

酿酒酵母生产羧酸的代谢工程策略

徐国强^{1,2}, 刘立明^{1,2*}, 陈坚^{1,2*}

江南大学,¹ 食品科学与技术国家重点实验室,² 工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122

摘要:羧酸广泛地应用于食品、医药和化工等行业,具有广阔的市场前景。作为真核模式微生物,酿酒酵母作为代谢工程平台用来生产有机酸具有明显优势。本文论述了酿酒酵母生产重要羧酸的策略:首先构建一条能够和糖酵解途径相连接的高效的重要羧酸积累途径,进而探讨如何将碳代谢流由乙醇转向目的产物,在此基础上研究有机酸的转运及涉及到的能量问题。最后,对当前研究存在的问题进行了分析,并对未来研究方向进行了展望。

关键词: 酿酒酵母, 羧酸, 代谢工程, 系统生物学

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2011) 12-1571-07

作为一类重要的有机酸,羧酸广泛应用于食品、医药、化工以及化妆品、畜牧、纺织等行业中,具有广阔的市场应用前景^[1]。其中,延胡索酸、苹果酸和琥珀酸,因是可源于生物质的平台化合物,其生产工艺的研究受到美国能源部的高度重视^[2]。目前,广泛应用于工业领域中的羧酸主要采用化学合成法生产,然而,该工艺因原料有限、环境污染严重、生产成本高昂等问题,其产能的进一步扩大受到了限制。而以可再生生物质为原料,采用微生物细胞及其酶系生产羧酸因原料来源广泛、对环境污染少而引起研究人员的广泛关注。在这一生产方法中,以细菌^[3]、丝状真菌^[4]、酵母属^[5]以及重组大肠杆菌^[6-7]等工业微生物,对糖质原料进行生物转化,成功实现了部分羧酸的高效生产。然而,该工艺遇到:(1)原料成本高:有些生产菌株营养需求复杂,增加了原料成本;(2)生理稳定性较差:某些生产菌株抵

御不利环境如酸、高渗透压及营养环境因素胁迫的能力较弱,导致生产效率低下;(3)代谢工程改造困难:由于部分工业生产菌株为非模式生物,缺乏充足的遗传背景知识,限制了代谢工程改造策略的应用;(4)目标产品应用范围有限:部分生产菌株分泌毒素或自身具有致病性,限制了目标产品的应用范围。因此,选择合适的生产菌株是目前国内外利用微生物高效制造羧酸面临的关键科学问题之一。

为了实现微生物发酵生产羧酸的工业化生产,羧酸生产菌株应具有:在简单培养基上快速生长和较强的非生宜环境的适应性、遗传改造操作简便、较高的安全性等特性。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)作为一种真核模式微生物,因具有:遗传信息丰富,代谢改造操作方便;营养需求简单,生化分离工艺成本低廉;在低 pH 条件(甚至 pH < 3.0)下生长良好;能耐受高浓度的底物;被 FDA 认证为

基金项目:国家“973 项目”——国家重大基础研究发展规划项目(2007CB714306);全国优秀博士学位论文作者专项资金(200962);教育部新世纪优秀人才基金(NCET-10-0456);江南大学博士研究生科学研究基金

* 通信作者。Tel/Fax: +86-510-85197875; E-mail: mingll@jiangnan.edu.cn; jchen@jiangnan.edu.cn

作者简介:徐国强(1984-),男,湖北孝感人,博士研究生,主要从事微生物代谢工程方面的研究。E-mail: xuguoqiang@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2011-05-18;修回日期:2011-06-20

GRAS(Generally Regarded As Safe) 微生物^[8], 发酵产品具有安全性等优点而成为发酵生产羧酸的潜在最适微生物。然而, *S. cerevisiae* 自身并不具备过量积累目标羧酸的代谢途径和转运系统, 且容易生成大量的副产物乙醇。因此需要对其进行遗传改造以促进目标羧酸的积累。代谢工程改造 *S. cerevisiae* 生产目标羧酸的策略包括: (1) 构建羧酸的积累途径; (2) 抑制或减弱副产物的合成途径; (3) 强化羧酸的转运途径。本文结合代谢工程改造 *S. cerevisiae* 生产羧酸的典型研究实例, 详细阐述代谢工程及其策略在改造 *S. cerevisiae* 生产羧酸的研究进展, 以为相关研究提供可借鉴的思路。

1 构建羧酸的积累途径

为了使 *S. cerevisiae* 过量积累目标羧酸, 可通过 (1) 对已有的代谢途径进行改造; (2) 引入新的合成途径等策略构建一条与糖酵解途径连接的目标羧酸合成途径。

对已有代谢途径进行代谢改造的策略主要是缺失或弱化关键酶后使得目标羧酸通过氧化 TCA 途径、乙醛酸途径, 或同时以这两种途径等进行合成。相应的代谢工程策略已成功应用于琥珀酸和延胡索酸等的代谢改造。Raab AM 等^[9] 通过缺失编码琥珀酸脱氢酶和异柠檬酸脱氢酶的基因 *SDH1*, *SDH2*, *IDH1* 和 *IDP1* 将碳代谢流转向乙醛酸循环, 琥珀酸的产量为 3.62 g/L (产率为 0.11 mol/mol) (图 1 - A)。类似地, Kaclikova E 等^[10] 缺失编码线粒体里的富马酸酶, 使得延胡索酸通过 TCA 的氧化途径和乙醛酸循环途径进行合成 (图 1 - B)。另外, 通过 TCA 氧化途径、乙醛酸循环途径也可高效合成苹果酸 (图 1 - C, D), 其最大理论得率分别为 1 mol/mol 和 1.33 mol/mol^[2]。然而, 对 *S. cerevisiae* 现有代谢途径进行改造最大理论得率相对较低且目标羧酸的产量无法达到预期最高产量。

引入新的合成途径策略可使细胞积累本身不能积累的目标产物。例如, 在 *S. cerevisiae* 中引入外源的乳酸脱氢酶基因 (*L-dhd*), 使碳代谢流流向 L-乳酸, 乳酸产量达到 122 g/L^[11-12]。引入新的合成途径, 还可提高目标羧酸的理论产率系数。如果 *S. cerevisiae* 通过胞质还原 TCA 途径来积累 C4 二元羧酸, 最大理论产率达到 2 mol/(mol glucose), 成为

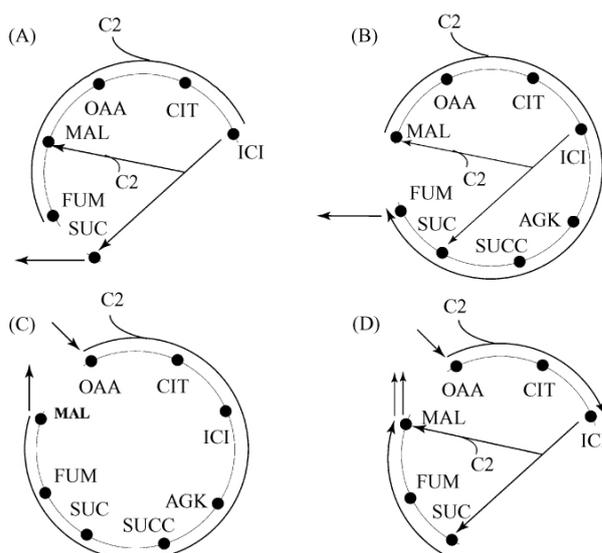


图 1 *S. cerevisiae* 中自身的代谢途径改造后可积累的 C4 二元羧酸及相应的合成途径

Fig. 1 Accumulation of C4-dicarboxylate by modifying native metabolic pathway and corresponding synthetic pathways in *S. cerevisiae*. (A) succinate-the glyoxylate cycle; (B) fumarate-oxidative TCA cycle and the glyoxylate cycle; (C) malate-oxidative TCA cycle; (D) malate-the glyoxylate cycle.

二元羧酸的最理想合成途径。基于这一考虑, 在 *S. cerevisiae* 胞质中过量表达编码苹果酸脱氢酶的基因, 可使 *S. cerevisiae* 大量积累苹果酸^[2, 13]。类似地, 本研究室将源于米根霉 (*Rhizopus oryzae*) 的苹果酸脱氢酶基因 (*RoMDH*) 及富马酸酶基因 (*RoFUM1*) 克隆到 *S. cerevisiae*, 可使 *S. cerevisiae* 通过胞质还原途径合成延胡索酸^[14]。有趣的是, 利用胞质还原 TCA 途径合成 C4 二元羧酸中涉及 CO₂ 的固定 (图 2)。尽管在微生物细胞中的 6 条固定 CO₂ 的代谢途径中, CBB (Calvin Benson Bassham) 循环途径研究得最为广泛 (主要源于微藻类), 但研究发现: 通过还原 TCA 途径固定二氧化碳具有更高的能量效率^[15]。因此, 通过还原 TCA 途径高效地固定 CO₂ 作为碳源生产 C4 二元羧酸引起了广泛的兴趣。

但是, 通过还原 TCA 途径积累 C4 二元羧酸的研究中涉及到两个关键科学问题: 一是需要通过补给反应提供大量的碳代谢流, 以提高目标羧酸的产率; 二是需要充足的 ATP, 以满足目标羧酸转运所需。由于丙酮酸羧化酶 (PYC) 提供的补给反应没有净的 ATP 产生, 细胞需要额外地消耗部分碳源以提供转运过程中所需的 ATP, 导致目标羧酸的产率系数显著下降。有两种酶可望替代 PYC 发挥补给作

用(图2):(1)磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PEPCK),该酶经改造后直接将磷酸烯醇式丙酮酸转化为草酰乙酸,每摩尔反应净增1摩尔ATP分子^[16];(2)苹果酸酶(ME),该酶改造后可直接将丙酮酸转化为苹果酸,同样净增1摩尔ATP/摩尔反应^[17]。因此,在后续研究可选择改造后的PEPCK*和ME*作为补给反应酶,将有利于细胞全局的能量平衡。

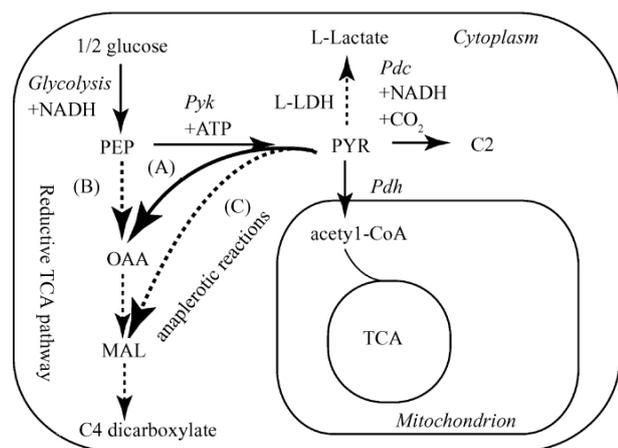


图2 *S. cerevisiae* 中补给还原 TCA 途径的 3 种反应

Fig.2 Three anaplerotic reactions for reductive TCA pathway in *S. cerevisiae*. (A) PYC: pyruvate to oxaloacetate; (B) PEPCK*: phosphoenolpyruvate to oxaloacetate; (C) ME*: pyruvate to malate. Abbreviations of metabolites: PEP, phosphoenolpyruvate; PYR, pyruvate; OAA, oxaloacetate; MAL, malate. Abbreviations of enzymes: Pyk, pyruvate kinase; Pdh, pyruvate dehydrogenase. Pyc, pyruvate carboxylase; PEPCK*, denotes mutated form of phosphoenolpyruvate carboxykinase; ME*, denotes mutated form of malic enzyme.

为了实现目标羧酸的大量积累,除了强化目标羧酸的合成途径外,还需阻断目标羧酸进一步代谢的途径。通常的代谢工程策略包括:敲除或下调编码目标羧酸进一步代谢的关键酶基因;抑制催化目

标羧酸降解的关键酶活性;强化目标羧酸的转运途径。如在代谢改造 *S. cerevisiae* 生产琥珀酸的过程中,通过缺失琥珀酸脱氢酶可有效地减少琥珀酸的进一步降解,提高琥珀酸对葡萄糖的产率^[18-20]。

2 降低乙醇代谢通量

S. cerevisiae 中丙酮酸脱氢酶旁路代谢具有重要的生理作用,包括:(1)促进 NAD^+ 的再生,维持胞内氧化还原平衡;(2)合成胞质乙酰辅酶 A,为合成细胞组成成分和氨基酸代谢提供前体;(3)产生乙醇,抑制其它微生物细胞的生长,提供生态学优势。但是,乙醇的产生导致大量碳代谢流及 NADH 等辅因子损失,从而导致 *S. cerevisiae* 不能大量积累丙酮酸。而目标羧酸积累所需的碳代谢流主要源于胞内丙酮酸库^[21],因此,通过调控关键酶的活性和胞内辅因子水平两种策略降低流向乙醇代谢节点的碳代谢通量,使碳代谢流大量积聚于丙酮酸节点,是代谢改造 *S. cerevisiae* 生产羧酸的研究重点之一。

2.1 调控关键酶的活性

乙醇合成途径的关键酶包括丙酮酸脱羧酶(pyruvate decarboxylase)和乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase)。因此,围绕上述两个关键酶,目前减少或消除乙醇积累的策略包括:(1)缺失乙醇脱氢酶;(2)缺失丙酮酸脱羧酶;(3)同时弱化丙酮酸脱羧酶和乙醇脱氢酶。详细信息列于表1。除上述3种策略以外,采用自身的或外源的基因替换 *PDC1* 和 *ADH1* 的结构基因,使其在 *PDC1* 和 *ADH1* 自身启动子的控制下进行整合表达。既能有效地降低乙醇的代谢通量,又能异源构建目标羧酸的合成途径^[22]。通过这种整合策略构建的基因工程菌,遗传稳定性好,利于目标羧酸的工业化生产。

表1 调控乙醇合成途径中关键酶活性的代谢工程策略

Table 1 Metabolic engineering strategies for manipulation of key enzymes activities in ethanol pathway

Strategies and genes for deletion	Advantage	Disadvantage	References
I: <i>ADH1</i> 2, 3, 4 or <i>ADH1</i>	Leads to lower ethanol titers	Caused the accumulation of glycerol and toxic acetaldehyde which leads to the poor growth.	[23-24]
II: <i>PDC1</i> 5 6	Completely eliminates alcoholic fermentation	Fail to grow on glucose as the sole carbon source and are hypersensitive to high glucose concentration	[25]
III: <i>PDC1</i> <i>ADH1</i>	Can grow on glucose minimal medium; the yield of ethanol was decreased	The specific growth rate was decreased on glucose by half compared to the single <i>pdcl</i> mutant	[22]

2.2 调控辅因子的水平

微生物细胞内氧化还原状态由 NADH/NAD^+ 比率决定, *S. cerevisiae* 在好氧条件大量合成乙醇的原因是:糖酵解速率超过呼吸速率,使得糖酵解产生的 H^+ 在传递给 O_2 时受到限制,从而导致 *S. cerevisiae* 通过溢流代谢合成乙醇^[26]。因此,在好氧的条件下,通过过量表达外源的 NADH 氧化酶减弱溢流代谢,可显著减少副产物乙醇的积累。赵亮亮等^[27]将来源于 *Streptococcus pneumoniae* 的 NADH 氧化酶(*nox*)过量表达于能够积累乳酸的代谢工程菌 *S. cerevisiae* 中,副产物乙醇浓度从16.2 g/L下降到8.2 g/L。

硫胺素焦磷酸(ThDP)作为丙酮酸脱羧酶和丙酮酸脱氢酶的重要辅因子,在调控丙酮酸代谢方面发挥着重要作用^[28]。Yonehara, T等^[29]在培养基中添加硫胺素结构类似物,干扰了 *S. cerevisiae* 的硫胺素的合成途径,使 *S. cerevisiae* 积累36.9 g/L丙酮酸,丙酮酸对葡萄糖的产率为0.37 g/g。但通过添加酶的抑制剂会引起产品的不安全性,限制了产品的应用范围。本研究的前期研究结果表明,通过敲除 *S. cerevisiae* 中硫胺素合成途径的调控基因,弱化

硫胺素的合成能力,有效地降低了乙醇的浓度,并显著促进了丙酮酸的积累,为降低乙醇代谢通量提供了新的策略。

3 强化羧酸的转运途径

在利用 *S. cerevisiae* 发酵生产目标羧酸的过程中,如何将胞内目标羧酸快速高效地转运到胞外是提高目标羧酸生产效率的关键之一。在 *S. cerevisiae* 已完成注释的全基因组序列中,约有30%基因编码细胞膜上的蛋白,这些膜蛋白中有10%的蛋白负责小分子物质的跨膜运输^[30]。其中,注释的有功能活性的转运蛋白有606个(<http://www.yeastgenome.org/>)。

羧酸是一种弱酸,在水溶液中处于部分解离状态。羧酸本身的 pK_a 值以及溶液的 pH 值决定了其在溶液中的存在形式,进而决定其透过细胞膜的方式。对于非解离状态的羧酸,主要通过不消耗能量的被动运输方式如自由扩散和促进扩散进行;而对于解离状态的羧酸,则采用消耗能量的主动运输方式进行(图3)。

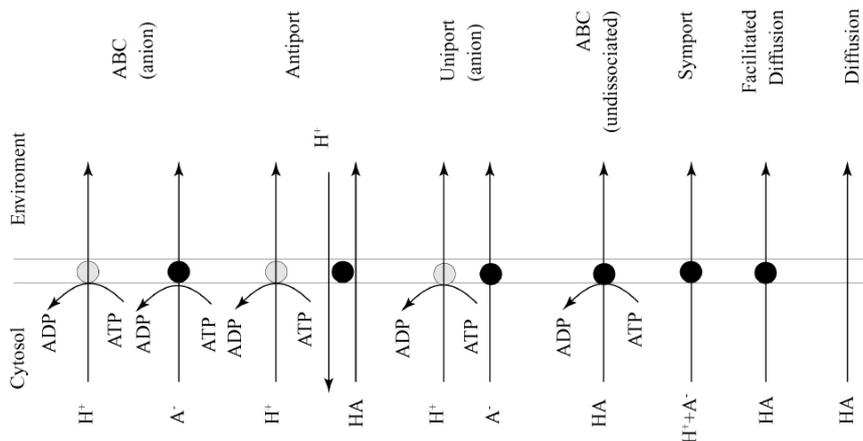


图3 酿酒酵母中一元羧酸可能的几种转运机制^[31]

Fig. 3 Several possible mechanisms for export of weak monocarboxylic acids from *S. cerevisiae*^[31].

已有研究表明 *S. cerevisiae* 仅能通过自由扩散的方式缓慢地吸收处于非解离状态的苹果酸^[32]。由于微生物细胞胞质的 pH 值为 $\text{pH} 6-7$, 此时细胞内的羧酸主要以解离状态存在,因此,羧酸根离子采用主动运输的方式转运到胞外。通过表达外源的羧酸转运蛋白,可显著提高羧酸的转运能力。例如,将源于栗酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)编码

苹果酸透性酶的基因 *SpMAE1* 于 *S. cerevisiae* 中过量表达,显著提高胞内苹果酸向胞外的转运速率^[33],而这种转运机制被认为是质子同向运输^[34]。

但是,上述关于转运的研究没有涉及到能量的平衡问题,其结果是导致了目标羧酸的得率系数下降。因此,能量需求及其供应成为提高羧酸转运效率的关键。若微生物细胞无法提供足够的能量,羧

酸转运就会停止,如在 *S. cerevisiae* 的同型乳酸发酵过程中,氧气停止供应则导致乳酸的发酵停止^[35]。针对这一问题,已有研究试图将羧酸积累途径的构建和羧酸转运所需 ATP 的供给相结合。如在通过还原 TCA 途径积累 C4 二羧酸时,采用经改造的 PEPC 或 ME 代替 PYC,在为 TCA 循环补给碳代谢流的同时提供了细胞维持生理代谢所需的能量^[16-17]。

4 结论和展望

代谢工程改造 *S. cerevisiae* 生产羧酸取得了显著的进展,表现为丙酮酸、乳酸和苹果酸等典型羧酸不仅在实验室规模而且在工业化生产中实现了较高的产量和产率。例如,*S. cerevisiae* 经代谢改造后,通过分批补料培养,丙酮酸的产量达到 135 g/L,丙酮酸对葡萄糖的产率为 0.54 g/g^[25]。但是,在代谢工程改造 *S. cerevisiae* 生产羧酸及其工业化生产过程中还面临如下难题:(1)产量低,难以实现工业化生产;(2)外源基因表达等代谢工程改造加重了 *S. cerevisiae* 生理负担,导致细胞生长缓慢,生产强度低;(3)工业生产环境与实验室水平环境的巨大差异,导致 *S. cerevisiae* 因面临多种环境胁迫致使生产效率低下。上述问题的实质在于:除了采用代谢工程修饰关键基因外,还应当在对代谢网络结构进行准确分析的基础上,重视微生物细胞内能荷水平和氧化还原状态等胞内微环境对代谢网络调控的研究以及提升微生物细胞抵御环境胁迫的能力的研究。因此,这些问题的存在,意味着我们需要从细胞全局的代谢网络和适应环境变化的调控网络重新进行研究、设计和改造。

以 *S. cerevisiae* 全基因组序列为基础,研究者们发展了大量的系统生物学研究策略,为从全局水平上理解和调控 *S. cerevisiae* 的生理代谢功能奠定了坚实的基础^[36]。借助高通量组学分析技术和全基因组规模代谢网络模型, Lee Sang Yup 发展了系统代谢工程策略^[37]:在对复杂微生物代谢和调控网络进行全局分析的基础上,定向性地对靶基因进行遗传改造,所获得的代谢工程菌不仅有效地促进目标产物的积累,减少副产物的产生,同时不会对细胞生长造成过多影响。因此,未来将系统生物学的技术应用到代谢工程改造 *S. cerevisiae* 生产羧酸的领域,将更加有效地促进羧酸的积累,减少代谢产生的副

反应,提升微生物细胞抵御环境胁迫能力。

参考文献

- [1] Sauer M, Porro D, Mattanovich D, Branduardi P. Microbial production of organic acids: expanding the markets. *Trends in Biotechnology*, 2008, 26(2): 100-108.
- [2] Werpy T., and G. Petersen. Top value added chemicals from biomass: I. Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas. U. S. Department of Energy, Washington DC, 2004.
- [3] Vaidya AN, Pandey RA, Mudliar S, Kumar MS, Chakrabarti T, Devotta S. Production and Recovery of Lactic Acid for Polylactide—An Overview. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2005, 35(5): 429-467.
- [4] Xu Q, Li S, Fu Y, Tai C, Huang H. Two-stage utilization of corn straw by *Rhizopus oryzae* for fumaric acid production. *Bioresource Technology*, 2010, 101(15): 6262-6264.
- [5] Qin Y, Liu LM, Xu S, Chen J. Accelerating glycolytic flux of *Torulopsis glabrata* CCTCC M202019 at high oxidoreduction potential created using potassium ferricyanide. *Biotechnology Progress*, 2010, 26(6): 1551-1557.
- [6] Zhang X, Jantama K, Shanmugam KT, Ingram LO. Re-engineering *Escherichia coli* for succinate production in mineral salts medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(24): 7807-7813.
- [7] Zhang X, Jantama K, Moore JC, Jarboe LR, Shanmugam KT, Ingram LO. Metabolic evolution of energy-conserving pathways for succinate production in *Escherichia coli*. *Proceeding of the National Academy of Science of United States of America*, 2009, 106(48): 20180-20185.
- [8] Nevoigt E. Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2008, 72(3): 379-412.
- [9] Raab AM, Gebhardt G, Bolotina N, Weuster-Botz D, Lang C. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the biotechnological production of succinic acid. *Metabolic Engineering*, 2010, 12(6): 518-525.
- [10] Kaclikova E, Lachowicz TM, Gbelska Y, Subik J. Fumaric acid overproduction in yeast mutants deficient in fumarase. *Fems Microbiology Letters*, 1992, 70(2): 101-106.

- [11] Saitoh S , Ishida N , Onishi T , Tokuhiko K , Nagamori E , Kitamoto K , Takahashi H. Genetically engineered wine yeast produces a high concentration of L-lactic acid of extremely high optical purity. *Applied and Environmental Microbiology* , 2005 , 71 (5) : 2789-2792.
- [12] Ishida N , Saitoh S , Ohnishi T , Tokuhiko K , Nagamori E , Kitamoto K , Takahashi H. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient production of pure L-(+)-lactic acid. *Applied Biochemistry and Biotechnology* , 2006 , 129-132 : 795-807.
- [13] Pines O , Shemesh S , Battat E , Goldberg I. Overexpression of cytosolic malate dehydrogenase (MDH2) causes overproduction of specific organic acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 1997 , 48 (2) : 248-255.
- [14] 刘立明 , 徐国强 , 段宁骏 , 庄洪波 , 陈坚. 一种产延胡索酸的酿酒酵母基因工程菌及其构建方法和应用. 中国 : 201010559061.3
- [15] Boyle NR , Morgan JA. Computation of metabolic fluxes and efficiencies for biological carbon dioxide fixation. *Metabolic Engineering* , 2011 , 13 (2) : 150-158.
- [16] Zelle RM , Trueheart J , Harrison JC , Pronk JT , van Maris AJ. Phosphoenolpyruvate carboxykinase as the sole anaplerotic enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* , 2010 , 76 (16) : 5383-5389.
- [17] Zelle RM , Harrison JC , Pronk JT , van Maris AJ. Anaplerotic role for cytosolic malic enzyme in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Applied and Environmental Microbiology* , 2011 , 77 (3) : 732-738.
- [18] Arikawa Y , Kobayashi M , Kodaira R , Shimosaka M , Muratsubaki H , Enomoto K , Okazaki M. Isolation of sake yeast strains possessing various levels of succinate- and/or malate-producing abilities by gene disruption or mutation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* , 1999 , 87 (3) : 333-339.
- [19] Arikawa Y , Kuroyanagi T , Shimosaka M , Muratsubaki H , Enomoto K , Kodaira R , Okazaki M. Effect of gene disruptions of the TCA cycle on production of succinic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* , 1999 , 87 (1) : 28-36.
- [20] Kubo Y , Takagi H , Nakamori S. Effect of gene disruption of succinate dehydrogenase on succinate production in a sake yeast strain. *Journal of Bioscience and Bioengineering* , 2000 , 90 (6) : 619-624.
- [21] Abbott DA , Zelle RM , Pronk JT , van Maris AJ. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of carboxylic acids: current status and challenges. *Fems Yeast Research* , 2009 , 9 (8) : 1123-1136.
- [22] Tokuhiko K , Ishida N , Nagamori E , Saitoh S , Onishi T , Kondo A , Takahashi H. Double mutation of the *PDC1* and *ADH1* genes improves lactate production in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* expressing the bovine lactate dehydrogenase gene. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 2009 , 82 (5) : 883-890.
- [23] Skory CD. Lactic acid production by *Saccharomyces cerevisiae* expressing a *Rhizopus oryzae* lactate dehydrogenase gene. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* , 2003 , 30 (1) : 22-27.
- [24] Drewke C , Thielen J , Ciriacy M. Ethanol formation in *adh0* mutants reveals the existence of a novel acetaldehyde-reducing activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* , 1990 , 172 (7) : 3909-3917.
- [25] van Maris AJ , Geertman JM , Vermeulen A , Groothuizen MK , Winkler AA , Piper MD , van Dijken JP , Pronk JT. Directed evolution of pyruvate decarboxylase-negative *Saccharomyces cerevisiae* , yielding a C2-independent , glucose-tolerant , and pyruvate-hyperproducing yeast. *Applied and Environmental Microbiology* , 2004 , 70 (1) : 159-166.
- [26] Vemuri GN , Eiteman MA , McEwen JE , Olsson L , Nielsen J. Increasing NADH oxidation reduces overflow metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceeding of the National Academy of Science of United States of America* , 2007 , 104 (7) : 2402-2407.
- [27] 赵亮亮 , 汪军 , 周景文 , 刘立明 , 堵国成 , 陈坚. 双层面调控 *Saccharomyces cerevisiae* 碳流促进 L-乳酸积累. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*) , 2011 , 51 (1) : 50-58.
- [28] Hohmann S , Meacock PA. Thiamin metabolism and thiamin diphosphate-dependent enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: genetic regulation. *Biochimica et Biophysica Acta* , 1998 , 1385 (2) : 201-219.
- [29] Yonehara T , Yomoto K. Microbial production of pyruvic acid and its enhancement by thiamine. Japan: JP 62 201 589.
- [30] Casal M , Paiva S , Queiro's O , Soares-Silva I. Transport of carboxylic acids in yeasts. *Fems Microbiology Reviews* , 2008 , 32 : 974-994.

- [31] Zelle RM. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for C₄-dicarboxylic acid production. *Delft University of Technology PhD thesis*, 2011.
- [32] Salmon JM. L-malic acid permeation in resting cells of anaerobically grown *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1987, 901(1): 30-34.
- [33] Zelle RM, de Hulster E, van Winden WA, de Waard P, Dijkema C, Winkler AA, Geertman M, van Dijken JP, Pronk JT, van Maris AJ. Malic acid production by *Saccharomyces cerevisiae*: engineering of pyruvate carboxylation, oxaloacetate reduction, and malate export. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(9): 2766-2777.
- [34] Sousa MJ, Mota M, Leao C. Transport of malic acid in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*: evidence for a proton-dicarboxylate symport. *Yeast*, 1992, 8(12): 1025-1031.
- [35] van Maris AJ, Winkler AA, Porro D, van Dijken JP, Pronk JT. Homofermentative lactate production cannot sustain anaerobic growth of engineered *Saccharomyces cerevisiae*: possible consequence of energy-dependent lactate export. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(5): 2898-2905.
- [36] Nielsen J, Jewett MC. Impact of systems biology on metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Fems Yeast Research*, 2008, 8(1): 122-131.
- [37] Park JH, Lee SY, Kim TY, Kim HU. Application of systems biology for bioprocess development. *Trends in Biotechnology*, 2008, 26(8): 404-412.

Metabolic engineering strategies for carboxylic acids production by *Saccharomyces cerevisiae*—A review

Guoqiang Xu^{1 2}, Liming Liu^{1 2*}, Jian Chen^{1 2*}

¹ State Key Laboratory of Food Science and Technology, ² Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract: Carboxylatic acids have been widely used in food, pharmaceutical and chemical industries. As a eukaryotic model organism, *Saccharomyces cerevisiae* is thought as cell factory to produce organic acids through manipulating metabolic pathway. In this review, we addressed the metabolic engineering strategies to construct a high titer route converting pyruvate to target carboxylate, and to explore how to divert the carbon flux to desired product from ethanol. Furthermore, we also discussed the mechanisms for carboxylate transport and energy involved in. Finally, the relevant strategies for development in future are proposed.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, carboxylatic acids, metabolic engineering, systems biology

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Major state Basic Research Development Program of China (2007CB714306), by the National Outstanding Doctorate Paper Author Special Fund (200962), by the Program for New Century Excellent Talents in University (NCET-04-0456) and by the Doctor Candidate Foundation of Jiangnan University

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-510-85197875, E-mail: mingll@jiangnan.edu.cn, jchen@jiangnan.edu.cn

Received: 18 May 2011 / Revised: 20 June 2011