

综述与专论

基于系统生物学和合成生物学的重要平台化学品 生物制造的研究进展

袁海波, 李江华, 刘龙, 堵国成, 陈坚

(江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 基于生物质资源的平台化学品制造, 是解决目前石化资源枯竭和环境问题的重要措施, 对经济社会的可持续发展具有重要意义。本文主要介绍了系统生物学和合成生物学在有机酸(琥珀酸、富马酸、L-苹果酸、葡萄糖二酸、丙酮酸、苯丙酮酸、 α -酮戊二酸)以及其他平台化学品(2,5-呋喃二甲酸)生物制造中的应用, 并展望了生物制造在平台化学品生产中的未来发展方向。

关键词: 系统生物学; 合成生物学; 生物催化; 生物技术; 平台化合物; 生物制造

DOI: 10.11949/j.issn.0438-1157.20151042

中图分类号: Q 815

文献标志码: A

文章编号: 0438—1157 (2016) 01—0129—11

Advances in production of important platform chemicals by bio-manufacturing based on systems biology and synthetic biology

YUAN Haibo, LI Jianghua, LIU Long, DU Guocheng, CHEN Jian

(School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract: Due to the limited amount of fossil fuels and global warming problem, bio-manufacturing based on renewable biomass has been paid more attention. In this review, the contribution of systems biology and synthetic biology in bio-manufacture of platform chemicals like organic acid such as succinate, fumarate, malate, glucaric acid, pyruvate, phenylpyruvic acid, α -ketoglutarate and other platform chemicals such as 2,5-furandicarboxylic acid are reviewed. Finally, the trends of bio-manufacture for platform chemical are prospected.

Key words: systems biology; synthetic biology; biocatalysis; biotechnology; platform chemical; bio-manufacture

引 言

近年来, 随着人们对环境问题的日益关注以及全球石化资源供给的日趋紧张, 生物制造在环境保护、生物能源以及生物基材料的开发等领域正受到人们越来越多的关注^[1-3]。生物基材料的开发是生物制造的一项重要内容, 它是以可再生的生物质资源为原料, 利用微生物细胞或酶的催化功能来生产多

种高附加值平台化合物, 这些化合物可经进一步加工或者直接使用来生产多种高附加值化工产品^[2, 4]。2004 年, 美国能源部在一份名为“源自生物基质的高附加值化学品”的报告中, 提出了 12 种未来最有价值的平台化合物, 包括: 琥珀酸、2,5-呋喃二甲酸、3-羟基丙酸、谷氨酸、天冬氨酸、葡萄糖二酸、衣康酸、3-羟基丁内酯、乙酰丙酸、甘油、山梨醇和木糖醇^[5], 图 1 所示为该 12 种重要平台化合物的

2015-07-01 收到初稿, 2015-08-16 收到修改稿。

联系人: 陈坚。第一作者: 袁海波 (1991—), 男, 博士研究生。

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目 (2012CB720802, 2013CB733602); 国家自然科学基金项目 (21390204)。

Received date: 2015-07-01.

Corresponding author: Prof. CHEN Jian, jchen@jiangnan.edu.cn

Foundation item: supported by the National Basic Research Program of China (2012CB720802, 2013CB733602) and the National Natural Science Foundation of China (21390204).

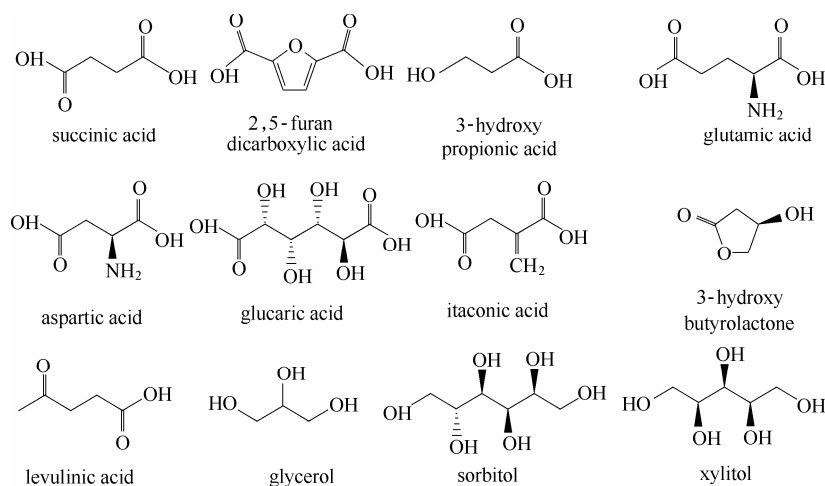


图 1 12 种重要平台化合物化学结构

Fig.1 Structures of 12 top value added bio-based chemicals

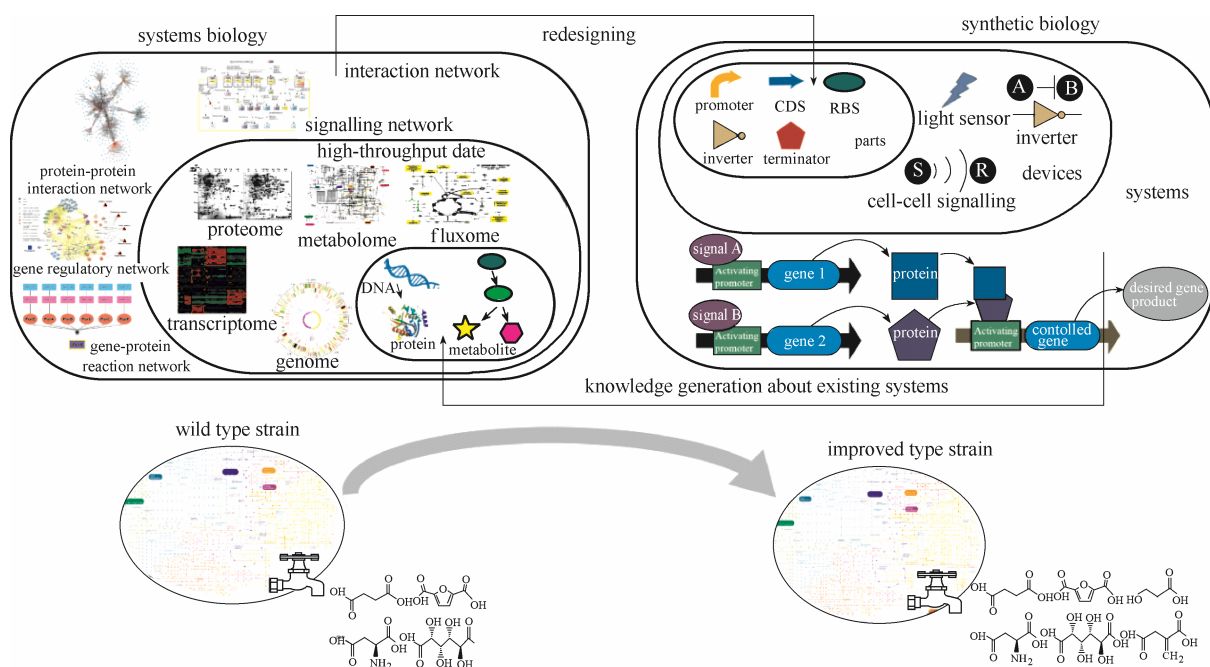


图 2 系统生物学和合成生物学在工业生产菌株改造中的应用

Fig.2 Application of systems biology and synthetic biology in strain improvement for industrial products

化学结构。

近年来,系统生物学和合成生物学的快速发展,为定向改造微生物细胞生产目标化合物提供了有力的分析手段和工具,图2所示为系统生物学和合成生物学在工业生产菌株改造中的应用^[6]。目前,系统生物学的发展已经可以使人们从基因组层面去研究细胞的代谢网络,包括代谢途径中的关键基因、细胞代谢的复杂调节机制以及外界环境的扰动对细胞整体代谢的影响,进而通过建立代谢模型,评价

和预测可能的代谢工程操作,从而改善细胞的生理机能和生产性状。合成生物学作为综合了生物科学和工程学的崭新的研究领域,通过理性设计创建生物零件、模块和系统甚至新物种,实现对现有的天然生物系统进行改造和优化,或者设计新的生物途径或网络,实现人工生物系统的构建^[7]。本文总结了系统生物学和合成生物学技术在生物基平台化学品制造领域的最新应用进展,并展望了生物制造在平台化学品生产中的未来发展方向。

1 系统生物学和合成生物学与有机酸的生物制造

有机酸 (organic acids) 作为一类重要的平台化学品, 广泛应用于食品、医药及化工生产等领域。目前, 有 20 多种有机酸可以采用发酵法进行生产, 有机酸的发酵生产行业已经逐渐成为发酵工业的重要支柱。

1.1 琥珀酸

琥珀酸又名丁二酸 (succinate), 是三羧酸循环的中间代谢产物, 广泛存在于人体、动植物以及微生物中^[8]。琥珀酸作为一种重要的 C₄ 平台化合物, 可以替代由石油衍生的化学品来合成己二酸、1,4-丁二醇、 γ -丁内酯、四氢呋喃等大宗化学品以及聚丁二酸丁二醇酯 (PBS) 等可降解生物材料^[9]。

琥珀酸生产菌株种类繁多, 目前研究最多的是 *Actinobacillus succinogenes*、*Anaerobiosprillum succiniciproducens*、*Mannheimia succiniciproducens*、*Corynebacterium glutamicum* 和重组大肠杆菌^[10-12]。由于培养条件相对简单、生长迅速、遗传背景和代谢途径清楚等优点, 大肠杆菌被广泛应用于琥珀酸的生产^[9]。重组大肠杆菌可以通过有氧、厌氧和两阶段发酵来生产琥珀酸^[13-15]。其中, 两阶段发酵过程包括有氧条件下菌体的生长和厌氧条件下琥珀酸的积累。近年来, 随着琥珀酸生物制造工业的快速发展, 人们在大肠杆菌的代谢途径改造和发酵工艺等方面做了大量的研究。尤其是在大肠杆菌的琥珀酸代谢途径方面, 如强化琥珀酸合成途径、抑制或阻断琥珀酸竞争途径或者构建琥珀酸有氧生产体系, 提高琥珀酸生产强度^[16]。

1.1.1 强化琥珀酸合成途径 有氧条件下, 对于野生型大肠杆菌, 琥珀酸仅作为三羧酸循环的中间产物, 不作积累; 在厌氧条件下, 可以进行混合酸发酵产生少量的琥珀酸 (7.8%)^[17-18]。在厌氧条件下, 葡萄糖先经糖酵解途径生成磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP), 然后在 PEP 羧化酶作用下转化为草酰乙酸 (OAA), 进而在苹果酸脱氢酶和富马酸还原酶的作用下生成琥珀酸 (代谢途径见图 3)。Millard 等^[19]在大肠杆菌中过表达了内源性基因 *ppc* 和 *pck*, 结果表明过表达 *ppc* 可以明显提高琥珀酸的产量, 而过表达 *pck* 对发酵结果没有显著影响, 但是在 *ppc* 缺陷菌株中, 过表达 *pck* 可以提高琥珀酸的产量。Liu 等^[20]通过在敲除了 *ldhA*、*pflB* 和 *ppc* 基因的大肠杆菌 K12 中过表达 *pck*, 额外提供了菌体生长所

需的 ATP, 显著提高了生物量和琥珀酸产量。此外, Kwon 等^[21]进一步研究发现, 只有在添加重碳酸盐的条件下, 过表达 PEP 羧激酶才能提高琥珀酸产量。Wang 等^[22]和 Goldberg 等^[23]通过在大肠杆菌中过表达富马酸还原酶, 可以直接将富马酸转化为琥珀酸, 且转化率达到 93%。

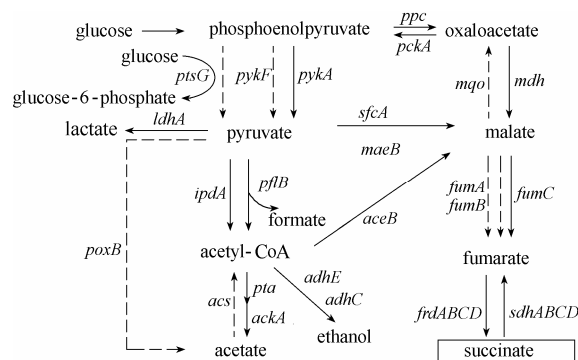


图 3 大肠杆菌中琥珀酸合成途径

Fig.3 Central metabolic pathways related to succinate formation in *E. coli*

目前, 很多研究者通过在大肠杆菌中引入外源的关键酶基因, 来提高琥珀酸产量及生产强度。Kim 等^[24]通过引入产琥珀酸放线杆菌 *Actinobacillus succinogenes* 的 *pck* 基因, 使琥珀酸产量较出发菌株提高了 6.5 倍, 与过表达内源性 *pck* 基因相比, 效果显著。Lin 等^[25]通过引入 *Sorghum vulgare* 中的 *ppc* 基因以及 *Lactococcus lactis* 中的丙酮酸羧化酶基因 *pyc*, 琥珀酸的产量大大提高, 且乳酸、乙酸含量很低。Sánchez 等^[15]在大肠杆菌 *E. coli* SBS550MG 中引入柠檬酸合成酶基因 *cs*, 琥珀酸产量有了明显提高, 琥珀酸对葡萄糖的得率为 $1.58 \text{ mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。Vemuri 等^[26]在 *E. coli* AFP111 中引入了来自菜豆根瘤菌 *Rhizobium etli* 的 *pyc* 基因, 该菌株在双阶段发酵中琥珀酸产量可以达到 $99.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 生产强度为 $1.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。Yang 等^[27]在 *E. coli* ZJG13 中过表达了调控乙醛酸支路的 *aceKBA* 基因, 结果表明对琥珀酸的生产强度影响较小。随后, Yang 等利用计算机模拟对琥珀酸生产途径中的 3 个羧化酶——丙酮酸羧化酶、苹果酸酶和 PEP 羧化酶对琥珀酸产率的影响进行了分析, 结果显示丙酮酸羧化酶对琥珀酸产率影响最大, 这一结果在实验中得到了验证。采用补料分批发酵策略, 琥珀酸的产量可以达到 $36.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 生产强度为 $2.75 \text{ mmol} \cdot (\text{g DCW})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, 是目前已报道的有氧发酵中生产强度最大的菌株。

1.1.2 抑制或阻断琥珀酸竞争途径 要提高琥珀酸

产量,就必须减少 *E. coli* 中混酸发酵的副产物,如甲酸、乙酸及少量乳酸等,使代谢流更多流向琥珀酸。Chatterjee 等^[28]通过抑制 *E. coli* 中的磷酸转移系统 (PTS),使 *E. coli* 的生长和琥珀酸的产量都有所提高。Lee 等^[29]通过在基因组范围内比较琥珀酸高效生产菌株 *M. Succiniciproducens* 和混合酸发酵下的 *E. coli* 中琥珀酸的中心代谢途径,通过找出差异基因并对这些基因进行改造以提高 *E. coli* 发酵生产琥珀酸的产量。Lee 等首先选择了 *E. coli* 中的 *ptsG*, *pykF*, *sdhA*, *mgo* 和 *aceBA* 5 个基因,并对它们进行了组合失活,发现该方法并不能提高琥珀酸的产量。随后,采用计算机模拟分析预测,发现敲除 *E. coli* 中与丙酮酸生成相关的 3 个酶——*ptsG*, *pykF* 和 *pykA* 可以提高琥珀酸产量,这一结果在实验中得到了验证。Lin 等^[13,30]通过构建包含 TCA 循环氧化支路和乙醛酸循环的代谢工程菌株,有氧条件下,补料分批发酵,琥珀酸产量可以达到 $58.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,得率为 $0.85 \text{ mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。Jantama 等^[14]以 *E. coli* C 菌株为基础,通过敲除一系列与副产物生成相关的基因,构建了菌株 *E. coli* KJ073 (ΔldhA ΔadhE ΔackA ΔfocA ΔpflB ΔmgsA ΔpoxB),在矿物盐培养基中通过简单控制 pH 分批发酵,琥珀酸产量可以达到 $688 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,琥珀酸对葡萄糖产率为 $1.2 \text{ mol} \cdot \text{mol}^{-1}$,生产强度为 $0.82 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。

目前,利用 *E. coli* 生产琥珀酸的突出问题是生产强度相对于某些瘤胃细菌还较低^[31]。比如 *M. succiniciproducens* 的琥珀酸生产强度可以达到 $25.28 \text{ mmol} \cdot (\text{g DCW})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ^[32]。随着系统和合成生物学的发展,人们对 *E. coli* 的生理代谢和调控机制方面的认识也会越来越清晰,进而可以通过定向改造和优化琥珀酸表达调控网络或者重构有潜力的代谢途径来提高琥珀酸生产强度。

1.2 富马酸

富马酸又名延胡索酸 (fumaric acid),是一种重要的 C_4 平台化合物。富马酸作为重要的精细化工产品 and 有机化工原料,广泛应用于医药、材料、化工、饲料及食品添加剂等领域^[33]。同时,富马酸还可以通过酶催化、水合、氨化、加氢等工艺生产 L-天冬氨酸、琥珀酸、苹果酸和 1,4-丁二醇等 C_4 化合物^[5]。目前,工业上主要采用化学合成法和生物转化法生产富马酸。其中,化学合成法主要包括糠醛氧化法和顺酐异构法。由于化学合成法面临着化石资源的短缺和环境污染等问题,生物转化法成为富马酸产业发展和提升的有力技术支撑。

富马酸的生物合成法包括微生物发酵和酶催化转化法。酶催化转化一般是用马来酸异构酶催化马来酸生成富马酸。微生物发酵法主要是利用根霉菌、酿酒酵母和工程大肠杆菌发酵生产富马酸^[33-35]。

真菌是包括富马酸在内的有机酸生产的主要菌株,其中根霉菌 *Rhizopus species* 的富马酸产生能力较强,由于其环境适应能力强、易培养以及生长迅速等优点,使其成为了主要研究对象,主要包括少根根霉 *Rhizopus arrhizus* 和米根霉 *Rhizopus oryzae* 等。Osmani 等^[36]提出的关于富马酸在根霉菌中积累的“胞液途径”学说,是目前被认同的主流观点。他们认为在少根根霉 *Rhizopus arrhizus* 的胞液中存在 TCA 还原途径,丙酮酸羧化酶是该途径中的关键酶之一,它催化丙酮酸固定 CO_2 生成草酰乙酸,然后草酰乙酸在苹果酸脱氢酶和富马酸酶的作用下生成富马酸。Kenealy 等^[37]证实了该途径是 *R. arrhizus* 中富马酸生成的主要途径,而 TCA 循环的作用主要是为菌体生长提供 ATP 和中间代谢物。Wright 等^[38]通过 ^{14}C 同位素标记得到了葡萄糖的代谢模型,证明了 *R. oryzae* 中存在两个独立的丙酮酸代谢池,一个位于胞液中用于合成富马酸、乳酸及乙醇等,另外一个位于线粒体用于 TCA 循环。由于富马酸酶在胞液途径富马酸的生成中的重要作用,Zhang 等^[39]在米根霉中表达了富马酸酶基因 *fumR*,结果显示单纯过表达富马酸酶并不能提高富马酸产量,因为富马酸酶也可以催化富马酸生成苹果酸,因而 L-苹果酸产量反而有所提高。

近年来,研究者们也尝试采用基因工程手段在酿酒酵母和大肠杆菌中重构富马酸的代谢途径。Kaclíková 等^[40]通过对酿酒酵母中的线粒体富马酸酶进行突变失活,以葡萄糖为底物,富马酸的产量约为 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。吴世根等通过在毕赤酵母 GS115 中过表达丙酮酸羧化酶胞质同工酶,结果表明该酶的表达有助于草酰乙酸和 L-苹果酸的积累,富马酸的产量仅有少量增加。Xu 等^[34]通过在酿酒酵母中表达来自米根霉的苹果酸脱氢酶基因、富马酸酶基因以及酿酒酵母自身的丙酮酸羧化酶基因,实现了富马酸的积累,但是产量仅有 $3.18 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Song 等^[35]通过敲除大肠杆菌中的异柠檬酸裂解酶调节因子基因 *iclR*、富马酸酶基因 *fumABC*、葡萄糖特异性转运蛋白 II CB^{Glc} 基因 *ptsG* 和天冬氨酸酶基因 *aspA*,并且过表达了磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因 *ppc*,补料分批发酵 63 h 后,富马酸的产量和生产强度分别

达到了 $28.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.448 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。

1.3 L-苹果酸

L-苹果酸(L-malic acid)是生物体中三羧酸循环及其支路乙醛酸循环的中间代谢产物。作为一种重要的 C_4 化合物, L-苹果酸被广泛应用于食品、医药和化工领域^[41]。

L-苹果酸的生物合成法主要有3种: 第1种是直接发酵法, 使用霉菌(米曲霉、黄曲霉及寄生曲霉等)以糖类为原料直接发酵生产 L-苹果酸; 第2种是混合发酵, 首先利用根霉菌将糖类转化为富马酸, 然后再利用酵母将富马酸转化成 L-苹果酸; 第3种是酶催化转化, 利用微生物的富马酸酶直接将富马酸转化为 L-苹果酸。已有研究表明, 曲霉等微生物生成 L-苹果酸的主要途径是丙酮酸羧化支路途径, 即丙酮酸在丙酮酸羧化酶作用下固定 CO_2 生成草酰乙酸, 然后在苹果酸脱氢酶作用下生成 L-苹果酸^[42-43]。

目前, 采用系统生物学及合成生物学手段来改造和构建 L-苹果酸生产菌株已成为苹果酸高产菌株育种的主要研究方向。Zhang 等^[44]在生产琥珀酸的大肠杆菌(KJ060 和 KJ073)的基础上敲除了富马酸还原酶基因 *frdBC*、苹果酸酶基因 *sfcA* 和 *maeB* 以及富马酸同功酶基因 *fumB* 和 *fumAC*, 构建了工程菌 XZ658 ($\text{KJ073}\Delta\text{frdBC}\Delta\text{sfcA}\Delta\text{maeB}\Delta\text{fumB}\Delta\text{fumAC}$)。该菌株在双阶段发酵下, 72 h 后 L-苹果酸产量可以达到 $253 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 糖酸转化率为 $1.42 \text{ mol} \cdot \text{mol}^{-1}$, 生产强度为 $0.47 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。Mu 等^[45]首次采用合成生物学手段将大肠杆菌中的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶和酿酒酵母中苹果酸脱氢酶引入到枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*, 成功构建了一条 L-苹果酸的异源生物合成途径。该工程菌在进一步敲除乳酸脱氢酶基因后, 采用两阶段发酵可以实现 L-苹果酸的积累, 最大产量为 $(15.65 \pm 0.13) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Zelle 等^[46]在丙酮酸脱羧酶缺陷型的酿酒酵母中过表达苹果酸脱氢酶 MDH3 的等位基因、内源性丙酮酸羧化酶基因和苹果酸转运蛋白基因 *SpMAE1*, 分批培养下, L-苹果酸产量达到 $59 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 糖酸转化率为 $0.42 \text{ mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。Oba 等^[47]从清酒醪中分离到一株高产苹果酸的酿酒酵母, 通过基因芯片技术比较该菌株和原始菌株的基因表达水平时发现, L-苹果酸高产菌株中的应激反应基因如 *HSP12* 出现上调, 而硫胺素合成基因 *THI4* 和 *SNZ2* 出现下调, 此研究为今后代谢改造酿酒酵母生产 L-苹果酸提供了研究方向。

1.4 葡萄糖二酸

葡萄糖二酸(D-glucaric acid, GA)是一种天然存在于樱桃、柑橘等水果和十字花科蔬菜中的无毒化合物, 也少量存在于包括人类的哺乳类动物中^[48-50]。葡萄糖二酸在糖尿病、癌症的治疗和降低胆固醇方面也有广泛应用^[49, 51-52]。葡萄糖二酸及其酯还可作为合成羟基化的尼龙和超支化聚酯的起始单体原料, 具有巨大的应用潜力^[5]。

目前, 化学氧化法是制备葡萄糖二酸的主要方法, 通过氧化 D-葡萄糖来生产 D-葡萄糖二酸, 如硝酸氧化和以 2,2,6,6-四甲基-1-哌啉氧化物(TEMPO)为介导的氧化^[53-55]。微生物发酵法作为一种更为经济、环保的方法越来越受到研究者的青睐。

葡萄糖二酸作为哺乳动物体内的代谢终产物, 以葡萄糖为底物需要经过 10 步以上的反应才可以得到^[49]。Marsh^[56]用小鼠腺体中提取纯化的葡萄糖醛酸酶, 以葡萄糖醛酸为底物, 在 Fe^{2+} 和 H_2O_2 存在的条件下, 可以得到葡萄糖二酸。目前, 并没有微生物存在从葡萄糖到葡萄糖二酸的完整的天然合成途径的报道。

Moon 等^[57]首次用合成生物学的方法在 *E. coli* 中构建了一条葡萄糖二酸的合成途径, 成功实现了由葡萄糖到葡萄糖二酸的生物制备。研究者通过在 *E. coli* 中共表达了 3 个外源基因——酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 的肌醇-1-磷酸合成酶基因 *Ino1*, 小鼠的肌醇氧化酶基因 *MIOX* 以及丁香假单胞菌 *Pseudomonas syringae* 中的糖醛酸脱氢酶基因 *Udh*, 构建了一条葡萄糖二酸的生物合成途径。进一步研究发现, 该途径中催化肌醇转化为葡萄糖醛酸的 MIOX 是限速酶, 其活性受到底物肌醇浓度的直接影响。为了增大肌醇的有效浓度, 从而提高葡萄糖二酸的产量, Moon 等^[58]依据蛋白之间的相互作用构建了多肽支架, 将途径中的 3 种酶组成蛋白复合体, 提高了物质流的利用效率, 使葡萄糖二酸的产量提高了 5 倍, 达到 $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。随后, Shiue 等^[59]通过在 MIOX 的 N 端融合表达了 SUMO (小泛素相关修饰物) 标签以及提高肌醇的转运速率, 以肌醇为底物, 使葡萄糖二酸的产量提高至 $4.85 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Shiue 等在研究中发现, 以肌醇为底物生产葡萄糖二酸时, 存在产物抑制现象, 葡萄糖二酸的产量无法超过 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 这种现象可能是由于产物葡萄糖二酸的积累导致体系 pH 过低, 从而引起细胞正常的生理和代谢机能发生变化^[59-60]。Konishi

等^[61]通过使用不同来源的 *Ino1*、*MIOX* 和 *Udh* 在大肠杆菌中构建了葡萄糖二酸的合成途径, 添加并且强化了 *Ino1*, 通过控制培养基中葡萄糖的浓度和采取补料分批发酵策略, 葡萄糖二酸的产量可以达到 $73 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.5 丙酮酸

丙酮酸 (pyruvate) 是生物体中重要的中间代谢产物, 被广泛应用于制药、化工、农用化学品和保健品等行业。目前, 丙酮酸的化学合成法主要有酒石酸法、乳酸催化氧化法、羟基丙酮法和电化学法等; 生物合成法主要包括生物催化转化法和直接发酵法。

早在 20 世纪 50 年代, 就有学者对发酵法生产丙酮酸开始了研究。1989 年, 日本学者 Miyata 和 Yonehara 选育出了多种丙酮酸产量可以超过 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的球拟酵母 (*Torulopsis*)。其中, 光滑球拟酵母 *Torulopsis glabrata* 是工业化生产上也是目前研究较多的菌株。丙酮酸作为糖酵解的最终产物, 处于生物体内代谢的关键节点, 很容易代谢生成其他产物, 不易积累。要实现丙酮酸的大量积累, 就需要弱化或切断丙酮酸的进一步代谢。日本学者 Yonehara 和 Yokota 分别对多重维生素营养缺陷型球拟酵母和能量代谢有缺陷的大肠杆菌进行了研究, 获得了一株丙酮酸生产能力良好的多重维生素营养缺陷型 *T. glabrata* IFO0005, 正常培养条件下, 丙酮酸对葡萄糖的产率为 $0.41 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。对该菌株通过诱变处理后, 增加了一系列遗传标记 (如 L-精氨酸营养缺陷型、L-异亮氨酸和 L-缬氨酸营养缺陷型等), 其丙酮酸产率可以达到 $0.54 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。李寅等^[62]考察了 *T. glabrata* WSH-IP303 菌株在葡萄糖为碳源、氯化铵为唯一氮源的培养基中, 不同维生素对丙酮酸产量的影响, 分批发酵 57.5 h 后, 丙酮酸的产量和产率分别达到了 $69.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.593 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。丙酮酸在多重维生素营养缺陷型菌株 *T. glabrata* 中的积累, 被认为是由于以硫胺素为辅因子的丙酮酸脱氢酶系 PDH 受损, 导致丙酮酸氧化脱羧减少造成的。

除了筛选营养缺陷型菌株用于丙酮酸的生产外, 借助生化工程方法和代谢工程策略, 综合运用定量 PCR (qPCR)、表达谱芯片、代谢物分析和关键酶活性分析等系统生物学手段来研究胞内 NADH 和 ATP 的代谢控制方式, 也是提高 *T. glabrata* 丙酮酸生产效率的有效手段。Hua 等通过代谢分析研究了不同溶氧浓度对丙酮酸发酵的影

响, 发现不同溶氧水平对能量代谢和关键代谢途径的影响是不同的。当溶氧为 30%~40% 时, 丙酮酸的产率提高了 15%, 且副产物乙醇的生成量减少。Li 等^[63]通过考察分批发酵中不同的体积溶氧系数对丙酮酸发酵的影响, 结果表明分阶段控氧比恒定 $K_L a$ 的丙酮酸生产强度有大幅度提高。通过代谢分析可知, 抑制氧化磷酸化途径中 ATP 的生成是提高丙酮酸生产强度的有效措施。刘立明等^[64-65]通过选育 *T. glabrata* 的呼吸缺陷型突变株, 削弱了氧化磷酸化的活性, 提高了糖酵解速度, 丙酮酸的生产强度也得到提高。由于细胞内 NADH/NAD⁺ 的水平也会直接影响 ATP 的水平, 刘立明等通过加入电子传递链抑制剂 (抗霉素 A 和鱼藤酮) 和 F_0F_1 -ATPase 抑制剂 (寡霉素) 或选育新霉素抗性菌株, 达到了提高丙酮酸产量的目的。此外, Liu 等^[66]用高渗透条件筛选到一株可以耐受 $70 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 的菌株 *T. glabrata* RS23。此菌株以葡萄糖为碳源, 丙酮酸产量和产率可以达到 $94.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.635 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。Wang 等^[67]通过 DNA 重组技术敲除了 *T. glabrata* 中的丙酮酸脱羧酶 PDC, 减少了发酵过程中副产物乙醇的产生, 丙酮酸产量可以达到 $82.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Zelić 等^[68]构建了一株重组大肠杆菌 *E. coli* YYC202 *ldhA::Kan*, 该菌株丧失了丙酮酸转化为乙酰辅酶 A、醋酸和乳酸的能力, 利用该菌株发酵生产丙酮酸产率可以达到 $0.54 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

1.6 α -苯丙酮酸

α -苯丙酮酸 (phenylpyruvic acid, PPA) 是一种双羰基化合物, 广泛应用于医药、食品和化工生产等领域^[69]。PPA 是合成 D-苯丙氨酸的前体, 而 D-苯丙氨酸可以用来生产手性药物和食品添加剂^[70]。此外, PPA 还可以用来生产苯乳酸和阿斯巴甜等。

目前, PPA 的生产主要是化学合成法和生物转化法。化学法主要有海因法、双羰基化法和 α -乙酰氨基肉桂酸水解法等。相对于化学合成法, 生物转化法具有环境污染小、生产成本低以及产物安全性高等优点, 正受到人们的广泛关注。

PPA 的生物转化法主要包括微生物发酵法和酶转化法。但是由于发酵法的 PPA 产量较低 ($1.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 因此目前研究较多的是酶转化法^[71]。酶转化法是通过 L/D-氨基酸脱氨酶 (LAAO/DAAO) 催化 L/D-苯丙氨酸脱氨基生成。但是由于 D-苯丙氨酸价格较高以及 DAAO 催化过程产生的双氧水对转化的不利影响, 因此目前主要采用非双氧水生成型的 LAAO 进行 PPA 的生产。LAAO 广泛存在于蛇

毒、真菌、细菌、藻类及动物中。其中，来源于普通变形杆菌 *Proteus vulgaris*、奇异变形杆菌 *Proteus mirabilis*、雷特格氏变形杆菌 *Proteus rettgeri*、魔氏变形杆菌 *Proteus morganii* 以及普罗维登斯菌属 *Providencia* 的菌株因具有苯丙氨酸脱氨酶而被广泛研究^[72]。

有研究者在 *E. coli* BL21 (DE3) 中表达了来源于 *P. mirabilis* KCTC2566 的脱氨酶基因 *pma*，在最优条件下，以浓度为 $14 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 L-苯丙氨酸为底物，PPA 的产量可以达到 $6.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ，转化率为 44.6%。随后，利用易错 PCR 对该脱氨酶进行定向进化并且敲除了 *E. coli* 中与 L-苯丙氨酸进一步代谢有关的基因，最终 PPA 的产量和转化率分别达到了 $11.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 82%^[73]。

1.7 α -酮戊二酸

α -酮戊二酸 (α -ketoglutarate, α -KG) 作为三羧酸循环 (TCA 循环) 中重要的中间代谢产物，参与体内氨基酸、糖类以及脂肪代谢等多种代谢过程。因此， α -酮戊二酸被广泛应用于食品、医疗以及化工生产等领域^[74]。目前，工业上生产 α -酮戊二酸主要采用的是化学合成法，但是化学合成过程中使用的氰化物和重金属离子等有毒试剂，限制了 α -酮戊二酸在食品和医疗等领域的应用。因此，生物法成为了生产 α -酮戊二酸的最佳选择。

目前，人们已经发现了多种可以过量积累 α -KG 的微生物，包括多种原核微生物和真核微生物^[75-77]。由于真核微生物相对于原核微生物来说，能耐受更低的 pH 条件，更适合发酵生产短链有机酸^[78]，因此目前研究的生产 α -KG 的菌株多以真核微生物为主。其中，解脂亚洛酵母 *Yarrowia lipolytica* 因其生长迅速、生理特征清晰、底物谱宽和安全性等优点，越来越受到人们的重视^[79]。

由于 α -KG 在三羧酸循环中处于关键位置，并且连接着碳-氮代谢，参与细胞内多种调控过程，因此采取基于代谢组学的系统生物学手段对微生物积累 α -KG 的过程进行系统分析，对于揭示微生物的代谢机理和实现 α -KG 的过量积累具有重要的意义。 α -KG 生产菌株在积累 α -KG 的过程中，存在两个重要的代谢节点：一是丙酮酸在丙酮酸脱氢酶系 PDHC 作用下生成乙酰辅酶 A，然后进入 TCA 循环；二是 α -酮戊二酸脱氢酶系 KGDH 催化的 α -KG 的进一步代谢。硫胺素作为 PDHC 和 KGDH 的辅因子，是 α -KG 积累的关键因素。Chernyavskaya 等^[80]对硫胺素营养缺陷型菌株 *Y. lipolytica* N1 在不同硫胺素

浓度、氮源、pH 和溶氧下 α -KG 的产量进行了研究，结果显示亚适量硫胺素和过量氮源是积累 α -KG 的必要条件，在最佳条件下 α -KG 的产量可以达到 $49.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ，对乙醇产率为 42%。紧接着，Il'chenko 等^[81]对 *Y. lipolytica* N1 菌株中心代谢途径中关键酶的活性进行了研究，结果显示在积累 α -KG 阶段，KGDH 和柠檬酸合酶活性较低，而依赖于 NADPH 的异柠檬酸脱氢酶具有较高活性。为了提高 α -KG 的产量，基于增大流向目标产物的代谢流和减弱目标产物的进一步代谢的代谢工程改造是较为有效的手段。为了增大流向目标产物的代谢流，Foerster 等^[82]在 *Y. lipolytica* H222 中过表达了异柠檬酸裂解酶 ICL1，实现了菌体在总产酸不变的情况下，异柠檬酸占总酸比例的显著下降。随后，Holz 等^[83]通过表达顺乌头酸酶 ACO1，使异柠檬酸占总酸的比例由 35%~49% 提高到 66%~71%。Yin 等^[84]在 *Y. lipolytica* WSH-Z06 中分别过表达了来自酿酒酵母和米根霉的丙酮酸羧化酶 PYC，重组菌株的 α -KG 产量分别提高了 24.5% 和 35.3%，在 3 L 发酵罐上的产量可以达到 $69.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。此外，通过削弱 α -KG 的进一步代谢是提高 α -KG 产量的另一策略。Verseck 等敲除了 *C. glutamicum* 菌株的谷氨酸脱氢酶基因 *gdh*，使得 α -KG 在发酵液中的浓度达到 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Holz 等^[85]在研究 KGDH 对 *Y. lipolytica* 的产酸影响时，利用生物信息学技术，将 *Y. lipolytica* 与 *S. cerevisiae* 中 KGDH 的 3 个基因 (*ScKGD1*, *KGD2*, *LPD1*) 进行了比较分析，找到了 *Y. lipolytica* 中的 3 个相应基因 *YIKGD1*, *YIKGD2* 和 *YILPD1*，并将这 3 个基因在 *Y. lipolytica* 中进行过量表达。发酵结果显示， α -KG 的产量从原始菌中的 $97 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 下降到重组菌中的 $72 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ，而丙酮酸含量有所提高。

虽然在微生物代谢生产 α -KG 的机制及代谢工程改造方面已经取得一定成果，但是依然存在着过量积累 α -KG 机制不清楚以及代谢副产物过多等问题。

1.8 2,5-呋喃二甲酸

2,5-呋喃二甲酸 (2,5-furandicarboxylic acid, FDCA) 作为一种重要的化工原料及有机合成中间体，广泛应用在医药、抗菌剂和高分子材料的合成中^[86-87]。此外，由于 2,5-呋喃二甲酸的结构和性质与对苯二甲酸相似，可以作为其替代品用于聚酯类材料的制造^[88-90]。

2,5-呋喃二甲酸可以由 5-羟甲基糠醛 (HMF) 氧化生成，而 5-羟甲基糠醛可以由葡萄糖或果糖脱

水而成。目前,对于 FDCA 的生产,主要是化学合成法。FDCA 的化学合成需要高压、高温、有机溶剂和金属离子催化,致使整个生产工艺高成本和高污染,不利于实际生产应用^[91-93]。与化学催化不同的是,生物(酶或全细胞)催化可以在相对温和的条件下进行,可以显著降低生产成本和有害物质的排放^[94]。然而,目前用生物催化法生产 FDCA 的研究还处于初始阶段,已报到的文献中只有极少的酶可以氧化 HMF 生成 FDCA。其中来源于 *Caldariomyces fumago* 的氯过氧化物酶可以氧化 HMF,生成 74% 的 2,5-呋喃二甲醛和 20% 的 5-羟甲基-2-呋喃甲酸,但是不能生成 FDCA^[95]。近年来, Koopman 等^[96]通过转座子突变筛选鉴定出了贪铜菌 *Cupriavidus basilensis* HMF14 中的 HMF 和呋喃甲酸的代谢途径,证实了 5-羟甲基糠醛氧化还原酶(HmfH)可以将 5-羟甲基糠醛氧化为 2,5-呋喃二甲酸。随后, Koopman 等^[97]在恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* S12 中异源表达了 HmfH,以甘油为碳源,补料分批培养,可以得到 30.1 g · L⁻¹ 的 FDCA,产率为 97%。该恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* S12 自身只能催化 HMF 生成 5-羟甲基-2-呋喃甲酸,只有表达了来源于贪铜菌 *Cupriavidus basilensis* HMF14 中的 HmfH 基因后,才可以催化 HMF 生成 FDCA。随后, Dijkman 等^[98-99]在大肠杆菌中表达了来源于甲基营养菌 *Methylovorus* sp. strain MP688 的 5-羟甲基糠醛氧化酶(HMFO),该酶不仅可以将 HMF 氧化为 FDCA,而且还可以氧化芳香族醇类和醛类物质,该酶可以在 24 h 内将 95% 的 HMF 转化为 FDCA。

虽然人们对 5-羟甲基糠醛氧化酶研究还处于起始阶段,但生物催化仍是未来 2,5-呋喃二甲酸生产的重要研究方向。

2 展 望

系统生物学和合成生物学的飞速发展,为理性改造微生物提供了技术手段。系统生物学的发展使人们能够从整体水平上来理解和把握微生物的生理、代谢和功能,有助于识别代谢途径中的关键靶基因,从而对其进行代谢工程操作。另外,关于目标代谢途径和表达宿主的系统生物学研究也为合成生物学的开展提供了重要的参考。

生物制造离不开生物细胞转化技术,即利用微生物细胞或酶将底物转化为目标产物的过程。微生物转化技术在平台化学品如葡萄糖二酸、琥珀酸、

α-酮戊二酸等有机酸的生产中已展现出良好的应用前景。尽管我国在有机酸制造工业取得了显著成绩,但是总体技术仍低于国际同期水平,特别是在转化率、物耗和能耗以及产品质量等产业化指标方面仍明显落后于国际先进水平。因此,通过系统改造微生物代谢过程,构建高效的生物合成途径,是提高微生物转化水平的重要途径,也是推动生物制造业可持续发展的重要举措。

References

- [1] KERR R A. Global warming is changing the world [J]. *Science*, 2007, **316**(5822): 188-190.
- [2] LEE J W, NA D, PARK J M, *et al.* Systems metabolic engineering of microorganisms for natural and non-natural chemicals [J]. *Nature Chemical Biology*, 2012, **8**(6): 536-546.
- [3] JANG Y S, PARK J M, CHOI S, *et al.* Engineering of microorganisms for the production of biofuels and perspectives based on systems metabolic engineering approaches [J]. *Biotechnology Advances*, 2012, **30**(5): 989-1000.
- [4] STEEN E J, KANG Y, BOKINSKY G, *et al.* Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass [J]. *Nature*, 2010, **463**(7280): 559-562.
- [5] WERP Y T, PETERSEN G. Top Value Added Chemicals from Biomass: Volume I -- Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas[M]. United States: USDOE, 2004.
- [6] BARRETT C L, KIM T Y, KIM H U, *et al.* Systems biology as a foundation for genome-scale synthetic biology [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2006, **17**(5): 488-492.
- [7] 刘夺, 杜瑾, 赵广荣, 等. 合成生物学在医药及能源领域的应用 [J]. *化工学报*, 2011, **62**(9): 2391-2397.
- [8] LIU D, DU J, ZHAO G R, *et al.* Applications of synthetic biology in medicine and energy [J]. *CIESC Journal*, 2011, **62**(9): 2391-2397.
- [8] 徐冰, 马江峰, 梁丽亚, 等. 基于高密度培养的反复分批发酵法生产丁二酸 [J]. *化工学报*, 2011, **62**(9): 2595-2599.
- [9] XU B, MA J F, LIANG L Y, *et al.* Succinic acid production by repeated batch fermentation based on high density culture [J]. *CIESC Journal*, 2011, **62**(9): 2595-2599.
- [9] MCKINLAY J, VIEILLE C, ZEIKUS J G. Prospects for a bio-based succinate industry [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, **76**(4): 727-740.
- [10] LEE S J, SONG H, LEE S Y. Genome-based metabolic engineering of *Mannheimia succiniciproducens* for succinic acid production [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, **72**(3): 1939-1948.
- [11] 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.
- [12] OKINO S, NOBURYU R, SUDA M, *et al.* An efficient succinic acid production process in a metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* strain [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, **81**(3): 459-464.
- [13] LIN H, BENNETT G N, SAN K Y. Fed-batch culture of a metabolically engineered *Escherichia coli* strain designed for high-level succinate production and yield under aerobic conditions [J].

- Biotechnology and Bioengineering*, 2005, **90**(6): 775-779.
- [14] JANTAMA K, HAUPT M J, SVORONOS S A, *et al.* Combining metabolic engineering and metabolic evolution to develop nonrecombinant strains of *Escherichia coli* C that produce succinate and malate [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2008, **99**(5): 1140-1153.
- [15] SÁNCHEZ A M, BENNETT G N, SAN K Y. Novel pathway engineering design of the anaerobic central metabolic pathway in *Escherichia coli* to increase succinate yield and productivity [J]. *Metabolic Engineering*, 2005, **7**(3): 229-239.
- [16] 王乐, 倪子富, 惠明, 等. 代谢控制发酵产琥珀酸研究进展 [J]. *化工学报*, 2015, **66**(4): 1243-1251.
- WANG L, NI Z F, HUI M, *et al.* Research advances in metabolic control of succinic acid fermentation [J]. *CIESC Journal*, 2015, **66**(4): 1243-1251.
- [17] CLARK D P. The fermentation pathways of *Escherichia coli* [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 1989, **5**(3): 223-234.
- [18] WENDISCH V F, BOTT M, EIKMANN B J. Metabolic engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for biotechnological production of organic acids and amino acids [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2006, **9**(3): 268-274.
- [19] MILLARD C S, CHAO Y P, LIAO J C, *et al.* Enhanced production of succinic acid by overexpression of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Escherichia coli* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, **62**(5): 1808-1810.
- [20] LIU R, LIANG L, CHEN K, *et al.* Fermentation of xylose to succinate by enhancement of ATP supply in metabolically engineered *Escherichia coli* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, **94**(4): 959-968.
- [21] KWON Y D, LEE S Y, KIM P. Influence of gluconeogenic phosphoenolpyruvate carboxykinase (PCK) expression on succinic acid fermentation in *Escherichia coli* under high bicarbonate condition [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2006, **16**(9): 1448-1452.
- [22] WANG X, GONG C S, TSAO G. Bioconversion of fumaric acid to succinic acid by recombinant *E. coli* [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1998, **70/71/72**: 919-928.
- [23] GOLDBERG I, LONBERG-HOLM K, BAGLEY E A, *et al.* Improved conversion of fumarate to succinate by *Escherichia coli* strains amplified for fumarate reductase [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1983, **45**(6): 1838-1847.
- [24] KIM P, LAIVENIEKS M, VIEILLE C, *et al.* Effect of overexpression of *Actinobacillus succinogenes* phosphoenolpyruvate carboxykinase on succinate reduction in *Escherichia coli* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, **70**(2): 1238-1241.
- [25] LIN H, SAN K Y, BENNETT G. Effect of *Sorghum vulgare* phosphoenolpyruvate carboxylase and *Lactococcus lactis* pyruvate carboxylase coexpression on succinate production in mutant strains of *Escherichia coli* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, **67**(4): 515-523.
- [26] VEMURI G N, EITEMAN M A, ALTMAN E. Effects of growth mode and pyruvate carboxylase on succinic acid production by metabolically engineered strains of *Escherichia coli* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, **68**(4): 1715-1727.
- [27] YANG J, WANG Z, ZHU N, *et al.* Metabolic engineering of *Escherichia coli* and in silico comparing of carboxylation pathways for high succinate productivity under aerobic conditions [J]. *Microbiological Research*, 2014, **169**(5/6): 432-440.
- [28] CHATTERJEE R, MILLARD C S, CHAMPION K, *et al.* Mutation of the *ptsG* gene results in increased production of succinate in fermentation of glucose by *Escherichia coli* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, **67**(1): 148-154.
- [29] 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.
- [30] LIN H, BENNETT G, SAN K Y. Effect of carbon sources differing in oxidation state and transport route on succinate production in metabolically engineered *Escherichia coli* [J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2005, **32**(3): 87-93.
- [31] SONG H, LEE S Y. Production of succinic acid by bacterial fermentation [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, **39**(3): 352-361.
- [32] KIM T Y, KIM H U, PARK J M, *et al.* Genome-scale analysis of *Mannheimia succiniciproducens* metabolism [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, **97**(4): 657-671.
- [33] 高振, 张昆, 黄和, 等. 利用根霉菌生产富马酸 [J]. *化学进展*, 2009, **21**(1): 251-258.
- GAO Z, ZHANG K, HUANG H, *et al.* Fumaric acid production by *Rhizopus* sp. [J]. *Progress in Chemistry*, 2009, **21**(1): 251-258.
- [34] XU G, ZOU W, CHEN X, *et al.* Fumaric acid production in *Saccharomyces cerevisiae* by in silico aided metabolic engineering [J]. *PLoS ONE*, 2012, **7**(12): e52086.
- [35] SONG C W, KIM D I, CHOI S, *et al.* Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of fumaric acid [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2013, **110**(7): 2025-2034.
- [36] OSMANI S A, SCRUTTON M C. The sub-cellular localisation and regulatory properties of pyruvate carboxylase from *Rhizopus arrhizus* [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1985, **147**(1): 119-128.
- [37] KENEALY W, ZAADY E, DU PREEZ J C, *et al.* Biochemical aspects of fumaric acid accumulation by *Rhizopus arrhizus* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1986, **52**(1): 128-133.
- [38] WRIGHT B E, LONGACRE A, REIMERS J. Models of metabolism in *Rhizopus oryzae* [J]. *Journal of Theoretical Biology*, 1996, **182**(3): 453-457.
- [39] ZHANG B, YANG S T. Metabolic engineering of *Rhizopus oryzae*: effects of overexpressing *fumR* gene on cell growth and fumaric acid biosynthesis from glucose [J]. *Process Biochemistry*, 2012, **47**(12): 2159-2165.
- [40] KACLÍKOVÁ E, LACHOWICZ T M, GBELSKÁ Y, *et al.* Fumaric acid overproduction in yeast mutants deficient in fumarase [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1992, **91**(2): 101-106.
- [41] MOON S Y, HONG S H, KIM T Y, *et al.* Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of malic acid [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2008, **40**(2): 312-320.
- [42] BATTAT E, PELEG Y, BERCOVITZ A, *et al.* Optimization of L-malic acid production by *Aspergillus flavus* in a stirred fermentor [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1991, **37**(11): 1108-1116.
- [43] 周小燕, 陈素云, 吴清平, 等. 通气条件对曲霉 N1-14' 产生 L-苹果酸的影响 [J]. *食品与发酵工业*, 2000, **26**(1): 11-15.
- ZHOU X Y, CHEN S Y, WU Q P, *et al.* Effects of aeration conditions on L-malic acid production by *Aspergillus* sp. N1-14' [J]. *Food and*

- Fermentation Industries*, 2000, **26**(1): 11-15.
- [44] ZHANG X, WANG X, SHANMUGAM K T, *et al.* L-Malate production by metabolically engineered *Escherichia coli* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, **77**(2): 427-434.
- [45] MU L, WEN J. Engineered *Bacillus subtilis* 168 produces L-malate by heterologous biosynthesis pathway construction and lactate dehydrogenase deletion [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2013, **29**(1): 33-41.
- [46] ZELLE R M, DE HULSTER E, VAN WINDEN W A, *et al.* Malic acid production by *Saccharomyces cerevisiae*: engineering of pyruvate carboxylation, oxaloacetate reduction, and malate export [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, **74**(9): 2766-2777.
- [47] OBA T, SUENAGA H, NAKAYAMA S, *et al.* Properties of a high malic acid-producing strains of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from sake mash [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2011, **75**(10): 2025-2029.
- [48] MARSH C A. Metabolism of D-glucuronolactone in mammalian systems (2): Conversion of D-glucuronolactone into D-glucaric acid by tissue preparations [J]. *Biochemical Journal*, 1963, **87**(1): 82-90.
- [49] WALASZEK Z, SZEMRAJ J, HANAUSEK M, *et al.* D-Glucaric acid content of various fruits and vegetables and cholesterol-lowering effects of dietary D-glucarate in the rat [J]. *Nutrition Research*, 1996, **16**(4): 673-681.
- [50] OEN H, VESTRHEIM S R. Detection of non-volatile acids in sweet cherry fruits [J]. *Acta Agriculturae Scandinavica*, 1985, **35**(2): 145-152.
- [51] BHATTACHARYA S, MANNA P, GACHHUI R, *et al.* D-Saccharic acid 1,4-lactone protects diabetic rat kidney by ameliorating hyperglycemia-mediated oxidative stress and renal inflammatory cytokines via NF- κ B and PKC signaling [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2013, **267**(1): 16-29.
- [52] GUPTA K P, SINGH J. Modulation of carcinogen metabolism and DNA interaction by calcium glucarate in mouse skin [J]. *Toxicological Sciences*, 2004, **79**(1): 47-55.
- [53] MERBOUH N, BOBBITT J M, BRÜCKNER C. 4-AcNH-TEMPO-catalyzed oxidation of aldoses to aldaric acids using chlorine or bromine as terminal oxidants [J]. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2002, **21**(1/2): 65-77.
- [54] PAMUK V, YILMAZ M, ALICILAR A. The preparation of D-glucaric acid by oxidation of molasses in packed beds [J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2001, **76**(2): 186-190.
- [55] MEHLTRETTER C L, RIST C E. Sugar oxidation, saccharic and oxalic acids by the nitric acid oxidation of dextrose [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1953, **1**(12): 779-783.
- [56] MARSH C A. Biosynthesis of D-glucaric acid in mammals: a free-radical mechanism? [J]. *Carbohydrate Research*, 1986, **153**(1): 119-131.
- [57] MOON T S, YOON S H, LANZA A M, *et al.* Production of glucaric acid from a synthetic pathway in recombinant *Escherichia coli* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, **75**(3): 589-595.
- [58] MOON T S, DUEBER J E, SHIUE E, *et al.* Use of modular, synthetic scaffolds for improved production of glucaric acid in engineered *E. coli* [J]. *Metabolic Engineering*, 2010, **12**(3): 298-305.
- [59] SHIUE E, PRATHER K L J. Improving D-glucaric acid production from myo-inositol in *E. coli* by increasing MIOX stability and myo-inositol transport [J]. *Metabolic Engineering*, 2014, **22**: 22-31.
- [60] WARNECKE T, GILL R T. Organic acid toxicity, tolerance, and production in *Escherichia coli* biorefining applications [J]. *Microbial Cell Factories*, 2005, **4**: 25.
- [61] KONISHI K, IMAZU S. Method for producing glucaric acid: US20150010969A1[P]. 2015-01-08.
- [62] 李寅, 陈坚, 伦世仪, 等. 维生素在丙酮酸过量合成中的重要作用 [J]. *微生物学报*, 2000, **40**(5): 528-534.
- LI Y, CHEN J, LUN S Y, *et al.* The important role of vitamins in the over-production of pyruvic acid [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2000, **40**(5): 528-534.
- [63] 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.
- [64] 刘立明, 陈坚, 李华钟, 等. 氧化磷酸化抑制剂对光滑球拟酵母糖酵解速度的影响 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2005, **32**(3): 251-257.
- LIU L M, CHEN J, LI H Z, *et al.* Effect of oxidative phosphorylation inhibitors on the glycolytic flux in *Torulopsis glabrata* [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2005, **32**(3): 251-257.
- [65] LIU L M, LI Y, DU G C, *et al.* Increasing glycolytic flux in *Torulopsis glabrata* by redirecting ATP production from oxidative phosphorylation to substrate-level phosphorylation [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2006, **100**(5): 1043-1053.
- [66] LIU L, XU Q, LI Y, *et al.* Enhancement of pyruvate production by osmotic-tolerant mutant of *Torulopsis glabrata* [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, **97**(4): 825-832.
- [67] WANG Q, HE P, LU D, *et al.* Metabolic engineering of *Torulopsis glabrata* for improved pyruvate production [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2005, **36**(5/6): 832-839.
- [68] ZELIĆ B, VASIĆ-RAČKI Đ, WANDREY C, *et al.* Modeling of the pyruvate production with *Escherichia coli* in a fed-batch bioreactor [J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2004, **26**(4): 249-258.
- [69] 肖慧萍, 邱祖民, 郑典模, 等. 苯丙酮酸的合成进展 [J]. *内蒙古工业大学学报(自然科学版)*, 2002, **21**(1): 9-15.
- XIAO H P, QIU Z M, ZHENG D M, *et al.* The synthetic development of phenylpyruvic acid [J]. *Journal of Inner Mongolia Polytechnic University(Natural Science Edition)*, 2002, **21**(1): 9-15.
- [70] PANTALEONE D P, GELLER A M, TAYLOR P P. Purification and characterization of an L-amino acid deaminase used to prepare unnatural amino acids [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2001, **11**(4/5/6): 795-803.
- [71] COBAN H, DEMIRCI A, PATTERSON P, *et al.* Screening of phenylpyruvic acid producers and optimization of culture conditions in bench scale bioreactors [J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2014, **37**(11): 2343-2352.
- [72] SMIT J A. Specific activity of phenylalanine deaminase in extracts of the proteus-providence group [J]. *Nature*, 1966, **211**(5052): 1003.
- [73] 陈坚, 周景文, 刘龙. 新型有机酸的生物法制造技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2015: 265-274.
- CHEN J, ZHOU J W, LIU L. Synthesis of Organic Acids by Biological Methods [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2015: 265-274.
- [74] MATZI V, LINDENMANN J, MUENCH A, *et al.* The impact of preoperative micronutrient supplementation in lung surgery. A prospective randomized trial of oral supplementation of combined

- α -ketoglutaric acid and 5-hydroxymethylfurfural [J]. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 2007, **32**(5): 776-782.
- [75] LOCKWOOD L B, STODOLA F H. Preliminary studies on the production of alpha-ketoglutaric acid by *Pseudomonas fluorescens* [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1946, **164**: 81-83.
- [76] TANAKA K, KIMURA K, YAMAGUCHI K. Process for producing L-glutamic acid and alpha-ketoglutaric acid: US 3450599A[P]. 1969-06-17.
- [77] FINOGENOVA T V, LOZINOV A B, BELIKOV V M, *et al.* Keto-acid production by paraffin-oxidizing yeasts [J]. *Mikrobiologiya*, 1968, **37**(1): 38-43.
- [78] YUZBASHEV T V, YUZBASHEVA E Y, SOBOLEVSKAYA T I, *et al.* Production of succinic acid at low pH by a recombinant strain of the aerobic yeast *Yarrowia lipolytica* [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2010, **107**(4): 673-682.
- [79] BEOPOULOS A, CESCUT J, HADDOUCHE R, *et al.* *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production [J]. *Progress in Lipid Research*, 2009, **48**(6): 375-387.
- [80] IL'CHENKO A P, CHERNYAVSKAYA O G, SHISHKANOVA N V, *et al.* Metabolic characteristics of the mutant *Yarrowia lipolytica* strain 1 producing alpha-ketoglutaric and citric acids from ethanol and the effect of NH_4^+ and O_2 on yeast respiration and acidogenesis [J]. *Microbiology*, 2001, **70**(2): 151-157.
- [81] IL'CHENKO A P, CHERNYAVSKAYA O G, SHISHKANOVA N V, *et al.* Metabolism of *Yarrowia lipolytica* grown on ethanol under conditions promoting the production of alpha-ketoglutaric and citric acids: a comparative study of the central metabolism enzymes [J]. *Microbiology*, 2002, **71**(3): 269-274.
- [82] FOERSTER A, JACOBS K, JURETZKE T, *et al.* Overexpression of the *ICL1* gene changes the product ratio of citric acid production by *Yarrowia lipolytica* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, **77**(4): 861-869.
- [83] HOLZ M, FOERSTER A, MAUERSBERGER S, *et al.* Aconitase overexpression changes the product ratio of citric acid production by *Yarrowia lipolytica* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, **81**(6): 1087-1096.
- [84] YIN X, MADZAK C, DU G, *et al.* Enhanced alpha-ketoglutaric acid production in *Yarrowia lipolytica* WSH-Z06 by regulation of the pyruvate carboxylation pathway [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, **96**(6): 1527-1537.
- [85] HOLZ M, OTTO C, KRETZSCHMAR A, *et al.* Overexpression of alpha-ketoglutarate dehydrogenase in *Yarrowia lipolytica* and its effect on production of organic acids [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, **89**(5): 1519-1526.
- [86] ROMÁN-LESHKOV Y, CHHEDA J N, DUMESIC J A. Phase modifiers promote efficient production of hydroxymethylfurfural from fructose [J]. *Science*, 2006, **312**(5782): 1933-1937.
- [87] LEWKOWSKI J. Synthesis, chemistry and applications of 5-hydroxymethylfurfural and its derivatives [J]. *Arkivoc*, 2001: 17-54.
- [88] CHRISTENSEN C H, RASS-HANSEN J, MARSDEN C C, *et al.* The renewable chemicals industry [J]. *ChemSusChem*, 2008, **1**(4): 283-289.
- [89] ZHU J, CAI J, XIE W, *et al.* Poly(butylene 2,5-furan dicarboxylate), a biobased alternative to PBT: synthesis, physical properties, and crystal structure [J]. *Macromolecules*, 2013, **46**(3): 796-804.
- [90] KAMM B. Production of platform chemicals and synthesis gas from biomass [J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2007, **46**(27): 5056-5058.
- [91] CASANOVA O, IBORRA S, CORMA A. Biomass into chemicals: aerobic oxidation of 5-hydroxymethyl-2-furfural into 2,5-furandicarboxylic acid with gold nanoparticle catalysts [J]. *ChemSusChem*, 2009, **2**(12): 1138-1144.
- [92] CARLINI C, PATRONO P, GALLETTI A M R, *et al.* Selective oxidation of 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde to furan-2,5-dicarboxaldehyde by catalytic systems based on vanadyl phosphate [J]. *Applied Catalysis A: General*, 2005, **289**(2): 197-204.
- [93] GORBANEV Y Y, KLITGAARD S K, WOODLEY J M, *et al.* Gold-catalyzed aerobic oxidation of 5-hydroxymethylfurfural in water at ambient temperature [J]. *ChemSusChem*, 2009, **2**(7): 672-675.
- [94] THOMAS S M, DICOSIMO R, NAGARAJAN V. Biocatalysis: applications and potentials for the chemical industry [J]. *Trends in Biotechnology*, 2002, **20**(6): 238-242.
- [95] VAN DEURZEN M P J, VAN RANTWIJK F, SHELDON R A. Chloroperoxidase-catalyzed oxidation of 5-hydroxymethylfurfural [J]. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 1997, **16**(3): 299-309.
- [96] KOOPMAN F, WIERCKX N, DE WINDE J H, *et al.* Identification and characterization of the furfural and 5-(hydroxymethyl)furfural degradation pathways of *Cupriavidus basilensis* HMF14 [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, **107**(11): 4919-4924.
- [97] KOOPMAN F, WIERCKX N, DE WINDE J H, *et al.* Efficient whole-cell biotransformation of 5-(hydroxymethyl)furfural into FDCA, 2,5-furandicarboxylic acid [J]. *Bioresource Technology*, 2010, **101**(16): 6291-6296.
- [98] DIJKMAN W P, FRAAIJE M W. Discovery and characterization of a 5-hydroxymethylfurfural oxidase from *Methylovorus* sp. strain MP688 [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, **80**(3): 1082-1090.
- [99] DIJKMAN W P, GROOTHUIS D E, FRAAIJE M W. Enzyme-catalyzed oxidation of 5-hydroxymethylfurfural to furan-2,5-dicarboxylic acid [J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2014, **53**(25): 6515-6518.