

DOI: 10.14188/j.ajsh.2021.01.013

提高衣康酸产量的代谢工程育种研究进展

李露[†], 韩雪影[†]

(青岛科技大学 海洋科学与生物工程学院, 山东 青岛 266042)

摘要: 衣康酸(itaconic acid, IA)是一种白色结晶状的不饱和二元羧酸,它是化学和制药工业中许多相关化合物的前体,被广泛应用于树脂、塑料、胶乳和超吸附剂等的工业生产中。与化学法生产衣康酸相比,生物法具有原料来源广泛,生产过程能耗低,不污染环境等优点。介绍了衣康酸合成的生物代谢途径,以及在野生型宿主和异源宿主中生产衣康酸和提高衣康酸产量的生物技术,为今后开展利用生物技术生产衣康酸的研究提供参考。

关键词: 衣康酸;生物合成;代谢工程

中图分类号: Q819

文献标志码: A

文章编号: 2096-3491(2021)01-0094-06

Research progress of metabolic engineering breeding to improve itaconic acid production

LI Lu[†], HAN Xueying[†]

(College of Marine Science and Biological Engineering, Qingdao University of Science & Technology, Qingdao 266042, Shandong, China)

Abstract: Itaconic acid (IA), also known as methylene succinic acid, is a white crystalline unsaturated dicarboxylic acid. It is the precursor of many related compounds in the chemical and pharmaceutical industries, and widely used in the industrial production of resins, plastics, latexes and superabsorbents. Compared with chemical production of itaconic acid, biotechnology has the advantages of a wide range of raw materials, low energy consumption in the production process, and no environmental pollution. In order to provide a reference for future research on itaconic acid production by biotechnology, the biometabolic pathway of itaconic acid synthesis is introduced, and the biotechnologies to produce itaconic acid in wild-type hosts and heterologous hosts and increase the production of itaconic acid are reviewed.

Key words: itaconic acid; biosynthesis; metabolic engineering

0 引言

衣康酸又称甲叉琥珀酸、亚甲基丁二酸,其化学结构中含有一个不饱和双键和两个羧基,使其具有活泼的化学性质,通过反应可以转化为高价值的生物基化学品,能够取代基于石油化学的丙烯酸和甲基丙烯酸合成乳胶、不饱和树脂和清洁剂等,2004年被美国能源部评选为12种最具发展潜力的生物

基平台化合物之一^[1]。目前衣康酸的生产方法有化学法和生物法,与化学法生产衣康酸相比,生物法具有生产成本低、生产效率高、工艺技术成熟、节能环保等优点,因此生物法是工业生产衣康酸中最常用的方法。生产衣康酸的微生物众多,可分为天然生产和非天然生产衣康酸微生物。天然生产衣康酸的微生物有土曲霉(*Aspergillus terreus*)、黑粉菌(*Ustilago*),非天然生产衣康酸的微生物必须表达外源基

收稿日期: 2020-10-15 修回日期: 2020-11-24 接受日期: 2020-12-15

作者简介: 李露(1976-),女,博士,教授,主要从事生物质化工方面的研究,E-mail: zhanglilu@126.com; 韩雪影(1997-),女,硕士生,主要从事大肠杆菌生产衣康酸的研究,E-mail: hanxueying0128@163.com。[†]李露、韩雪影对本文有同等贡献,为共同第一作者

引用格式: 李露,韩雪影. 提高衣康酸产量的代谢工程育种研究进展[J]. 生物资源, 2021, 43(1): 94-99.

Li L, Han X Y. Research progress of metabolic engineering breeding to improve itaconic acid production [J]. Biotic Resources, 2021, 43(1): 94-99.

因 *Cad* (编码顺乌头酸脱羧酶) 才能生产衣康酸, 目前经过改造后能够产衣康酸的微生物有黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、酵母菌 (yeast)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 等^[2]。本文对不同微生物生产衣康酸的研究进展进行梳理, 总结现有研究的不足, 展望未来研究的方向。

1 衣康酸的生物合成途径

土曲霉和黑粉菌是天然生产衣康酸的微生物,这两种微生物中衣康酸的合成途径有所不同。如图1所示,两种途径中衣康酸的合成都以三羧酸循环为依托,以胞质顺乌头酸(*cis*-ACO)为底物,线粒体中的顺乌头酸由线粒体转运蛋白(*MttA*基因表达)运输至细胞质中。在土曲霉中顺乌头酸由顺乌头酸脱羧酶(*Cad*基因表达)催化生成衣康酸,衣康酸为分泌型产物,通过质膜转运蛋白(*MfsA*基因表达)被运输至胞外。在黑粉菌中,顺乌头酸在胞质乌头酸异构酶(*Adi1*基因表达)的作用下转化为反式乌头酸,然后经反式乌头酸脱羧酶(*Tad1*基因表达)催化合成衣康酸,最后通过质膜转运蛋白(*Itp1*基因表达)分泌至胞外^[3]。

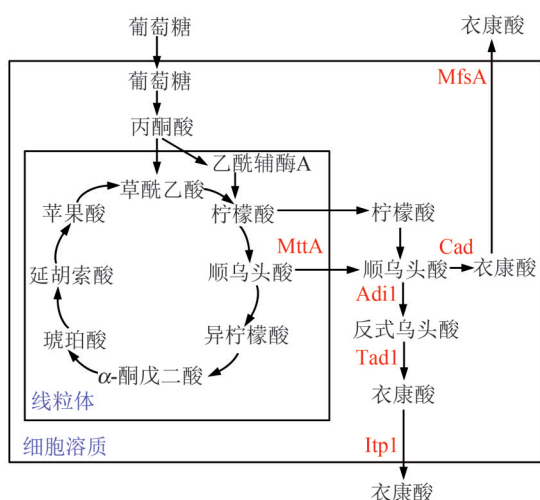


图1 衣康酸的生物合成途径

Fig. 1 Biosynthetic pathway of itaconic acid

2 产衣康酸野生型菌株

2.1 土曲霉生产衣康酸

土曲霉是最早应用于衣康酸工业生产的微生物,具有天然高产的优点。由于发现和应用都较早,对于土曲霉产衣康酸的研究已经比较全面、系统。

从培养基成分、发酵条件的优化,诱变处理土曲霉获得高产衣康酸菌株,构建工程菌改善土曲霉内部合成通路等各个角度吸引了众多研究者。

2.1.1 发酵条件

实验表明,持续的氧气供应是必需的,适度加强搅拌和增加曝气气体中的氧气浓度可提高衣康酸的产量,剧烈搅拌会对菌丝体造成损伤^[4]。发酵中pH值变化也会影响衣康酸的生产,研究者测试了3.0~3.6之间的pH值对衣康酸生产的影响,发现当pH值控制在3.4时衣康酸产量最高^[5]。培养基中的某些微量元素对衣康酸的生产有抑制作用,比如锰离子浓度小于 3×10^{-9} mol/L是衣康酸高产的基础^[6]。

2.1.2 诱变处理

通过诱变筛选高产衣康酸的菌株是提高衣康酸产量有效且简便的方法之一。用亚硝基胍(NTG)处理土曲霉 IFO6365 后,采用衣康酸浓度梯度琼脂平板技术筛选,成功得到突变菌株 TN-484,在 2.5 L 的生物反应器中发酵获得 82.3 g/L 衣康酸^[7]。采用原生质体硫酸二乙酯诱变技术对土曲霉 CICC2433 进行两次诱变,衣康酸产量较原始菌株提高了 167.98%^[8]。LiCl 和 UV 诱变是常用的菌株诱变方法,对土曲霉进行 LiCl 和 UV 复合诱变,通过筛选均获得了比出发菌株产量更高的菌株^[9,10]。

2.1.3 利用不同发酵底物生产衣康酸

土曲霉发酵原料以葡萄糖为主,由于土曲霉缺乏分泌糖化酶的能力,所以不能直接利用淀粉等大分子碳水化合物,对淀粉等大分子碳水化合物进行预处理后,才能成为衣康酸生产原料。近年来为了贯彻环保、节能理念,同时为了降低衣康酸的生产成本,许多研究者以廉价淀粉、农业残余、林业残余等作为原料生产衣康酸。如:以小麦糠为二代原料,对其进行碱性预处理和酶水解得到混合糖液,以此为碳源进行发酵生产衣康酸,得到27.7 g/L 的衣康酸^[11]。以稻草秸秆酶解糖化液为原料,利用土曲霉 KY-013 发酵生产衣康酸,在不额外添加葡萄糖和木糖条件下,衣康酸产量可达到9.78 g/L^[12]。

2.2 黑粉菌生产衣康酸

除了土曲霉外,黑粉菌也能够天然生产衣康酸,与土曲霉相比,黑粉菌具有较高的pH耐受性,但容易丝状生长,影响发酵过程中搅拌和氧气通量。研究者以玉米黑粉菌(*Ustilago maydis*) MB215作为发酵菌株,使用200 g/L葡萄糖和75 mM铵盐发酵产

生了44.5 g/L衣康酸,最大生产速率为0.74 g/L/h^[13]。从126种香根草黑穗菌(*Ustilago vetiveriae*)菌株中筛选出衣康酸产率最高并具有较高的甘油摄取率的菌株TZ1,并以甘油作为原料进行生产衣康酸,获得了37.2 g/L的衣康酸产量^[14]。

3 工程菌株构建

3.1 土曲霉工程育种生产衣康酸

通过在土曲霉中表达外源基因使代谢通路中衣康酸的前体物质积累,可增加衣康酸的产量。*Cad*和*MfsA*两种基因的过表达有利于衣康酸产量的提高,*TEG_01954*,*ACN*和*CITA*基因在土曲霉中过表达时,衣康酸产量均比原菌株低,表明这些基因的过表达不利于土曲霉中衣康酸产量的提高^[15]。研究者将*glaA*基因(编码葡萄糖淀粉酶)转入土曲霉CICC40205,得到直接从液化淀粉生产衣康酸的土曲霉菌株,发酵获得了77.6 g/L衣康酸^[16]。

3.2 黑粉菌工程育种生产衣康酸

研究者敲除使黑粉菌丝状生长的*ras2*、*fuz7*和*ubc3*这三个基因,使其形态与酵母菌相像,消除了发酵中的剪切力,使其形态更有利于发酵生产^[17]。删除玉米黑粉菌中催化衣康酸生成副产物的基因*Cyp3*,同时过表达基因簇调节子*ria1*,可将衣康酸产量提高至(63.2±0.7) g/L^[18]。通过缺失衣康酸氧化酶和过量表达限速生产步骤来优化衣康酸生产,利用狗牙根黑穗菌(*Ustilago cynodontis*) $\Delta fuz7^r \Delta cyp3^r P_{etef} mttA P_{ria1} ria1$ 菌种发酵产量可达(82.9±0.8) g/L^[19]。对玉米黑粉菌菌株MB215做*fuz7*基因缺失处理,使菌株形态得到改善,并用CaCO₃原位产物结晶,最终衣康酸产量高达220 g/L^[20]。

3.3 黑曲霉工程育种生产衣康酸

文献中报道的土曲霉生产衣康酸的产量在大多数情况下明显低于黑曲霉生产柠檬酸的产量。而柠檬酸又是衣康酸生物合成途径中重要的前体物质之一,柠檬酸的过量表达是衣康酸高产的基础,虽然黑曲霉不是衣康酸的天然生产者,但黑曲霉具有生产衣康酸的天然优势。外源基因*Cad*(编码顺乌头酸脱羧酶)在黑曲霉中的表达,完善了黑曲霉中衣康酸的生物合成途径。将*Cad*基因转化至黑曲霉中进行外源表达,发现其生产水平较低,之后研究者将*Cad*、*MttA*与*MfsA*这三个基因共同在黑曲霉中过度表达,衣康酸产量大幅度提高^[21]。以黑曲霉AB1.13作为宿主,构建工程菌株AB1.13 *Cad*+*MfsA*+*MttA*,并将胞质柠檬酸合成酶基因*CitB*在

AB1.13 *Cad*+*MfsA*+*MttA*菌株中过表达,通过分批发酵实现了高达26.2 g/L的衣康酸产量,且减少了副产物柠檬酸的生成^[22]。以工业柠檬酸生产菌株YX-1217为宿主,将*ACN*基因(编码顺乌头酸酶)和*Cad*基因构建在同一个表达载体中,与仅表达*Cad*的菌株相比,衣康酸产量增加了71.4%^[23]。通过过表达编码ATP柠檬酸裂解酶的基因*acl2*,增加溶质中的乙酰辅酶A含量,可增加衣康酸的产量至42.7 g/L^[24]。

3.4 酵母工程育种生产衣康酸

酵母在工业发酵中具有许多优势,包括在低pH值和低温下也能旺盛生长,对剪切应力的高度耐受性,极少发生噬菌体污染以及易于分离等,这些优势可用于衣康酸的生产中。将*Cad*基因转化进酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)BY4741中,成功获得生产衣康酸的酿酒酵母,最高产量为59 mg/mL^[25]。通过计算机指导依次敲除了*ade3*、*bnal2*和*tes1*这三个基因,将衣康酸产量提高至168 mg/L。*Cad*基因也已被引入产油酵母解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)中,将*MttA*基因和*Cad*基因在耶氏解脂酵母中共同表达,通过发酵优化,工程耶氏解脂酵母的衣康酸产量达到22.03 g/L^[26],此值为迄今报道的使用限定培养基在自然低pH条件下酵母获得的最高发酵衣康酸含量。毕赤酵母(*Pichia kudriavzevii*)是一种非常规酵母,对低pH值的有机酸具有很高的耐受性。将*Cad*基因和*MttA*基因转入毕赤酵母,并敲除了两个编码异柠檬酸脱氢酶的基因,但获得的衣康酸产量略低^[27]。

3.5 大肠杆菌工程育种生产衣康酸

大肠杆菌作为底盘细胞具有自身的优势:细胞生长周期短,最终时空产率高;遗传背景清楚,基因改造较为容易,具有很好的有机酸耐受性,具备生产较高浓度衣康酸的潜力。采用基于模型的方法,以一种新的迭代方式优化大肠杆菌的衣康酸生产,构建出工程大肠杆菌($\Delta pykA \Delta pykF \Delta pta \Delta Picd :: cam_Bba_J23115$ pCadCS),获得衣康酸的最高浓度为32 g/L^[28]。对*Cad*基因进行密码子优化,在大肠杆菌中表达得以实现衣康酸的生产,但产量低于10 mg/L^[29]。将*Cad*、*ACN*、*Ppc*(pEp(磷酸烯醇式丙酮酸)羧化酶)在大肠杆菌中过表达,同时将*icd*基因敲除阻断乙醛酸分流途径,以木糖和甘油为碳源,通过分批补料发酵,获得衣康酸产量为43 g/L,最终收率为每克甘油0.6 g衣康酸^[30]。以柠檬酸为原料,通过过表达*ACN*和*Cad*基因,构建大肠杆菌

全细胞生物催化剂,将柠檬酸转化为衣康酸^[31],结果表明增加 *Cad* 的拷贝数能够提高柠檬酸向衣康酸的转化率,包含 ACN 和三个 *Cad* 基因的大肠杆菌柠檬酸的转化率可达到 64.0%。利用酶的自组装技术,将衣康酸通路中三个关键的基因 ACN、*Cad*、*gltA* 通过配对的蛋白质支架融合在一起,使这些蛋白酶彼此靠近,形成相应底物产物通道,比无蛋白质支架的衣康酸的产量高出 3.8 倍^[32]。由于大肠杆菌是兼性厌氧微生物,因此在厌氧的条件下也可以进行发酵生产衣康酸。在磷酸乙酰转移酶(*PTA*)和乳酸脱氢酶(*ldhA*)缺陷型大肠杆菌菌株 BW25113(DE3)中过表达基因 *Cad*、*gltA*、ACN,发酵得到的衣康酸浓度为 2.9 mM^[33],这是首次利用厌氧发酵生产衣康酸。

3.6 其他微生物工程育种生产衣康酸

以葡萄糖为原料的土曲霉工业生产中,衣康酸的生产水平高达 146 g/L,但是,由于成本原因,衣康酸的价格仍然过高,可以通过开发新菌株来实现价格的进一步降低。

蓝细菌在生物工业中显示出很高的潜力,利用工程蓝细菌已经实现了从二氧化碳(CO₂)生产出有价值的产品,例如生物燃料和散装化学品。将 *Cad* 基因转入集胞藻 PCC6803 中,利用光合作用从二氧化碳生产衣康酸,在 5%CO₂ 持续鼓泡的条件下,产生 14.5 mg/L 的衣康酸,生产速率为 919 μg/L/d^[34]。与非光合微生物相比,集胞藻可以通过连续的细胞生长来实现衣康酸的持续产生,在衣康酸生产中更具优势和吸引力,但产量有待提高。

粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)具有分泌纤维素酶的能力,利用粗糙脉孢菌生产衣康酸,通过将 *Cad* 基因转入野生型粗糙脉孢菌 FGSC 9720 中使纤维素直接转化为衣康酸,从而节省了原料和操作过程的成本,最终获得了 20 mg/L 的衣康酸产量^[35]。

谷氨酸棒状杆菌对衣康酸具有高度的耐受性,并且不代谢衣康酸。在谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 中表达 *Cad*,产生了 1.4 mmol/L 衣康酸;将 *Cad* 与大肠杆菌麦芽糖结合蛋白基因融合,衣康酸产量提高了两倍;通过将 *ATG* 起始密码子交换为 *GTG* 或 *TTG* 降低异柠檬酸脱氢酶活性,获得衣康酸最大产量为 7.8 g/L,产率为 2.1 mmol/L/h^[36]。

4 结 论

衣康酸作为一种可再生的有机酸,受到越来越多的关注。土曲霉是衣康酸的主要生产者,但仍具

有一些缺点,筛选高产菌株,优化发酵条件一直是提高衣康酸产量的重点。目前黑曲霉、耶氏解脂酵母、大肠杆菌、酵母菌和部分藻类已经作为具有衣康酸生产潜力的异源宿主被开发,改善关键酶的活性,阻断竞争性副产物的合成途径以及增强代谢产物运输的策略已用于改善衣康酸的生产,但是,异源宿主的衣康酸产量仍然未达到土曲霉的生产水平。

衣康酸产量的提高仍然存在问题,包括土曲霉的生长抑制,衣康酸的低碳通量以及缺乏异源宿主的代谢物转运蛋白。基因组,转录组,蛋白质组和代谢组分析,以及合成生物学,可有助于了解衣康酸合成的潜在机制,增加向衣康酸的碳通量,还可以用于解决微生物的生长抑制问题。另外,目前发现的与衣康酸代谢有关的转运蛋白可以解决底物的运输问题,从而提高其产量。

参考文献

- [1] 杨中伟. 大肠杆菌多酶自组装合成衣康酸及代谢工程研究 [D]. 上海: 华东理工大学, 2018.
Yang Z W. Enhanced itaconic acid by multi-enzyme self-assemble and metabolic engineering in *Escherichia coli* [D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2018.
- [2] Kuenz A, Krull S. Biotechnological production of itaconic acid-things you have to know [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2018, 102(9): 3901-3914.
- [3] Zhao M L, Lu X Y, Zong H, *et al.* Itaconic acid production in microorganisms [J]. Biotechnol Lett, 2018, 40(3): 455-464.
- [4] Nemestóthy N, Bakonyi P, Komáromy P, *et al.* Evaluating aeration and stirring effects to improve itaconic acid production from glucose using *Aspergillus terreus* [J]. Biotechnol Lett, 2019, 41(12): 1383-1389.
- [5] Krull S, Hevekerl A, Kuenz A, *et al.* Process development of itaconic acid production by a natural wild type strain of *Aspergillus terreus* to reach industrially relevant final titers [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2017, 101(10): 4063-4072.
- [6] Karaffa L, Díaz R, Papp B, *et al.* A deficiency of manganese ions in the presence of high sugar concentrations is the critical parameter for achieving high yields of itaconic acid by *Aspergillus terreus* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2015, 99(19): 7937-7944.
- [7] Yahiro K, Takahama T, Park Y S, *et al.* Breeding of *Aspergillus terreus* mutant TN-484 for itaconic acid production with high yield [J]. J Ferment Bioeng, 1995, 79(5): 506-508.

- [8] 杨静. 林业剩余物土曲霉发酵制备衣康酸的研究 [D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2018.
Yang J. Itaconic acid production from forest residue by *Aspergillus terreus* [D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry, 2018.
- [9] 廖威, 龙光祥, 钟梅清. 废糖蜜生产衣康酸发酵条件的优化 [J]. 广西职业技术学院学报, 2014, 7(6): 1-10.
Liao W, Long G X, Zhong M Q. The optimization of fermentation conditions of itaconic acid from waste molasses [J]. Guangxi Vocational and Technical College, 2014, 7(6): 1-10.
- [10] 魏凌云, 梁海秋, 周河治, 等. 以淀粉为碳源衣康酸高产菌株的筛选 [J]. 微生物学通报, 2010, 37(2): 246-250.
Wei L Y, Liang H Q, Zhou H Z, *et al.* Screening of high itaconic acid yielding strain using corn starch [J]. Microbiology China, 2010, 37(2): 246-250.
- [11] Krull S, Eidt L, Hevekerl A, *et al.* Itaconic acid production from wheat chaff by *Aspergillus terreus* [J]. Process Biochem, 2017, 63: 169-176.
- [12] 刘兰, 倪赛, 任雨萍, 等. 稻草秸秆的酶解糖化及发酵生产衣康酸 [J]. 化学与生物工程, 2020, 37(4): 51-57.
Liu L, Ni C, Ren Y P, *et al.* Enzymatic saccharification of rice straw and itaconic acid production by fermentation [J]. Chemistry Bioengineering, 2020, 37(4): 51-57.
- [13] Maassen N, Panakova M, Wierckx N, *et al.* Influence of carbon and nitrogen concentration on itaconic acid production by the smut fungus *Ustilago maydis* [J]. Eng Life Sci, 2014, 14(2): 129-134.
- [14] Zambanini T, Hosseinpour Tehrani H, Geiser E, *et al.* Efficient itaconic acid production from glycerol with *Ustilago vetiveriae* TZ1 [J]. Biotechnol Biofuels, 2017, 10: 131.
- [15] Huang X N, Lu X F, Li Y M, *et al.* Improving itaconic acid production through genetic engineering of an industrial *Aspergillus terreus* strain [J]. Microb Cell Fact, 2014, 13: 119.
- [16] Huang X N, Chen M, Lu X F, *et al.* Direct production of itaconic acid from liquefied corn starch by genetically engineered *Aspergillus terreus* [J]. Microb Cell Fact, 2014, 13: 108.
- [17] Hosseinpour Tehrani H, Tharmasothirajan A, Track E, *et al.* Engineering the morphology and metabolism of pH tolerant *Ustilago cynodontis* for efficient itaconic acid production [J]. Metab Eng, 2019, 54: 293-300.
- [18] Geiser E, Przybilla S K, Engel M, *et al.* Genetic and biochemical insights into the itaconate pathway of *Ustilago maydis* enable enhanced production [J]. Metab Eng, 2016, 38: 427-435.
- [19] Hosseinpour Tehrani H, Saur K, Tharmasothirajan A, *et al.* Process engineering of pH tolerant *Ustilago cynodontis* for efficient itaconic acid production [J]. Microb Cell Factories, 2019, 18(1): 213.
- [20] Hosseinpour Tehrani H, Becker J, Bator I, *et al.* Integrated strain and process design enable production of 220 g/L itaconic acid with *Ustilago maydis* [J]. Biotechnol Biofuels, 2019, 12: 263.
- [21] van der Straat L, Vernooij M, Lammers M, *et al.* Expression of the *Aspergillus terreus* itaconic acid biosynthesis cluster in *Aspergillus niger* [J]. Microb Cell Fact, 2014, 13: 11.
- [22] Hossain A H, Li A, Brickwedde A, *et al.* Rewiring a secondary metabolite pathway towards itaconic acid production in *Aspergillus niger* [J]. Microb Cell Fact, 2016, 15(1): 130.
- [23] Xie H, Ma Q Y, Wei D Z, *et al.* Metabolic engineering of an industrial *Aspergillus niger* strain for itaconic acid production [J]. 3 Biotech, 2020, 10(3): 113.
- [24] Hossain A H, van Gerven R, Overkamp K M, *et al.* Metabolic engineering with ATP-citrate lyase and nitrogen source supplementation improves itaconic acid production in *Aspergillus niger* [J]. Biotechnol Biofuels, 2019, 12: 233.
- [25] Blazeck J, Miller J, Pan A, *et al.* Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for itaconic acid production [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2014, 98(19): 8155-8164.
- [26] Zhao C, Cui Z Y, Zhao X Y, *et al.* Enhanced itaconic acid production in *Yarrowia lipolytica* via heterologous expression of a mitochondrial transporter MTT [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2019, 103(5): 2181-2192.
- [27] Sun W, Vila-Santa A, Liu N, *et al.* Metabolic engineering of an acid-tolerant yeast strain *Pichia kudriavzevii* for itaconic acid production [J]. Metab Eng Commun, 2020, 10: e00124.
- [28] Harder B J, Bettenbrock K, Klamt S. Model-based metabolic engineering enables high yield itaconic acid production by *Escherichia coli* [J]. Metab Eng, 2016, 38: 29-37.
- [29] Vuoristo K S, Mars A E, Sangra J V, *et al.* Metabolic engineering of itaconate production in *Escherichia coli* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2015, 99(1): 221-228.

- [30] Chang P C, Chen G S, Chu H Y, *et al.* Engineering efficient production of itaconic acid from diverse substrates in *Escherichia coli* [J]. J Biotechnol, 2017, 249: 73-81.
- [31] Kim J, Seo H M, Bhatia S K, *et al.* Production of itaconate by whole-cell bioconversion of citrate mediated by expression of multiple cis-aconitate decarboxylase (cadA) genes in *Escherichia coli* [J]. Sci Rep, 2017, 7: 39768.
- [32] Tran K N T, Somasundaram S, Eom G T, *et al.* Efficient itaconic acid production via protein-protein scaffold introduction between GltA, AcnA, and CadA in recombinant *Escherichia coli* [J]. Biotechnol Prog, 2019, 35 (3): e2799.
- [33] Vuoristo K S, Mars A E, Sangra J V, *et al.* Metabolic engineering of the mixed-acid fermentation pathway of *Escherichia coli* for anaerobic production of glutamate and itaconate [J]. AMB Express, 2015, 5(1): 61.
- [34] Chin T, Sano M, Takahashi T, *et al.* Photosynthetic production of itaconic acid in *Synechocystis* sp PCC6803 [J]. J Biotechnol, 2015, 195: 43-45.
- [35] Zhao C, Chen S L, Fang H. Consolidated bioprocessing of lignocellulosic biomass to itaconic acid by metabolically engineering *Neurospora crassa* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2018, 102(22): 9577-9584.
- [36] Otten A, Brocker M, Bott M. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the production of itaconate [J]. Metab Eng, 2015, 30: 156-165.

□

(编辑: 梅楠)