.
- [87] CAI P, DUAN X P, WU X Y, et al. Recombination machinery engineering facilitates metabolic engineering of the industrial yeast *Pichia pastoris*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(13): 7791-7805.
- [88] WANG M, LUAN G D, LU X F. Systematic identification of a neutral site on chromosome of *Synechococcus* sp. PCC7002, a promising photosynthetic chassis strain[J]. *Journal of Biotechnology*, 2019, 295: 37-40.
- [89] PORRO D, BIANCHI M M, BRAMBILLA L, et al. Replacement of a metabolic pathway for large-scale production of lactic acid from engineered yeasts[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(9): 4211-4215.

- [90] HIDESE R, MATSUDA M, OSANAI T, et al. Malic enzyme facilitates D-lactate production through increased pyruvate supply during anoxic dark fermentation in *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. ACS Synthetic Biology, 2020, 9(2): 260-268.
- [91] BIANCHI M M, BRAMBILLA L, PROTANI F, et al. 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.
- [92] ANGERMAYR S A, VAN DER WOUDE A D, CORREDDU D, et al. Exploring metabolic engineering design principles for the photosynthetic production of lactic acid by *Synechocystis* sp. PCC6803[J]. Biotechnology for Biofuels, 2014, 7: 99.
- [93] BAEK S H, KWON E Y, KIM Y H, et al. 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.
- [94] PACHECO A, TALAIA G, SÁ-PESSOA J, et al. Lactic acid production in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated by expression of the monocarboxylate transporters Jen1 and Ady2 [J]. FEMS Yeast Research, 2012, 12(3): 375-381.
- [95] WAKAMATSU M, TOMITAKA M, TANI T, et al. Improvement of ethanol production from D-lactic acid by constitutive expression of lactate transporter Jen1p in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2013, 77(5): 1114-1116.
- [96] GUIARD B. Structure, expression and regulation of a nuclear gene encoding a mitochondrial protein: the yeast L(+)-lactate cytochrome c oxidoreductase (cytochrome b2)[J]. The EMBO Journal, 1985, 4(12): 3265-3272.
- [97] MOURIER A, VALLORTIGARA J, YOBOUE E D, et al. Kinetic activation of yeast mitochondrial D-lactate dehydrogenase by carboxylic acids[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 2008, 1777(10): 1283-1288.
- [98] BAUMSCHABL M, ATA Ö, MITIC B M, et al. Conversion of CO<sub>2</sub> into organic acids by engineered autotrophic yeast[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2022, 119(47): e2211827119.
- [99] TONG T, CHEN X L, HU G P, et al. Engineering microbial metabolic energy homeostasis for improved bioproduction[J]. Biotechnology Advances, 2021, 53: 107841.
- [100] LEE J Y, KANG C D, LEE S H, et al. Engineering cellular redox balance in *Saccharomyces cerevisiae* for improved production of L-lactic acid[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2015, 112(4): 751-758.
- [101] KOMATI REDDY G, LINDNER S N, WENDISCH V F. Metabolic engineering of an ATP-neutral Embden-Meyerhof-Parnas pathway in *Corynebacterium glutamicum*: growth restoration by an adaptive point mutation in NADH dehydrogenase[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(6): 1996-2005.
- [102] QI H S, LI S S, ZHAO S M, et al. Model-driven redox pathway manipulation for improved isobutanol production in *Bacillus subtilis* complemented with experimental validation and metabolic profiling analysis[J]. PLoS One, 2014, 9(4): e93815.
- [103] MULLINEAUX C W. Electron transport and light-harvesting switches in cyanobacteria[J]. Frontiers in Plant Science, 2014, 5: 7.
- [104] LIU X T, ZHAO G, SUN S J, et al. Biosynthetic pathway and metabolic engineering of succinic acid[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2022, 10: 843887.
- [105] LIU Y P, ZHENG P, SUN Z H, et al. Economical succinic acid production from cane molasses by *Actinobacillus succinogenes* [J]. Bioresource Technology, 2008, 99(6): 1736-1742.
- [106] LEE P C, LEE S Y, HONG S H, et al. Batch and continuous cultures of *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E for the production of succinic acid from whey and corn steep liquor [J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2003, 26(1): 63-67.
- [107] MEYNIAL-SALLES I, DOROTYN S, SOUCAILLE P. A new process for the continuous production of succinic acid from glucose at high yield, titer, and productivity[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2008, 99(1): 129-135.
- [108] KUHNERT P, SCHOLTEN E, HAEFNER S, et al. *Basfia succiniciproducens* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Pasteurellaceae* isolated from bovine rumen[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010, 60(Pt 1): 44-50.
- [109] LEE S J, LEE D Y, KIM T Y, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for enhanced production of succinic acid, based on genome comparison and *in silico* gene knockout simulation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(12): 7880-7887.
- [110] LITSANOV B, BROCKER M, BOTT M. Toward homosuccinate fermentation: metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for anaerobic production of succinate from glucose and formate[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(9): 3325-3337.
- [111] CUI Z Y, GAO C J, LI J J, et al. Engineering of unconventional yeast *Yarrowia lipolytica* for efficient succinic acid production from glycerol at low pH[J]. Metabolic Engineering, 2017, 42: 126-133.
- [112] LAI M J, TSAI J C, LAN E I. CRISPRi-enhanced direct photosynthetic conversion of carbon dioxide to succinic acid by metabolically engineered cyanobacteria[J]. Bioresource Technology, 2022, 366: 128131.
- [113] HASUNUMA T, MATSUDA M, KONDO A. Improved sugar-free succinate production by *Synechocystis* sp. PCC 6803

- following identification of the limiting steps in glycogen catabolism[J]. *Metabolic Engineering Communications*, 2016, 3: 130-141.
- [114] LAN E I, WEI C T. Metabolic engineering of cyanobacteria for the photosynthetic production of succinate[J]. *Metabolic Engineering*, 2016, 38: 483-493.
- [115] LU S Y, EITEMAN M A, ALTMAN E. Effect of CO<sub>2</sub> on succinate production in dual-phase *Escherichia coli* fermentations[J]. *Journal of Biotechnology*, 2009, 143(3): 213-223.
- [116] COTELESAGE J J H, PUTTICK J, GOLDIE H, et al. How does an enzyme recognize CO<sub>2</sub>?[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2007, 39(6): 1204-1210.
- [117] XIAO M Y, ZHU X N, BI C H, et al. Improving succinate productivity by engineering a cyanobacterial CO<sub>2</sub> concentrating system (CCM) in *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology Journal*, 2017, 12(9): 1700199.
- [118] PRICE G D, WOODGER F J, BADGER M R, et al. Identification of a SulP-type bicarbonate transporter in marine cyanobacteria[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(52): 18228-18233.
- [119] SHIBATA M, KATOH H, SONODA M, et al. Genes essential to sodium-dependent bicarbonate transport in cyanobacteria: function and phylogenetic analysis[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(21): 18658-18664.
- [120] ZHU L W, ZHANG L, WEI L N, et al. Collaborative regulation of CO<sub>2</sub> transport and fixation during succinate production in *Escherichia coli*[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 17321.
- [121] DURALL C, KUKIL K, HAWKES J A, et al. Production of succinate by engineered strains of *Synechocystis* PCC 6803 overexpressing phosphoenolpyruvate carboxylase and a glyoxylate shunt[J]. *Microbial Cell Factories*, 2021, 20(1): 39.
- [122] TAPSCOTT T, GUARNIERI M T, HENARD C A. Development of a CRISPR/Cas9 system for *Methylococcus capsulatus* *in vivo* gene editing[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(11): e00340-19.
- [123] MO X H, ZHANG H, WANG T M, et al. Establishment of CRISPR interference in *Methylorubrum extorquens* and application of rapidly mining a new phytoene desaturase involved in carotenoid biosynthesis[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(10): 4515-4532.
- [124] SCHULTENKÄMPER K, BRITO L F, LÓPEZ M G, et al. Establishment and application of CRISPR interference to affect sporulation, hydrogen peroxide detoxification, and mannitol catabolism in the methylotrophic thermophile *Bacillus methanolicus*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(14): 5879-5889.
- [125] GAO J Q, GAO N, ZHAI X X, et al. Recombination machinery engineering for precise genome editing in methylotrophic yeast *Ogataea polymorpha*[J]. *iScience*, 2021, 24(3): 102168.
- [126] ZHAI X X, JI L L, GAO J Q, et al. Characterizing methanol metabolism-related promoters for metabolic engineering of *Ogataea polymorpha*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(23): 8761-8769.
- [127] NIELSEN J, KEASLING J D. Engineering cellular metabolism [J]. *Cell*, 2016, 164(6): 1185-1197.
- [128] LIEBAL U W, FABRY B A, RAVIKRISHNAN A, et al. Genome-scale model reconstruction of the methylotrophic yeast *Ogataea polymorpha*[J]. *BMC Biotechnology*, 2021, 21(1): 23.
- [129] KING Z A, LU J, DRÄGER A, et al. BiGG Models: a platform for integrating, standardizing and sharing genome-scale models [J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(D1): D515-D522.
- [130] SHIH C F, ZHANG T, LI J H, et al. Powering the future with liquid sunshine[J]. *Joule*, 2018, 2(10): 1925-1949.



**通讯作者:** 周雍进(1984—),男,博士,研究员。研究方向为甲醇生物转化与天然产物生物合成。  
E-mail: zhouyongjin@dicp.ac.cn



**第一作者:** 禹伟(1992—),男,博士。研究方向为多形汉逊酵母甲醇生物转化与代谢工程。  
E-mail: yuweibio@dicp.ac.cn