特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2026-107

耐酸微生物底盘细胞创制及应用

王丽敏[1]，张莉敏[1,2]，于波[1]
（[1] 中国科学院微生物研究所微生物生理与代谢工程研究室，北京 100101；[2] 中国科学院大学，北京 100049）

摘要：在合成生物学的推动下，微生物制造作为连接基础研究与工业应用的桥梁，已在多种产品的规模化生产中展现出巨大潜力，成为当前生物制造领域备受瞩目的研究方向。与传统微生物相比，极端微生物因其在胁迫条件下优异的生长与合成能力而表现出更优的性能。耐酸微生物能够在极端酸性环境稳定增殖，是合成生物学研究领域极具潜力的新一代底盘细胞。基于耐酸微生物的新一代生物制造技术有望解决传统嗜中性模式菌发酵产酸所导致的产物抑制、杂菌污染、大量酸碱中和剂消耗以及盐类副产物污染等工业难题，可实现有机酸的清洁生产，成为可持续制造领域中一种颇具吸引力的绿色工艺。本文介绍了耐酸微生物底盘细胞的特征，阐释了耐酸机制以及提高微生物细胞酸耐受性的方法与手段。此外，本文还总结了适用于耐酸微生物的遗传元件、分子工具与操作策略，及其在有机酸等高价值生物基化学品合成领域的最新应用成果、面临的挑战与机遇，并展望了推动耐酸底盘细胞从实验室走向工业应用的方向，包括拓展遗传操作工具包为在耐酸底盘中进行多基因通路的理性重构与工业表型优化提供可操作手段、以及利用合成生物学与系统生物学手段提高耐酸底盘细胞工厂在工业场景中的适配能力。

关键词：耐酸微生物；合成生物学；生物制造；生物基化学品；代谢工程；途径改造

中图分类号：Q939.9　　**文献标志码：**A

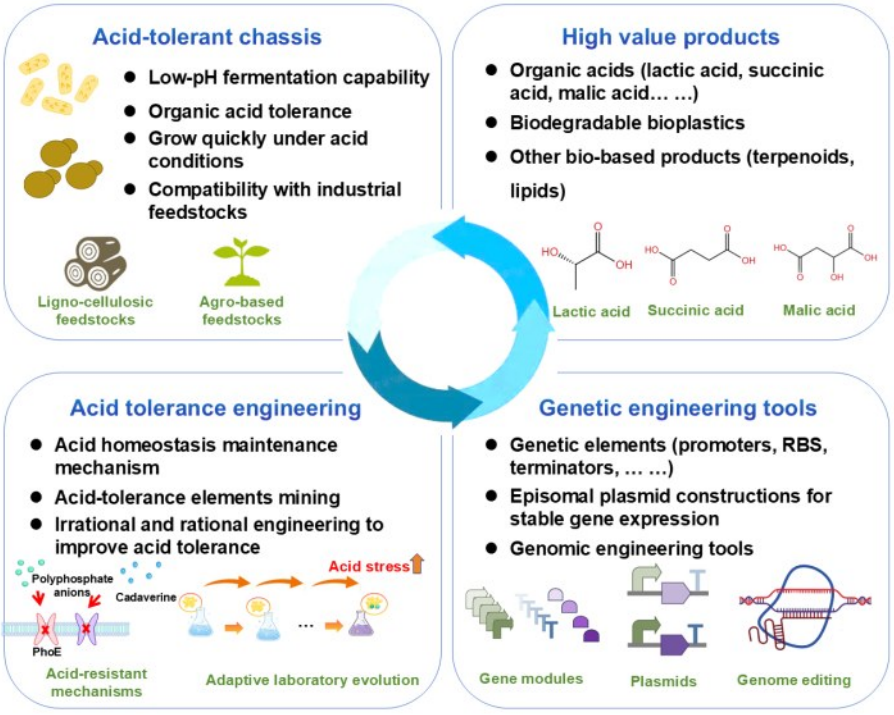
Development and Application of Acid-Tolerant Microbial Chassis Cells

Wang L-min[1], Zhang Limin[1,2], Yu Bo[1]
([1]*Department of Microbial Physiological & Metabolic Engineering, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*; [2]*University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*)

Abstract: Driven by advances in synthetic biology, microbial biomanufacturing, serving as a bridge between fundamental research and industrial applications, has demonstrated enormous potential in the large-scale production of a wide range of products, and has become a prominent research direction in the field of biomanufacturing. Compared with conventional microorganisms, extremophiles exhibit superior performance owing to their remarkable growth and biosynthetic capabilities under stressful conditions. Acid-tolerant microorganisms, capable of stable proliferation under

收稿日期：2026-09-18 修回日期：2026-11-01
基金项目：国家自然科学基金（31670045）
引用本文：王丽敏，张莉敏，于波. 耐酸微生物底盘细胞创制及应用[J]. 合成生物学，2026，7. DOI: 10.12211/2096-8280.2026-107
Citation: Wang L-min, Zhang Limin, Yu Bo. Development and Application of Acid-Tolerant Microbial Chassis Cells[J]. Synthetic Biology Journal, 2026, 7. DOI: 10.12211/2096-8280.2026-107

extremely acidic conditions, represent a new generation of highly promising chassis cells in synthetic biology. Biomanufacturing based on acid-tolerant microorganisms, offering solutions to long-standing industrial challenges associated with traditional neutrophilic model strains, such as product inhibition caused by acid accumulation, microbial contamination, substantial consumption of acid–base neutralizing agents, and pollution from salt by-products, is expected to simplify biomanufacturing processes, enable the clean production of organic acids and open (non-sterile) continuous fermentation, and utilize low-cost substrates, thus emerging as an attractive green process for sustainable manufacturing. This review describes the characteristics of acid-tolerant microbial chassis, and subsequently elucidates the underlying acid tolerance mechanisms together with strategies for enhancing microbial acid resistance. In addition, we summarize the genetic elements, molecular tools, and operational strategies developed for acid-tolerant microorganisms, as well as recent advances in the application of acid-tolerant chassis cells in the biosynthesis of high-value bio-based chemicals such as organic acids. Finally, the challenges and future opportunities of acid-tolerant chassis cells are discussed. This review also outlines directions for advancing acid-tolerant chassis cells from the laboratory to industrial applications, which include expanding the genetic manipulation toolkit to provide operable means for the rational reconstruction of multi-gene pathways and the optimization of industrial phenotypes in acid-tolerant chassis, and leveraging synthetic biology and systems biology to improve the adaptability of acid-tolerant chassis cell factories in industrial settings. We hope that this review can provide theoretical guidance for the rational design and industrial application of acid-tolerant chassis cell factories.



Keywords: acid-tolerant microorganisms; synthetic biology; biomanufacturing; bio-based chemicals; metabolic engineering; pathway engineering

传统工业制造以化学工程为基础，但因其伴随大量二氧化碳排放、环境污染及不可再生资源消耗，在可持续性和效率方面存在诸多弊端。相比之下，以微生物作为细胞工厂的生物制造正逐

渐成为一种环境友好的多元化化学品生产方案，近年来受到越来越多的关注，以生物合成方式生产与传统石油基方法类似产品的趋势日益增长[1]。在系统生物学与合成生物学快速发展的推动下，生物制造在生物燃料、生物塑料、食品添加剂及其他化学品的生产方面已具备与传统制造相竞争的能力。目前，越来越多的微生物已被应用于生物制造，如大肠杆菌（*Escherichia coli*）、酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）和谷氨酸棒杆菌（*Corynebacterium glutamicum*）等[2-4]。然而，工业环境往往对微生物具有胁迫性，如高温、高压、高渗透压及强酸/强碱等，这些因素会抑制微生物生长，并限制其滴度、产率和生产强度的提升[5]。提高微生物鲁棒性对于保障工业生产过程的稳定性与效率至关重要[6]。

酸胁迫是工业生产过程中较为常见的一种环境胁迫因素[7]。以有机酸生产为例，在生物合成过程中，产生的酸性代谢产物导致培养基pH逐渐偏离正常值。因此，在生产过程需要添加碱性溶液调控pH，从而减少对微生物的损害。然而，上述工艺增加了生产成本与操作复杂性。据统计，在中性pH条件下生产有机酸时，总生产成本中超过60%来自下游分离和纯化过程[8]。同时，下游提取过程中排放的盐类还会对环境造成一定程度的破坏[9]。因此，在酸性pH条件下进行有机酸发酵是解决上述问题的有效途径，有助于降低生产成本并减少环境影响。尤其对于有机酸的高效、低成本生产而言，具备优异耐酸性pH能力及高浓度有机酸耐受性的微生物是更为理想的选择[10]。耐酸微生物由于生长环境的特殊性，其基因组、代谢网络、蛋白质组、细胞膜结构经过数百万年的协同进化，形成了系统性、多层次的酸耐受体系，可以应对传统有机酸工业生产面临的困境，可以在不添加或少添加中和剂的情况下生产有机酸，从而实现有机酸的清洁生产。

本文详细阐述了当下已被用于生物制造的耐酸微生物底盘细胞的特征及其在基因工程和代谢工程方面的研究进展，探讨耐酸底盘细胞的耐酸机制以及提升传统微生物细胞工厂耐酸能力的策略，同时，本文还结合近期耐酸底盘细胞的工业应用成功案例进行讨论，并展望了在合成生物学推动下耐酸微生物底盘工程所面临的挑战与前景，提出了应对不同场景的耐酸微生物细胞工厂设计策略，从而展现了工程化耐酸微生物在未来生物制造中的发展蓝图。

1 耐酸微生物底盘特征

1.1 耐酸微生物的定义

耐酸微生物是一类能够在低pH环境中生存的极端微生物。按照最适生长pH以及对酸胁迫的耐受能力，可将其大致分为嗜酸菌和耐酸菌两类。嗜酸菌的最适生长pH通常低于3.0，且一般无法在pH高于5.5的环境中生长，而耐酸菌的最适生长pH则接近中性，但能够耐受较低的环境pH，其最低生长pH可显著低于中性菌的耐受下限[11]。极端嗜酸菌有属古细菌的硫化叶菌和嗜热支原体，属真细菌的氧化硫硫杆菌以及氧化亚铁硫杆菌。基于嗜酸菌的生长生理特点，其常被应用于生物冶金和废水废气处理等领域[12]。而耐酸菌能在强酸环境中生长或生存，但是它们最适生长pH值在4.0～9.0之间（比如非模式耐酸酵母）。耐酸菌由于在酸性条件下具有较强的生存能力，通常被开发为有机酸生产菌株，目前已有研究利用重组库德里阿兹威毕赤酵母（*Pichia kudriavzevii*）、解脂耶氏酵母（*Yarrowia lipolytica*）、巴斯德毕赤酵母（*Komagataella phaffii*）分别生产乳酸、琥珀酸和3-羟基丙酸[13-15]。

1.2 耐酸微生物的主要类群与优势

1.2.1 非模式耐酸酵母

酵母菌在食品工业以及大宗化学品、精细化学品和生物燃料的生产中一直发挥着至关重要的作用，酵母菌在工业生物技术中相较于其他微生物具有关键优势，包括具备可进行翻译后修饰的真核细胞机制、能够利用多种廉价且可再生的原料，以及在严苛工业条件下仍保持鲁棒性[16]。其中，*S. cerevisiae*是研究最为深入的物种，已被广泛用于乙醇、蛋白质以及多种工业化学品的生产[17]。然而，随着工业需求的日益复杂化，例如

合成复杂天然产物、利用替代原料以及在严苛发酵条件下运行等，*S. cerevisiae* 存在诸多局限性，包括底物利用范围狭窄、对胁迫条件（如高温和酸性pH）敏感，以及代谢偏向于乙醇生成（即Crabtree效应）[18]。这些限制制约了其商业竞争力，并凸显出开发具有更优代谢能力的替代微生物平台的必要性。非模式耐酸酵母具有优异的代谢灵活性、胁迫耐受性和底物利用能力，使其在工业应用中极具吸引力（表1）。

P. kudriavzevii（，也称东方伊萨毕赤酵母 *Issatchenkia orientalis*）能够在pH低至2.0的强酸性环境中生长。1960年，Kudryavtsev根据其形成球形子囊孢子的能力及明确的形态学特征，将从果汁和浆果中分离得到的该物种重新分类为 *P. kudriavzevii*。虽然 *P. kudriavzevii* 常常与克鲁斯念珠菌（*Candida krusei*）归为一类，被认为是一种机会性致病菌[19]。但是，*P. kudriavzevii* 的特定菌株已表现出益生菌潜力，并被认为可安全用于食品应用。例如，从发酵羊奶中分离得到的 *P. kudriavzevii* YGM091 菌株表现出显著的益生特性，并在使用 Galleria mellonella 模型的体内研究中被证实是安全的[20]。*P. kudriavzevii* 属于Crabtree阴性酵母，在高浓度葡萄糖条件下主要以呼吸代谢为主，能够积累大量生物量。基于这一代谢特征，可通过阻断乙醇合成途径，将碳流导向其它目标代谢产物的生成[13]。*P. kudriavzevii* 已经被代谢改造生产乳酸、苹果酸、琥珀酸、草酸、3-羟基丙酸等有机酸[8]，可以在减少添加剂或者无添加剂的条件下生产有机酸，避免了“钙盐沉淀-酸化再生”的复杂下游工艺，具有显著的经济与环保优势。

K. phaffii（又称 *P. pastoris*）是一种甲基营养型酵母，能够以甲醇为唯一碳源生长，耐受pH范围广（pH 3.0-7.0），常用于工业酶、药用蛋白以及有机酸生产[21]。值得注意的是，其强大的蛋白表达与分泌能力，以及进行翻译后修饰的能力，使 *K. phaffii* 成为胞内和分泌型蛋白生产的理想系统。这一特性使得目标蛋白能够高滴度分泌，从而简化下游加工，并促进包括人胰岛素和干扰素在内的药用蛋白的商业化生产[22]。*K. phaffii* 的另一优势在于其能够利用低成本底物、耐受高胁迫条件，并达到高于 *S. cerevisiae* 的细胞密度，使其成为更适用于可持续工业过程的宿主。凭借这些极具吸引力的特性，*K. phaffii* 已被改造用于以低培养成本和高可扩展性生产多种高附加值化学品，包括乳酸、苹果酸和3-羟基丙酸等[23-25]。

马克斯克鲁维酵母（*Kluyveromyces marxianus*）同样具有工业应用潜力，这是由于其具有多种有益特性，包括具有耐酸性（生长 pH 范围 3 – 8）、可耐受高达约50°C的高温、生长速率高以及底物谱广（如半纤维素水解物、木糖和乳制品工业废弃物）[26]。此外，*K. marxianus* 是乙酸乙酯及其他短链挥发性酯类的天然生产者，这些化合物广泛用

表1 具有工业应用价值的非模式耐酸酵母及其主要特性比较

菌株	自然生存环境	环境耐受能力	pH范围	碳源利用能力	参考文献
Kluyveromyces marxianus	乳制品与发酵食品、腐烂植物	耐热（＞42℃）、耐酸、耐渗透压与化学胁迫	最适pH4.0	葡萄糖、甘油、菊粉	[26]
Komagataella phaffii (或 *Pichia pastoris*)	橡树或栗树的树胶分泌物和黏液	对乙酸、呋喃醛类抑制剂具有耐受性	pH 3.0-7.0	甲醇、葡萄糖、甘油、山梨醇	[15, 21]
Ogataea polymorpha	腐败的橙汁、果园土地	耐热（20-45℃）、pH范围广、耐甲醇	pH2.5-6.0	葡萄糖、甲醇、甘油	[33]
Pichia kudriavzevii（或 *Issatchenkia orientalis*）	果汁、白酒	耐酸、耐受木质纤维素水解液中抑制剂（呋喃衍生物）、耐高渗透压	pH ＜3.0	葡萄糖	[8, 13]
Pichia occidentalis	植物、果蝇	耐受20 g/L 己二酸、耐酸	pH ＜3.0	葡萄糖	[32]
Rhodosporidium toruloides	蘑菇	耐受木质纤维素水解副产物（乙酸、糠醛）	pH ＜4.0	葡萄糖、木糖、纤维二糖	[34]
Yarrowia lipolytica	富含油脂的食物，奶制品，肉制品	耐酸、耐盐、在营养限制条件下仍能保持稳健生长	pH 2.5-3.5	脂肪酸、甘油、烷烃、葡萄糖	[14, 30]
Zygosaccharomyces bailii	葡萄表皮、酸腐葡萄	耐酸、耐受10 g/L 乙酸、60 g/L 乳酸	pH ＜3.0	葡萄糖	[35]

作风味和香料成分[27]。其在高温下生长的能力有利于木质纤维素及其他多糖类原料的同步糖化与发酵，从而降低冷却成本、减少污染风险并提高生物过程效率[28]。*K. marxianus* 已经被代谢改造生产乳酸、延胡索酸等有机酸[26, 29]。

Y. lipolytica 因其卓越的脂质积累能力而广受认可，其脂质含量天然可达细胞干重的30–50%，并且能够代谢多种非模式底物，包括木质纤维素水解物、脂肪酸、废弃油脂、粗甘油和乙酸[30]。在通过乙酰辅酶A和丙二酰辅酶A途径实现的高效碳通量驱动下，*Y. lipolytica* 可高效合成脂质、类胡萝卜素、ω-3脂肪酸等脂质衍生精细化学品[28]。近年来，*Y. lipolytica* 因其公认安全（GRAS）地位，以及对酸性pH环境的耐受性，作为生产多种有机酸的细胞工厂而受到广泛关注，代谢工程改造的 *Y. lipolytica* 已具备在酸性pH条件下生产琥珀酸、衣康酸等有机酸的能力[14, 31]。

除上述研究较为深入的酵母物种外，近年来还有几种非模式耐酸酵母因其工业潜力而受到广泛关注。Pyne等（2023）通过高通量筛选从108株酵母中鉴定出对己二酸具有强耐受性的西方毕赤酵母（*P. occidentalis*），并开发了该菌的基因组编辑工具包，将其改造为生产尼龙前体顺式粘康酸（CCM）的宿主[32]。多形汉逊酵母（*Ogataea polymorpha*）作为以甲醇为唯一碳源生产各类化学品的潜在底盘，近年来受到越来越多的关注。作为天然甲基营养型酵母，它具备快速生长、耐热性及广谱底物利用能力（葡萄糖、木糖、甲醇等），并且被认定为GRAS安全菌株。在合成生物学工具持续拓展的推动下，其细胞代谢已被广泛重编程，用于生产多种高附加值化学品[33]。圆红冬孢酵母（*Rhodosporidium toruloides*）是一种红色担子菌酵母，在自然界分布广泛且抗逆性强。*R. toruloides* 能够高效利用木质纤维素水解液中的葡萄糖和木糖，同时该菌对木质纤维素水解液中的抑制成分具有较好的抗性，是利用可再生生物质原料的优良底盘细胞之一[34]。拜耳接合酵母（*Zygosaccharomyces bailii*）是一种食品腐败酵母，能够在用作食品防腐剂的有机酸存在下生长。该菌可以在pH 3条件下，含10 g/L乙酸或60 g/L乳酸的培养基生长。Kuanyshev等（2020）构建了该菌的CRISPR-Cas9基因组操作系统，将该菌改造为乳酸生产菌株[35]。

虽然非模式耐酸酵母具有广泛的应用空间，但是许多非模式耐酸酵母仍存在遗传操作性有限、转化效率低以及缺乏特性明确的调控元件等问题，这制约了其在生物技术中的更广泛应用。近年来，在合成生物学快速突破的推动下，非模式耐酸酵母研究发展势头强劲。这些进展通过提供优化基因表达、代谢途径和菌株性能的有力工具，显著拓展了其工业应用价值。

1.2.2 耐酸细菌

耐酸细菌通常指能够在酸性环境中生长的细菌，根据耐受程度的不同，它们可以分为极端耐酸菌（又称嗜酸菌）和中度耐酸菌（**图1**）。嗜酸菌的最适生长pH通常低于3.0，主要包括铁和硫氧化菌、古菌等，他们广泛分布在酸性矿山、含硫温泉和土壤中。目前，嗜酸菌主要的应用领域为生物冶金、废水废气处理、生物防治、磷矿生物溶解与农业磷肥减施等领域[36]。生物冶金是依托嗜酸化能自养微生物的代谢特性，将矿石、冶金固废、工业灰渣等不溶性金属矿物转化为水溶性金属离子的绿色冶金技术，是当前矿业绿色转型的核心研究方向之一。嗜酸硫杆菌属、钩端螺旋菌属、硫化杆菌属等菌株已被筛选并应用于实际生产中[12]。氧化亚铁硫杆菌（*Acidithiobacillus ferrooxidans*）可同步氧化Fe^{2+}与硫化矿物，生成硫酸，参与生物浸出的直接与间接过程；氧化硫硫杆菌（*A. thiooxidans*）专性氧化单质硫与硫化物，持续降低体系pH值，营造极端酸性浸矿环境；嗜酸喜温硫杆菌（*A. caldus*）对溶解有机化合物更为敏感，是制约混合菌群浸矿稳定性的关键菌种；铁钩端螺旋菌（*Leptospirillum ferrooxidans*）仅靶向氧化Fe^{2+}，具备极强的耐酸性pH、高金属离子胁迫能力，常作为辅助菌种与其他菌群协同作用[37]。嗜酸细菌依托独特的耐酸生理机制与特异性污染物降解、转化能力，可高效适配酸性工业废气、废水的净化处理场景，有效弥补传统生物处理技术依赖中性环境、药剂消耗大、易产生二次污染、反应器易堵塞等短板，这是环境生物修复领域的核心研究方向之一[11, 38]。嗜酸菌株（*Acidithiobacillus*-like G8）可在极端酸性条件（最

适pH≈0.25，硫酸浓度0.2–0.75 M）下稳定代谢，高效氧化降解CS_2、H_2S等多种含硫污染物，其通过调控细胞膜质子梯度维持胞内pH稳态，保障极端酸性环境下的代谢活性，可从根源上抑制生物膜过度生长，有效控制反应器生物量堆积，大幅降低反应器运行压力[11]。链霉菌为土壤嗜酸放线菌，其拮抗特性显著高于中性放线菌。嗜酸菌株对真菌、酵母菌及多种植物病原镰刀菌的抑制活性更强，且在酸性培养条件下抑菌效果更显著，可为作物真菌病害的生物防控提供优质菌株资源[39]。除此之外，极端耐酸菌在生物聚合物、萜类等生物制造领域也具有广阔的应用前景，由于其卓越的耐酸性，可以实现可降解生物聚合物PHA的连续开放式发酵工艺[40-42]。嗜热嗜酸古菌以及酸热硫化叶菌（*Sulfolobus acidocaldarius*），可以在低pH值（2.0–3.5）和高温（75°C）的极端条件下生长，这一特征可以被用于开发新一代生物制造的微生物细胞工厂[43]。极端耐酸菌是极端环境微生物的重要类群，在人们的生产生活中发挥着巨大的作用。但是极端耐酸菌的发展仍面临瓶颈，仅有少数菌株具备成熟的遗传操作体系，绝大多数极端耐酸菌的基因工具仍极度匮乏。因此，还需要对极端耐酸菌进行更为广泛深入的研究，以真正发挥其科学价值和应用价值。

中度耐酸菌的最适生长pH通常在3.0-5.0之间。与极端耐酸菌不同，中度耐酸菌通常无法在pH 3.0以下的环境中存活。他们对酸的耐受力相对较弱，但在自然界中分布更广。一些耐酸细菌，如变形链球菌（*Streptococcus mutans*）、胶囊酸杆菌（*Acidobacterium capsulatum*）、丙酸丙酸杆菌（*Propionibacterium acidipropionici*）能够通过采取各种耐酸机制维持其稳定期，从而在酸性条件下存活数小时[36]。醋酸醋杆菌（*Acetobacter aceti*）借助*yro2*和*mrh1*耐受乙酸，这两个基因有助于细胞膜修饰[44]。*P. acidipropionici*借助谷氨酸脱羧酶（GAD）系统和精氨酸脱亚胺酶（ADI）系统耐受丙酸环境[45]。尽管中度耐酸细菌能够耐受一定程度的低pH环境，但其耐受能力通常有限。因此，在有机酸发酵过程中，需借助其他手段缩短其暴露于酸性环境的时间。比如在乳酸发酵过程中，需要添加中和剂减少酸性环境对发酵菌株的伤害[10]。

2 耐酸微生物的生理基础

微生物耐酸机制的核心是细胞如何在质子浓

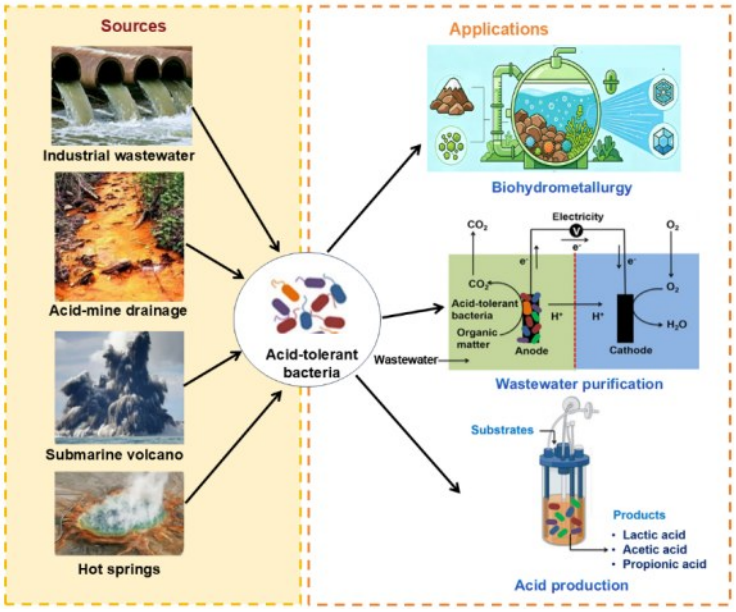


图1 耐酸细菌的环境来源及其在生物冶金、废水净化和生物制造中的应用

Fig. 1 Environmental sources of acid-tolerant bacteria and their applications in biohydrometallurgy, wastewater purification, and biomanufacturing

度极高的环境中维持胞内 pH 稳态、保护生物大分子并维持代谢活性。理解微生物的耐酸机制，挖掘耐酸元件，对于指导微生物底盘细胞的改造至关重要。通过耐酸机制解析，明确关键元件，阐明调控网路，揭示协同机制，从而为耐酸元件挖掘提供靶点，指导耐酸工程菌株的理性设计，赋予工业菌株在酸性 pH 下高效生产的能力（**图 2**）。

2.1　酸性稳态维持的分子机制

耐酸微生物在稳定期能够在酸性 pH 环境中存活数小时。为了适应极端酸性环境，多种细菌进化出了不同的细胞机制[36]，包括细胞膜修饰、F_1F_0-ATPase 质子泵、生物膜形成、碱生成（脲酶活性）以及大分子的保护和修复等[36, 46]。

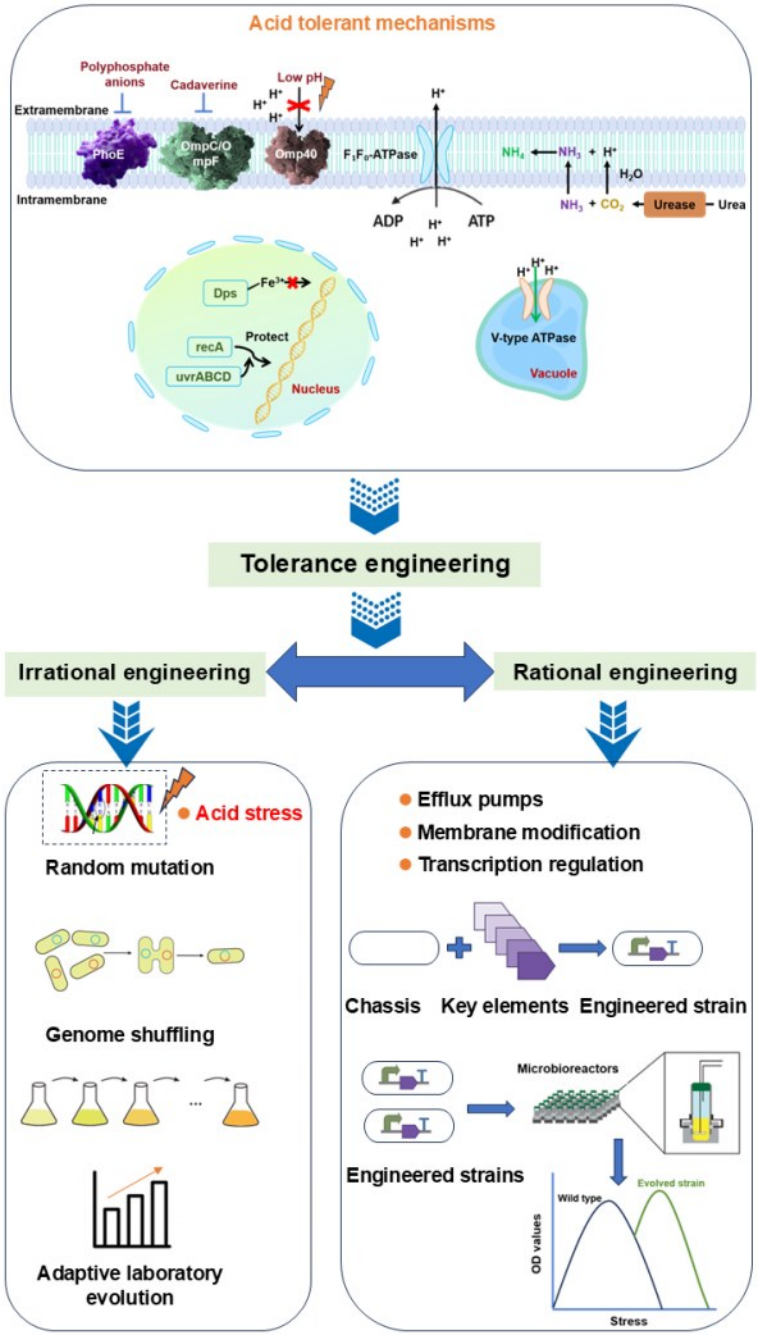


图 2　基于微生物耐酸分子机制解析的工业底盘菌株改造

Fig. 2　Engineering of industrial chassis strains based on the dissection of microbial acid-tolerance molecular mechanisms

2.1.1 外膜与细胞膜屏障减少质子被动内流

细胞膜是微生物抵御酸胁迫的第一道物理防线，微生物抵御酸胁迫的膜相关机制主要体现在两个方面。其一为外膜孔道的选择性调控。微生物可通过多磷酸盐阴离子阻断PhoE孔蛋白，或利用尸胺阻断OmpC/OmpF孔蛋白，以此收缩通道孔径，减少质子内流[47]。此外，*A. ferrooxidans*在酸性pH条件下上调外膜蛋白Omp40的表达，借助其外部L3环的构象变化，调节孔口大小与离子选择性，从而进一步限制质子向胞内渗透[48]。其二为膜脂结构的适应性优化。细菌可通过环丙烷脂肪酸磷脂合成酶降低不饱和脂肪酸的比例，并对磷脂尾部进行甲基化修饰，以调节膜流动性、降低质子跨膜渗漏。而嗜酸古菌 *Picrophilus oshimae* 则演化出更为极致的策略：其依赖刚性的单层膜及庞大的异戊二烯核心结构，使细胞膜具有较低的质子通透性，从而从根本上阻断了质子的跨膜进入[49]。

2.1.2 质膜质子泵主动排氢以维持胞质pH稳态

该模块在耐酸细菌和酵母中较为常见，其原理是依靠膜结合的ATP酶质子泵，水解ATP供能将胞质中过量的H^+逆浓度梯度排出胞外（或区隔至液泡），以抵消质子内流造成的胞质酸化。在嗜酸细菌中，F_1F_o-ATP酶是常见的质子外排系统。变形链球菌（*Streptococcus mutans*）、嗜酸乳杆菌（*Lactobacillus acidophilus*）等在酸胁迫下会上调F_1F_o操纵子转录，增强质子外排活性。极端嗜热古菌，如嗜酸热硫化叶菌（*Sulfolobus acidocaldarius*）也通过F_1F_o-ATPase持续排氢以适应极端酸环境，但其胞内pH维持机制与细菌存在本质差异，不宜简单类比。此外，某些真核微生物如 *S. cerevisiae*，则演化出液泡区隔化策略，通过液泡膜V型ATP酶将胞质H^+泵入液泡封存，VMA3结构亚基与FHN1调控蛋白共同保障酶活性与液泡结构完整[50]。可见，不同微生物类群的耐酸策略并不统一，该模块在部分类群中发挥重要作用。

2.1.3 代谢中和与毒物降解以消解质子毒性

微生物在酸胁迫下还可通过代谢反应主动中和胞内质子，并同步降解易跨膜渗透的有机酸毒物，从而减轻酸性损伤。该防御策略主要分为两类。其一为产碱中和：脲酶催化尿素水解生成氨与CO_2，其中氨可直接结合胞内质子，有效中和胞内酸度。例如，胃幽门螺旋杆菌（*Helicobacter pylori*）依赖其脲酶系统，可在pH 2.5的极端酸性环境中存活[51]。其二为有机酸降解：某些嗜酸微生物，如嗜热古生嗜热古菌（*Picrophilus torridus*），能够编码丙酰-CoA合成酶、乳酸-2-单加氧酶等酶系，降解乙酸、乳酸等易自由透过细胞膜的有机酸[52]。这一机制可有效阻止有机酸进入胞质后发生解离并释放质子，从而避免引发二次酸化。

2.1.4 其他机制

目前针对非模式耐酸酵母的耐酸机制尚缺乏系统的研究。酵母本身仅具备弱耐酸能力，pH 2.5-3.0为其生存极限，相较于极端嗜酸古菌，酵母缺少古菌特有的质子排泵、高糖脂膜屏障等元件，二者核心结构差异：古菌为类异戊二烯醚键细胞膜，酵母是脂肪酸酯键磷脂细胞膜；很多古菌虽然没有细菌型肽聚糖细胞壁，但具有S-layer等细胞包被结构；酵母具有β-葡聚糖、几丁质构成的真菌细胞壁；古菌多依靠膜蛋白直接外排H^+，酵母以液泡、质膜H^+-ATPase为主要质子稳态工具[46, 53]。鉴于此，推测酵母的耐酸策略更侧重于胞内缓冲与区室化隔离，而非膜结构的根本性重构。通过强化液泡质子泵活性及细胞壁致密性，酵母可在一定程度上抵御酸性pH胁迫。微生物的耐酸性并非由单一基因或通路所决定，而是依赖于一个涉及细胞膜、代谢网络、基因调控、离子转运等多层次协同作用的复杂适应系统。

2.2 多组学驱动的耐酸机制研究

研究者尝试用多组学分析的方法对微生物的耐酸机制进行探究，嗜酸铁支原体（*Ferroplasma acidiphilu*）的全基因组存在精氨酸发酵所必需的全部基因。精氨酸脱亚酶途径能够将精氨酸转化为鸟氨酸、二氧化碳、ATP和氨，产生的氨会增加细胞内的pH值，以上因素在原核生物适应酸性环境的过程中发挥着重要作用[54]。还有研究证明，在广古菌门（*Thermoplasma*，*Picrophilus* 和 *Ferroplasma* 菌属）以及泉古菌门（*Sulfolobus* 和 *Acidianu* 属）中，其细胞呼吸系统十分完善。基因

组分析表明，干热嗜酸古菌（*P. torridus*）的很多基因是通过水平基因转移获得的，包括一些有机酸降解基因、电子传递链的主要组成部分，以及处理氧胁迫的相关基因等，这非常有利于菌株在强酸性环境中生存，因为菌株生长需要产生大量的能量来维持细胞内的pH值在一个可接受的范围内[41, 42]。近年来，随着对耐酸酵母研究的日益广泛，多组学分析手段也应用于非模式耐酸酵母*P. kudriavzevii*的耐酸机制研究中。Seong等（2017）利用气相色谱-飞行时间质谱（GC-TOF MS）表征了*P. kudriavzevii*在胁迫条件下的代谢组学特征，发现其具有较高浓度的不饱和脂肪酸和嘌呤，这有助于增强其对高温和酸性条件的耐受性[55]。为了探究了*P. kudriavzevii*在乙酸胁迫下的响应机制，Li等（2020）采用RNA测序和串联质谱标签（TMT）蛋白质组学技术，鉴定出在乙酸应激条件下差异表达蛋白399个，以及差异表达基因876个。过表达基因主要富集在糖酵解途径和三羧酸循环中，提示这些代谢通路被激活，从而为乙酸的转化提供充足的还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸。同时，研究还发现多个与钾、铁、锌离子以及谷胱甘肽合成相关的基因显著上调，这些基因的上调有助于增强酵母对环境胁迫的耐受能力。对差异表达蛋白的功能分类分析揭示了分子伴侣、辅酶以及能量生成相关蛋白的显著富集，这些因子在胁迫响应中共同发挥着关键作用[56]。另一项研究则通过RNA测序分析，聚焦于*P. kudriavzevii*对酸性pH胁迫的响应机制。结果显示，在pH 2.0条件下，有434个差异表达基因被激活，这些基因主要涉及膜脂组成、菌丝生长，尤其是精氨酸代谢通路。研究结论指出，精氨酸通量的增加提高了细胞内pH，从而在酸性条件下促进了细胞生长并减少了细胞聚集[57]。

2.3 微生物底盘细胞耐酸性改造

耐酸机制的解析对于提高微生物底盘菌株耐酸性具有理论指导意义，迄今为止，已开发出多种策略来挖掘胁迫耐受元件以实现高效生物生产。通过挖掘工业微生物底盘细胞特有的酸响应转录因子，或引入耐酸基因元件，有望突破底盘菌株生理极限。但是以上尝试仍面临诸多挑战，包括元件不明确且不兼容、复杂性等不可预测的因素，因此，挖掘、改造和标准化新的生物元件是当前合成生物学的重点。不同微生物所利用的耐酸机制总结于**图2**以及**表2**。

现研究已经有针对传统模式微生物的改造，致力于扩大菌株对pH的适应范围，实现目标产物产量增加或增加可合成物质的种类。改造传统模式微生物的方法大致有：传统诱变与适应性进化、基因组重组技术、理性设计与代谢工程等[9]。研究者可以通过物理/化学诱变、基因组整合筛选和长期传代适应酸性环境，比如Liu等（2016）通过ARTP（常压室温等离子体）诱变获得了一株对阿魏酸具有高耐受性的拜氏梭菌（*Clostridium beijerinckii*）NCIMB 8052。在突变株中，突变体M11在阿魏酸胁迫（0.5 g/L～0.9 g/L）下能够生成丁醇[58]。Fletcher等（2017）采用适应性进化手段提高了*S. cerevisiae*对L-乳酸和盐酸的耐受性，获得的进化菌株对0.3 mol/L乳酸具有耐受性（pH＜2.8）[59]。在理性改造方面，膜结合的H^+-ATP酶通过将质子泵出细胞质来调节细胞的胞内pH，通过

表2 微生物底盘菌株耐酸性改造

机理	微生物底盘	关键基因/策略	效果	参考文献
F_0F_1-ATP酶质子泵	*Escherichia coli*	Δ*hemA*Δ*atpD*Δ*atpE*	在pH 2.5的极端酸性条件下的存活率显著下降	[60]
	Saccharomyces cerevisiae	Δ*pdr12*	乙酸、丙酸耐受性降低	[61]
脱羧作用与脱氨基作用	*Propionibacterium acidipropionici*	原生质体融合+基因组重排	丙酸耐受性提高	[45]
细胞膜修饰	*Saccharomyces cerevisiae*	Δ*mrh1*Δ*yro2*	菌株对乙酸耐受性降低	[62]
	Zygosaccharomyces bailii	*ZbMSN4*、*ZbTIF3*	乙酸相关关键基因	[63]
代谢调控	*Saccharomyces cerevisiae*	Δ*JJJ1*	乙酸耐受性提高	[64]
细胞器保护	*Saccharomyces cerevisiae*	过表达基因*PEP3*	乙酸耐受性提高	[65]

调节 H^+-ATP 酶的表达可以增加 *E. coli* 和 *S. cerevisiae* 对乙酸、丙酸等有机酸的耐受性[60, 61]。谷氨酸脱羧酶（GAD）系统和精氨酸脱亚胺酶（ADI）系统是 *P. acidipropionici*）在酸性环境中用来抵抗酸胁迫的两个核心系统，通过强化 GAD 系统和 ADI 系统，*P. acidipropionici* 对丙酸的耐受性得到提高，丙酸产量比对照组提高了 40%[45]。细胞在胁迫条件下的活力受膜状态调控，由于酸适应，细胞膜通过维持其完整性和流动性赋予细胞耐酸性。通过调整细胞膜的稳定性可以提高 *S. cerevisiae* 以及 *Z. bailii* 对乙酸的耐受性[62, 63]。小分子膜结合蛋白可以通过有效抑制蛋白质聚集来提高细菌的耐酸性，并在酸性条件下作为分子伴侣稳定膜蛋白和包膜蛋白。J-蛋白是 Hsp70 分子伴侣的共伴侣蛋白，敲除基因 *JJJ1* 可显著提高 *S. cerevisiae* 的乙酸耐受性，从而在该弱酸存在下提高乙醇发酵速率[64]。此外，大分子修复和细胞器保护策略也被用于提高底盘细胞的耐酸性，在 *S. cerevisiae* 中过表达基因 *PEP3*（编码参与液泡合成 HOPS 和 CORVET 复合体的一个组分），在添加 80 mM 乙酸的条件下，其液泡 pH 均未观察到显著差异。基因 *PEP3* 过表达通过增加液泡表面积和 V-ATPase 活性，进而增强质子隔离能力，从而提供对酸胁迫的保护[65]。

随着组学技术和代谢工程技术体系日益完善，将基因组片段构建文库，转化宿主后筛选耐酸株也取得了较好的进展，已有研究提高了 *E. coli* 对乙酸的耐受性[66]。还可以使用 CRISPR 介导进化、鉴定关键耐酸基因并理性改造等方法提高传统底盘的耐酸性[59, 67]。然而，传统底盘的耐酸性改造会出现生长速率显著下降、生物量降低、底物转化效率变差等问题。而天然耐酸菌的基因组、代谢网络、蛋白质组、细胞膜结构经过数百万年的协同进化，形成了系统性、多层次的酸耐受体系，耐酸系统与核心代谢高度整合，能量利用效率高。

综上所述，改造传统模式微生物的方法大致有：传统诱变与适应性进化、基因组重组技术、理性设计与代谢工程和信号通路与应激响应强化。研究者可以通过物理/化学诱变、基因组整合筛选和长期传代适应酸性环境，比如筛选耐酸 *S. cerevisiae* 突变株。基因组重组技术方面，采取将基因组片段构建文库，转化宿主后筛选耐酸株，已有研究实现 *E. coli* 和 *S. cerevisiae* 的乙酸、3-羟基丙酸耐受性增强。还可以使用 CRISPR 介导进化、鉴定关键耐酸基因并理性改造等方法实现传统底盘的耐酸化，减少生产成本和环境污染。然而，传统底盘的耐酸性改造会出现生长速率显著下降、生物量降低、底物转化效率变差等问题。而天然耐酸菌的基因组、代谢网络、蛋白质组及细胞膜结构经过数百万年的协同进化，形成了系统性、多层次的酸耐受体系。该耐酸体系与核心代谢高度整合，能量利用效率高，几乎不产生额外的代谢负担；相比之下，代谢工程改造的模式菌在引入外源耐酸模块时往往需要付出明显的适应代价。

3 改造耐酸微生物底盘的合成生物学工具

耐酸底盘细胞的合成生物学发展可以大致从两个方面平行展开介绍，基因工程技术的发展为耐酸底盘细胞的表达调控奠定基础，产品生产则为耐酸底盘细胞的应用提供目标。耐酸微生物底盘与常用微生物相比具有独特的性状。然而，除其自身的天然优势外，仍需针对特定目的进行遗传工程改造，以进一步增强其应用功能，从而在未来生物技术工艺中助力构建稳健的生物经济。下文将重点介绍近期可提升非模式耐酸底盘工业潜力的合成生物学工具与方法（**图 3**）。关键策略包括：（1）启动子与终止子工程，以实现基因表达的优化；（2）基于 CRISPR 的基因组编辑，以实现高效且多重化的遗传修饰；（3）代谢模型与代谢网络开发。

3.1 非模式耐酸酵母基因元件开发

合成生物学工具的进步与实施，结合不断扩充的遗传元件库，显著提升了非模式耐酸酵母作为多功能系统和底盘细胞在生物技术应用中的实用性。近期研究在利用专为非模式耐酸酵母定制的启动子和终止子等遗传元件方面取得了重要进展，推动了其应用的显著发展。这些遗传元件在

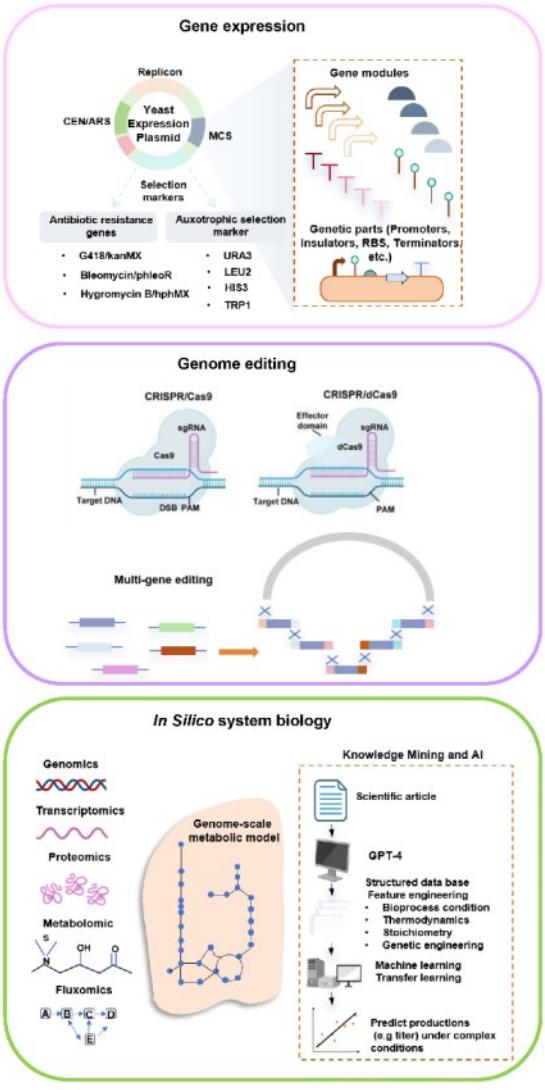


图 3　耐酸微生物底盘基因工程和代谢工程工具开发

（**备注：**Effector domain：转录抑制子、转录激活子、表观遗传编辑酶或其他功能蛋白。）

Fig. 3　Development of genetic engineering and metabolic engineering tools for acid-tolerant microbial chassis

(Effector domain: transcriptional repressor, transcriptional activator, epigenetic editing enzyme, or other functional proteins.)

调控转录速率和 mRNA 稳定性方面发挥关键作用，直接影响蛋白质表达水平，从而促使非模式耐酸酵母成为合成生物学和生物制造领域的重要工具。

标准化的启动子、核糖体结合位点（RBS）和终止子构成了合成生物学的生物砖体系。研究者可以像搭积木一样，将不同模块进行标准化组装。尽管非模式耐酸酵母具有多项适用于有机酸生产的优良性状，但其长期以来缺乏可用于代谢工程和合成生物学研究的遗传工具。Xiao 等（2014）通过实时荧光定量 PCR 鉴定出数个可用于异源基因表达的强组成型启动子，包括 P_{FBA1p}、P_{TEF1ap}、P_{PGK1p} 和 P_{TDH3p}[68]。随后，Cao 等（2020）利用 RNA-seq 分析和荧光报告系统，系统表征了不同培养条件下的启动子和终止子，发现了多个强、中、弱组成型启动子，并鉴定出 12 个能够有效终止转录且为翻译机器提供充足结合序列以支持蛋白表达的终止子[69]。对于目的基因的测试，使用附加型质粒比基因整合方法更为便捷。酵母附加型质粒主要包含两个关键遗传元件：用于质粒复制的自主复制序列和用于质粒维持的着丝粒序列。研究表明，*P. kudriavzevii* 能够识别来自 *S. cerevisiae* 的自主复制序列 4 和着丝粒序列 6。然而，Smith 等（2024）尝试将 2 μ 质粒转化至 *P. kudriavzevii* 时未能获得转化子，表明 2 μ 复制起点在该物种中不具有功能[70]。此外，尽管 ARS4/CEN6 具有功能，但其复制稳定性较差[71, 72]，以上结果暗示 CEN 序列的功能并不完善。Cao 等（2020）在 *P. kudriavzevii* 中鉴定出一个潜在的着丝粒序列 CEN-0.8k-2，该序列能够提高质粒稳定性，并进一步增强 CRISPR 编辑效率和乳酸产量[69]。最近本研究团队基于宿主-载体 GC 兼容性策略，从 *P. kudriavzevii*E1 内源基因组中鉴定功能性自主复制序列，并构建了适用于 *P. kudriavzevii*E1 的附加型表达系统。利用该表达系统，我们进一步通过转录组测序数据分析构建了 *P. kudriavzevii* E1 的内源启动子文库，并获得了比 *S. cerevisiae* 来源的强启动子 P_{ScTDH3} 更为稳定且持久的表达启动子 P_{PkTDH3}[73]。

3.2　非模式耐酸酵母基因编辑系统

3.2.1　基于 CRISPR 技术的基因组编辑工具开发

CRISPR 工具的开发是耐酸酵母作为工业宿主的核心技术支撑，解决了非模式耐酸酵母遗传操作困难的问题，为精准调控代谢网络（如碳流重分配、辅酶平衡）提供了高效手段[8]。目前已开发四种 CRISPR 质粒，差异在于 Cas 蛋白（如 iCas9、SpCas9）和 sgRNA 启动子（如 $P_{RPR1p'\text{-}tRNALeu}$、$P_{TDH3p\text{-}tRNAGly}$）的设计。例如，Tran 等（2019）使用 iCas9（SpCas9 的 D147Y/P411T 突变体）结合双 NLS 序列，实现高达 97% 的编辑效率，三基因敲

除效率达47%[71]。早期依赖URA3营养缺陷标记，限制非营养缺陷型菌株使用；后续开发含诺尔斯菌素（nourseothricin）或博来霉素（zeocin）抗性标记的系统，如Lee等（2022）构建的TEF1p驱动iCas9系统，在多菌株中*ADE2*基因敲除效率达81%-100%[74]。宿主菌株、Cas9变体及sgRNA表达策略显著影响效率。例如，Zhang等（2023）发现，zeocin标记在*P. kudriavzevii* E1中具有较高的假阳性率（即使质量浓度达到200 mg/L仍无法完全抑制菌株生长），致使*DLD*基因的敲除效率仅为30%；而采用*URA3*标记在尿嘧啶营养缺陷型菌株中进行敲除时，效率可提升至67%[13]。

在*Y. lipolytica*中，CRISPR-Cas9最早于2016年得到应用，该研究使用密码子优化的Cas9和由合成RNA聚合酶III启动子驱动表达的sgRNA，对*Ku70*以及脂质氧化相关的*Pex10*和*Mfe1*等基因进行敲除[75]。此后不久，一种结合了CRISPR-Cas9、胞苷脱氨酶和尿嘧啶糖基化酶抑制剂的碱基编辑器实现了不引入双链断裂（DSB）的靶向碱基修饰，进一步拓展了*Y. lipolytica*的基因组编辑工具箱。该系统在单基因上的编辑效率达94%，在双基因上达34%，展示了其用于精准遗传工程的潜力[76]。最近，Jiang等（2025）开发了一种基于CRISPR-Cas9的方法TUNE^{YALI}，该方法能够在*Y. lipolytica*中实现基因表达的高通量调控。通过构建质粒文库，可以鉴定出多个调控转录因子，提高代谢工程改造菌株的性能，从而加速应用菌株开发[77]。

3.2.2 代谢模型的构建

全基因组测序的出现以及基因组尺度代谢网络的重建，促进了计算机辅助设计工具的发展，这些工具可用于指导代谢工程。此类工具对于构建新型生物合成途径以及改善现有途径中的代谢通量具有重要意义。更具体地说，这些模型可用于预测遗传修饰的结果以及细胞对环境条件的代谢响应，并可用于确定最优工程策略。构建准确的基因组尺度代谢模型（GEMs）对于正确模拟细胞行为至关重要，而这需要高质量的基因组注释序列和实验数据。迄今为止，已针对*Y. lipolytica*（模型iNL895、iYL619_PCP、iMK735、iYali4、iYLI647）以及*P. kudriavzevii*（模型iIsor850）开发了GEMs[78, 79]。上述模型使得代谢工程计算工具能够用于改造非模式耐酸酵母，从而提高其工业实用性。

3.3 嗜酸细菌遗传操作工具的构建

3.3.1 CRISPR-Cas系统的适配与创新

嗜酸细菌（包括*Acidithiobacillus*属细菌与*Sulfolobus*属古菌）在引入Cas9系统时普遍遭遇严重的细胞毒性。在非嗜酸体系中，dCas9的毒性可能源于其对NGG PAM位点的非特异性结合，且通过R1335K突变消除PAM结合能力后毒性显著降低，间接表明非特异性结合是毒性的原因之一[80]。其次，tracrRNA介导的细胞毒性。传统Cas9系统依赖反式激活crRNA（tracrRNA）与crRNA形成双链复合物引导Cas9定位。最新研究在副干酪乳杆菌中发现，SpCas9系统的短型tracrRNA（tracrRNA-S）即使在无Cas9蛋白的情况下也具有显著细胞毒性，其机制涉及与宿主内源RNA的直接相互作用并干扰核心基因表达[81]。但是在嗜酸菌中有关Cas9对细胞的毒性尚缺少系统的研究。

Cas12a（旧称Cpf1）属于V型CRISPR系统，与Cas9在分子机制上存在本质区别，恰好针对嗜酸菌的上述痛点形成互补。Cas12a最突出的优势是PAM序列适配性，*AsCas12a*识别TTTV PAM序列（V=A/G/C），*LbCas12a*识别TTTN PAM，均为T富集型，与嗜酸菌尤其是嗜酸古菌的AT富集基因组高度匹配[82]。系统组成更精简，Cas12a仅需单一crRNA即可发挥功能，无需tracrRNA，避免了tracrRNA带来的额外毒性风险。同时，Cas12a蛋白本身具备RNase活性，可自主加工crRNA前体阵列，这一特性使多重基因编辑变得极为简便，只需构建串联的crRNA阵列，Cas12a即可将其加工为成熟的独立crRNA，无需额外的RNA加工因子[83]。Cas12a的异源表达毒性低于Cas9，研究通过构建四环素诱导型CRISPR-Cas12a系统（AsCas12a和FnCas12a），在梭菌中实现高效基因编辑，这表明优化Cas蛋白表达是提升编辑效率的关键，可能与毒性降低存在潜在关联[84]。

在嗜酸细菌领域，*A. ferrooxidans*的研究最具代表性。针对该菌遗传操作困难的瓶颈，研究者

成功建立了基于dCas12a的CRISPR干扰（CRISPRi）系统，实现了对电子传递链petI和petII操纵子的精准敲低。该系统在不造成DSB的前提下调控基因表达，有效规避了核酸酶毒性问题。实验表明，敲低*petB2*基因可增强铁氧化速率，进而提升黄铁矿和黄铜矿的生物浸出效率，展示了Cas12a工具在工业嗜酸菌代谢工程中的应用潜力[85]。

3.3.2 铁氧化与硫氧化响应启动子的挖掘与表征

嗜酸细菌长期栖息于pH 1.0–3.0的极端酸性环境，其转录调控系统演化出对铁、硫等无机能源底物的高度响应特性。目前已鉴定的启动子按调控模式可分为三类：组成型强启动子、底物诱导型启动子和环境胁迫响应型启动子。其中，铁氧化与硫氧化代谢相关的内源启动子因为诱导条件明确、诱导强度高，成为构建遗传工具箱的核心元件。在*A. ferrooxidans*中，早期研究多采用异源组成型启动子（如P*tac*）驱动外源基因表达[86]，但异源启动子在嗜酸菌中转录效率偏低且调控模式不匹配，限制了其应用。近年来，随着基因组测序与转录组技术的发展，内源启动子的系统挖掘成为主流方向。

四硫代硫酸盐水解酶基因启动子（P_{tetH}/P_{tth}）是目前研究最为深入的嗜酸菌内源诱导型启动子之一。由于P_{tth}在*E. coli*中无功能，该载体特别适用于克隆对*E. coli*有毒性的蛋白编码基因，显著提升了载体构建的成功率[87-89]。硫氧化（Sox）系统是嗜酸硫杆菌氧化硫代硫酸盐的核心途径，其启动子具有典型的σ^{54}（RpoN）依赖型结构特征，是研究嗜酸菌诱导型启动子的另一重要模式。σ^{54}依赖的调控模式在嗜酸硫杆菌中高度保守，*A. thiooxidans*、*A. caldus*等专性硫氧化菌均存在同源调控元件[90]。除诱导型启动子外，一系列不同强度的组成型启动子也得到鉴定：在*S. acidocaldarius*中，谷氨酸脱氢酶基因启动子P_{gdhA}和DNA结合蛋白基因启动子P_{sac7d}是常用的强组成型启动子；麦芽糖诱导型启动子P_{mal}构成了古菌领域成熟的诱导表达系统，其最小诱导区可缩减至169 bp[91]。

4 耐酸微生物高价值化学品的生物合成

依托日益完善的代谢工程技术体系，研究者们通过对耐酸微生物进行系统的途径重构，已成功实现了多种高价值化学品的酸性pH生物合成，涵盖有机酸、生物聚合物、萜类等多个类别。

4.1 基于非模式耐酸酵母底盘细胞工厂的有机酸生物合成

非模式耐酸酵母凭借其天然耐酸特性，为有机酸的无中和剂清洁发酵提供了极具竞争力的技术路线。随着合成生物学工具的完善和系统代谢工程的发展，非模式耐酸酵母已被成功改造用于生产多种有机酸。**表3**汇总了近10年利用非模式耐酸酵母宿主生产有机酸的研究成果。

4.1.1 乳酸

乳酸作为食品、医药、生物塑料等领域的关键原料，作为聚乳酸（PLA）的前体，乳酸的全球市场规模在2022年达到31亿美元，预计2023年至2030年间将以每年8.0%的增长率持续增长（https://straitsresearch.com/zh/report/lactic-acid-market）。乳酸的合成仅需一种酶，乳酸脱氢酶（LDH），该酶可将丙酮酸转化为乳酸。Park等（2018）分离了耐酸菌株*P. kudriavzevii* NG7，并用植物乳杆菌（*Lactobacillus plantarum*）来源的D-LDH替换了其丙酮酸脱羧酶（PDC）。然而，所得菌株仅能耐受2%的乳酸。为此，研究者进行了适应性实验室进化，最终获得了一株进化菌株，该菌株可在6%乳酸环境中存活，并产生135 g/L D-乳酸，葡萄糖转化率为0.75 g/g，生产强度为3.66 g/L/h，发酵终点pH为3.6[92]。Zhang等（2023）采用了类似的策略，对*P. kudriavzevii* E1进行工程改造，通过引入牛来源的L-LDH，在不添加任何中和剂的条件下，L-乳酸产量达到74.60 g/L，转化率为0.93 g/g葡萄糖，生产强度为2.08 g/L/h[13]。随后，研究团队对菌株进一步改造，通过强启动子替换实现关键酶的精细表达，有效平衡了代谢通量与胞内氧化还原状态；同时，引入乳酸转运蛋白，提升了菌株耐酸性能与乳酸外排效率，显著提升了乳酸发酵性能。为推动工艺的工业化应用，团队进一步开发了低成本无机盐培养基，该培养基中酵母提取物仅为0.03 g/L。在此基础上，团队系统比较了不同发酵工艺的糖酸转化效率，结果表明：在pH受控条件下制备高活性种子液，随后发酵过程中不

表3 以非模式耐酸酵母为底盘细胞有机酸的生物合成

产品	菌株	基因改造	发酵条件	发酵性能	参考文献
D-乳酸	*P. kudriavzevii* NG7	将丙酮酸脱羧酶基因(*PDC1*)替换为来源于植物乳杆菌的D-乳酸脱氢酶基因(*d-LDH*),适应性进化	YPD培养基,pH 3.6和pH 4.7	产量:135 g/L(pH 3.6)、154 g/L(pH 4.7) 生产速率:3.66 g/L/h(pH 3.6),4.16 g/L/h(pH 4.7)	[92]
L-乳酸	*P. kudriavzevii* Pkz04	敲除丙酮酸脱羧酶基因(*PDC*),引入两个拷贝L-乳酸脱氢酶基因,敲除D-乳酸脱氢酶基因	YPD培养基,无中和剂	产量:75 g/L 转化率:0.93 g/g葡萄糖	[13]
L-乳酸	*P. kudriavzevii* Pkz11	在*P. kudriavzevii* Pkz04基础上,插入多拷贝L-乳酸脱氢酶基因,启动子替换强化L-乳酸脱氢酶表达,强化乳酸外排	无机盐培养基(酵母粉含量0.03 g/L)、YPD培养基,无中和剂	L-乳酸产量:102 g/L(YPD)、75 g/L(无机盐培养基) 转化率:0.98 g/g葡萄糖	[93]
L-乳酸	*P. kudriavzevii* SD108	敲除*PDC*和甘油-3-磷酸脱氢酶(*GPD*),整合*L. mesenteroides*来源乳酸脱氢酶	YPD培养基,高粱生物质水解物为碳源,KOH调节pH	产量:67 g/L 转化率:0.59 g/g葡萄糖	[94]
L-苹果酸	*P. kudriavzevii MA09-10*	敲除基因*PDC*、*GPD*、*MAE*、*JEN2-1*、*JEN2-2*,过表达基因*AoPYC*、*AoMDH*、*SpMAE1*、*EcPPC*、*EcSthA*	无机盐培养基(酵母粉含量3 g/L),控制pH 3.0	产量:199 g/L 转化率:0.94 g/g葡萄糖	[96]
L-苹果酸	*Yarrowia lipolytica*	引入还原性TCA途径,强化苹果酸转运,适应性进化	YPD培养基,甘油为碳源,无中和剂	产量:112 g/L 转化率:0.57 g/g甘油	[97]
琥珀酸	*P. kudriavzevii*	敲除*PDC*/*GPD*/*JEN2*/*NDE*、过表达*MAE1*	利用混合碳源	产量110 g/L,转化率0.65 g/g,生产强度为0.54 g/L/h(葡萄糖+甘油) 产量63 g/L(甘蔗汁为碳源在pH 3)	[98]
琥珀酸	*P. kudriavzevii* SD108	胞质重构丙酮酸脱氢酶(PDH)复合物,耦合乙醛酸分流与还原性TCA途径	HCl和KOH调节pH到3.0	产量:104 g/L 转化率:0.85 g/g葡萄糖 生产速率:0.97 g/L/h	[99]
3-羟基丙酸	*P. kudriavzevii*	β-丙氨酸合成途径:引入天冬氨酸-1-脱羧酶(PAND)、β-丙氨酸-丙酮酸转氨酶(BAPAT)和3HP脱氢酶(YDFG),敲除丙酮酸脱羧酶和甘油-3-磷酸脱氢酶	补料发酵,pH 4.0	产量:92 g/L 转化率:0.72 g/g葡萄糖 生产速率:0.55 g/L/h	[101]
3-羟基丙酸	*Schizosaccharomyces pombe*	平衡调控编码丙二酰辅酶A还原酶*mcr*基因的两个功能片段,引入乙酰辅酶A合成酶以及内源性泛酸激酶的基因增加细胞中丙二酰辅酶A和乙酰辅酶A的供应	补料发酵,以纤维二糖为碳源	产量:11 g/L 转化率:11.2%	[100]
己二酸	*Candida tropicalis*	Δ*AOX4*::*AOX5*	补料发酵,pH 5.0	产量:12 g/L 生产速率:0.1 g/L/h	[103]
粘康酸	*P. occidentalis*	引入DHS脱水酶的AROZ编码基因*PaAROZ*、DAHP合酶编码基因突变体*ARO4K225L*、以及*E. coli*来源的*aroB*和*aroD*基因	补料发酵,pH 2.0-3.5	产量:39 g/L 转化率:0.13 g/g葡萄糖 生产速率:0.51 g/L/h	[32]
柠檬酸	*Candida tropicalis*和*Pichia kluyveri*	无	固定化细胞,葡萄糖为碳源,pH 5.0	产量:30-40 g/L	[105]

添加任何中和剂的工艺方案，可显著减少发酵初期的碳损失，与传统工艺相比，二氧化碳排放率从19.94%降至7.42%，使碳流更有效地导向L-乳酸合成（91.01%）[93]。以*P. kudriavzevii* SD108为

出发菌株，敲除PDC和甘油-3-磷酸脱氢酶（GPD），并整合肠膜明串珠菌（*Leuconostoc mesenteroides*）来源的LDH。所得菌株可产生74.00 g/L乳酸，转化率为0.70 g/g葡萄糖，生产强度为0.73 g/L/h，并在发酵前22.5 h将pH维持在6.0。该研究的主要发现是乳酸的缓冲效应：发酵初期仅需控制pH，随后乳酸本身即可作为缓冲试剂维持体系pH稳定[94]。Altvater等（2025）使用适应性进化手段获得耐酸高产菌株，该研究通过对一株基因工程改造的*S. cerevisiae* LACp进行长期适应性实验室进化以提高其在酸性pH条件下的乳酸生产能力。历时35个月（约3500-4000代），通过逐步提高培养基中乳酸浓度（0-38 g/L）和降低初始pH（4.5-2.6）施加选择压力，最终获得的进化菌株LACe-35在无pH控制条件下乳酸滴度达67 g/L（终pH 2.4）[95]。

4.1.2 苹果酸

苹果酸是重要的生物基平台化合物，年市场需求量为20万吨[8]。苹果酸可通过还原性三羧酸（TCA）循环途径合成，糖酵解途径生成的丙酮酸在丙酮酸羧化酶（PYC）的作用下转化为草酰乙酸，再经苹果酸脱氢酶（MDH）生成苹果酸。Xi等（2023）通过过表达*PYC*（*Aspergillus oryzae* AoPYC）、*MDH*（*A. oryzae* AoMDH），敲除苹果酸酶（MAE）和磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶（PCK）以阻断苹果酸降解，引入C4-二羧酸转运蛋白（*S. cerevisiae* SpMAE1）增强分泌，以实现高效生成苹果酸[96]。*Y. lipolytica*被美国FDA认定为GRAS微生物，是近年来代谢工程和合成生物学研究中的热门底盘菌株。Wang等（2024）在*Y. lipolytica*中引入还原型TCA途径，并过表达乙醛酸循环途径中的异柠檬酸裂解酶、苹果酸合酶和苹果酸脱氢酶，同时强化苹果酸外排。获得的基因工程菌通过适应性实验室进化，提高了工程菌株Po1g-CEE2+Sp的pH耐受性。以甘油为碳源，无需添加中和剂，苹果酸产量达到112.5 g/L。本研究证明了通过代谢工程与实验室进化相结合的方法，能够在*Y. lipolytica*中成功实现酸性pH生产L-苹果酸，为其他有机酸的清洁生产提供了参考[97]。

4.1.3 琥珀酸

琥珀酸是一种重要的四碳二羧酸，被美国能源部列为最具价值的平台化合物之一，年市场需求量为7.6万吨[8]。与苹果酸一样，琥珀酸也可以通过还原性三羧酸（TCA）循环途径合成。早期研究通过过表达*PYC*、*MDH*、*FUMR*和*FRD*，所得菌株可从100 g/L葡萄糖中产生11.6 g/L琥珀酸[68]。为进一步提升产量，研究者采取了*PDC/GPD*敲除、羧酸转运蛋白敲除（Δ*JEN2*）、*MAE1*过表达、*NDE*敲除以平衡氧化还原状态以及甘油利用等工程策略。优化后的菌株利用甘油和葡萄糖混合碳源，琥珀酸产量达109.5 g/L，转化率为0.65 g/g，生产强度为0.54 g/L/h。此外，该研究还进行了甘蔗汁的中试规模生产，在pH 3条件下琥珀酸产量达63.1 g/L[98]。最近，该团队还针对酵母中因辅因子代谢区室化导致的化学合成瓶颈，提出了线粒体代谢解区室化策略以提高*P. kudriavzevii*的琥珀酸生产能力。研究人员将内源性线粒体PDH亚基（去除线粒体靶向序列）定位于胞质，结合脂酰化酶表达，使胞质NADH水平提升，琥珀酸滴度从26.45 g/L增至31.47 g/L，丙酮酸积累减少69.2%；并通过表达*E. coli*乙醛酸分流关键酶（柠檬酸合酶*gltA*、顺乌头酸酶*AcnA*等），部分绕过NADH依赖的苹果酸脱氢酶（MDH），进一步提高NADH利用效率。他们还将胞质PDH策略应用于乙酰辅酶A衍生产品（柠苹酸、三乙酸内酯），产量分别提升1.22倍和4.35倍，证实该区室化策略对还原型和乙酰辅酶A衍生化学品的普适性[99]。

4.1.4 其他有机酸

3-羟基丙酸（3-HP）是第三大具有商业化潜力的生物基平台化合物，其市场规模预计可达每年100亿美元[10]。粟酒裂殖酵母（*Schizosaccharomyces pombe*）对3-HP具有天然耐受性，通过引入丙二酰辅酶A（malonyl-CoA）途径已被工程改造用于生产3-HP。然而，目前获得的3-HP浓度（11 g/L）仍需进一步提升，方能与商业化路线相竞争[100]。最近，Tan等（2026）通过*P. kudriavzevii* SD108基因组尺度建模结合热力学分析，挖掘得到了高活性的3-HP合成关键酶，天冬氨酸1-脱羧酶（PAND）、β-丙氨酸-丙酮酸氨基转移酶（BAPAT）和3HP脱氢酶（YDFG），通过多拷贝PAND整合、副产物消除（敲除丙酮酸脱羧酶和甘油-3-磷酸脱

氢酶）以及通过过表达丙酮酸羧化酶和天冬氨酸氨基转移酶强化天冬氨酸通量等途径优化策略，将3-HP的产量提高至92 g/L，具有一定的经济性[101]。

己二酸（AA）是尼龙生产中的关键结构单元，年市场需求量约为300万吨[10]。己二酸传统的生产方法为环己烷的化学氧化。尽管目前尚未发现能够天然合成己二酸的微生物，但通过代谢工程已开发出三条生物合成途径，分别为脂肪酸降解途径，反向降解途径，以及间接粘康酸转化途径[102]。热带假丝酵母（*Candida tropicalis*）对己二酸具有耐受性，且能以油脂和脂肪酸作为碳源，是生产己二酸的理想宿主。一株经代谢工程改造的菌株在含月桂酸甲酯的培养基中，基于酰基辅酶A氧化酶途径可产生12 g/L己二酸[103]。最近，研究者分离到一株耐己二酸的*P. occidentalis*，并将其工程改造用于生产己二酸前体，粘康酸（*cis*，*cis*-muconic acid）。粘康酸的最大产量达39 g/L，超过了其他菌株的产率。这一策略凸显了宿主选择的重要性，为己二酸的生物合成提供了另一条可行路线[32]。

柠檬酸是生物技术产量最大的有机酸之一，在食品、化妆品和化工行业中具有广泛的用途。黑曲霉（*Aspergillus niger*）已被公认为柠檬酸商业化生产的最佳菌种。然而，黑曲霉的发酵过程受到菌丝体形成的大型聚集体以及高溶氧需求的显著制约[104]。从沙特阿拉伯分离获得的热带假丝酵母（*Candida tropicalis*）和克鲁维毕赤酵母（*P. kluyveri*）均具有合成柠檬酸的能力，其中固定化细胞的柠檬酸产量（30–40 g/L）显著高于游离细胞（8–19 g/L）。经4个周期、共计20天的重复分批发酵后，培养体系的活性仍保持稳定[105]。

4.2 基于嗜酸细菌为底盘细胞工厂的化学品生物合成

聚羟基烷酸酯（PHA）是一类可生物降解的生物塑料，具有广阔的应用前景。嗜酸异养菌如*Acidiphilium cryptum*可天然积累聚3-羟基丁酸（P3HB）作为胞内储能物质。由于嗜酸培养条件可有效抑制杂菌污染，PHA发酵可采用开放连续工艺，降低灭菌能耗与操作成本。通过代谢工程强化前体供应与PHA合酶表达，可进一步提升产量与聚合物性能[40]。嗜酸菌生产的另外一个聚合物是聚羟基烷酸酯。嗜酸菌属（*Acidiphilium* sp.）可以产生以蛋白质和碳水化合物为主要成分的结合态胞外聚合物，其中可吸附Fe（III）[106]。随后González等（2023）研究表明*Acidiphilium cryptum* Lhet 2合成的可溶性胞外聚合物中含有甘露糖、鼠李糖和葡萄糖，同时三者比例接近3.2∶2.3∶1[107]。而嗜热菌硫磺矿硫化叶菌（*Sulfolobus solfataricus*）、托科达伊硫化叶菌（*S. tokodaii*）和酸热硫化叶菌（*S. acidocalcarius*）合成的聚合物含有半乳糖、葡萄糖胺以及甘露糖/葡萄糖残基[108]。与嗜热菌合成的胞外聚合物相比，嗜酸菌合成的胞外聚合物是功能多样的复杂基质，在金属吸附和生物浸矿场景中更具实用价值。链嗜酸菌属（*Streptacidiphilus*）作为嗜酸放线菌的重要类群，其基因组中蕴含丰富的次级代谢基因簇。Yan等（2026）从江西链嗜酸菌（*Streptacidiphilus jiangxiensis*）中鉴定了新型二萜合酶SjJS，可催化生成新型二萜化合物，为萜类药物筛选提供了新的分子骨架与酶资源[41]。四氢嘧啶（Ectoine）是一种重要的相容性溶质与生物保护剂，广泛应用于化妆品与生物医药领域。泛养硫球菌（*Leptospirillum ferriphilum*）等嗜酸铁氧化细菌基因组中含有完整的四氢嘧啶合成基因簇（*ectABC*），可在酸性高渗环境中合成四氢嘧啶以维持胞内渗透压。通过强化四氢嘧啶合成途径与优化培养条件，有望开发新型酸性四氢嘧啶细胞工厂[42]。

此外，嗜酸性细菌和古菌来源的多种酶（如淀粉水解酶、酯酶、组氨酸氨裂解酶等）能在酸性pH、高温下保持活性，在工业、塑料降解及微反应器等领域具有应用潜力[40，109-112]。嗜酸性细菌和古菌来源的酶具有较好的pH稳定性，可以在碱性或者酸性条件下表现出优异活性[109，112]。

5 总结与展望

*E. coli*和乳酸菌等模式微生物遗传操作系统与组学工具成熟，启动子，质粒，基因组敲除工具，高通量筛选体系以及代谢模型等较为成熟。此外，模式微生物生长快，在有机酸生产方面成功的案

例比较多。但是这类底盘细胞通常不耐酸性pH与高浓度未解离有机酸，必须维持近中性pH，导致大量碱中和与有机酸盐生成；下游要脱盐、酸化、纯化，提取成本高。相比之下，非模式耐酸菌株的核心价值是可在更低pH甚至弱酸环境中维持生产，降低中和剂、杂菌风险和后续脱盐压力，并可能简化分离纯化。近年来，随着合成生物学的不断发展，针对耐酸微生物底盘细胞进行分子改造的工具日益完善，从而加速了耐酸微生物在实际工业生产中的应用进程。未来，可依据不同耐酸微生物的特性，将其应用领域拓展至生物采矿、稀土回收、电驱动碳固定、有机酸平台化合物合成，以及基于耐酸元件的耐酸工程菌株构建等方面。目前，耐酸微生物的遗传操作工具发展严重滞后于模式菌株。目前仅少数菌株建立了较为成熟的遗传操作系统，且转化效率因菌株差异巨大。古菌域嗜酸菌因细胞壁的特殊性，常规转化方法几乎失效；嗜酸细菌等核心生物冶金菌株至今仍被视为“遗传难操作”菌株。这一瓶颈直接限制了合成生物学模块在嗜酸底盘中的应用。此外，嗜酸菌的细胞内环境维持近中性pH，但其膜系统、周质空间及分泌蛋白均需适应极端酸性环境。异源多基因途径的引入可能会打破细胞原有代谢平衡，引发显著的代谢负担。目前嗜酸菌的代谢工程研究多停留在实验室纯培养阶段，工业规模的工程菌应用案例极为有限。生物冶金堆浸体系的规模可达万亿升级，实验室摇瓶水平的工程菌株难以直接适配工业场景。放大过程中存在多重挑战：复杂矿石中抑制剂（如氯离子、重金属离子）的累积效应、微生物群落结构的动态演替、温度/pH/氧气的空间异质性，以及工程菌株在天然菌群中的生态竞争力不足。非模式耐酸酵母是下一代有机酸生物制造的优良底盘。目前*P. kudriavzevii*、*P. occidentalis*等菌株已建立CRISPR-Cas9基因组编辑系统，通过代谢途径重构实现了乳酸、苹果酸、琥珀酸、粘康酸、柠檬酸等多种有机酸的酸性pH合成，部分产物性能优于模式菌。然而，大部分非模式耐酸酵母仍存在基因组功能解析不足、多基因编辑工具有限、产量与生产速率未达工业化要求等挑战。如很多非模式酵母遗传工具、启动子表征、同源重组与标记回收体系不如模式微生物；部分菌株Crabtree效应导致乙醇分流强，碳流走向乙醇而非有机酸。

此外，与*E. coli*、*S. cerevisiae*等成熟底盘相比，耐酸微生物领域极度缺乏标准化的生物元件资源。已鉴定的耐酸启动子、核糖体结合位点（RBS）、终止子等功能元件数量稀少，且缺乏跨菌株通用性的定量表征，导致生物合成难以在耐酸底盘中高效展开。未来，随着自动化基因组合成、人工智能辅助代谢设计及组学驱动途径优化的整合，将进一步挖掘耐酸微生物底盘的应用潜力，使其能够在广泛的应用场景中实现精确的代谢精细调控。展望未来，合成生物学、系统生物学与机器学习的深度融合，将在简化菌株工程流程、提升预测模型精度及增强菌株设计效率等方面发挥关键作用。此外，拓展耐酸微生物底盘的分子工具箱，涵盖新型诱导型启动子、可调基因回路及基因组规模化工程策略，将进一步提升其多功能性与环境适应性。为充分释放耐酸微生物底盘在生物制造中的潜能，未来合成生物学的发展应着力于突破现有瓶颈，例如物种特异性调控元件匮乏及诱导型启动子种类受限等问题。构建模块化、可编程且可扩展的工具平台，将助力实现更精准、灵活且具有情境特异性的菌株工程，从而加速向下一代酵母基生产体系的转型。在后续的研究中，研究人员仍可以从基因组、代谢组、蛋白质组等方面入手，系统鉴定与酸耐受性相关的关键基因及单核苷酸多态性位点，特别关注跨膜转运蛋白、转录调控因子及应激响应蛋白编码基因的差异分布与功能分化，监测酸性胁迫下胞内代谢物谱的动态变化，尤其关注有机酸、氨基酸及能量代谢中间产物的积累与消耗规律，揭示代谢重编程对胞内pH稳态维持的贡献。通过多组学联合分析与系统生物学策略，系统解析微生物耐酸机制的全貌，并以此为基础，开发适用于酸性pH生物浸矿、有机酸发酵及纤维素水解等工业过程的耐酸高效菌株，为绿色生物制造提供核心菌种支撑。

参 考 文 献

[1] Ye J W, Lin Y N, Yi X Q, et al. Synthetic biology of extremophiles: a new wave of biomanufacturing [J]. Trends in

Biotechnology, 2023, 41(3): 342-357.

[2] Zhang Z, Liu P, Zhang B, et al. De novo biosynthesis of caffeic acid and chlorogenic acid in *Escherichia coli* via enzyme engineering and pathway engineering [J]. ACS Synthetic Biology, 2025, 14(5): 1581-1593.

[3] Narayanan A K, Rao K R R, Megha K, et al. Toward sustainable production of bulnesol and elemol enabled by synthetic biology in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Archives of Microbiology, 2026, 208(7): 332.

[4] Wang J, Ma W, Zhou J, et al. Microbial chassis design and engineering for production of γ-aminobutyric acid [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2024, 40(5): 159.

[5] Raj K, Venayak N, Mahadevan R. Novel two-stage processes for optimal chemical production in microbes [J]. Metabolic Engineering, 2020, 62: 186–97.

[6] Kuang Z, Yan X, Yuan Y, et al. Advances in stress-tolerance elements for microbial cell factories [J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2024, 9: 793–808.

[7] Gao S, Liao Y, He H, et al. Advance of tolerance engineering on microbes for industrial production [J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2023, 8: 697–707.

[8] Tan S, Liu Z, Tran V G, et al. *Issatchenkia orientalis* as a platform organism for cost-effective production of organic acids [J]. Metabolic Engineering, 2025, 89: 12–21.

[9] Gao X, Xu K, Ahmad N, et al. Recent advances in engineering of microbial cell factories for intelligent pH regulation and tolerance [J]. Biotechnology Journal, 2021, 16(9): e2100151

[10] Wang Y, Wang Y, Cui J, et al. Non-conventional yeasts: Promising cell factories for organic acid bioproduction [J]. Trends in Biotechnology, 2025, 43(7): 1609–1626.

[11] Kraakman J R, Pok A, Smeulders M J, et al. Extremely acidophilic sulfur-oxidizing bacteria applied in biotechnological processes for gas purification [J]. Journal of Environmental Science and Health, Part A, 2012, 47(7): 964-969.

[12] López-Martinez A, Martinez-Prado M A, Núñez-Ramirez D M, et al. Acidophilic bacteria for metal extraction: Biotechnological characteristics and applications [J]. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 2024, 42(1): 31-52.

[13] Zhang B, Li R, Yu L, et al L-lactic acid production via sustainable neutralizer-free route by engineering acid-tolerant yeast *Pichia kudriavzevii* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(29): 11131-11140.

[14] Zhong Y, Shang C, Tao H, et al. Boosting succinic acid production of *Yarrowia lipolytica* at low pH through enhancing product tolerance and glucose metabolism [J]. Microbial Cell Factories, 2024, 23: 291.

[15] Avila-Cabre S, Perez-Trujillo M, Albiol J, et al. Engineering the synthetic β-alanine pathway in *Komagataella phaffii* for conversion of methanol into 3-hydroxypropionic acid [J]. Microbial Cell Factories, 2023, 22(1): 237.

[16] Watcharawipas A, Runguphan W, Khamwachirapithak P, et al. Integrating yeast biodiversity and machine learning for predictive metabolic engineering [J]. FEMS Yeast Research, 2025, 25: foaf072.

[17] Narayanan V, Sànchez i Nogué V, van Niel E W J, et al. Adaptation to low pH and lignocellulosic inhibitors resulting in ethanolic fermentation and growth of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Amb Express, 2016, 6(1): 59.

[18] Li B, Liu N, Zhao X. Response mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* to the stress factors present in lignocellulose hydrolysate and strategies for constructing robust strains [J]. Biotechnology for Biofuels, 2022, 15: 28.

[19] Nguyen T A, Kim H Y, Stocker S, et al. *Pichia kudriavzevii* (*Candida krusei*): a systematic review to inform the World Health Organisation priority list of fungal pathogens [J], Medical Mycology, 2024, 62 (6): myad132.

[20] Tran K D, Le-Thi L, Vo H H, et al. Probiotic properties and safety evaluation in the invertebrate model host galleria mellonella of the *Pichia kudriavzevii* YGM091 strain isolated from fermented goat milk [J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2024, 16: 1288–1303.

[21] Vijayakumar V E, Venkataraman K A. Systematic review of the potential of *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) as an alternative host for biologics production [J]. Molecular Biotechnology, 2024, 66: 1621–1639.

[22] Zha J, Liu D, Ren J, et al. Advances in metabolic engineering of *Pichia pastoris* strains as powerful cell factories [J]. Journal of Fungi, 2023, 9: 1027.

[23] Sae-Tang K, Bumrungtham P, Mhuantong W, et al. Engineering flocculation for improved tolerance and production of D-lactic acid in *Pichia pastoris* [J]. Journal of Fungi, 2023, 9: 409.

[24] Guo F, Dai Z, Peng W, et al. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for malic acid production from methanol [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2021, 118: 357–371.

[25] Chen S, Zhang M, Wu X, et al. Promoter engineering for enhanced 3-hydroxypropionic acid production in *Pichia pastoris* [J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2025, 10: 916–924.

[26] Smets J, Godoy H E, Goossenaerts J, et al., Metabolic engineering and adaptive laboratory evolution of *Kluyveromyces Marxianus* for lactic acid production [J]. Microbial Cell Factories, 2025, 24(1): 179.

[27] Perpetuini G, Tittarelli F, Perla C, et al. Influence of different aggregation states on volatile organic compounds released by dairy *Kluyveromyces marxianus* strains [J]. Food Security, 2022, 11: 2910.

[28] Moon S Y, An N Y, Lee JY. Transforming non-conventional yeasts into key players in biotechnology: advances in synthetic biology applications [J]. Frontiers in Microbiology, 2025, 16: 1600187.

[29] Mackenzie T, Raha P O, Lalit K, et al. Tri-Functional CRISPR screen reveals overexpression of *QDR2* and *QDR3* transporters increase fumaric acid production in *Kluyveromyces marxianus* [J]. ACS Synthetic Biology, 2025, 14 (12): 4907–4922.

[30] Lopes M, Miranda S M, Costa A R, et al. *Yarrowia lipolytica* as a biorefinery platform for effluents and solid wastes valorization—challenges and opportunities [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2022, 42: 163–83.

[31] Fu J, Zaghen S, Lu H, et al. Reprogramming *Yarrowia lipolytica* metabolism for efficient synthesis of itaconic acid from flask to semipilot scale [J]. Science Advances, 2024, 10: eadn0414.

[32] Pyne M E, Bagley J A, Narcross L, et al. Screening non-conventional yeasts for acid tolerance and engineering *Pichia occidentalis* for production of muconic acid [J]. Nature Communications, 2023, 14(1): 5294.

[33] Wefelmeier K, Schmitz S, Haut A M. Engineering the methylotrophic yeast *Ogataea polymorpha* for lactate production from methanol [J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2023, 11: 1223726.

[34] Park Y K, Nicaud J M, Ledesma-Amaro R. The engineering potential of *Rhodosporidium toruloides* as a workhorse for biotechnological applications [J]. Trends in Biotechnology, 2018, 36(3): 304–317.

[35] Kuanyshev N, RAO C, BIEN B, et al. Domesticating a food spoilage yeast into an organic acid-tolerant metabolic engineering host: lactic acid production by engineered *Zygosaccharomyces bailii* [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2021, 118: 372–382.

[36] Mallick S, Das S. Acid-tolerant bacteria and prospects in industrial and environmental applications [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2023, 107(11): 3355-3374.

[37] Vardanyan A, Vyrides I. Acidophilic bioleaching at high dissolved organic compounds: Inhibition and strategies to counteract this [J]. Minerals Engineering, 2019, 143: 105943.

[38] Xu Y, Li H, Zeng X C. A novel biofilm bioreactor derived from a consortium of acidophilic arsenite-oxidizing bacteria for the cleaning up of arsenite from acid mine drainage [J]. Ecotoxicology, 2020, 30(7): 1437-1445.

[39] Zakalyukina Y V, Zenova G M. Antagonistic activity of soil acidophilic actinomycetes [J]. Biology Bulletin, 2007, 34(4): 329-332.

[40] González E, Vera F, Scott F, et al. Acidophilic heterotrophs: Basic aspects and technological applications [J]. Frontiers in Microbiology, 2024, 15: 1374800.

[41] Yan B, Chen H, Deng Z, et al. Functional analysis of a diterpene synthase for jiangxidienes and jiangxienols biosynthesis from *Streptacidiphilus jiangxiensis* [J]. Chinese Chemical Letters, 2026, 37(9): 112790.

[42] Li Y, Yang J, Zhang X, et al. Integrative multi-omics identify key secondary metabolites linked to acid tolerance in *Leptospirillum ferriphilum* [J]. Microorganisms, 2025, 13(11): 2493.

[43] Igbojionu L I, Martinez M M, Goddard A D, et al. Whole-cell biotechnological applications with thermoacidophilic Crenarchaeota: Opportunities and challenges [J]. Process Biochemistry, 2026, 160: 86-101.

[44] Sakuntala M, Kim JR. Recent advances and challenges in the bioconversion of acetate to value-added chemicals [J]. Bioresource Technology, 2022, 364:128064.

[45] Guan N, Liu L, Shin H, et al. Systems-level understanding how *Propionibacterium acidipropionici* respond to propionic acid stress at the microenviron ment levels: mechanism and application [J]. Journal of Biotechnology, 2013, 167: 56–63.

[46] Frousnoon T B, Pham N N, Wu Z Y, et al. Comparison of stress tolerance mechanisms between *Saccharomyces cerevisiae* and the multistress-tolerant *Pichia kudriavzevii* [J]. FEMS Yeast Research, 2025, 25: foaf024.

[47] Rowbury RJ, Goodson M. PhoE porin of *Escherichia coli* and phosphate reversal of acid damage and killing and of acid induction of the CadA gene product[J]. The Journal of Bacteriology, 1993, 74(6): 652-661.

[48] Jerez C A, Seeger M, Amaro A M. Phosphate starvation affects the synthesis of outer membrane proteins in *Thiobacillus ferrooxidans* [J], FEMS Microbiology Letters, 1992, 98(1-3): 29–33.

[49] Van de Vossenberg J L C M, Driessen A J M, Zillig W, et al. Bioenergetics and cytoplasmic membrane stability of the extremely acidophilic, thermophilic archaeon *Picrophilus oshimae* [J]. Extremophiles, 1998, 2(2): 67–74.

[50] Peetermans A, Foulquié -Moreno M R, Thevelein J M. Mechanisms underlying lactic acid tolerance and its influence on lactic acid production in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Microbial Cell, 2021, 8(6): 111-130.

[51] Xia X. Multiple regulatory mechanisms for pH homeostasis in the gastric pathogen, Helicobacter pylori [J]. Advanced Genetics, 2022, 109: 39-69.

[52] Fütterer O, Angelov A, Liesegang H, et al. Genome sequence of *Picrophilus torridus* and its implications for life around pH 0 [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2004, 101(24): 9091-9096

[53] Auernik K S, Cooper C R, Kelly R M. Life in hot acid: Pathway analyses in extremely thermoacidophilic archaea [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2008, 19(5): 445-453.

[54] Golyshina O V, Tran H, Reva O N, et al. Metabolic and evolutionary patterns in the extremely acidophilic archaeon *Ferroplasma acidiphilum* Y^T [J]. Scientific Reports, 2017, 7 (1): 3682.

[55] Seong Y J, Lee H J, Lee J E, et al. Physiological and metabolomic analysis of *Issatchenkia orientalis* MTY1 with multiple tolerance for cellulosic bioethanol production [J]. Biotechnology Journal, 2017, 12 (11): 1700110.

[56] Li Y, Wu Z, Li R, et al. Integrated transcriptomic and proteomic analysis of the acetic acid stress in *Issatchenkia orientalis* [J]. Journal of Food Biochemistry, 2020, 44 (6): e13203.

[57] Ji H, Xu K, Dong X, et al. Transcriptional profiling reveals molecular basis and the role of arginine in response to low-pH stress in *Pichia kudriavzevii* [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2020, 130 (6): 588–595

[58] Liu J, Guo T, Wang D, et al. Butanol production by a *Clostridium beijerinckii* mutant with high ferulic acid tolerance [J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2016, 63: 727-33.

[59] Fletcher E, Feizi A, Bisschops M M, et al. Evolutionary engineering reveals divergent paths when yeast is adapted to different acidic environments [J]. Metabolic Engineering, 2017, 39: 19-28.

[60] Sun Y, Fukamachi T, Saito H, et al. Respiration and the F1Fo-ATPase enhance survival under acidic conditions in *Escherichia coli* [J]. PLoS One, 2012, 7:e52577.

[61] Nygård Y, Mojzita D, Toivari M, et al. The diverse role of Pdr12 in resistance to weak organic acids [J]. Yeast, 2014, 31: 219–232.

[62] Takabatake A, Kawazoe N, Izawa S. Plasma membrane proteins Yro2 and Mrh1 are required for acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99: 2805-2814.

[63] Palma M, de Canaveira R F, Guerreiro J F, et al. Search for genes responsible for the remarkably high acetic acid tolerance of a *Zygosaccharomyces bailii*-derived interspecieshybrid strain [J]. BMC Genomics, 2015, 16: 1070.

[64] Wu XC, Zhang LJ, Jin XN, et al. Deletion of *JJJ1* improves acetic acid tolerance and bioethanol fermentation performance of *Saccharomyces cerevisiae* strains [J]. Biotechnology Letters, 2016, 38: 1097-1106.

[65] Ding J, Holzwarth G, Bradford C S, et al. PEP3 overexpression shortens lag phase but does not alter growth rate in *Saccharomyces cerevisiae* exposed to acetic acid stress [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99: 8667-8680.

[66] Sandoval N R, Mills T Y, Zhang M, et al. Elucidating acetate tolerance in *E. coli* using a genome-wide approach [J]. Metabolic Engineering, 2011, 13(2): 214-224.

[67] Garst A D, Bassalo M C, Pines G, et al., Genome-wide mapping of mutations at single-nucleotide resolution for protein, metabolic and genome engineering [J]. Nature Biotechnology, 2017, 35(1): 48-55.

[68] Xiao H, Shao Z, Jiang Y, et al. Exploiting *Issatchenkia orientalis* SD108 for succinic acid production [J]. Microbial Cell Factory, 2014, 13: 1-11.

[69] Cao M, Fatma Z, Song X, et al. A genetic toolbox for metabolic engineering of *Issatchenkia orientalis* [J]. Metabolic Engineering, 2020, 59: 87-97.

[70] Smith J R, Sislak C D, Mendoza P F, et al. Auxotrophy-independent plasmid shuttle vectors for applications in diverse yeasts [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2024, 4 (1): 453-469.

[71] Tran V G, Cao M, Fatma Z, et al. Development of a CRISPR/Cas9- based tool for gene deletion in *Issatchenkia orientalis* [J]. mSphere, 2019, 4(3): e00345.

[72] Sun W, Vila-Santa A, Liu N, et al. Metabolic engineering of an acid-tolerant yeast strain *Pichia kudriavzevii* for itaconic acid production [J]. Metabolic Engineering Communications, 2020, 10: e00124

[73] Wang Y, Gao S, Wu C, et al. Expanding the genetic toolkit of *Pichia kudriavzevii* E1 for enhanced mycoprotein production [J]. Microbial Biotechnology, 2026, 19(9): e70447

[74] Lee Y G, Kim C, Kuanyshev N, et al. Cas9-based metabolic engineering of *Issatchenkia orientalis* for enhanced utilization of cellulosic hydrolysates [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(38): 12085-12094.

[75] Schwartz C M, Hussain MS, Blenner M, et al. Synthetic RNA polymerase iii promoters facilitate high-efficiency CRISPR-Cas9-mediated genome editing in *Yarrowia lipolytica* [J]. ACS Synthetic Biology, 2016, 5: 356-359.

[76] Bae SJ, Park BG, Kim BG, et al. Multiplex gene disruption by targeted base editing of *Yarrowia lipolytica* genome using cytidine deaminase combined with the CRISPR/Cas9 system [J]. Biotechnology Journal, 2020, 15: e1900238.

[77] Jiang W, Wang S, Ahlheit D, et al. High-throughput metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* through gene expression tuning [J]. PNAS, 2025, 122 (23): e2426686122.

[78] Larroude M, Rossignol T, Nicaud J M, et al. Synthetic biology tools for engineering *Yarrowia lipolytica* [J]. Biotechnology Advances, 2018, 36: 2150-2164.

[79] Suthersa PF, Dinha HV, Fatma Z, et al., Genome-scale metabolic reconstruction of the non-model yeast *Issatchenkia orientalis* SD108 and its application to organic acids production [J]. Metabolic Engineering Communications, 2020, 11: e00148.

[80] Zhang S, Voigt C A. Engineered dcas9 with reduced toxicity in

bacteria: Implications for genetic circuit design [J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(20): 11115-11125.

[81] Arifah A Q, Vento J M, Kurrer I, et al. Cas9-independent tracrrna cytotoxicity in *Lacticaseibacillus paracasei* [J]. microLife, 2025, 6: uqaf013.

[82] Xuan Q, Wang J, Nie Y, et al. Research progress and application of miniature CRISPR-Cas12 system in gene editing [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(23): 12686.

[83] Meliawati M, Schilling C, Schmid J. Recent advances of Cas12a applications in bacteria [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021, 105(8): 2981-2990.

[84] Zhang Y, Kubiak A M, Bailey T S, et al. Development of a CRISPR-Cas12a system for efficient genome engineering in clostridia [J]. Microbiology Spectrum, 2023, 11(6): e02459-02423.

[85] Jung H, Inaba Y, Banta S. CRISPR/dCas12a knock-down of *Acidithiobacillus ferrooxidans* electron transport chain bc1 complexes enables enhanced metal sulfide bioleaching [J]. Journal of Biological Chemistry, 2024, 300(9): 107703.

[86] Jung H, Inaba Y, West A C, et al. Overexpression of quorum sensing genes in *Acidithiobacillus ferrooxidans* enhances cell attachment and covellite bioleaching [J]. Biotechnology Reports, 2023, 38: e00789.

[87] Kanao T. Tetrathionate hydrolase from the acidophilic microorganisms [J]. Frontiers in Microbiology, 2024, 15: 1338669.

[88] Wang Z B, Li Y Q, Lin J Q, et al. The two-component system RSRS-RSRR regulates the tetrathionate intermediate pathway for thiosulfate oxidation in *Acidithiobacillus caldus* [J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1755.

[89] Moinier D, Byrne D, Amouric A, et al. The global redox responding RegB/RegA signal transduction system regulates the genes involved in ferrous iron and inorganic sulfur compound oxidation of the acidophilic *Acidithiobacillus ferrooxidans* [J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1277.

[90] Sepúlveda-Rebolledo P, González-Rosales C, Dopson M, et al. Comparative genomics of sigma factors in acidithiobacillia sheds light into the transcriptional regulatory networks involved in biogeochemical dynamics in extreme acidic environments [J]. Microorganisms, 2025, 13(6): 1199.

[91] Berkner S, Wlodkowski A, Albers SV, et al. Inducible and constitutive promoters for genetic systems in *Sulfolobus acidocaldarius* [J]. Extremophiles, 2010, 14(3): 249-259.

[92] Park H J, Bae J H, Ko H J, et al. Low-pH production of D-lactic acid using newly isolated acid tolerant yeast *Pichia kudriavzevii* NG7 [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2018, 115 (9): 2232-2242.

[93] Wang Y, Cui J, Liu Z, et al. Industrial perspective validation of a neutralizer-free L-lactic acid production process by engineered acid-tolerant yeast *Pichia kudriavzevii* [J]. Trends in Biotechnology, 2026, 44(6): 1660-1682.

[94] Lee YG, Kang NK, Kim C, et al. Self-buffering system for cost-effective production of lactic acid from glucose and xylose using acid-tolerant *Issatchenkia orientalis* [J]. Bioresource Technology, 2024, 399: 130641.

[95] Altvater M, Tomico-Cuenca I, Mattanovich D, et al. Long-term adaptive laboratory evolution of *Saccharomyces cerevisiae* for high-titer lactic acid production at low pH [J]. Microbial Cell Factories, 2025, 24(1):242.

[96] Xi Y, Xu H, Zhan T, et al. Metabolic engineering of the acid-tolerant yeast *Pichia kudriavzevii* for efficient L-malic acid production at low pH [J], Metabolic Engineering, 2023, 75: 170-180.

[97] Wang Y, HAN Y, LIU H, et al. Engineering *Yarrowia lipolytica* to produce L-malic acid from glycerol [J]. ACS Synthethic Biology, 2024, 13(11), 3635-3645.

[98] Tran V G, Mishra S, Bhagwat S S, et al. An end-to-end pipeline for succinic acid production at an industrially relevant scale using *Issatchenkia orientalis* [J]. Nature Communications, 2023, 14(1): 6152.

[99] Tran V G, Tan S I, Xu H, et al. Decompartmentalization of the yeast mitochondrial metabolism to improve chemical production in *Issatchenkia orientalis* [J]. Nature Communications, 2025, 16(1): 7110.

[100] Takayama S, Ozaki A, Konishi R, et al. Enhancing 3-hydroxypropionic acid production in combination with sugar supply engineering by cell surface-display and metabolic engineering of *Schizosaccharomyces pombe* [J]. Microbial Cell Factories, 2018, 17: 176.

[101] Tan S I, Bhagwat S S, Martin T A, et al. High yield production of 3-hydroxypropionic acid using *Issatchenkia orientalis* [J]. Nature Communications, 2026, 117(1): 899.

[102] Ning Y, Liu H, Zhang R, et al. Research progress on the construction of artificial pathways for the biosynthesis of adipic acid by engineered microbes [J]. Fermentation, 2022, 8: 393.

[103] Ju J H, Oh B R, Heo S Y, et al. Production of adipic acid by short- and long chain fatty acid acyl-CoA oxidase engineered in yeast *Candida tropicalis* [J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2020, 43: 33-43.

[104] Ksiazek E. Citric acid: properties, microbial pro duction, and applications in industries [J]. Molecules, 2024, 29: 22.

[105] Hesham A E, Mostafa Y S, AlSharqi L E O. Optimization of citric acid production by immobilized cells of novel yeast isolates [J]. Mycobiology, 2020, 48: 122-132.

[106] Tapia J M, Muñoz J A, González F, et al. Mechanism of adsorption of ferric iron by extracellular polymeric substances

(EPS) from a bacterium *Acidiphilium* sp [J]. Water Science and Technology, 2011, 64: 1716-1722.

[107] González E, Zuleta C, Zamora G, et al. Production of poly (3-hydroxybutyrate) and extracellular polymeric substances from glycerol by the acidophile *Acidiphilium cryptum* [J]. Extremophiles, 2023, 27: 3.

[108] Zolghadr B, Klingl A, Koerdt A, et al. Appendage-mediated surface adherence of *Sulfolobus solfataricus* [J]. Journal of Bacteriology, 2010, 192: 104-110.

[109] Vidal P, Martínez-Martínez M, Fernandez-Lopez L, et al. Metagenomic mining for esterases in the microbial community of los rueldos acid mine drainage formation [J]. Frontiers in Microbiology, 2022,13: 868839.

[110] Golyshina O V, Golyshin P N, Timmis K N, et al. The 'pH optimum anomaly' of intracellular enzymes of *Ferroplasma acidiphilum* [J]. Environmental Microbiology, 2006, 8: 416-425.

[111] Isobe K, Wakao N. Tween-hydrolyzing esterase produced by *Acidiphilium* sp [J]. Journal of General and Applied Microbiology, 1996, 42: 285-295.

[112] Ade C, Marcelino T F, Dulchavsky M, et al. Microreactor equipped with naturally acid-resistant histidine ammonia lyase from an extremophile [J]. Materials Advances, 2022, 3: 3649-3662.



第一作者及通讯作者：王丽敏（1978年8月—），女，项目研究员，中国科学院微生物研究所特聘研究骨干。研究方向为芽孢杆菌及非模式酵母菌的化学品合成与代谢工程改造，主要包括可降解材料聚乳酸合成单体L-乳酸和D-乳酸，以及高分子生物聚合物的生物合成研究。

E-mail：wanglimin@im. ac. cn

作者贡献声明：

于波、王丽敏：提出概念、基本框架、研究方向、设计论文框架；

王丽敏、张莉敏：起草论文；

于波、王丽敏：参与论文修订、论文最终版本修订。

所有作者均已阅读并同意文章的已发布版本。

利益冲突

没有利益冲突。