



微生物有机酸转运蛋白的研究进展

金利群, 李晓菡, 赵贝贝, 柳志强*, 郑裕国

浙江工业大学生物工程学院, 浙江 杭州 310014

金利群, 李晓菡, 赵贝贝, 柳志强, 郑裕国. 微生物有机酸转运蛋白的研究进展[J]. 微生物学报, 2023, 63(9): 3386-3408.
JIN Liqun, LI Xiaohan, ZHAO Beibei, LIU Zhiqiang, ZHENG Yuguo. Organic acid transporters in microorganisms[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(9): 3386-3408.

摘要: 转运蛋白是一类膜蛋白, 可介导生物膜内外化学物质的跨膜转运及信号交换。有机酸转运蛋白在微生物有机酸代谢的跨膜转运过程中发挥重要作用, 根据转运蛋白有机酸转运的方向不同可以分为摄取转运蛋白和外排转运蛋白。在微生物代谢中, 有些有机酸可以作为能源直接参与体内代谢, 有些是能量转换过程中的重要中间产物; 摄取转运蛋白的过表达, 可以促进微生物细胞获取能源物质, 高效的生产目标产物; 有机酸摄取转运蛋白敲除或外排转运蛋白表达, 有利于底盘细胞外排更多目标产物, 进而促进有机酸的生物合成。研究有机酸转运蛋白的结构和功能, 有助于解析微生物细胞有机酸生物合成及利用的机制, 对于提高工业微生物对有机酸的利用及生物合成具有重要作用。本文综述了微生物有机酸转运蛋白分类和结构、转运方式和转运功能等方面, 重点综述了转运蛋白在有机酸生产中的应用, 为工业微生物有机酸的高效生物合成及未来发展提供参考。

关键词: 转运蛋白; 有机酸; 摄取; 外排; 跨膜转运

Organic acid transporters in microorganisms

JIN Liqun, LI Xiaohan, ZHAO Beibei, LIU Zhiqiang*, ZHENG Yuguo

College of Biotechnology and Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China

Abstract: Transporters are membrane proteins that mediate the transmembrane transport and signal exchange of chemicals inside and outside the biological membrane. Organic acid

资助项目: 国家重点研发计划(2020YFA0908404); 浙江省科技计划(2022R52041)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2020YFA0908404) and the Department of Science and Technology of Zhejiang Province (2022R52041).

*Corresponding author. Tel: +86-571-88320614, E-mail: microlu@zjut.edu.cn

Received: 2023-01-17; Accepted: 2023-04-19; Published online: 2023-04-25

transporters play a key role in the transmembrane transport of microbial organic acid metabolism. They can be classified into uptake transporters and efflux transporters according to the different directions of organic acid transport. In microbial metabolism, some organic acids can directly participate in the metabolism as energy, and some are important intermediates in energy conversion. The overexpression of uptake transporters promotes the absorbance of energy substances and increases the yield of target products in microorganisms. The knockout of uptake transporters or the overexpression of efflux transporters contributes to the efflux of target products from chassis cells and thus promotes the biosynthesis of organic acids. Studying the structures and functions of organic acid transporters helps to decipher the mechanism of organic acid biosynthesis and utilization in microbial cells, which is of great significance for improving the utilization and biosynthesis of organic acids in industrial microorganisms. This paper introduces the classification, structures, transport modes, and transport functions of organic acid transporters in microorganisms and the application of these transporters in organic acid production. It provides references for the efficient biosynthesis and future development of organic acids in industrial microorganisms.

Keywords: transporter; organic acid; uptake; efflux; transmembrane transport

生物膜是物质交换的屏障,使细胞具有一个相对稳定的环境,同时在细胞内外进行物质运输。物质通过膜转运前后不发生化学变化,因此它一直是小分子生物技术生产中易忽视的一环。微生物代谢工程中,细胞作为一个系统,增强细胞对底物的摄取有助于提高底物的利用率和产物的合成;提高外排使产物能及时分泌,减少了细胞内代谢物积累而产生的细胞毒性,也在一定程度上避免了负反馈调节,从而进一步提高目标产物的合成;同时产物的高效外排有利于下游的分离纯化。要执行这样的功能就离不开细胞膜上的转运蛋白。

合成生物学领域的技术进步使得能够对各种微生物底盘细胞中的代谢途径进行快速而有效的设计和改造,使微生物底盘细胞能够产生极其多样的特异性代谢产物,并在细胞内积累到极高的浓度^[1-2]。转运蛋白是一类膜蛋白,可介导生物膜内外化学物质的跨膜转运及信号交换,广泛存在于微生物、植物和动物中,在营养物质摄取、代谢产物外排及信号转导等方

面起着重要作用。尽管一些代谢产物,如醇和酮,可以通过简单的被动扩散快速跨膜^[3-4],但许多产品,如短链单羧酸和二元羧酸等有机酸,在细胞内外不能透过膜,需要膜转运蛋白才能进行转运^[5-6]。有机酸不仅广泛应用于食品、化工、农业、医药和生物材料等领域,更是一类重要的生物基燃料,具有原料可再生、生产过程清洁的特点。有机酸的高效生物合成是当前研究的一个重要热点之一。利用微生物细胞合成有机酸后,需要借助于转运蛋白转运到胞外;同时一些生物合成的有机酸副产物借助摄取转运蛋白也能被微生物细胞重新摄取利用。常见的有机酸有脂肪族的一元有机酸、二元有机酸和多元羧酸,如乙酸、乳酸、琥珀酸、苹果酸和柠檬酸等,芳香族有机酸如苯甲酸、水杨酸和肉桂酸等,甚至更复杂的糖酸。本文将从目前文献报道的工业微生物生产菌中几类常见有机酸跨膜转运蛋白的类型和结构、转运方式和转运特征等方面进行综述,主要包括一元有机酸转运蛋白、二元有机酸转运蛋

白、多元有机酸转运蛋白和芳香族有机酸转运蛋白, 为开展工业微生物有机酸的高效生物合成及合成生物学研究提供参考。

1 一元有机酸转运蛋白

在微生物中, 常见的一元有机酸有甲酸、乙酸、丙酮酸、乳酸、葡萄糖酸以及泛酸。在国际生物化学与分子生物学学会命名委员会(Nomenclature Committee of the International Society for Biochemistry and Molecular Biology, NC-I-UBMB) 的分类系统(Transporter Classification Database, TCDB)^[7]中, 一元有机酸转运蛋白主要分布于电化学势驱动的转运蛋白大类和通道/微孔蛋白大类。对 TCDB 数据库(<http://www.tcdb.org>)进行检索, 发现微生物中甲酸转运蛋白大多属于甲酸盐/亚硝酸盐转运蛋白(formate/nitrite transporter, FNT)家族; 乙酸转运蛋白主要分布在 Na⁺ 共转运蛋白(solute:sodium symporter, SSS)家族和醋酸盐摄取转运蛋白(acetate uptake transporter, AceTr)家族; 丙酮酸转运蛋白主要分布在 SSS 家族和碳饥饿诱导肽转运蛋白(carbon starvation-inducing peptide transporters, CstA)家族; 乳酸转运蛋白主要分布在 AceTr 家族、唾液酸:H⁺ 共转运(sialate:H⁺ symporter, SHS)家族和乳酸渗透酶(lactate osmozyme, LctP)家族。葡萄糖酸转运蛋白主要属于葡萄糖酸盐:H⁺ 共转运(gluconate:H⁺ symporter, GntP)家族; 泛酸转运蛋白主要分布在 SSS 家族和胆汁酸:Na⁺ 共转运(bile acid:Na⁺ symporter, BASS)家族。其中, 仅有 FNT 家族属于通道/微孔蛋白大类, 该家族的蛋白属于通道蛋白且通常不需要能量的消耗来催化甲酸的扩散。其余的家族属于电化学势驱动的转运蛋白大类中的次级主动转运蛋白(TCDB 中归纳于 2.A 亚家族)。次级主动转运蛋

白共有的转运机制是细胞膜上的离子泵利用水解 ATP 释放的能量, 将细胞内的 Na⁺、H⁺ 等势能离子转运到细胞膜外侧, 形成跨膜的电化学势梯度, 次级主动转运蛋白就利用这种电化学势梯度进行有机酸的跨膜转运, 同时在膜外侧的势能离子可能顺电化学梯度流向膜内^[8]。次级主动转运蛋白的转运机制可以根据有机酸转运时是否有伴随物质可分为单独转运和共转运, 在共转运中, 又根据 2 种被转运物质的转运方向, 分为同向共转运和反向共转运。表 1 对一元有机酸的主要转运蛋白的基本特性进行了总结。

1.1 甲酸转运蛋白

FNT 家族包含了大多数微生物的甲酸转运蛋白。其中对大肠杆菌(*Escherichia coli*)中的甲酸盐转运蛋白通道(formate transporter channels, FocA)研究的最为透彻。2010 年, Falke 等^[9]发现 FocA 能双向转运甲酸, 转运机制为: 在中性培养基条件下, 甲酸在胞内积累, 被动扩散通过 FocA 蛋白通道^[10]; 当培养基 pH 较低时, 甲酸经 FocA 向细胞内转运, 保持胞内甲酸的平衡。研究表明, FocA 双向转运甲酸机制至少受控于 2 个关键结构特征: 一是 FocA 的 N-末端具有高度的灵活性, 能与 *E. coli* 内负责甲酸生成的丙酮酸甲酸裂解酶(pyruvate formate lyase, PflB)中的不同区域进行交联反应, 形成 PflB-FocA 复合物, 该复合物便于 FocA 监测细胞质中甲酸水平的变化来控制甲酸向低浓度方向转运^[11]; 二是 FocA 结构上保守的孔隙残基 Thr-91 和 His-209 共同控制甲酸在 FocA 通道上的转运^[12], pH 变化影响 H209 位点残基的质子化状态, 从而控制甲酸的摄取, T91 位点则直接参与甲酸在 FocA 上的外排^[13]。表征 FocA 蛋白的底物特异性, 发现它还能作为 D-乳酸的外排转运蛋白^[14]。

表 1 一元有机酸主要转运蛋白介绍

Table 1 Introduction of monobasic organic acid transporters

Monoprotic organic acid	Transporters	TC No.	Family	Organism	Other substrates	Mechanism
Formate	FocA	1.A.16.1.1	FNT	<i>E. coli</i>	Lactate	Channel-mediated diffusion
Acetate	ActP	2.A.21.7.2	SSS	<i>E. coli</i>	Glyoxylate and pyruvate	H ⁺ symport
	MctP	2.A.21.7.3	SSS	<i>R. leguminosarum</i>	Lactate, propionate, pyruvate, butyrate and α -hydroxybutyrate	H ⁺ symport
	Ady2	2.A.96.1.4	AceTr	<i>S. cerevisiae</i>	Lactate and pyruvate	H ⁺ symport
	YaaH	2.A.96.1.1	AceTr	<i>E. coli</i>	Succinate and pyruvate	H ⁺ symport
Pyruvate	MctC	2.A.21.7.3	SSS	<i>C. glutamicum</i>	Acetate and propionate	H ⁺ symport
	YjiY	2.A.114.1.9	CstA	<i>E. coli</i>	N/A	H ⁺ symport
Lactate	Jen1	2.A.1.12.2	SHS	<i>S. cerevisiae</i>	N/A	H ⁺ symport
	LctP	2.A.14.1.1	LctP	<i>E. coli</i>	Glycolate	H ⁺ symport
	GlcA	2.A.14.1.2	LctP	<i>E. coli</i>	Glycolate	H ⁺ symport
Gluconate	GntU	2.A.8.1.8	GntP	<i>E. coli</i>	N/A	H ⁺ symport
	GntT	2.A.8.1.4	GntP	<i>E. coli</i>	N/A	H ⁺ symport
Pantothenate	PanF	2.A.21.1.1	SSS	<i>E. coli</i>	N/A	Na ⁺ symport
	PanS	Not found	BASS	<i>S. enterica</i>	Ketopantoate and pantoate	Na ⁺ symport
	PanT1	Not found	BASS	<i>L. pseudomesenteroides</i>	N/A	Na ⁺ symport
	PanT2	Not found	BASS	<i>S. gallolyticus</i>	N/A	Na ⁺ symport
	PanT3	Not found	BASS	<i>S. intermedius</i>	N/A	Na ⁺ symport

根据 FocA 的结构特征以及转运机制可以有效地调控该转运蛋白, 使 FocA 在工业微生物中更好的应用。Kammel 等^[15]将 *E. coli* DH701 中 FocA 上 H209 残基替换为天冬酰胺或谷氨酰胺这 2 种不可质子化的氨基酸时, FocA 突变体起到高效外排甲酸的效果, 细胞外甲酸的浓度积累至约 30 mmol/(L·OD₆₀₀)(单位 OD₆₀₀ 的菌浓产生的甲酸浓度), 比含天然 FocA 通道细胞的培养基中的浓度高 3 倍。在 *E. coli* 生产琥珀酸中存在甲酸这类副产物在胞外积累量高的问题, Tang 等^[16]在菌株 *E. coli* JM109 中敲弱产甲酸的代谢支路关键酶, 以及敲除基因 *focA*, 副产物的积累量明显下降。另外, FocA 在防止细胞内 D-乳酸积累方面发挥着生理功能。Wang 等^[17]在利用粗甘油生产 D-乳酸的 *E. coli* 系统工程研究中, 在重组菌株 *E. coli* BL21 中增强了 FocA 蛋

白的表达, 减少了 D-乳酸在细胞内的积累从而提高培养基中的 D-乳酸浓度, D-乳酸的转化率从 55% 提升到 85.2%。

1.2 乙酸转运蛋白

据报道, 未解离形式的乙酸主要通过简单扩散进出细胞, 而解离形式需要转运蛋白系统的协助^[18]。乙酸是一种可以在水溶液中解离的弱羧酸, 因此细胞必须具有转运蛋白才能有效地将乙酸以阴离子形式输入或输出细胞。一直以来人们对乙酸外排转运蛋白的研究较少, 目前只了解在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中 Yro2 和 Mrh1 是乙酸外排转运蛋白^[19]。相较而言, 已在常见的细菌和真菌中表征了某些乙酸摄取转运蛋白。

SSS 家族中包含部分细菌的乙酸摄取转运蛋白。2003 年, Gimenez 等^[20]通过转座元件随

机干扰多个 *E. coli* 菌株中某一基因正常表达, 定位到一种能摄取乙醇酸的转运蛋白 ActP, 通过 RNA 印迹法(Northern blotting)发现编码 ActP 蛋白的基因 *actP* 与其上游乙酰辅酶 A 合成酶基因 *acs* 共转录, 构成了乙酸摄取和乙酸同化的操纵子。进一步表征 ActP 的底物特异性, 发现它能识别具有单羧酸的短链脂肪族, 对乙酸、乙醛酸和丙酮酸均具有摄取活性^[20]。随后, 科研人员又发现属于 SSS 家族的 MctC 和 MctP 蛋白分别在谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*) 和豆科根瘤菌(*Rhizobium leguminosarum*)中均具有摄取乙酸的活性, 其中 MctC 在 *C. glutamicum* 中对丙酮酸摄取利用是必不可少的^[21], 这部分内容将在本文 1.3 节中详细介绍, MctP 对乳酸、丙酸、丙酮酸、丁酸和 α -羟基丁酸均表现摄取活性^[22]。

AceTr 家族作为摄取乙酸的主要蛋白家族, 该家族的蛋白几乎都是乙酸转运蛋白。其中研究

较为透彻的有 *S. cerevisiae* 中的 Ady2 蛋白以及 *E. coli* 中的 YaaH 蛋白。2004 年, Paiva 等^[23]对 *S. cerevisiae* 细胞从葡萄糖向乙酸转移的基因表达谱进行分析, Ady2 蛋白被鉴定为乙酸摄取关键蛋白, 通过 RNA 印迹法检查发现, Ady2 蛋白也能摄取乳酸以及丙酮酸。诱导该蛋白表达要满足 2 个条件, 一是在乙酸、乳酸以及丙酮酸存在的情况下诱导表达, 二是 Ady2 蛋白受某种转录因子 *cat8* 的调控, 促使该蛋白在碳源不足的情况下表达^[24]。2013 年, Sá-Pessoa 等^[25]基于同源性假设, 首次鉴别 YaaH 蛋白对乙酸的摄取活性, 并将 *E. coli* 中的基因 *actP* 和编码 YaaH 蛋白的基因 *yaaH* 同时敲除, 发现 *E. coli* 完全缺失摄取乙酸的能力来论证 *E. coli* 中只存在 2 种乙酸摄取转运蛋白 ActP 和 YaaH。表征 YaaH 的底物特异性, 发现它能摄取琥珀酸和乳酸^[25]。进一步表征 YaaH 的蛋白结构^[26], 发现它是一个六聚体(图 1A), 每个原体都有一个被 6 个跨膜

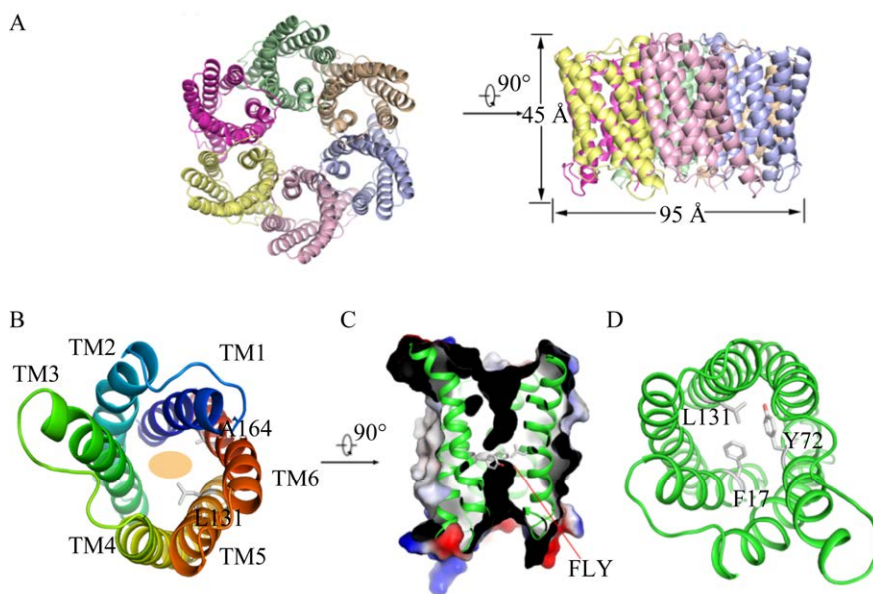


图 1 YaaH 转运蛋白的结构表征^[26]

Figure 1 Structural characterization of YaaH transporter^[26]. A: The ribbon representation of the hexameric YaaH. B: The ribbon representation of the protomer. N terminus in blue and the C terminus in red. The two residues (L131 and A164) with related substrate specificity are colored white. The axial passage in the center of the protomer is represented by a yellow ellipse. C: The overall structure of the protomer. D: The constrictive site (F17, Y72 and L131) in the center of the protomer is white.

(transmembrane, TM)结构包围的中心孔和 2 个相关底物特异性的残基 L131 和 A164 (图 1B), 立体旋转 90°观测原体的整体结构呈沙漏状, 在中心部分有一个收缩部位“FLY”(图 1C), 收缩部位由 3 个疏水残基(F17, Y72 和 L131)的侧链产生(图 1D), AceTr 家族中每个成员都有几乎相同的“FLY”^[26]。

乙酸与生物技术工业息息相关, 因为乙酸是微生物发酵过程中的高水平不良副产物, 乙酸在培养基中的积累会影响基因的转录翻译, 最终对细胞高密度培养和目标产物合成形成抑制^[27], 特别是微氧条件发酵。因此科研工作者们试图调控乙酸的摄取转运蛋白, 希望可以将培养基中的乙酸再次摄取来作为碳源, 减少培养基中乙酸的积累。据了解, *E. coli* 中全局调控因子 ArcA 一定程度上抑制 ActP 的表达^[28], 影响细胞对高浓度乙酸的摄取, 造成工业发酵后期培养环境中大量乙酸的积累。为解决乙酸积累的问题, Veeravalli 等^[29]将菌株 *E. coli* W3110 中的编码 ArcA 蛋白的基因 *arcA* 敲除, 乙酸积累量降为菌株 *E. coli* W3110 的 55%, 转录组结果表明, ActP 蛋白、乙酰辅酶 A 合成酶以及 TCA 循环中的一些酶蛋白的表达水平提高, 从而促进乙酸摄取和同化。Sá-Pessoa 等^[25]在菌株 *E. coli* MG1693 $\Delta yaaH\Delta actP$ 中质粒过表达 YaaH 来提高 *E. coli* 对乙酸的摄取, 在 pH 为 6.0 时, YaaH 最大摄取速率(V_{max})为每分钟每毫克蛋白摄取 8.72 nmol 乙酸; 当高表达 YaaH 的时候, V_{max} 为每分钟每毫克蛋白摄取 14.49 nmol 乙酸。另外, YaaH 也应用于加强对乳酸的摄取, Rendulić 等^[30]对 YaaH 和 Ady2 中的 2 个相关底物特异性的残基进行突变, 结果发现 YaaH (L131V 和 A164G)与 Ady2 (L219V 和 A252G)能加强对乳酸的摄取。

1.3 丙酮酸转运蛋白

丙酮酸在细胞中形成碳代谢的中心节点, 因

此对于大多数活细胞都是至关重要的。工业微生物生产菌在发酵过程中, 大量碳的加入导致丙酮酸在对数增长期溢出, 对数增长期结束进入稳定期时, 细胞会经历营养的限制并诱导丙酮酸的快速再摄取^[31]。本文主要关注丙酮酸的摄取转运蛋白。

SSS 家族和 AceTr 家族部分乙酸转运蛋白也能实现对丙酮酸的摄取, 如 1.2 节中提到的 ActP、MctC、MctP 以及 Ady2, 其中, MctC 蛋白是 *C. glutamicum* 摄取丙酮酸必不可少的。MctC 蛋白的功能特征为: 一是对乙酸的摄取活性高于丙酸和丙酮酸, 对丙酸的亲和力高于乙酸和丙酮酸; 二是当乙酸、丙酸或丙酮酸和葡萄糖等碳源作为混合碳源时, 它的摄取活性又受其他碳源的抑制; 三是在中性或酸性外部 pH 下乙酸和丙酸不需要依靠 MctC 蛋白也能透过 *C. glutamicum* 的细胞膜向内扩散, 丙酮酸则必须依靠 MctC 蛋白透过 *C. glutamicum* 的细胞膜向内扩散^[21]。

CstA 家族大部分转运蛋白能实现细菌在营养限制期(碳饥饿)对丙酮酸的摄取。目前被报道最多的是来自 *E. coli* 的蛋白 YjiY, 它与 OFA 家族的蛋白 YhjX 协同作用, 共同调控 *E. coli* 对丙酮酸的摄取。2017 年 Vilhena 等^[32]剖析了 *E. coli* 中 2 个相似的组氨酸激酶/反应调节系统 BtsS/BtsR 和 YpdA/YpdB 分别对 YjiY 和 YhjX 诱导表达的模型(图 2)。调控机制为: 细胞处于生长对数期之后的营养限制期(碳饥饿), 并在细胞外丙酮酸浓度大于 50 $\mu\text{mol/L}$ 时与 BtsS 结合, 激活 BtsS/BtsR 系统, 导致 YjiY 的表达^[33]。因此, YjiY 转运蛋白是高亲和力的丙酮酸转运蛋白, 在细胞需要高亲和力的摄取转运体来利用微量的丙酮酸作为碳源时, BtsS/BtsR 系统才能被激活。在细胞外丙酮酸浓度大于 600 $\mu\text{mol/L}$ 时激活 YpdA/YpdB 系统, 导致基因 *yhjX* 表达^[34]。

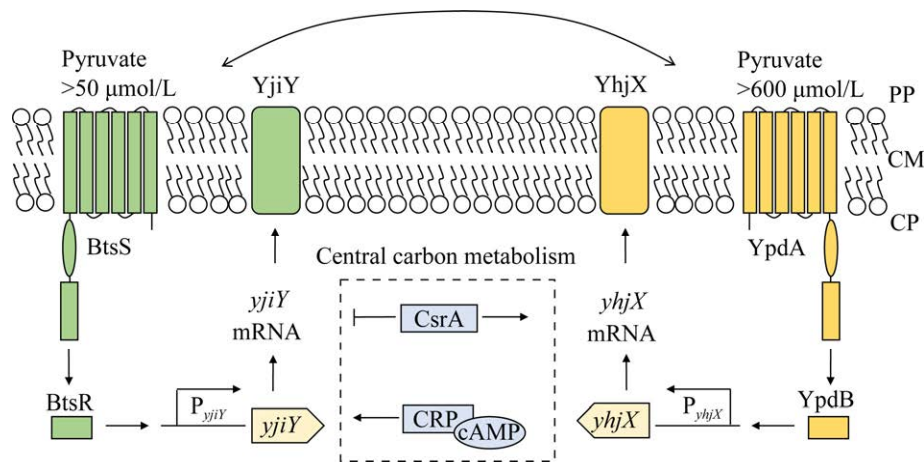


图2 大肠杆菌中营养敏感的 BtsS/BtsR 和 YpdA/YpdB 网络模型^[32]

Figure 2 Model of the nutrient-sensing BtsS/BtsR and YpdA/YpdB network in *Escherichia coli*^[32]. The model summarizes the signal transduction cascades triggered by the BtsS/BtsR and YpdA/YpdB systems and the influence of other regulatory elements. Activating (→) and inhibitory (⊥) effects are indicated. PP: Periplasm; CM: Cytoplasmic membrane; CP: Cytoplasm.

此外，碳饥饿激活的环腺苷酸受体蛋白复合物 cAMP-CRP^[35]诱导基因 *yjiY* 转录表达，而由碳过剩激活的碳储存调节剂 CsrA^[36]在转录后上调基因 *yhjX* 并下调基因 *yjiY*^[37]，2 个系统功能互连，相互影响。除了以上几种转运蛋白，枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)中还存在由 2 个组氨酸激酶/反应调节系统诱导的 YsbA 和 YsbB 蛋白参与丙酮酸的摄取转运^[38]；金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)中的 LrgA 和 LrgB 蛋白促进微需氧和厌氧生长过程中丙酮酸的摄取^[39]。

在工业微生物发酵过程中，加快以及加强丙酮酸的摄取，能提高菌株对原料的利用率，并在一定程度上提高产品产量。在 *C. glutamicum* 生产缬氨酸或赖氨酸的过程中，观察到丙酮酸的排泄，导致产品的产量低、产率低^[40-41]。Jolkver 等^[21]认为过表达 MctC 蛋白，可以实现丙酮酸的再利用，从而防止碳损失。相反，如果希望生产丙酮酸，则必须敲除基因 *mctC*，以避免产品的再吸收，并提高生产效率。Schlegel 等^[42]发现突变菌株 *E. coli* C41(DE3)^[43]中的基因 *btsS* 发生了

一个点突变导致了基因 *yjiY* 的组成型表达，使 YjiY 蛋白过度生产表达，保证了所有细胞独立于外部或内部因素对丙酮酸的充分摄取，赋予了工程菌过度生产的能力。

1.4 乳酸转运蛋白

SHS 家族中来自 *S. cerevisiae* 的蛋白 Jen1 是典型的乳酸转运蛋白，Jen1 能够参与乳酸的摄取和外排，并且 Jen1 对乳酸的亲合力是 Ady2 对乳酸亲和力的 7 倍^[44]。Jen1 蛋白依靠细胞膜上的质子驱动力，可以任意识别浓度较高一侧的乳酸，将浓度较高一侧的乳酸转运到浓度较低一侧^[45]。Jen1 的调控机制为在葡萄糖的存在下，Jen1 蛋白的活性会丧失^[46]，因此当菌株以葡萄糖为碳源生长时，在葡萄糖还未耗尽的生长对数期，该蛋白对乳酸的外排会受到抑制，使细胞内乳酸积累，抑制乳酸脱氢酶 Ldh 活性，导致乳酸生产的减少或停止^[47]。而在葡萄糖耗尽的平稳期，由于胞外乳酸浓度的增加，Jen1 又能对乳酸实现有效的摄取。其他种类的真菌均存在 Jen1 同源物，能够参与乳酸的有效摄取^[48]。

LctP 家族中许多结构功能相似的蛋白能够实现革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌以及古细菌对乳酸的转运。在 *E. coli* 中有 2 个底物特异性和动力学性质高度相似的 LctP 家族蛋白 LctP 和 GlcA^[49], 对乳酸和乙醇酸都具有一定摄取效果但对乙酸尚无作用效果, 究其原因 2 种蛋白的活性位点与底物的羧基和羟基相互作用^[49-50]。2 种蛋白的相似之处既表现在都能依靠质子驱动力有效地摄取乳酸和乙醇酸的能力上, 也表现在对 2 种底物的高表现亲和力上。不同点在于: 一是 LldP 在摄取乳酸方面最有效, 而 GlcA 在摄取乙醇酸方面最有效; 二是 LldP 是高度组成性表达, 与 GlcA 的高度诱导性相反; 三是 LldP 参与 *E. coli* 对 D-乳酸的摄取, 而 GlcA 表达对 D-乳酸的摄取无效^[50]。

乳酸是一种重要的化学物质, 在食品、制药和化学工业中有很多应用^[51]。特别地, 由 D-乳酸和 L-乳酸合成的聚乳酸(poly-lactic acid, PLA)被认为是一种可生物降解的环境友善材料, 对于取代石油化工产品的合成塑料具有很大的潜力^[52]。除了 FocA 应用于提高乳酸的外排。Pacheco 等^[53]在菌株 *S. cerevisiae* W303-1A 中异源表达来自干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*) 的乳酸脱氢酶 Ldh, 使 *S. cerevisiae* 细胞中能够产生乳酸, 并将菌株 W303-1A 中编码蛋白 Jen1 和 Ady2 的基因 *jen1* 和 *ady2* 分别敲除, 与野生型相比, 在葡萄糖耗尽后, 突变体 W303-1A-*ldh-Δjen1* 和 W303-1A-*ldh-Δady2* 的培养基中的乳酸浓度提高, 并且双突变体 W303-1A-*ldh-Δjen1-Δady2* 的这种现象更明显, 乳酸产量提高了一倍。在双突变体中利用 p415-GPD 质粒, 引入基因 *jen1* 的组成性表达, 使 Jen1 的外排功能不受葡萄糖的抑制, 当葡萄糖存在时, 基因 *jen1* 的组成性表达导致更高的外部乳酸浓度^[53]。

1.5 葡萄糖酸转运蛋白

葡萄糖酸大多数情况下可以作为微生物生

长所需的碳源, 与葡萄糖相比, 使用葡萄糖酸作为碳源使菌株 NADH 产量减少, 减缓糖酵解的抑制, 可促进丙酮酸产量增加^[54]。GntP 家族的转运蛋白能够介导细菌摄取葡萄糖酸, 并作为碳源。该家族中报道的转运蛋白主要来自 *E. coli*, 如 GntU 蛋白、GntT 蛋白和 GntP 蛋白等^[55]。GntU 和 GntT 的作用机理类似, 但 GntT 对葡萄糖酸的亲和力远远大于 GntU, 是 *E. coli* 中主要参与葡萄糖酸摄取的转运蛋白。编码 GntU 的基因 *gntU* 与相邻的 2 个基因 *gntK* 以及 *gntR* 构成一个操纵子 *gntRKU*, 该操纵子功能特性类似乳糖操纵子: 基因 *gntR* 编码阻遏蛋白 GntR, 该蛋白阻遏 *gntKU* 的启动子和 *gntT* 的启动子发生转录, 葡萄糖酸存在下能抑制 GntR 的阻遏作用, 基因 *gntK*、*gntU* 和 *gntT* 能转录翻译葡萄糖酸激酶 GntK 和葡萄糖摄取转运蛋白 GntU、GntT, 将摄入细胞的葡萄糖酸快速代谢^[56]。其中基因 *gntU* 和 *gntT* 的转录受碳饥饿诱导的 cAMP-CRP 复合物正调控, 因此在葡萄糖上培养的 *E. coli* 进入稳定期时(葡萄糖耗尽), GntT 和 GntU 可以恢复细胞在低浓度的葡萄糖酸中生长^[57]。Bates 等^[58]将 GntP 鉴定为介导 *E. coli* 摄取果糖醛酸的转运蛋白。基因 *gntP* 启动子受到阻遏蛋白 UxuR 的抑制, 环境中的果糖醛酸能与 UxuR 结合, 消除 UxuR 对基因 *gntP* 启动子的阻遏, 基因 *gntP* 同时也受到碳饥饿诱导的 cAMP-CRP 复合物正调控, 因此, 当环境中不存在葡萄糖但存在果糖醛酸时, GntP 能够摄取果糖醛酸。目前报道 *B. subtilis* 中存在 GntP, 它与葡萄糖酸激酶编码在同一个操纵子里, 并与 *E. coli* 的 GntU 蛋白的氨基酸序列有 37% 相同, 能够介导 *B. subtilis* 摄取葡萄糖酸^[59]。另外, *C. glutamicum* 中也由 GntP 来介导细胞摄取葡萄糖酸^[60]。

1.6 泛酸转运蛋白

泛酸是维生素 B 族的一种, 其中 D-泛酸具

有生物活性,在体内参与各种代谢,广泛应用于医药、食品和饲料工业。目前,SSS 家族和 BASS 家族中已有泛酸转运蛋白的报道。早在 1990 年,Reizer 等^[61]发现来自 *E. coli* 且属于 SSS 家族的渗透酶 PanF 专门用于泛酸的摄取,它通过膜两侧的 Na^+ 浓度差产生的电化学势能将泛酸与 Na^+ 共同转运到胞内。据报道 PanF 对泛酸具有高度特异性,在结构上与泛酸相似的几种化合物中, PanF 只对泛酰巯基乙胺具有摄取活性^[62]。培养基中加入 10 pmol/L 浓度的泛酸测定 PanF 的 V_{\max} , 菌株 *E. coli* SJ207 中野生型 PanF 的 V_{\max} 为每 10^8 个细胞摄取泛酸速率为 0.4 pmol/min, 在 *E. coli* SJ207 Δ panF 中用质粒 pBR322 过表达基因 panF, V_{\max} 提高至每 10^8 个细胞摄取泛酸速率为 6.2 pmol/min^[62]。2015 年, Ernst 等^[63]发现鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella enterica*) 中基因 *stm4195* 编码的蛋白 PanS (TCDB 未收录) 是泛解酸、酮泛解酸和泛酸的摄取蛋白, PanS 蛋白与来自 BASS 家族的胆汁酸: Na^+ 共转运蛋白 AstB [来自脑膜炎双球菌 (*Neisseria meningitidis*)] 同源性较高,同时 PanS 蛋白具有 BASS 家族特有的保守结构域,因此 PanS 属于 BASS 家族,但 PanS 并不转运胆汁酸。据报道假肠膜明串珠菌 (*Leuconostoc pseudomesenteroides*)、解没食子酸链球菌 (*Streptococcus gallolyticus*) 和中间链球菌 (*Streptococcus intermedius*) 中存在与 PanS 同源性较高的泛酸转运蛋白 (TCDB 未收录)^[64]。目前,利用发酵法生产 D-泛酸受到了越来越多的关注,找到泛酸外排转运蛋白是近几年的新方向,2021 年, Zhang 等^[65]首次验证了 PanF 蛋白 (来自 *E. coli*)、PanT1 蛋白 (来自 *L. pseudomesenteroides*)、PanT2 蛋白 (来自 *S. gallolyticus*) 和 PanT3 蛋白 (来自 *S. intermedius*) 的外排泛酸能力,在泛酸高产菌株 *E. coli* DPA21-pBCS 的基础上分别质粒过表达了上述 4 种蛋白,发酵结果表明,异源表达 PanT3 蛋白, D-泛酸产量从 6.12 g/L 提高至 6.33 g/L。

2 二元有机酸转运蛋白

微生物中,常见的二元有机酸主要都为 C4-二羧酸(包括富马酸、苹果酸、琥珀酸和酒石酸)。在 TCDB 中, C4-二羧酸转运蛋白主要分布于电化学势驱动的转运蛋白大类的次级主动转运蛋白。对 TCDB 数据库进行检索,发现细菌中 C4-二羧酸转运蛋白主要分布于二羧酸/氨基酸: Na^+/H^+ 共转运 (dicarboxylate/amino acid: Na^+/H^+ symporter, DAACS) 家族、C4-二羧酸盐摄取 (C4-dicarboxylate uptake, Dcu) 家族、C4-二羧酸盐摄取 C (C4-dicarboxylate uptake C, DcuC) 家族和二价阴离子: Na^+ 共转运 (divalent anion: Na^+ symporter, DASS) 家族,其中 DAACS 家族的 C4-二羧酸转运蛋白在有氧条件下表达^[66], Dcu 家族、DcuC 家族和 DASS 家族的 C4-二羧酸转运蛋白在厌氧条件下表达^[67];真菌中 C4-二羧酸转运蛋白主要分布于线粒体携带者 (mitochondrial carriers, MC) 家族和 Tellurite-resistance/二羧酸转运蛋白 (dicarboxylic acid transporter, TDT) 家族。特别的, *C. glutamicum* 和 *E. coli* 中存在额外的琥珀酸外排转运蛋白,它们主要有天冬氨酸:丙氨酸交换器 (aspartic acid:alanine exchanger, AAEx) 家族的 SucE 蛋白、苏氨酸/丝氨酸外排转运 (threonine/serine efflux transport, ThrE) 家族的 YjjP 和 YjjB 蛋白以及吡啶黄素敏感性 (acriflavin-sensitivity, YnfM) 家族的 YnfM 蛋白。表 2 对各类二元有机酸的主要转运蛋白的基本特性进行了总结。

2.1 C4-二羧酸转运蛋白

对 2 种及以上的 C4-二羧酸有特异性识别能力,并能摄取或/和外排 C4-二羧酸的转运蛋白,在本文将它们概括为 C4-二羧酸转运蛋白。C4-二羧酸如富马酸、苹果酸、琥珀酸和酒石酸与中枢代谢密切相关,因此 C4-二羧酸的转运蛋白在许多微生物的能量代谢和碳代谢中起着重要作用。

表 2 二元有机酸主要转运蛋白介绍

Table 2 Introduction of dicarboxylic organic acid transporters

Dicarboxylic organic acid Transporters	TC No.	Family	Organism	Aerobic/Anaerobic	Mechanism
C4-dicarboxylates	DctA	2.A.23.1.7	DAACS <i>E. coli</i>	Aerobic	H ⁺ symport
	DcuB	2.A.13.1.2	Dcu <i>E. coli</i>	Anaerobic	Succinate antiport
	DcuA	2.A.13.1.1	Dcu <i>E. coli</i>	Anaerobic	Succinate antiport
	DcuC	2.A.61.1.1	DcuC <i>E. coli</i>	Anaerobic	Succinate antiport
	DcuD	2.A.61.1.2	DcuC <i>E. coli</i>	Anaerobic	Succinate antiport
	TdtT	2.A.47.3.3	DASS <i>E. coli</i>	Anaerobic	Succinate antiport
	Sfc1	2.A.29.13.1	MC <i>S. cerevisiae</i>	Aerobic	Succinate/Fumarate antiporter
	Mae1	2.A.16.2.1/ 2.A.16.2.3	TDT <i>S. pombe</i> / <i>A. nidulans</i>	Aerobic	H ⁺ symport
Succinate	SucE	2.A.81.1.3	AAEx <i>C. glutamicum</i>	Anaerobic	Self exchange
	YjjP/YjjB	2.A.79.2.1	ThrE <i>E. coli</i>	Aerobic	H ⁺ antiport
	YnfM	2.A.1.36.6	YnfM <i>C. glutamicum</i>	Aerobic/anaerobic	N/A

DAACS 家族的蛋白在有氧条件下介导细菌摄取 C4-二羧酸,最典型的是来自 *E. coli* 的 DctA 蛋白。在有氧条件下, DctA 蛋白能介导 *E. coli* 摄取多种 C4-二羧酸,包括琥珀酸、L-苹果酸、富马酸、L-天冬氨酸、D-苹果酸和酒石酸^[68-70],特别是,琥珀酸在中性条件下的摄取是由 DctA 蛋白介导,在 pH 为 6 时,由乙酸摄取转运蛋白 YaaH 介导^[24],在 pH 为 5 时由 DauA 介导^[71],摄取后这些二羧酸被三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA)反应代谢。许多细菌中都存在高度同源的 DctA 蛋白帮助细胞摄取 C4-二羧酸,如枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)、空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*)、金黄色假单胞菌(*Pseudomonas aureofaciens*)等^[72-74]。

Dcu 家族的蛋白在厌氧条件下介导细菌摄取或外排 C4-二羧酸,最典型的是来自 *E. coli* 的 DcuB 蛋白。在厌氧条件下, DcuB 蛋白能介导 *E. coli* 摄取富马酸、苹果酸、酒石酸和 L-天冬氨酸,这些 C4-二羧酸最终被用作电子受体缺氧呼吸被还原成琥珀酸,而琥珀酸不能被 *E. coli* 氧化必须外排,细胞又通过 DcuB 对琥珀酸进行外排^[75]。和 DcuB 属于同家族的 DcuA 蛋白也能在 DcuB 缺失的情况下代替它的功能^[76];属于另

一个 C4-二羧酸盐摄取转运蛋白家族 DcuC 家族的 DcuC 和 DcuD 蛋白也能部分代替 DcuB 蛋白的功能^[77-78]。DASS 家族的蛋白也能在厌氧条件下介导细菌摄取或外排 C4-二羧酸,如来自 *E. coli* 的 TdtT 能高度特异性摄取 L-酒石酸,并外排琥珀酸^[79]。

MC 家族和 TDT 家族的蛋白介导真菌摄取或外排 C4-二羧酸,帮助在线粒体中的 TCA 循环顺利进行,已报道有 MC 家族的 Sfc1 蛋白,该蛋白促使 *S. cerevisiae* 中乙醛酸途径产生的琥珀酸从胞质中转运到线粒体中,通过 TCA 循环产生的富马酸又可以通过该蛋白外排到胞质中^[80]; TDT 家族的 Mae1 蛋白介导裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)和构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)将线粒体中过剩的苹果酸、草酰乙酸、琥珀酸或富马酸外排到胞质中^[81]。

细菌的 C4-二羧酸转运蛋白在生产富马酸、苹果酸和琥珀酸中起到有效应用。Zhang 等^[82]在高产富马酸的菌株 *E. coli* ABCDIA10 上敲除基因 *dcuB*,单位细胞干重的富马酸产量提高了 12.7%,且单位细胞干重外排富马酸的速率提高了 1.75 倍。另外,基因 *dctA* 的敲除使单位细胞干重苹果酸的产量较对照菌株提高了 42.8%,质

粒过表达 DctA、DcuA、DcuB、DcuC 和 DcuD 对琥珀酸产量的提升均有帮助,其中 DcuC 效果最明显,单位细胞干重琥珀酸产量提高了 4 倍。Chen 等^[83]在采用菌株 *E. coli* Suc-T110 生产琥珀酸时,对基因 *dcuB* 和 *dcuC* 上游具有“CAGGAGRNNN”序列的核糖体结合位点(ribosome binding site, RBS)文库进行调控,提高了 2 个基因表达强度,使琥珀酸产量提高 34%。Kwon 等^[84]发现在 *E. coli* MC4100 中过表达 TtdT 可以提高菌株对较高浓度琥珀酸钠的抗性,使菌株的生长速率提高 7.3 倍,最终能使琥珀酸产量提升。此外,真菌的 C4-二羧酸转运蛋白也在生产富马酸和苹果酸中有效的应用。Chen 等^[85]在高产富马酸的光滑念珠菌(*Candida glabrata*) T.G-KS(H)-S(M)-A-2S 中,异源表达了来自 *S. cerevisiae* 的 Sfc1 蛋白,促使富马酸产量提高了 14.7%,之后又异源表达了来自 *S. pombe* 的 Mae1,富马酸产量提高了 38%。Liu 等^[86]在高产苹果酸的米曲霉(*Aspergillus oryzae*) WS-M-P-PP 中异源表达了分别来自 *S. pombe* 和 *A. nidulans* 的 Mae1 蛋白,苹果酸的产量从 58.5 g/L 提高到 89.5 g/L。

2.2 琥珀酸转运蛋白

琥珀酸被认为是生物技术生产中最具潜力的大宗化学品之一,可以取代苯或其他石油化工产品作为一系列化学衍生物的起始原料,在食品、医药、化工和农业等领域具有广泛的应用。在 *C. glutamicum* 和 *E. coli* 生产菌中,已经开发了許多代谢工程策略应用于琥珀酸的生产^[87],包括对琥珀酸外排转运蛋白的研究与改造。除了 2.1 中提到的 C4-二羧酸转运蛋白,*C. glutamicum* 和 *E. coli* 中还存在其他特异性外排琥珀酸的转运蛋白。

据报道,*C. glutamicum* 在有氧条件下不产琥珀酸,在微氧和厌氧条件下产生琥珀酸和乳酸,在乳酸脱氢酶 A (lactate dehydrogenase A, LdhA)的缺失下只生产琥珀酸^[88]。2011 年, Fukui

等^[89]利用上述 *C. glutamicum* 生产琥珀酸的特性,分析比较了在有氧和微氧条件下菌株 *C. glutamicum* MJ233 Δ *ldhA* 的基因表达水平,并提取了在微氧条件下表达量明显提高并且被注释为编码膜蛋白的基因,其中就发现了 *NCgl2130*,其在微氧条件下的表达量是有氧条件下的 3 倍,编码了一种属于 AAEx 家族的膜转运蛋白 SucE。在 SucE 的亚基中存在酪氨酸激酶(tyrosine kinase, TrkA)结构域, SucE 可通过 TrkA 结合烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺)或烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的还原态(NADH)来调节转运蛋白的活性,因此在有氧条件转变为厌氧条件中,伴随着 NADH/NAD 比率的变化, SucE 的活性也随之变化^[90]。此外与 SucE 同家族的 YbjL 和 YidE 蛋白可能也在 *E. coli* 中发挥着与 SucE 相同的功能^[91]。在厌氧发酵中, SucE 广泛应用于提高琥珀酸外排。例如, Fukui 等^[89]在菌株 *C. glutamicum* MJ233 Δ *ldhA* 中利用 pVK9 质粒过表达了 SucE 蛋白,厌氧发酵下琥珀酸产量提高了 1.5 倍。Huhn 等^[90]在野生型 *C. glutamicum* 中导入表达载体 pXMJ19-SucE,高效表达了 SucE,厌氧发酵下可使琥珀酸产率提高 19%。Li 等^[92]在重组 *E. coli* AFP111 中外源表达了来自 *C. glutamicum* 的 SucE 蛋白,在前期进行有氧发酵,初糖耗尽进行厌氧发酵,最终琥珀酸产量从 58.89 g/L 上升到 68.66 g/L,其中琥珀酸释放的增加还提高了上游代谢途径中关键酶的活性,磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(phosphoenolpyruvate carboxylase, PPC)、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase, PCK)、参与丙酮酸和 ATP 生物合成的酶(PYK)和苹果酸脱氢酶(malate dehydrogenase, MDH)的最大活性分别增加了 1.50、1.38、1.28 倍和 1.27 倍。

据报道,需氧细胞培养条件比厌氧细胞条件

具有优势,如更高的生物量产生、更快产物形成^[93]。大肠杆菌 *E. coli*、谷氨酸棒杆菌 *C. glutamicum*、产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)等细菌中敲除琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase, SDH)后,可以在好氧条件下产生琥珀酸^[94],但缺乏SDH的菌株同时也会产生大量副产物乙酸和丙酮酸^[95]。因此,探索有氧条件下具有外排琥珀酸功能且能减少副产物积累的蛋白是近几年的新方向。2017年,Fukui等^[96]在*E. coli*中筛选出基因 *yjjP* 和 *yjjB* 分别编码蛋白 YjjP 和 YjjB,它们能在好氧和厌氧条件下外排琥珀酸。厌氧条件下,在菌株 *E. coli* MG1655 中敲除基因 *yjjPB*,琥珀酸产量降低了 70%; 有氧条件下,在菌株菠萝泛菌(*Pantoea ananatis*) FKSP4 中用 pSTV28 质粒异源表达来自 *E. coli* 的 *yjjPB* 基因,琥珀酸的产量从原来的 0.93 g/L 增加到 8.6 g/L,但是单独过表达基因 *yjjP* 或 *yjjB*,琥珀酸产量未增加。同年,Fukui等^[97]发现 *E. aerogenes* 中有与 *E. coli* 的 YjjP 和 YjjB 的同源性较高的 YjjP 和 YjjB(83%和 81%),在有氧条件下,在菌株 *E. aerogenes* FK08 中用 pTSV28 质粒过表达基因 *yjjPB*,琥珀酸产量从 4.1 g/L 增加到 9.1 g/L。2019年,Fukui等^[98]发现在有氧条件下菌株 *C. glutamicum* FKS3 用 pVK9 质粒过表达 YnfM 能

使琥珀酸的产量从 66 mmol/L 增至 110 mmol/L,副产物丙酮酸和乙酸的产生量显著降低,丙酮酸从 120 mmol/L 减少到 6.2 mmol/L,乙酸减少到检测不到的水平。在厌氧条件下,将琥珀酸主要外排基因 *sucE* 敲除后,YnfM 也能恢复 *C. glutamicum* 在厌氧条件下琥珀酸的产量。

3 多元有机酸转运蛋白

微生物中,常见的多元有机酸主要为柠檬酸和抗坏血酸。在 TCDB 中,多元有机酸转运蛋白主要分布于电化学势驱动的转运蛋白大类的次级主动转运蛋白。对 TCDB 数据库进行检索,发现柠檬酸转运蛋白主要分布于 2-羟基羧酸转运蛋白(2-hydroxycarboxylic acid transporter, 2-HCT)家族、DASS 家族、金属离子-柠檬酸盐配合物: H^+ 共转运蛋白(citrate- $Mg^{2+}/Ca^{2+}:H^+$ symporter, CitMHS)家族、代谢物: H^+ 共转运(metabolite: H^+ symporter, MHS)家族、线粒体载体(MC)家族、三方三羧酸转运蛋白(trigonal tricarboxylic acid transporter, TTT)家族。抗坏血酸转运蛋白属于 PTS L-抗坏血酸(L-ascorbic acid, L-ASC)家族。表 3 对多元有机酸的主要转运蛋白的基本特性进行了总结。本文主要介绍柠檬酸转运蛋白。

表 3 多元有机酸主要转运蛋白介绍

Table 3 Introduction of polyatomic organic acid transporters

Polyatomic organic acid	Transporters	TC No.	Family	Organism	Other substrates	Mechanism
Citrate	CitW	2.A.24.2.5	2-HCT	<i>K. pneumoniae</i>	Acetate	Acetate antiport
	CimH	2.A.24.2.4	2-HCT	<i>B. subtilis</i>	L-malate	L-malate antiport
	CitP	2.A.24.3.2	2-HCT	<i>L. plantarum</i>	Lactate and acetate	Lactate antiport
	CitN	2.A.24.3.1	2-HCT	<i>L. lactis</i>	Lactate	Lactate antiport
	CiT	2.A.47.3.2	DASS	<i>E. coli</i>	Succinate	Succinate antiport
	CitM	2.A.11.1.1	CitMHS	<i>B. subtilis</i>	Divalent metal ion	H^+ symport
	CitA	2.A.1.6.1	MHS	<i>K. pneumoniae</i>	N/A	H^+ symport
	TcuC	2.A.1.6.7	MHS	<i>S. enterica</i>	N/A	H^+ symport
	Yhm2	2.A.29.29.1	MC	<i>S. cerevisiae</i>	N/A	N/A
	CTP1	2.A.29.7.3	MC	<i>S. cerevisiae</i>	N/A	Dicarboxylates antiport
	TctABC	2.A.80.1.1	TTT	<i>S. enterica</i>	Isocitrate and aconite	Na^+ symport
	DmtA	2.A.55.1.6	Nramp	<i>A. niger</i>	N/A	H^+ symport
	CexA	Not found	Unknown	<i>A. niger</i>	N/A	N/A

2-HCT 家族的蛋白能够帮助大部分细菌在厌氧条件下实现对柠檬酸摄取。摄取过程为通过膜上的电化学势能,将胞外的 Na^+ 或 H^+ 与柠檬酸共同输入胞内,并将柠檬酸的脱羧产物输出胞外^[99]。例如,肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)的 CitW,能摄取柠檬酸,外排柠檬酸发酵的产物乙酸^[100]; *B. subtilis* 的 CimH,能摄取柠檬酸并外排 L-苹果酸^[101];植物乳杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)的 CitP,能摄取柠檬酸、外排乳酸和乙酸^[102];乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)的 CitN,能摄取柠檬酸、外排乳酸^[103]。

DASS 家族的 CitT 蛋白能够帮助 *E. coli* 在厌氧条件下实现对柠檬酸的摄取,柠檬酸脱羧为琥珀酸后,实现琥珀酸的外排^[104]。近年来,Blount 等^[105]描述了一种新的自然突变,即 CitT 蛋白能够帮助 *E. coli* 需氧利用柠檬酸,使 CitT 蛋白更好地服务于工业大肠杆菌利用柠檬酸生产琥珀酸。该突变源于编码 CitT 蛋白的基因 *citT* 以及其下游编码 RNase I 的基因 *rna* 串联扩增。野生型的 *E. coli* 中基因 *citT* 的上游边界位于编码三磷酸核糖基去磷酸辅酶 A 合成酶基因 *citG* 的 3'端,而基因 *rna* 下游的边界位于编码核苷二磷酸激酶的调节因子 *rnk* 的 5'端,(图 3A),串联扩增后,基因 *citG* 下游片段和基因 *rnk* 上游片段结合,产生了由基因 *rnk* 上游的启动子表达的 *rnk-citG* 杂交基因,因为基因 *citT* 和 *citG* 通常是单顺反子的,所以基因 *citT* 与杂交基因共用基因

rnk 的启动子(图 3B)。基因 *rnk* 的启动子在有氧条件下诱导转录,允许 CitT 在有氧代谢过程中表达。

CitMHS 家族的 CitM 能够帮助 *B. subtilis* 在有氧条件下实现对柠檬酸的摄取^[106]。其中, CitM 由 CitST 双组分系统控制转录表达, CitST 中的传感器激酶 CitS 可以检测外部介质中的柠檬酸,并将信号传递给反应调节因子 CitT,之后磷酸化的 CitT 特异性地结合 CitM 转录起始点上游某序列,以激活 CitM 转录^[107]。转录后的 CitM 与 Mg^{2+} 络合时能依靠质子驱动力对柠檬酸摄取,同时也能催化二价金属离子 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 和 Ni^{2+} 的转运。当在几种碳源(葡萄糖、甘油和肌醇)存在下,编码 CitM 蛋白基因的转录将被抑制^[108-109]。

除了以上 3 种转运蛋白家族, MHS 家族中存在 *K. pneumoniae* 的柠檬酸摄取转运蛋白 CitA^[110],以及 *S. enterica* 的柠檬酸摄取转运蛋白 TcuC^[111]; MC 家族中存在 *S. cerevisiae* 的柠檬酸摄取转运蛋白 Yhm2 和 CTP1^[112-113]; TTT 家族中存在 *S. enterica* 的柠檬酸摄取转运蛋白 TctABC,同时该蛋白还能摄取氟柠檬酸、异柠檬酸和顺式乌头酸^[114]。目前关于柠檬酸外排的蛋白的报道少之又少,近些年来,黑曲霉(*Aspergillus niger*)中来自 Nramp 家族的 DmtA 蛋白和未知家族的 CexA 蛋白(TCDB 未收录)被报道调节柠檬酸外排的蛋白^[115-116]。

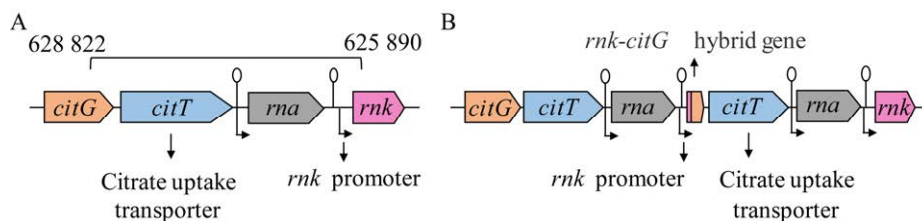


图 3 柠檬酸摄取转运基因 *citT* 串联扩增突变为有氧转录^[104]

Figure 3 The tandem amplification in citrate uptake transporter gene *citT* is mutated into aerobic transcription^[104]. A: Ancestral arrangement of *citG*, *citT*, *rna* and *rnk* genes. B: Arrangement after mutation.

目前,不少柠檬酸转运蛋白在工业微生物发酵生产中应用。乳酸菌摄取柠檬酸代谢生产葡萄酒的过程中, Yang 等^[117]敲除基因 *citP* 使得葡萄酒生产菌 *L. plantarum* XJ25 失去了对柠檬酸的代谢能力,其中一些柠檬酸代谢产生的致葡萄酒不良风味物质(乙酸、双乙酰和乙酰)浓度有所下降,接着基因过表达突变体 XJ25- Δ *citP*-pMG36ek11-*citP* 则恢复了对柠檬酸的利用能力,其中后者的柠檬酸利用率是前者的 3.95 倍,乙酸浓度恢复到较高水平(可采用其他方式去除),双乙酰和乙酰依然维持在较低浓度。另外, *E. coli* 的 CitT 可以在柠檬酸的存在下,代谢生产琥珀酸。Takahashi 等^[104]将基因 *citT* 与 *lac* 启动子融合并克隆在质粒上,并将该质粒转入琥珀酸生产菌 *E. coli* MG1655 Δ *sdhA* Δ *iclR*, 在有氧条件下,乳糖诱导 CitT 蛋白表达,该菌株能将 30 mmol/L 柠檬酸转化为 20.1 mmol/L 琥珀酸,质粒转入之前,在琥珀酸生产菌 *E. coli* MG1655 Δ *sdhA* Δ *iclR* 的胞外无法检测到琥珀酸。Steiger 等^[116]在天然产生柠檬酸 *A. niger* 的野生型中质粒过表达 CexA, 导致分泌的柠檬酸显著增加。使用强诱导性表达系统过表达 CexA, 使柠檬酸的产量高达 109 g/L, 比亲本野生型菌株高 5 倍。

4 芳香族有机酸转运蛋白

在微生物中,对芳香族有机酸转运蛋白研究尚浅,检索 TCDB 数据库,发现芳香有机酸转运蛋白几乎属于 2 种转运蛋白家族且属于电化学势驱动的转运蛋白大类的次级主动转运蛋白。下面简单介绍 2 个芳香有机酸转运蛋白家族以及一个 *E. coli* 中外排芳香有机酸的外排系统,芳香酸:H⁺共转运(aromatic acid:H⁺ symporter, AAHS)家族、苯甲酸盐:H⁺共转运(benzoate:H⁺ symporter, BenE)家族和 YhcRQP 系统。其中 YhcRQP 系统由 YhcR、YhcQ 和 YhcP 蛋白组成,它们分别来自不同的转运蛋白家族。表 4 对芳香族有机酸的主要转运蛋白的基本特性进行了总结。

4.1 AAHS 家族

该家族的蛋白主要功能特性是在质子动力的驱动下帮助部分细菌摄取某些芳香族有机酸。已有报道有大肠杆菌 *E. coli* 的 MhpT 蛋白、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)的 BenK 蛋白和 PcaK 蛋白以及谷氨酸棒杆菌(*C. glutamicum*)的 GenK 蛋白和 VanK 蛋白。其中,来自 *E. coli* 的 MhpT 蛋白能够摄取 3-(3-羟基苯基)丙酸酯

表 4 芳香族有机酸主要转运蛋白介绍

Table 4 Introduction of aromatic organic acid transporters

Family/System	Transporters	TC No.	Organism	Substrates	Mechanism
AAHS	MhpT	2.A.1.15.2	<i>E. coli</i>	3-(3-hydroxyphenyl) propionate	H ⁺ symport
	BenK	2.A.1.15.16	<i>P. putida</i>	Benzoate	H ⁺ symport
	PcaK	2.A.1.15.1	<i>P. putida</i>	4-hydroxybenzoate	H ⁺ symport
	GenK	2.A.1.15.10	<i>C. glutamicum</i>	Gentisate	H ⁺ symport
	VanK	2.A.1.15.11	<i>C. glutamicum</i>	Vanillate	H ⁺ symport
BenE	BenE	2.A.46.1.1	<i>A. calcoaceticus</i>	Benzoate	H ⁺ symport
	YdcO	2.A.46.1.9	<i>E. coli</i>	Benzoate	H ⁺ symport
YhcRQP	YhcR	8.A.1.7.1	<i>E. coli</i>	P-hydroxybenzoate, salicylate, benzoate, 1-naphthoate and cinnamate	N/A
	YhcP	2.A.85.1.2	<i>E. coli</i>	P-hydroxybenzoate, salicylate, benzoate, 1-naphthoate and cinnamate	N/A

[3-(3-hydroxyphenyl) propionate, 3HPP], Xu 等^[118]利用菌株 *E. coli* W3110 Δ *mhpT*(pVLT31-*mhpT*)探索影响 MhpT 摄取活性的因素。pH 影响 MhpT 摄取活性的结果表明, pH 从 8.2 降为 6.2 时, 第一分钟内每毫克蛋白摄取 3HPP 数量从 60.07 nmol 提高至 178.33 nmol; MhpT 蛋白氨基酸残基影响摄取活性的结果表明, A272H 突变体的摄取活性提高了 30%。来自 *P. putida* 的 BenK 蛋白能够摄取苯甲酸^[119], Choudhary 等^[120]利用菌株 *P. putida* CSv86 测定每毫克 BenK 蛋白摄取苯甲酸的最大速率 V_{\max} 为 484 pmol/min, 亲和力常数 K_m 为 4.5 μ mol/L。另外, 来自 *P. putida* 的 PcaK 蛋白能够摄取 4-羟基苯甲酸^[121], 来自 *C. glutamicum* 的 GenK 蛋白能够摄取龙胆酸^[122], 同样来自 *C. glutamicum* 的 VanK 蛋白能够摄取香子兰酸等^[123]。

4.2 BenE 家族

根据氨基酸序列分类, 可以把 BenE 家族成员归纳为 2 种蛋白, 即钙乙酸不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*)的苯甲酸摄取转运蛋白 BenE 以及 *E. coli* 的苯甲酸摄取转运蛋白 YdcO^[124], 其余 BenE 家族的成员大都是 BenE 的同系物。这些蛋白质的长度约为 400 个残基, 约有 12–13 个跨膜结构域。2 种蛋白彼此之间表现出约 30% 的同一性, 并且均与 AAHS 家族的成员具有有限的序列相似性^[119]。该家族的蛋白主要功能特性是在质子动力的驱动下帮助各类细菌摄取甲酸。

4.3 YhcRQP 系统

van Dyk 等^[125]利用 DNA 微阵列技术, 分析 *E. coli* 在接触 25 mmol/L 对羟基苯甲酸 (parahydroxybenzoic acid, pHBA) 后基因转录高低的变化, 其中一个编码芳香酸外排转运 (aromatic acid efflux transport, ArAE) 家族蛋白的基因 *yhcP* 上调了 12 倍, 相邻的基因 *yhcQ* 和 *yhcR* 也上调了 22 倍和 10 倍, 它们分别编码一个膜融

合蛋白(membrane fusion proteins, MFP)家族的蛋白和一种未知功能的蛋白, 这 3 个基因共转录, 因此这 3 个基因被称为操纵子 *yhcRQP*。此外, 一个紧挨着操纵子 *yhcRQP* 的基因 *yhcS* 编码 YhcS 蛋白, 是该操纵子的正转录因子^[126]。*E. coli* 在一般情况下生长代谢时 pHBA 浓度很低, 不能与 YhcS 蛋白结合, YhcS 为非活性形式, *yhcRQP* 不转录(图 4A); 如果 pHBA 在细胞中积累到高水平, 它的芳香分子结构能与非活性形式的蛋白 YhcS 结合, 并将 YhcS 转化为活性形式, 活化的 YhcS 蛋白激活 *yhcRQP* 的转录, 转录翻译形成的 YhcRQP 蛋白把胞内的 pHBA 外排到胞外(图 4B)。通常 pHBA 在胞内积累浓度越高(不超过 50 mmol/L), YhcRQP 表达水平越高。目前已证实 YhcRQP 能外排水杨酸、苯甲酸、1-萘甲酸和肉桂酸。这种高度调节的外排系统通常可以作为对细胞内压力条件的反应, 这种生理作用可能是一个“代谢减压阀”, 以减轻代谢失衡的毒性效应。因此, 具有细胞代谢物底物的其他外排转运蛋白同样具有代谢减压阀功能, 如大部分氨基酸外排系统^[127]。

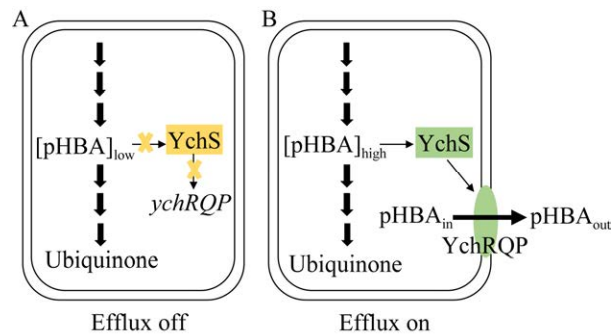


图 4 YhcRQP 外排泵的代谢溢流阀模型^[125]

Figure 4 Metabolic relief valve model for YhcRQP efflux pump expression^[125]. A: Normal metabolism. Low intracellular pHBA concentration and YhcS protein in inactive form (yellow box indicate). B: Metabolic upset. High intracellular pHBA concentration and YhcS protein in active form (green box indicate).

5 总结

本文综述了研究有机酸转运蛋白的结构特性或功能特性以及优化有机酸转运蛋白的表达对于提高工业生产菌对有机酸的利用及生产至关重要。对于有机酸转运蛋白,目前存在的困境是大部分膜蛋白未表征,通过现代合成生物学技术对有机酸转运蛋白进行优化改造仍处于早期阶段^[128]。其中,在有机酸高产菌株中对外排转运蛋白进行优化的报道相对较少,部分有机酸的外排系统仍是未知的,因此对外排转运蛋白结构功能发现的需求将会逐步增加,转运蛋白工程在有机酸外排转运蛋白功能修饰和增强改造领域的应用也将会越来越广泛。

通过详细介绍目前几种有机酸转运蛋白的研究及其在代谢工程中的应用,提出以下几点展望:(1) 绝大多数的转运蛋白都尚无底物专一性,它们往往都是特异性识别某个基因或结构,这对转运蛋白新功能的发现提供了很大的帮助;(2) 不同微生物中的转运蛋白对有机酸摄取和外排的能力有高低,如来自 *S. pombe* 和 *A. nidulans* 的 Mae1 蛋白有很高的外排苹果酸能力,而在高产苹果酸的 *A. oryzae* 中苹果酸转运蛋白的外排能力较弱,因此,实现转运蛋白的高效异源表达对于提高微生物细胞转运有机酸的能力至关重要;(3) 部分转运蛋白具有双向转运底物的功能,如 FocA 蛋白取决于甲酸在胞内外的浓度差来定转运方向,如 Jen1 蛋白由于诱导型表达,在能够外排乳酸的时期活性被葡萄糖抑制,如 DcuB 蛋白可以摄取 C4-二羧酸,外排琥珀酸,因此某些有机酸的摄取转运蛋白也可以成为或改造成为促进有机酸外排的蛋白;(4) 大多数有机酸转运蛋白属于次级主动转运蛋白,并依靠质子驱动力来转运有机酸,由此优化发酵条件如发酵环境的 pH 值等也可能是帮助转运蛋白发挥积

极作用的关键。有机酸转运蛋白工程的研究意义非凡,它可以解除细胞生长抑制、提高工程菌的环境耐受、促进终产物的外排、提高碳源的再利用和简化从胞内分离产物的步骤等等,提高生物法生产的经济效益,是未来工业化生产高价值化学品的重要方向。

参考文献

- [1] DAVY AM, KILDEGAARD HF, ANDERSEN MR. Cell factory engineering[J]. Cell Systems, 2017, 4(3): 262-275.
- [2] LEE SY, KIM HU. Systems strategies for developing industrial microbial strains[J]. Nature Biotechnology, 2015, 33(10): 1061-1072.
- [3] KELL DB, SWAINSTON N, PIR P, OLIVER SG. Membrane transporter engineering in industrial biotechnology and whole cell biocatalysis[J]. Trends in Biotechnology, 2015, 33(4): 237-246.
- [4] VERMAAS JV, BECKHAM GT, CROWLEY MF. Membrane permeability of fatty acyl compounds studied via molecular simulation[J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2017, 121(50): 11311-11324.
- [5] CASAL M, PAIVA S, QUEIRÓS O, SOARES-SILVA I. Transport of carboxylic acids in yeasts[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2008, 32(6): 974-994.
- [6] van MARIS AJ, KONINGS WN, van DIJKEN JP, PRONK JT. Microbial export of lactic and 3-hydroxypropanoic acid: implications for industrial fermentation processes[J]. Metabolic Engineering, 2004, 6(4): 245-255.
- [7] SAIER MH, REDDY VS, MORENO-HAGELSIEB G, HENDARGO KJ, ZHANG YC, IDDAMSETTY V, LAM KJK, TIAN N, RUSSUM S, WANG JN, MEDRANO-SOTO A. The transporter classification database (TCDB): 2021 update[J]. Nucleic Acids Research, 2021, 49(D1): D461-D467.
- [8] SHI YG. Common folds and transport mechanisms of secondary active transporters[J]. Annual Review of Biophysics, 2013, 42: 51-72.
- [9] FALKE D, SCHULZ K, DOBERENZ C, BEYER L, LILIE H, THIEMER B, SAWERS RG. Unexpected oligomeric structure of the FocA formate channel of

- Escherichia coli*: a paradigm for the formate-nitrite transporter family of integral membrane proteins[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2010, 303(1): 69-75.
- [10] WANG Y, HUANG YJ, WANG JW, CHENG C, HUANG WJ, LU PL, XU YN, WANG PY, YAN NE, SHI YG. Structure of the formate transporter FocA reveals a pentameric aquaporin-like channel[J]. *Nature*, 2009, 462(7272): 467-472.
- [11] DOBERENZ C, ZORN M, FALKE D, NANNEMANN D, HUNGER D, BEYER L, IHLING CH, MEILER J, SINZ A, SAWERS RG. Pyruvate formate-lyase interacts directly with the formate channel FocA to regulate formate translocation[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2014, 426(15): 2827-2839.
- [12] KAMMEL M, SAWERS RG. The FocA channel functions to maintain intracellular formate homeostasis during *Escherichia coli* fermentation[J]. *Microbiology (Reading, England)*, 2022, 168(4): 10.1099/mic.0.001168.
- [13] HUNGER D, DOBERENZ C, SAWERS RG. Identification of key residues in the formate channel FocA that control import and export of formate[J]. *Biological Chemistry*, 2014, 395(7/8): 813-825.
- [14] LÜ W, DU J, SCHWARZER NJ, GERBIG-SMENTEK E, EINSLE O, ANDRADE SLA. The formate channel FocA exports the products of mixed-acid fermentation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(33): 13254-13259.
- [15] KAMMEL M, TREBBIN O, PINSKE C, SAWERS RG. A single amino acid exchange converts FocA into a unidirectional efflux channel for formate[J]. *Microbiology (Reading, England)*, 2022, 168(1): 10.1099/mic.0.001132.
- [16] 唐文秀, 王学明, 郭亮, 季立豪, 高聪, 陈修来, 刘立明. 代谢工程改造大肠杆菌生产琥珀酸[J]. *化工进展*, 2022, 41(2): 938-950.
TANG WX, WANG XM, GUO L, JI LH, GAO C, CHEN XL, LIU LM. Metabolic engineering of *Escherichia coli* to produce succinic acid[J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2022, 41(2): 938-950 (in Chinese).
- [17] WANG ZW, SAINI M, LIN LJ, CHIANG CJ, CHAO YP. Systematic engineering of *Escherichia coli* for d-lactate production from crude glycerol[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(43): 9583-9589.
- [18] WARNECKE T, GILL RT. Organic acid toxicity, tolerance, and production in *Escherichia coli* biorefining applications[J]. *Microbial Cell Factories*, 2005, 4: 25.
- [19] 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(6): 2805-2814.
- [20] GIMENEZ R, NUÑEZ MF, BADIA J, AGUILAR J, BALDOMA L. The gene *yjcG*, cotranscribed with the gene *acs*, encodes an acetate permease in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(21): 6448-6455.
- [21] JOLKVER E, EMER D, BALLAN S, KRÄMER R, EIKMANN BJ, MARIN K. Identification and characterization of a bacterial transport system for the uptake of pyruvate, propionate, and acetate in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(3): 940-948.
- [22] HOSIE AF, ALLAWAY D, POOLE PS. A monocarboxylate permease of *Rhizobium leguminosarum* is the first member of a new subfamily of transporters[J]. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(19): 5436-5448.
- [23] PAIVA S, DEVAUX F, BARBOSA S, JACQ C, CASAL M. *Ady2p* is essential for the acetate permease activity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Yeast (Chichester, England)*, 2004, 21(3): 201-210.
- [24] HAURIE V, PERROT M, MINI T, JENÖ P, SAGLIOCCO F, BOUCHERIE H. The transcriptional activator *Cat8p* provides a major contribution to the reprogramming of carbon metabolism during the diauxic shift in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(1): 76-85.
- [25] SÁ-PESSOA J, PAIVA S, RIBAS D, SILVA IJ, VIEGAS SC, ARRAIANO CM, CASAL M. *SATP (YaaH)*, a succinate-acetate transporter protein in *Escherichia coli*[J]. *The Biochemical Journal*, 2013, 454(3): 585-595.
- [26] SUN PC, LI JL, ZHANG XL, GUAN ZY, XIAO QJ, ZHAO CJ, SONG MX, ZHOU YX, MOU LQ, KE M, GUO L, GENG J, DENG D. Crystal structure of the bacterial acetate transporter *SatP* reveals that it forms a

- hexameric channel[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2018, 293(50): 19492-19500.
- [27] COLLINS T, AZEVEDO-SILVA J, DA COSTA A, BRANCA F, MACHADO R, CASAL M. Batch production of a silk-elastin-like protein in *E. coli* BL21(DE3): key parameters for optimisation[J]. *Microbial Cell Factories*, 2013, 12: 21.
- [28] PARK DM, AKHTAR MS, ANSARI AZ, LANDICK R, KILEY PJ. The bacterial response regulator ArcA uses a diverse binding site architecture to regulate carbon oxidation globally[J]. *PLoS Genetics*, 2013, 9(10): e1003839.
- [29] VEERAVALLI K, SCHINDLER T, DONG E, YAMADA M, HAMILTON R, LAIRD MW. Strain engineering to reduce acetate accumulation during microaerobic growth conditions in *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology Progress*, 2018, 34(2): 303-314.
- [30] RENDULIĆ T, ALVES J, AZEVEDO-SILVA J, SOARES-SILVA I, CASAL M. New insights into the acetate uptake transporter (AceTr) family: unveiling amino acid residues critical for specificity and activity[J]. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2021, 19: 4412-4425.
- [31] PACZIA N, NILGEN A, LEHMANN T, GÄTGENS J, WIECHERT W, NOACK S. Extensive exometabolome analysis reveals extended overflow metabolism in various microorganisms[J]. *Microbial Cell Factories*, 2012, 11: 122.
- [32] VILHENA C, KAGANOVITCH E, SHIN JY, GRÜNBERGER A, BEHR S, KRISTOFICOVA I, BRAMEYER S, KOHLHEYER D, JUNG K. A single-cell view of the BtsSR/YpdAB pyruvate sensing network in *Escherichia coli* and its biological relevance[J]. *Journal of Bacteriology*, 2017, 200(1): e00536-e00517.
- [33] BEHR S, KRISTOFICOVA I, WITTING M, BRELAND EJ, EBERLY AR, SACHS C, SCHMITT-KOPPLIN P, HADJIFRANGISKOU M, JUNG K. Identification of a high-affinity pyruvate receptor in *Escherichia coli*[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 1388.
- [34] FRIED L, BEHR S, JUNG K. Identification of a target gene and activating stimulus for the YpdA/YpdB histidine kinase/response regulator system in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(4): 807-815.
- [35] SAIER MH JR, ZHANG ZG. Control of transposon-mediated directed mutation by the *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system[J]. *Microbial Physiology*, 2015, 25(2/3): 226-233.
- [36] DUBEY AK, BAKER CS, SUZUKI K, JONES AD, PANDIT P, ROMEO T, BABITZKE P. CsrA regulates translation of the *Escherichia coli* carbon starvation gene, *cstA*, by blocking ribosome access to the *cstA* transcript[J]. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(15): 4450-4460.
- [37] KRAXENBERGER T, FRIED L, BEHR S, JUNG K. First insights into the unexplored two-component system YehU/YehT in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(16): 4272-4284.
- [38] van den ESKER MH, KOVÁCS ÁT, KUIPERS OP. YsbA and LytST are essential for pyruvate utilization in *Bacillus subtilis*[J]. *Environmental Microbiology*, 2017, 19(1): 83-94.
- [39] LAABEI M, DUGGAN S. CidA and LrgA: a “hole” lot more than programmed cell death[J]. *mBio*, 2022, 13(3): e0076122.
- [40] BLOMBACH B, SCHREINER ME, HOLÁTKO J, BARTEK T, OLDIGES M, EIKMANN BJ. L-valine production with pyruvate dehydrogenase complex-deficient *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(7): 2079-2084.
- [41] BLOMBACH B, SCHREINER ME, MOCH M, OLDIGES M, EIKMANN BJ. Effect of pyruvate dehydrogenase complex deficiency on l-lysine production with *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 76(3): 615-623.
- [42] SCHLEGEL S, GENEVAUX P, de GIER JW. De-convoluting the genetic adaptations of *E. coli* C41(DE3) in real time reveals how alleviating protein production stress improves yields[J]. *Cell Reports*, 2015, 10(10): 1758-1766.
- [43] MIROUX B, WALKER JE. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1996, 260(3): 289-298.

- [44] CASAL M, PAIVA S, ANDRADE RP, GANCEDO C, LEÃO C. The lactate-proton symport of *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by JEN₁[J]. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(8): 2620-2623.
- [45] LAW CJ, MALONEY PC, WANG DN. Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2008, 62: 289-305.
- [46] SOARES-SILVA I, SCHULLER D, ANDRADE RP, BALTAZAR F, CÁSSIO F, CASAL M. Functional expression of the lactate permease Jen_{1p} of *Saccharomyces cerevisiae* in *Pichia pastoris*[J]. *The Biochemical Journal*, 2003, 376(Pt 3): 781-787.
- [47] BRANDUARDI P, SAUER M, de GIOIA L, ZAMPELLA G, VALLI M, MATTANOVICH D, PORRO D. Lactate production yield from engineered yeasts is dependent from the host background, the lactate dehydrogenase source and the lactate export[J]. *Microbial Cell Factories*, 2006, 5: 4.
- [48] LODI T, DIFFELS J, GOFFEAU A, BARET PV. Evolution of the carboxylate jen transporters in fungi[J]. *FEMS Yeast Research*, 2007, 7(5): 646-656.
- [49] NÚÑEZ MF, KWON O, WILSON TH, AGUILAR J, BALDOMA L, LIN ECC. Transport of L-lactate, D-lactate, and glycolate by the LldP and GlcA membrane carriers of *Escherichia coli*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 290(2): 824-829.
- [50] NÚÑEZ MF, TERESA PM, BAD₁ AJ, AGUILAR J, BALDOMÀ L. The gene *yghK* linked to the *glc* operon of *Escherichia coli* encodes a permease for glycolate that is structurally and functionally similar to L-lactate permease[J]. *Microbiology (Reading, England)*, 2001, 147(Pt 4): 1069-1077.
- [51] ABDEL-RAHMAN MA, TASHIRO Y, SONOMOTO K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes[J]. *Biotechnology Advances*, 2013, 31(6): 877-902.
- [52] DRUMRIGHT RE, GRUBER PR, HENTON DE. Polylactic acid technology[J]. *Advanced Materials*, 2000, 12(23): 1841-1846.
- [53] PACHECO A, TALAIA G, SÁ-PESSOA J, BESSA D, GONÇALVES MJ, MOREIRA R, PAIVA S, CASAL M, QUEIRÓS O. Lactic acid production in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated by expression of the monocarboxylate transporters Jen₁ and Ady₂[J]. *FEMS Yeast Research*, 2012, 12(3): 375-381.
- [54] YANG M, MU T, ZHONG W, OLAJUYIN AM, XING J. Analysis of gluconate metabolism for pyruvate production in engineered *Escherichia coli* based on genome-wide transcriptomes[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2017, 65(2): 165-172.
- [55] PEEKHAUS N, TONG S, REIZER J, SAIER MH, MURRAY E, CONWAY T. Characterization of a novel transporter family that includes multiple *Escherichia coli* gluconate transporters and their homologues[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1997, 147(2): 233-238.
- [56] IZU H, ADACHI O, YAMADA M. Gene organization and transcriptional regulation of the *gntR_{KU}* operon involved in gluconate uptake and catabolism of *Escherichia coli*¹[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1997, 267(4): 778-793.
- [57] PORCO A, PEEKHAUS N, BAUSCH C, TONG S, ISTURIZ T, CONWAY T. Molecular genetic characterization of the *Escherichia coli gntT* gene of GntI, the main system for gluconate metabolism[J]. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(5): 1584-1590.
- [58] BATES UC, NGUYEN AB, SMALLEY DJ, ANDERSON AB, CONWAY T. GntP is the *Escherichia coli* fructuronic acid transporter and belongs to the UxuR regulon[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(22): 7690-7696.
- [59] ZHANG MX, ZHAO XC, CHEN X, LI MY, WANG XD. Enhancement of riboflavin production in *Bacillus subtilis* via *in vitro* and *in vivo* metabolic engineering of pentose phosphate pathway[J]. *Biotechnology Letters*, 2021, 43(12): 2209-2216.
- [60] FRUNZKE J, ENGELS V, HASENBEIN S, GÄTGENS C, BOTT M. Co-ordinated regulation of gluconate catabolism and glucose uptake in *Corynebacterium glutamicum* by two functionally equivalent transcriptional regulators, GntR₁ and GntR₂[J]. *Molecular Microbiology*, 2008, 67(2): 305-322.
- [61] REIZER J, REIZER A, SAIER MH JR. The Na⁺/pantothenate symporter (PanF) of *Escherichia coli* is homologous to the Na⁺/proline symporter (PutP) of *E. coli* and the Na⁺/glucose symporters of mammals[J]. *Research in Microbiology*, 1990, 141(9): 1069-1072.
- [62] JACKOWSKI S, ALIX JH. Cloning, sequence, and expression of the pantothenate permease (*panF*) gene

- of *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 1990, 172(7): 3842-3848.
- [63] ERNST DC, DOWNS DM. The *STM4195* gene product (PanS) transports coenzyme A precursors in *Salmonella enterica*[J]. Journal of Bacteriology, 2015, 197(8): 1368-1377.
- [64] HUANG LL, PYC M, ALSEEKH S, MCCARTY DR, de CRÉCY-LAGARD V, GREGORY JF 3rd, HENRY CS, FERNIE AR, MULLEN RT, HANSON AD. A plastidial pantoate transporter with a potential role in pantothenate synthesis[J]. The Biochemical Journal, 2018, 475(4): 813-825.
- [65] ZHANG B, CHEN L, JIN JY, ZHONG N, CAI X, ZOU SP, ZHOU HY, LIU ZQ, ZHENG YG. Strengthening the (R)-pantoate pathway to produce D-pantothenic acid based on systematic metabolic analysis[J]. Food Bioscience, 2021, 43: 10.1016/J.FBIO.2021.101283.
- [66] TERAMOTO H, SHIRAI T, INUI M, YUKAWA H. Identification of a gene encoding a transporter essential for utilization of C4 dicarboxylates in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(17): 5290-5296.
- [67] RHIE MN, YOON HE, OH HY, ZEDLER S, UNDEN G, KIM OB. A Na⁺-coupled C4-dicarboxylate transporter (Asuc_0304) and aerobic growth of *Actinobacillus succinogenes* on C4-dicarboxylates[J]. Microbiology (Reading, England), 2014, 160(Pt 7): 1533-1544.
- [68] MARKOVICH D. Sodium-sulfate/carboxylate cotransporters (SLC13)[J]. Current Topics in Membranes, 2012, 70: 239-256.
- [69] KAY WW, KORNBERG HL. The uptake of C4-dicarboxylic acids by *Escherichia coli*[J]. European Journal of Biochemistry, 1971, 18(2): 274-281.
- [70] LUKAS H, REIMANN J, KIM OB, GRIMPO J, UNDEN G. Regulation of aerobic and anaerobic D-malate metabolism of *Escherichia coli* by the LysR-type regulator DmlR (YeaT)[J]. Journal of Bacteriology, 2010, 192(10): 2503-2511.
- [71] KARINOUE E, COMPTON ELR, MOREL M, JAVELLE A. The *Escherichia coli* SLC26 homologue YchM (DauA) is a C(4)-dicarboxylic acid transporter[J]. Molecular Microbiology, 2013, 87(3): 623-640.
- [72] GROENEVELD M, WEME RG, DUURKENS RH, SLOTBOOM DJ. Biochemical characterization of the C4-dicarboxylate transporter DctA from *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Bacteriology, 2010, 192(11): 2900-2907.
- [73] WÖSTEN MMSM, van de LEST CHA, van DIJK L, van PUTTEN JPM. Function and regulation of the C4-dicarboxylate transporters in *Campylobacter jejuni*[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 174.
- [74] NAM HS, SPENCER M, ANDERSON AJ, CHO BH, KIM YC. Transcriptional regulation and mutational analysis of a *dctA* gene encoding an organic acid transporter protein from *Pseudomonas chlororaphis* O6[J]. Gene, 2003, 323: 125-131.
- [75] UNDEN G, STRECKER A, KLEEFELD A, KIM OB. C4-dicarboxylate utilization in aerobic and anaerobic growth[J]. EcoSal Plus, 2016, 7(1): 10.1128/ecosalplus.ESP-10.1128/ecosalplus0021-2015.
- [76] GOLBY P, KELLY DJ, GUEST JR, ANDREWS SC. Transcriptional regulation and organization of the *dcuA* and *dcuB* genes, encoding homologous anaerobic C4-dicarboxylate transporters in *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(24): 6586-6596.
- [77] ZIENTZ E, JANAUSCH IG, SIX S, UNDEN G. Functioning of DcuC as the C4-dicarboxylate carrier during glucose fermentation by *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(12): 3716-3720.
- [78] ZIENTZ E, SIX S, UNDEN G. Identification of a third secondary carrier (DcuC) for anaerobic C4-dicarboxylate transport in *Escherichia coli*: roles of the three Dcu carriers in uptake and exchange[J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(24): 7241-7247.
- [79] KIM OB, UNDEN G. The L-tartrate/succinate antiporter TtdT (YgjE) of L-tartrate fermentation in *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(5): 1597-1603.
- [80] PALMIERI F, AGRIMI G, BLANCO E, CASTEGNA A, Di NOIA MA, IACOBAZZI V, LASORSA FM, MAROBIO CMT, PALMIERI L, SCARCIA P, TODISCO S, VOZZA A, WALKER J. Identification of mitochondrial carriers in *Saccharomyces cerevisiae* by transport assay of reconstituted recombinant proteins[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2006, 1757(9/10): 1249-1262.

- [81] CAMARASA C, BIDARD F, BONY M, BARRE P, DEQUIN S. Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* malate permease by expression in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(9): 4144-4151.
- [82] ZHANG T, SONG RR, WANG M, DENG L, FAN LH, WANG F. Regulating C₄-dicarboxylate transporters for improving fumaric acid production[J]. *RSC Advances*, 2017, 7(5): 2897-2904.
- [83] CHEN J, ZHU XN, TAN ZG, XU HT, TANG JL, XIAO DG, ZHANG XL. Activating C₄-dicarboxylate transporters DcuB and DcuC for improving succinate production[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(5): 2197-2205.
- [84] KWON YD, KIM S, LEE SY, KIM P. Long-term continuous adaptation of *Escherichia coli* to high succinate stress and transcriptome analysis of the tolerant strain[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2011, 111(1): 26-30.
- [85] CHEN XL, DONG XX, WANG YC, ZHAO ZH, LIU LM. Mitochondrial engineering of the TCA cycle for fumarate production[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 31: 62-73.
- [86] LIU JJ, XIE ZP, SHIN HD, LI JH, DU GC, CHEN J, LIU L. Rewiring the reductive tricarboxylic acid pathway and L-malate transport pathway of *Aspergillus oryzae* for overproduction of L-malate[J]. *Journal of Biotechnology*, 2017, 253: 1-9.
- [87] MCKINLAY JB, VIEILLE C, ZEIKUS JG. Prospects for a bio-based succinate industry[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 76(4): 727-740.
- [88] LEE P, LEE S, HONG S, CHANG H. Isolation and characterization of a new succinic acid-producing bacterium, *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E, from bovine rumen[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 58(5): 663-668.
- [89] FUKUI K, KOSEKI C, YAMAMOTO Y, NAKAMURA J, SASAHARA A, YUJI R, HASHIGUCHI K, USUDA Y, MATSUI K, KOJIMA H, ABE K. Identification of succinate exporter in *Corynebacterium glutamicum* and its physiological roles under anaerobic conditions[J]. *Journal of Biotechnology*, 2011, 154(1): 25-34.
- [90] HUHNS S, JOLKVER E, KRÄMER R, MARIN K. Identification of the membrane protein SucE and its role in succinate transport in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 89(2): 327-335.
- [91] SANGURDEKAR DP, SRIENC F, KHODURSKY AB. A classification based framework for quantitative description of large-scale microarray data[J]. *Genome Biology*, 2006, 7(4): R32.
- [92] LI XZ, ZHANG WM, WU MK, XIN FX, DONG WL, WU H, ZHANG M, MA JF, JIANG M. Performance and mechanism analysis of succinate production under different transporters in *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2017, 22(5): 529-538.
- [93] CHEN Z, LIU HJ, ZHANG JN, LIU DH. Elementary mode analysis for the rational design of efficient succinate conversion from glycerol by *Escherichia coli*[J]. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2010, 2010: 518743.
- [94] ZHU NQ, XIA HH, WANG ZW, ZHAO XM, CHEN T. Engineering of acetate recycling and citrate synthase to improve aerobic succinate production in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e60659.
- [95] YUZBASHEV TV, YUZBASHEVA EY, SOBOLEVSKAYA TI, LAPTEV IA, VYBORNAYA TV, LARINA AS, MATSUI K, FUKUI K, SINEOKY SP. Production of succinic acid at low pH by a recombinant strain of the aerobic yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2010, 107(4): 673-682.
- [96] FUKUI K, NANATANI K, HARA Y, YAMAKAMI S, YAHAGI D, CHINEN A, TOKURA M, ABE K. *Escherichia coli yjjPB* genes encode a succinate transporter important for succinate production[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2017, 81(9): 1837-1844.
- [97] FUKUI K, NANATANI K, HARA Y, TOKURA M, ABE K. Identification of *EayjjPB* encoding a dicarboxylate transporter important for succinate production under aerobic and anaerobic conditions in *Enterobacter aerogenes*[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2018, 125(5): 505-512.
- [98] FUKUI K, NANATANI K, NAKAYAMA M, HARA Y, TOKURA M, ABE K. *Corynebacterium glutamicum* CgynfM encodes a dicarboxylate transporter applicable

- to succinate production[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2019, 127(4): 465-471.
- [99] SOBCZAK I, LOLKEMA JS. The 2-hydroxycarboxylate transporter family: physiology, structure, and mechanism[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 2005, 69(4): 665-695.
- [100] KÄSTNER CN, SCHNEIDER K, DIMROTH P, POS KM. Characterization of the citrate/acetate antiporter CitW of *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Archives of Microbiology*, 2002, 177(6): 500-506.
- [101] KROM BP, LOLKEMA JS. Conserved residues R420 and Q428 in a cytoplasmic loop of the citrate/malate transporter CimH of *Bacillus subtilis* are accessible from the external face of the membrane[J]. *Biochemistry*, 2003, 42(2): 467-474.
- [102] MARTY-TEYSSET C, LOLKEMA JS, SCHMITT P, DIVIÈS C, KONINGS WN. The citrate metabolic pathway in *Leuconostoc mesenteroides*: expression, amino acid synthesis, and alpha-ketocarboxylate transport[J]. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(21): 6209-6215.
- [103] PUDLIK AM, LOLKEMA JS. Substrate specificity of the citrate transporter CitP of *Lactococcus lactis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(14): 3627-3635.
- [104] TAKAHASHI S, MIYACHI M, TAMAKI H, SUZUKI H. The *Escherichia coli* CitT transporter can be used as a succinate exporter for succinate production[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2021, 85(4): 981-988.
- [105] BLOUNT ZD, BARRICK JE, DAVIDSON CJ, LENSKI RE. Genomic analysis of a key innovation in an experimental *Escherichia coli* population[J]. *Nature*, 2012, 489(7417): 513-518.
- [106] WARNER JB, LOLKEMA JS. Growth of *Bacillus subtilis* on citrate and isocitrate is supported by the Mg²⁺-citrate transporter CitM[J]. *Microbiology (Reading, England)*, 2002, 148(Pt 11): 3405-3412.
- [107] YAMAMOTO H, MURATA M, SEKIGUCHI J. The CitST two-component system regulates the expression of the Mg-citrate transporter in *Bacillus subtilis*[J]. *Molecular Microbiology*, 2000, 37(4): 898-912.
- [108] WARNER JB, KROM BP, MAGNI C, KONINGS WN, LOLKEMA JS. Catabolite repression and induction of the Mg(2+)-citrate transporter CitM of *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(21): 6099-6105.
- [109] REPIZO GD, BLANCATO VS, SENDER PD, LOLKEMA J, MAGNI C. Catabolite repression of the citST two-component system in *Bacillus subtilis*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, 260(2): 224-231.
- [110] SEVVANA M, VIJAYAN V, ZWECKSTETTER M, REINELT S, MADDEN DR, HERBST-IRMER R, SHELDRIK GM, BOTT M, GRIESINGER C, BECKER S. A ligand-induced switch in the periplasmic domain of sensor histidine kinase CitA[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2008, 377(2): 512-523.
- [111] LEWIS JA, HORSWILL AR, SCHWEM BE, ESCALANTE-SEMERENA JC. The tricarboxylate utilization (*tcuRABC*) genes of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(6): 1629-1637.
- [112] CASTEGNA A, SCARCIA P, AGRIMI G, PALMIERI L, ROTTENSTEINER H, SPERA I, GERMINARIO L, PALMIERI F. Identification and functional characterization of a novel mitochondrial carrier for citrate and oxoglutarate in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(23): 17359-17370.
- [113] MA CL, REMANI S, SUN JK, KOTARIA R, MAYOR JA, WALTERS DE, KAPLAN RS. Identification of the substrate binding sites within the yeast mitochondrial citrate transport protein[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(23): 17210-17220.
- [114] WINNEN B, HVORUP RN, SAIER MH Jr. The tripartite tricarboxylate transporter (TTT) family[J]. *Research in Microbiology*, 2003, 154(7): 457-465.
- [115] FEJES B, OUEDRAOGO JP, FEKETE E, SÁNDOR E, FLIPPHI M, SOÓS Á, MOLNÁR ÁP, KOVÁCS B, KUBICEK CP, TSANG A, KARAFFA L. The effects of external Mn²⁺ concentration on hyphal morphology and citric acid production are mediated primarily by the NRAMP-family transporter DmtA in *Aspergillus niger*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2020, 19(1): 17.
- [116] STEIGER MG, RASSINGER A, MATTANOVICH D, SAUER M. Engineering of the citrate exporter protein enables high citric acid production in *Aspergillus niger*[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 52: 224-231.
- [117] YANG XK, ZHAO LL, CHEN QL, WANG N, SHI K, LIU SW. Functional verification of the citrate

- transporter gene in a wine lactic acid bacterium, *Lactiplantibacillus plantarum*[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022, 10: 894870.
- [118] XU Y, CHEN B, CHAO HJ, ZHOU NY. *mhpT* encodes an active transporter involved in 3-(3-hydroxyphenyl) propionate catabolism by *Escherichia coli* K-12[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(20): 6362-6368.
- [119] NISHIKAWA Y, YASUMI Y, NOGUCHI S, SAKAMOTO H, NIKAWA JI. Functional analyses of *Pseudomonas putida* benzoate transporters expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2008, 72(8): 2034-2038.
- [120] CHOUDHARY A, PUROHIT H, PHALE PS. Benzoate transport in *Pseudomonas putida* CSV86[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2017, 364(12): fnx118.
- [121] WADA A, PRATES ÉT, HIRANO R, WERNER AZ, KAMIMURA N, JACOBSON DA, BECKHAM GT, MASAI EJ. Characterization of aromatic acid/proton symporters in *Pseudomonas putida* KT2440 toward efficient microbial conversion of lignin-related aromatics[J]. *Metabolic Engineering*, 2021, 64: 167-179.
- [122] XU Y, WANG SH, CHAO HJ, LIU SJ, ZHOU NY. Biochemical and molecular characterization of the gentisate transporter GenK in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e38701.
- [123] MORABBI HK, LANGE JL, WATZLAWICK H, KALINOWSKI J, ALTENBUCHNER J. Transcriptional regulation of the vanillate utilization genes (*vanABK* operon) of *Corynebacterium glutamicum* by VanR, a PadR-like repressor[J]. *Journal of Bacteriology*, 2015, 197(5): 959-972.
- [124] COWLES CE, NICHOLS NN, HARWOOD CS. BenR, a XylS homologue, regulates three different pathways of aromatic acid degradation in *Pseudomonas putida*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(22): 6339-6346.
- [125] van DYK TK, TEMPLETON LJ, CANTERA KA, SHARPE PL, SARIASLANI FS. Characterization of the *Escherichia coli* AaeAB efflux pump: a metabolic relief valve?[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(21): 7196-7204.
- [126] SCHELL MA. Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators[J]. *Annual Review of Microbiology*, 1993, 47: 597-626.
- [127] BURKOVSKI A, KRÄMER R. Bacterial amino acid transport proteins: occurrence, functions, and significance for biotechnological applications[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 58(3): 265-274.
- [128] SOARES-SILVA I, RIBAS D, SOUSA-SILVA M, AZEVEDO-SILVA J, RENDULIĆ T, CASAL M. Membrane transporters in the bioproduction of organic acids: state of the art and future perspectives for industrial applications[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2020, 367(15): fnaa118.