DOI:10.12441/spyswjs.20250115001 [文章编号] 1673-1689(2026)02-0088-11

代谢工程改造马克斯克鲁维酵母生产琥珀酸

顾子蕴[1,2] 唐永圣[1,2] 陈修来[1,2*]

(1. 江南大学生物工程学院,江苏 无锡 214122; 2. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室,江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】构建琥珀酸生物合成细胞工厂,实现琥珀酸的高效合成。**【方法】**以马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*,*K. marxianus*)为底盘菌株,通过代谢工程策略,包括阻断副产物合成路径、强化糖酵解途径、构建异源琥珀酸合成途径、优化关键酶表达量、增强琥珀酸跨膜转运能力等,构建了生物合成琥珀酸的酵母工程菌株。最后,通过发酵工艺优化提高其生产能力。**【结果】**在 5 L 发酵罐上,工程菌株 *K. marxianus* SA011 的琥珀酸产量、得率和生产强度分别达到了 10.06 g/L、11.4% 和 0.15 g/(L·h)。**【结论】**该研究为 *K. marxianus* 的代谢工程改造提供了新思路,也为利用酵母高效生物合成琥珀酸及其工业化应用奠定了重要基础。

关键词:马克斯克鲁维酵母;琥珀酸;代谢工程;转运子工程

Metabolic Engineering of *Kluyveromyces marxianus* for Succinic Acid Production

GU Ziyun[1,2] *TANG Yongsheng*[1,2] *CHEN Xiulai*[1,2*]

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: [**Objective**] This study constructed a succinic acid-producing cell factory for the efficient biosynthesis of succinic acid. [**Method**] Using *Kluyveromyces marxianus* (*K. marxianus*) as the chassis strain, an engineered yeast strain for the biosynthesis of succinic acid through comprehensive metabolic engineering strategies was constructed. These strategies encompassed the disruption of by-product synthesis pathways, enhancement of glycolytic flux, introduction of a heterologous succinic acid biosynthetic pathway, optimization of key enzyme expression, and augmentation of transmembrane transport of succinic acid. Finally, a fermentation process optimization was performed to improve the production performance. [**Result**] The engineered strain *K. marxianus* SA011 achieved a succinic acid titer of 10.06 g/L, a yield of 11.4%, and a productivity of 0.14 g/(L·h) in a 5 L bioreactor. [**Conclusion**] This study provides new insights into the metabolic engineering of *K. marxianus* and establishes a foundation for the efficient biosynthesis of succinic acid by yeast, facilitating its industrial application.

Keywords: *Kluyveromyces marxianus*; succinic acid; metabolic engineering; transporter engineering

琥珀酸作为一种四碳二羧酸,主要应用于清洁剂、食品添加剂、制药以及生物可降解塑料等领域[1-3]。琥珀酸因具有广泛的应用前景,被美国能源部列为最关键的 12 种生物基平台化合物之一[4-5]。目前,生物法生产琥珀酸的菌株主要是细菌,包括产琥珀酸放线杆菌[6-8]、谷氨酸棒状杆

基金项目:国家自然科学基金面上项目(22378166);江苏省基础研究计划项目和江苏省合成生物基础研究中心资助项目(BK20233003)。

通信作者:陈修来(1985—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事系统代谢工程与合成生物学研究。E-mail:xlchen@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2025-01-15 **修回日期:**2025-02-17

菌[9-10]、产琥珀酸曼氏杆菌[11]和大肠杆菌[12]等。然而，细菌生产琥珀酸存在生产条件苛刻、耐酸性差及食品安全等问题[13-14]。细菌生产过程需要添加大量中和剂，会造成下游处理成本增加和环境污染加重，因此，利用更耐酸的酵母生产琥珀酸的研究得到了广泛关注[15]。

目前已有一些研究通过改造模式微生物酿酒酵母及非常规酵母（如东方伊萨酵母、解脂耶氏酵母等），实现了酵母细胞工厂中琥珀酸的高效生产[16-21]。主要的代谢工程策略包括以下几个方面。1）阻断冗余路径：酵母在发酵过程中，会积累甘油、乙醇及乙酸等代谢产物，严重影响琥珀酸的产量和得率。因此，敲除这些副产物路径能够有效提高琥珀酸的积累。例如，在解脂耶氏酵母中敲除SDH5和ACH1并过表达*Sc*PCK和*Yl*SCS2，琥珀酸产量和得率分别达到110.70 g/L和53.0%[19]。2）强化合成路径通量：合成路径的通量直接关系产物的类型及产量，过表达关键基因是提高琥珀酸合成效率的有效策略。在PDC缺陷型酿酒酵母中过表达琥珀酸还原合成路径酶PYC、MDH、FUM及FRD，琥珀酸产量达到12.97 g/L[20]。3）强化琥珀酸转运：加强琥珀酸的外排不仅能减少反馈抑制和细胞毒性，还能提高底物利用速率。例如，在东方伊萨酵母SA中过表达二羧酸转运蛋白*Sp*MAE1，琥珀酸产量从6.80 g/L提升到24.10 g/L，提高了2.54倍[16]。4）优化辅因子供应：辅因子参与细胞内的许多重要催化反应，在细胞生长代谢中占据重要地位，也是琥珀酸合成的主要限制因素[22]。在东方伊萨酵母P-8a中过表达荧光假单胞菌来源的转氢酶*Pf*STHA，将胞内NADPH转换为NADH，琥珀酸产量达到89.00 g/L[23]。5）强化前体供应：丙酮酸是糖酵解途径的最终代谢产物，也是TCA循环的起始代谢物，增加关键前体丙酮酸的供给或减少丙酮酸的不必要消耗，能够增强细胞的代谢能力和琥珀酸的合成效率[24]。例如，在酿酒酵母中过表达PYK，成功增加了丙酮酸的积累，使终产物产量提高了2.5%[25]。虽然上述策略有效提高了酵母生产琥珀酸的产量及得率，但酵母的琥珀酸生产水平仍和细菌存在差距，且酵母发酵过程面临着发酵周期长及冷却成本高等问题，这些技术瓶颈限制了其工业化应用[26]。

本研究以非常规酵母——马克斯克鲁维酵母Km003为出发菌株，针对琥珀酸生物合成过程中前体供给不足、代谢通量受限及产物跨膜转运效率低等问题，采用前体供应强化、代谢通量优化、转运蛋白工程以及发酵优化等策略，对菌株进行系统改造，以构建高效合成琥珀酸的工程菌株，证实酵母菌生产琥珀酸的可行性，并为其进一步工业化应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒

E. coli Jm109用于表达载体的构建，*K. marxianus* Km003作为代谢工程改造的底盘，*K. marxianus* Km003为保藏的营养缺陷型菌株。所使用的菌种见表1。

1.1.2 主要仪器和试剂

凝胶成像仪：ChemiDoc XRS型，伯乐生命医学产品（上海）公司；PCR扩增仪：T100型，伯乐生命医学产品（上海）公司；核酸电泳仪：Sub-Cell GT型，伯乐生命医学产品（上海）公司；电转仪：Mini-Protean Tetra型，伯乐生命医学产品（上海）公司；分析天平：MA54/A型，梅特勒托利多科技（中国）有限公司；恒温培养箱：JY-150型，上海跃进医疗器械厂；分光光度计：UV-1800型，岛津（香港）有限公司；pH计：S210型，梅特勒托利多科技（中国）有限公司；高速离心机：5415R型，艾本德国际贸易（上海）有限公司；液相色谱仪：UltiMate 3000型，赛默飞世尔科技（中国）有限公司；生物分析仪：2100型，安捷伦科技（中国）有限公司；5 L全自动搅拌式发酵罐：T&J intelli-Ferm型，迪必尔生物工程（上海）有限公司。

T4 DNA Ligase、QucikCut™ *Dpn1*、Ex *Taq*、PrimeSTAR Max DNA Polymerase、DNA Markers：宝生物工程（大连）有限公司；一步同源重组酶、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、细菌基因组提取试剂盒：诺唯赞生物科技（南京）股份有限公司；酵母基因组提取试剂盒、酵母质粒小提试剂盒：天根生化科技（北京）有限公司。尿嘧啶（纯度≥99%）、5-氟乳清酸（纯度≥99%）、遗传霉素（纯度≥98%）：生工生物工程（上海）股份有限公司；琥珀酸、丙酮酸、乳酸、乙酸：分析纯，西格玛奥德里奇（上海）贸易有限公司；PCR引物：亦欣生物科技（上海）有限

公司；其他试剂：分析纯，国药集团化学试剂有限公司。

1.1.3 培养基

1）LB培养基：10 g/L NaCl、5 g/L酵母提取物、10 g/L蛋白胨。

2）YPD培养基：60 g/L葡萄糖、10 g/L酵母提取物、20 g/L胰蛋白胨。

3）SC培养基：1.7 g/L酵母基础氮源、5 g/L $(NH_4)_2SO_4$、60 g/L葡萄糖。

4）SD培养基：1.7 g/L酵母基础氮源、1.96 g/L氨基酸缺失混合物、5 g/L $(NH_4)_2SO_4$、60 g/L葡萄糖。

5）IM1培养基：60 g/L葡萄糖、5 g/L $(NH_4)_2SO_4$、6.6 g/L K_2SO_4、0.25 g/L $MgSO_4$、3 g/L KH_2PO_4、15 mg/L EDTA、4.5 mg/L $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$、0.3 mg/L $CoCl_2 \cdot 6H_2O$、1 mg/L $MnCl_2 \cdot 4H_2O$、0.3 mg/L $CuSO_4 \cdot 4H_2O$、0.1 mg/L KI、4.5 mg/L $CaC1_2 \cdot H_2O$、3 mg/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$、0.4 mg/L $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$、1 mg/L H_3BO_4、0.25 g/L肌醇、0.01 g/L烟酸、0.01 g/L盐酸吡哆醇、0.01 g/L盐酸硫胺素、0.000 5 g/L生物素、0.01 g/L泛酸钙、0.002 g/L对氨基苯甲酸。

6）IM2培养基：60 g/L葡萄糖、2 g/L $(NH_4)_2SO_4$、0.5 g/L KH_2PO_4、1 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$、5 g/L酵母提取物、0.2 mg/L $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$、0.05 mg/L $MnSO_4 \cdot 5H_2O$、0.1 mg/L $CuSO_4 \cdot 5H_2O$、0.2 mg/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$、0.01 g/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$、0.02 mg/L $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$、0.01 mg/L $H_8MoN_2O_4$、0.1 g/L肌醇、0.05 g/L烟酰胺、0.05 g/L组氨酸、0.1 g/L苏氨酸、0.1 g/L色氨酸、0.1 g/L亮氨酸、0.05 g/L泛酸钙、0.05 g/L缬氨酸、0.1 g/L尿嘧啶。

表1 本研究所使用的菌种

Table 1 Strains used in this study

菌株	相关特性	来源
E. coli Jm109	表达载体宿主	保藏菌株
K. marxianus NBRC1777	野生型宿主	保藏菌株
K. marxianus Km003	*K. marxianus* NBRC1777Δ*ura3*Δ*leu2*Δ*trp1*	保藏菌株
K. marxianus PA001	*K. marxianus* Km003-P_{adh1}-*fba1*-T_{cyc1}	作者构建
K. marxianus PA002	*K. marxianus* Km003-P_{adh1}-*pyk1*-T_{cyc1}	作者构建
K. marxianus PA003	*K. marxianus* Km003-P_{adh1}-*fba1*-T_{cyc1}-P_{adh1}-*pyk1*-T_{cyc1}	作者构建
K. marxianus PA004	*K. marxianus* PA003Δ*pdc1*	作者构建
K. marxianus PA005	*K. marxianus* PA003Δ*adh1*	作者构建
K. marxianus PA006	*K. marxianus* PA004Δ*adh1*	作者构建
K. marxianus PA007	*K. marxianus* PA004Δ*gpd1*	作者构建
K. marxianus SA001	*K. marxianus* PA004-*Ropyc-Cgmdh-Ecfum-Tbfrd*	作者构建
K. marxianus SA002	*K. marxianus* SA001-P_{tef1}-*Tbfrd*-T_{cyc1}	作者构建
K. marxianus SA003	*K. marxianus* SA002-P_{tef1}-*Tbfrd*-T_{cyc1}	作者构建
K. marxianus SA004	*K. marxianus* SA003-P_{tef1}-*Tbfrd*-T_{cyc1}	作者构建
K. marxianus SA005	*K. marxianus* SA003-P_{gpd1}-*Romae*-T_{adh1}	作者构建
K. marxianus SA006	*K. marxianus* SA003-P_{gpd1}-*Scmae*-T_{adh1}	作者构建
K. marxianus SA007	*K. marxianus* SA003-P_{gpd1}-*Afmae*-T_{adh1}	作者构建
K. marxianus SA008	*K. marxianus* SA003-P_{gpd1}-*Spmae*-T_{adh1}	作者构建
K. marxianus SA009	*K. marxianus* SA008-P_{eno1}-*Spmae*-T_{adh1}	作者构建
K. marxianus SA010	*K. marxianus* SA008-P_{gpd2}-*Spmae*-T_{adh1}	作者构建
K. marxianus SA011	*K. marxianus* SA008-P_{adh1}-*Spmae*-T_{adh1}	作者构建

1.2 方法

1.2.1 重组质粒的构建

采用吉布森（Gibson）组装法构建质粒[26]。设计并合成上下游扩增引物，利用上下游引物从*K. marxianus* NBRC1777基因组上扩增*adh1*、*pdc1*、*eno1*、*pgk1*、*mdh1*和*gpd2*基因上游1 000 bp的片段，将它们分别连接到荧光蛋白报告质粒pURA-eGFP上，得到质粒pURA-P_{adh1}-eGFP、

pURA-P_{pdc1}-eGFP、pURA-P_{eno1}-eGFP、pURA-P_{pgk1}-eGFP、pURA-P_{mdh1}-eGFP和pURA-P_{gpd2}-eGFP，重组质粒均已通过测序验证。所使用的重组质粒及引物分别见表2和表3。

表2　本研究使用的质粒

Table 2　Plasmids used in this study

质粒	相关特性	来源
pCAS	*panars*，*amp*，*ura3*，P_{TEF}-*cas9*，P_{GPD}-gRNA	保藏菌株
pURA	*ars7*/*cen1*，*amp*，*ura3*	保藏菌株
pURA-eGFP	*ars7*/*cen1*，*amp*，*ura3*，eGFP-T_{cyc1}	作者构建
pURA-P_{adh1}-eGFP	*ars7*/*cen1*，*amp*，*ura3*，P_{adh1}-eGFP-T_{cyc1}	作者构建
pURA-P_{pdc1}-eGFP	*ars7*/*cen1*，*amp*，*ura3*，P_{pdc1}-eGFP-T_{cyc1}	作者构建
pURA-P_{eno1}-eGFP	*ars7*/*cen1*，*amp*，*ura3*，P_{eno1}-eGFP-T_{cyc1}	作者构建
pURA-P_{pgk1}-eGFP	*ars7*/*cen1*，*amp*，*ura3*，P_{pgk1}-eGFP-T_{cyc1}	作者构建
pURA-P_{gpd2}-eGFP	*ars7*/*cen1*，*amp*，*ura3*，P_{gpd2}-eGFP-T_{cyc1}	作者构建
pURA-P_{mdh1}-eGFP	*ars7*/*cen1*，*amp*，*ura3*，P_{mdh1}-eGFP-T_{cyc1}	作者构建

1.2.2　发酵条件

1）平板培养：取保存于−80 ℃的甘油管中的样品，接种于含有25 mL YPD液体培养基的100 mL培养瓶中，37 ℃摇床（200 r/min）培养12 h。随后将接种物划线接种在YPD固体培养基表面，在37 ℃恒温箱中倒置培养24 h，平板划线第5区应长出独立且大小均匀的分散菌落。

2）一级种子培养：用接种环挑取一个独立的菌落并将其接种于25 mL YPD液体培养基中，37 ℃摇床（200 r/min）培养12 h。

3）二级种子培养：从一级种子培养瓶中吸取100 μL一级种子培养液，转接至100 mL YPD液体培养基中，37 ℃摇床（200 r/min）培养8 h。

4）摇瓶发酵：从二级种子培养瓶中吸取10 mL二级种子液，转接到100 mL发酵培养基（pH 6.0）中，37 ℃摇床（200 r/min）培养。葡萄糖质量浓度控制在5~10 g/L，初始添加30 g/L $CaCO_3$，发酵过程中通过加入$CaCO_3$维持pH为5.5~7.0，直至72 h结束发酵。

5）发酵罐发酵：在5 L全自动搅拌生物反应器中进行分批补料发酵。吸取300 mL二级种子培养液，用无菌水清洗2遍后用300 mL发酵培养基重悬，与金属离子液及维生素液等混合后一同转接到3 L发酵培养基（pH 6.0）中，在37 °C条件下培养72 h。初始添加20 g/L $CaCO_3$，在发酵过程中，当发酵液pH低于6.0时，向发酵液中补加10 g/L

表3　本研究使用的引物

Table 3　Primers used in this study

引物	序列（5′—3′）
Romae-F	ATGTTTGCCGCCTCTCGTGTT
Romae-R	TTATTGAACAAAGCTGTTACCC
Scmae-F	ATGCTTAGAACCAGACTATCCG
Scmae-R	CTACAATTGGTTGGTGTGCACCG
Afmae-F	ATGTTTTGGGTGCCTCCTCAGG
Afmae-R	CTACAGCTTGGCATCCTTGCTC
Spmae-F	ATGGGTGAACTCAAGGAAAT
Spmae-R	TTAAACGCTTTCATGTTCAC
P_{adh1}-F	AAACAGCTATGACCATGATTACGCCGGGGAGACCCCAAAACCCAAAC
P_{adh1}-R	TCCTCGCCCTTGCTCACCATATCCGTGTGTTGTGTATGATTTTGTTT
P_{pdc1}-F	AAACAGCTATGACCATGATTACGCCTTTCCGAGAGAAAATTAACAAGAGCG
P_{pdc1}-R	CTCCTCGCCCTTGCTCACCATATCCGTGCAATTATTTGGTTTGGGTG
P_{eno1}-F	AAACAGCTATGACCATGATTACGCCCAAGAAGCCGGAATCCACCGGAATC
P_{eno1}-R	TCCTCGCCCTTGCTCACCATATCCGTGTAGTTTGTGTTTGTTGTTGTTG
P_{pgk1}-F	AAACAGCTATGACCATGATTACGCCTGGCCAATGCCTTGGCCTTG
P_{pgk1}-R	CTCCTCGCCCTTGCTCACCATATCCGGGTAGTGTGTATTAAAATGTATCAACCG
P_{gpd2}-F	AAACAGCTATGACCATGATTACGCCCTTATGGCGCAGAGTGCCGAG
P_{gpd2}-R	TCCTCGCCCTTGCTCACCATATCCGGTGTTGATTGTTACTCTATTAGTGTAG
P_{mdh1}-F	AAACAGCTATGACCATGATTACGCCAGTGCGCTGCCGCTTGATGC
P_{mdh1}-R	TCCTCGCCCTTGCTCACCATATCCGTGTGTAGTAGTATATGTATGTACTTG

$CaCO_3$以维持pH。所有发酵试验采用相同的补料策略：当发酵培养基中的葡萄糖低于10 g/L时，补充40 g/L葡萄糖，直至72 h结束发酵。

1.3 分析方法

1.3.1 生物量测定

用0.2 mol/L的盐酸将发酵液稀释适当倍数，于室温下静置反应10 min，取4 mL用紫外-可见分光光度计测定其OD_{600}值。

1.3.2 葡萄糖质量浓度测定

取适量发酵液进行离心，取上清液并适当稀释，使用深圳西尔曼生物传感分析仪测定葡萄糖质量浓度。

1.3.3 酶活力测定

取适量细胞培养物用无菌PBS清洗2遍并重悬，超声破碎后低温离心收集上清液，置于冰上使用。通过在标准反应混合物中测量消耗的NADH计算得到富马酸还原酶（FRD）活力，该标准反应混合物含有100 mmol/L Tris-HCl（pH=8.0）、5 mmol/L富马酸、10 mmol/L $MgCl_2$和0.15 mmol/L NADH[27]。

1.3.4 胞内琥珀酸质量摩尔浓度测定

参照文献[28]的方法测定胞内琥珀酸质量摩尔浓度。取适量发酵液用PBS洗涤2次，将细胞悬液转移至预先干燥并称质量的铝盘中，烘干（105 ℃，约12 h）至恒质量，计算干细胞质量浓度。取收集的细胞沉淀，破碎后收集上清液，测定琥珀酸浓度，根据式（1）计算胞内琥珀酸质量摩尔浓度。

$$c_i=\frac{c_e\times V_e}{d\times V_s} \quad (1)$$

式中：

c_i——胞内琥珀酸质量摩尔浓度，mmol/g；

c_e——提取液中琥珀酸浓度，mmol/L；

V_e——提取液体积，L；

d——干细胞质量浓度，g/L；

V_s——采样体积，L。

1.3.5 荧光强度测定

取适量细胞培养物进行适当稀释，使用SpectraMax M3型多功能板读数器在96孔板中检测细胞培养物的荧光信号，eGFP的激发波长为485 nm、发射波长为525 nm。测定细胞培养物的OD_{600}值，对检测到的荧光强度进行归一化处理。

1.3.6 有机酸质量浓度测定

取适量发酵液于12 000 r/min离心10 min，取适量上清液并稀释适量倍数，用0.22 μm滤膜过滤，使用高效液相色谱仪检测有机酸、甘油和乙醇质量浓度。琥珀酸、苹果酸、丙酮酸、乳酸、富马酸和α-酮戊二酸等的检测色谱柱为Aminex HPX-87H，流动相为5 mmol/L H_2SO_4，流量为0.6 mL/min，柱温为52 ℃，进样量为10 μL，检测器为紫外检测器，检测波长为210 nm；甘油、乙醇检测色谱柱为Aminex HPX-87H，流动相为5 mmol/L H_2SO_4，流量为0.6 mL/min，柱温为52 ℃，进样量为10 μL，检测器为示差检测器。

1.4 数据处理

采用Excel进行数据统计及分析，采用Origin 2024进行绘图，采用Adobe Illustrator 2023进行组图绘制，每组样品进行3次平行试验。

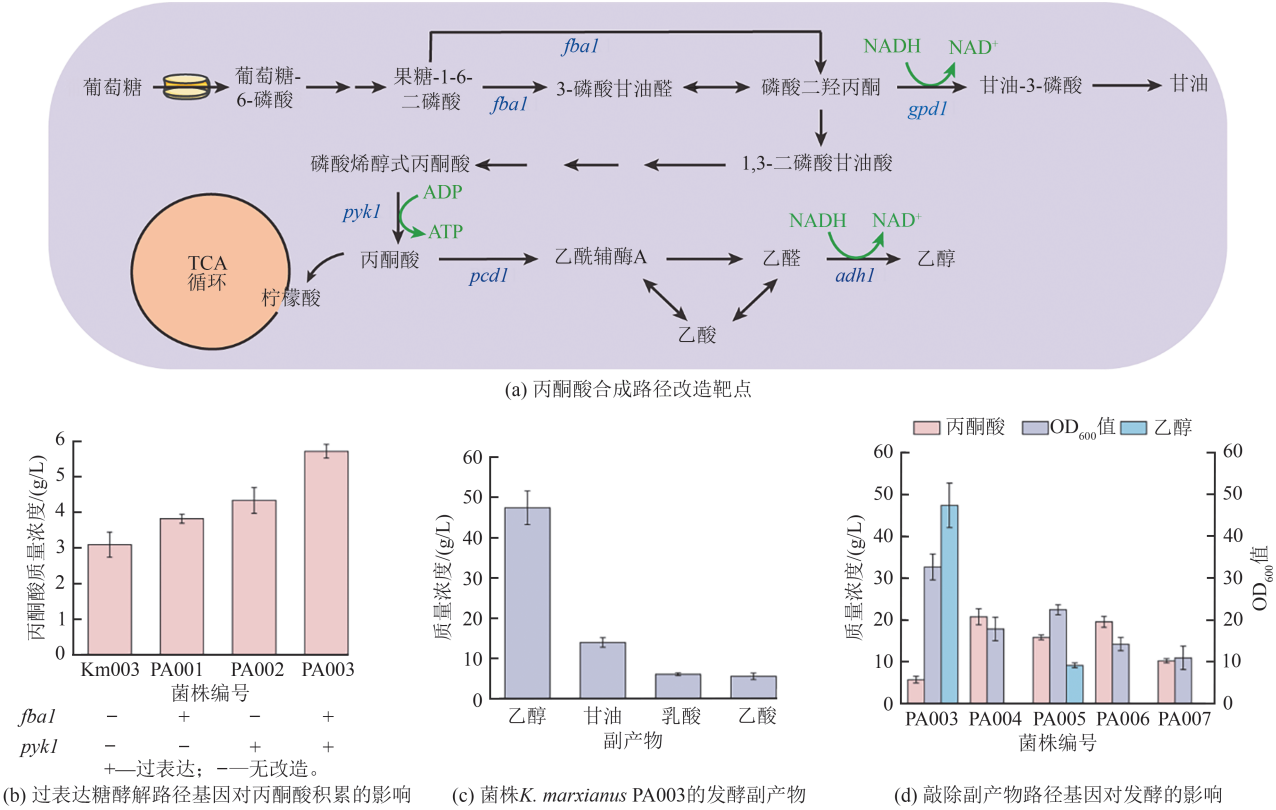
2 结果与讨论

2.1 高产丙酮酸底盘菌株的构建

为了增加琥珀酸合成前体物质——丙酮酸的积累，在营养缺陷型底盘菌株*K. marxianus* Km003的基础上，过表达了糖酵解途径相关基因，见图1（a）。通过在*K. marxianus* Km003中过表达果糖-1，6-二磷酸醛缩酶（*fba1*）、丙酮酸激酶（*pyk1*），获得了工程菌株*K. marxianus* PA001（过表达*fba1*）、PA002（过表达*pyk1*）和PA003（同时过表达*fba1*和*pyk1*）。在此基础上，对*K. marxianus* PA001、PA002和PA003进行摇瓶发酵，发现*K. marxianus* PA003的丙酮酸质量浓度最高（5.77 g/L），相较于出发菌株*K. marxianus* Km003提高了85.1%，见图1（b）。结果表明，糖酵解途径中关键基因的过表达可有效促进丙酮酸积累。此外，*K. marxianus* PA003还积累了乙醇、甘油、乳酸及乙酸等副产物，分别积累了47.33、13.96、6.05、5.51 g/L，见图1（c）。因此，需要进一步抑制副产物合成相关基因的表达，以降低副产物对碳流的竞争，提高丙酮酸的积累量。

为了进一步增强丙酮酸的积累，对副产物合成路径相关基因进行敲除，从而减弱丙酮酸的消耗。首先，对主要副产物乙醇和乙酸代谢路径的相关基因进行敲除。乙醇代谢路径基因丙酮酸脱羧酶（*pdc1*）及醇脱氢酶（*adh1*）是改造酵母生产有机酸的

有效代谢工程策略，已被应用于多种有机酸的生产[16,29-30]。首先，分别在 *K. marxianus* PA003 中敲除了 *pdc1* 和 *adh1*，获得了工程菌株 *K. marxianus* PA004 和 PA005。在 *K. marxianus* PA004 中完全消除了乙醇积累，同时丙酮酸质量浓度提高至 20.71 g/L，相较于 *K. marxianus* PA003 提高了 258.9%，见图 1(d)。而 *K. marxianus* PA005 仍然积累了 9.10 g/L 的乙醇，同时丙酮酸质量浓度提高至 14.03 g/L，这可能是由于 *K. marxianus* 基因组上存在多个 ADH 同工酶，仅敲除 *adh1* 无法完全消除醇脱氢酶活性，导致仍有少部分碳流从丙酮酸节点流向乙醇合成路径。此外，在 *K. marxianus* PA004 中，进一步敲除了 *adh1*，获得了菌株 *K. marxianus* PA006，但丙酮酸的积累量并未进一步增加。其次，对 *K. marxianus* PA004 的甘油合成路径关键基因 *gpd1* 进行敲除，获得菌株 *K. marxianus* PA007。然而，*K. marxianus* PA007 细胞的生长受到了显著抑制。敲除 *gpd1* 可能影响了细胞对葡萄糖的分解代谢能力，从而导致丙酮酸的积累量下降。上述结果表明，通过敲除副产物相关基因，能够有效降低副产物对碳代谢流的竞争，提高丙酮酸的积累量。基于上述菌株的丙酮酸积累能力及细胞生长代谢能力，选择 *K. marxianus* PA004 进行下一步研究。



(a) 丙酮酸合成路径改造靶点

(b) 过表达糖酵解路径基因对丙酮酸积累的影响　(c) 菌株*K. marxianus* PA003的发酵副产物　(d) 敲除副产物路径基因对发酵的影响

图 1　高产丙酮酸马克斯克鲁维酵母的构建

Fig. 1　Construction of a pyruvate-overproducing *K. marxianus* strain

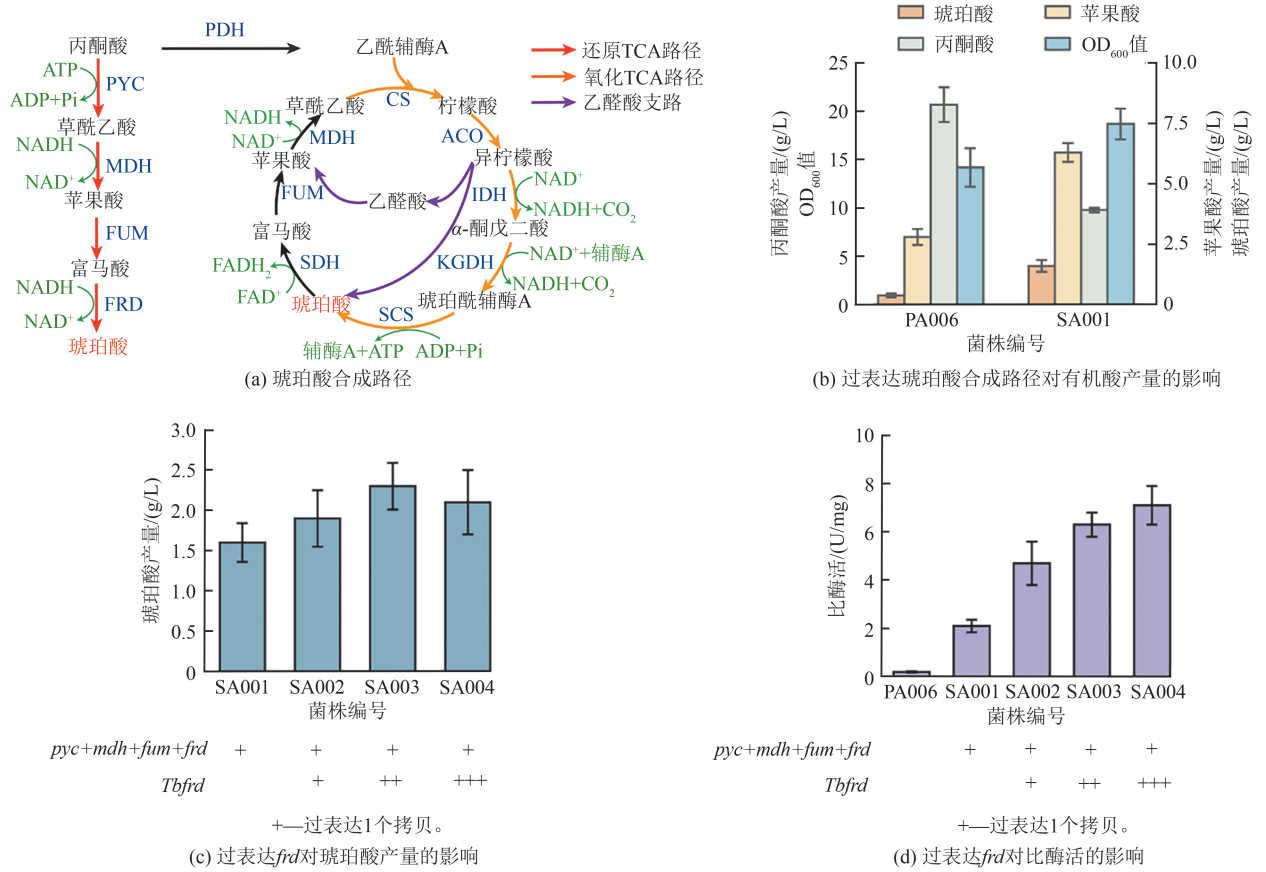
2.2　琥珀酸合成路径的构建与优化

如图 2(a)所示，还原 TCA 路径、氧化 TCA 路以及乙醛酸支路是合成琥珀酸的 3 条主要代谢路径，其中还原 TCA 路径在以葡萄糖为底物时的理论得率(131%)最高[14]。在还原 TCA 路径中，基因 *pyc*、*mdh*、*fum* 和 *frd* 分别编码丙酮酸羧化酶(PYC)、苹果酸脱氢酶(MDH)、富马酸酶(FUM)和富马酸还原酶(FRD)。虽然这些酶在 *K. marxianus* 中存在，但是催化的却是相反的反应方向，或者是存在亚细胞定位差异(如定位于线粒体而非胞质)[31]。

为了促进琥珀酸的积累，设计了异源琥珀酸合成路径并在胞质中进行了过表达。在 *K. marxianus* PA004 中，共表达 *Rhizopus oryzae* 来源的 *pyc*、*Corynebacterium glutamicum* 来源的 *mdh*、*Escherichia coli* 来源的 *fum* 及 *Trypanosoma brucei*

来源的*frd*，获得了工程菌株 *K. marxianus* SA001，琥珀酸产量达到 1.60 g/L，比 *K. marxianus* PA004 提高了 321.1%。与此同时，*K. marxianus* SA001 的苹果酸质量浓度达到了 6.32 g/L，提高了 125.0%，见图 2(b)。上述结果表明，表达完整的异源琥珀酸合成路径有利于提高 *K. marxianus* 的琥珀酸合成能力，但是琥珀酸的积累水平仍然较低。此外，中间产物苹果酸的积累证明了该路径的催化效率仍存在不足，需要进一步改造来提高琥珀酸合成效率。

为了进一步强化琥珀酸合成路径，继续提高关键路径酶的表达量，在 *K. marxianus* SA001 中分别过表达 1、2、3 个拷贝的 *Tbfrd*，获得工程菌株 *K. marxianus* SA002、SA003 和 SA004。其中 *K. marxianus* SA003 琥珀酸产量最高，达到 2.31 g/L，比 *K. marxianus* SA001 提高了 44.4%，见图 2(c)。在此基础上，分析了 *K. marxianus* SA002、SA003 和 SA004 的体内 FRD 比酶活，结果表明 FRD 比酶活随着 *Tbfrd* 拷贝数的增加而提高，其中 *K. marxianus* SA004 中 FRD 比酶活最高，比 *K. marxianus* SA001 提高了 238.1%，见图 2(d)。上述结果表明，增加关键限速酶 *Tbfrd* 的拷贝数，能够强化路径酶的表达，有利于提升琥珀酸的合成能力。



(a) 琥珀酸合成路径　(b) 过表达琥珀酸合成路径对有机酸产量的影响

(c) 过表达*frd*对琥珀酸产量的影响　(d) 过表达*frd*对比酶活的影响

+—过表达1个拷贝。

图 2　琥珀酸合成路径的构建与优化

Fig. 2　Construction and optimization of the succinic acid synthetic pathway

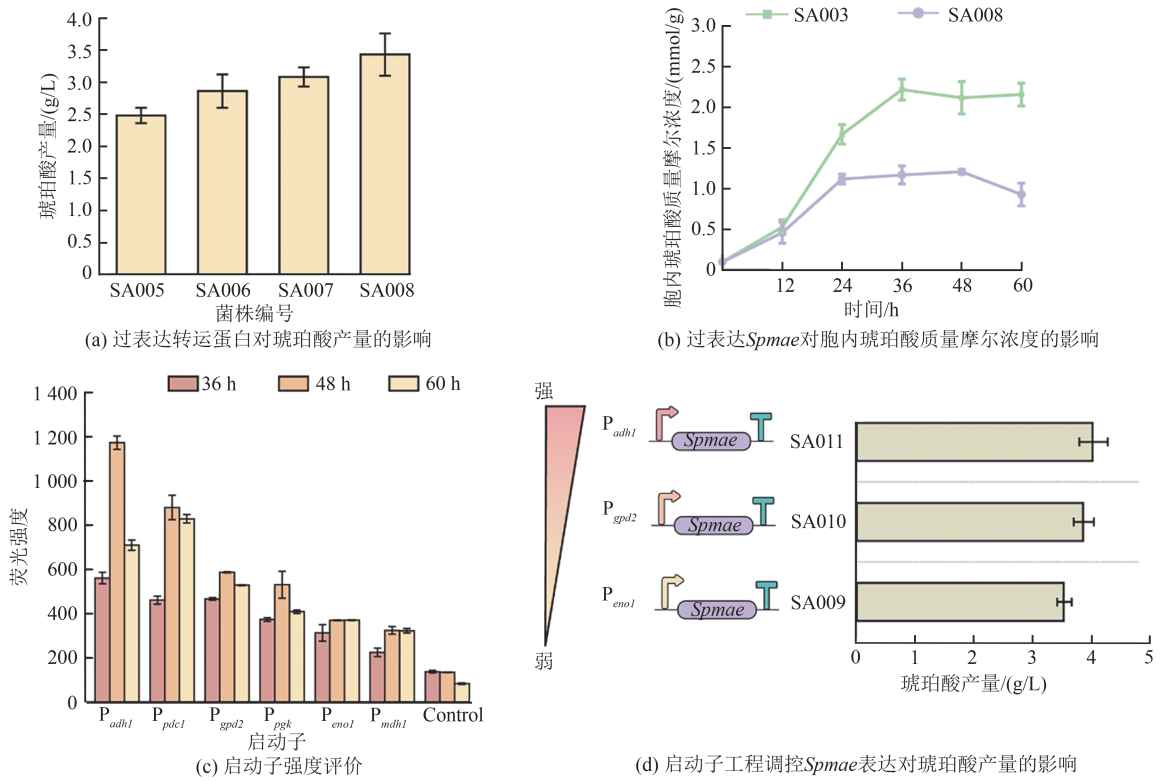
2.3　强化琥珀酸跨膜转运

在酵母发酵过程中，随着有机酸等酸性产物的积累，发酵液的 pH 逐渐降低，抑制了琥珀酸的跨膜运输，导致细胞内琥珀酸过量积累，对细胞造成了一定的毒性，这不仅降低了细胞的代谢活性，而且还会导致反馈抑制，最终影响琥珀酸合成[32]。

研究表明，*Sp*MAE 和 *Af*MAE 等二羧酸转运蛋白可以提高酵母对二羧酸的转运能力，从而提升琥珀酸和苹果酸等四碳二羧酸的产量及得率[33-34]。为了提高 *K. marxianus* 对琥珀酸的外转运能力，在 *K. marxianus* SA003 中分别过表达了 *Rhizopus oryzae* 来源的 *Romae*、*Saccharomyces*

cerevisiae 来源的 *Scmae*、*Aspergillus flavus* 来源的 *Afmae* 和 *Schizosaccharomyces pombe* 来源的 *Spmae*，构建了工程菌株 *K. marxianus* SA005、SA006、SA007 和 SA008。其中 *K. marxianus* SA008 的琥珀酸产量最高，达到了 3.22 g/L，相较于 *K. marxianus* SA003 提高了 39.4%，见图 3(a)。随后，分析了 *K. marxianus* SA008 的胞内琥珀酸质量摩尔浓度，结果显示，发酵 60 h 时，*K. marxianus* SA008 的胞内琥珀酸质量摩尔浓度为 0.93 mmol/g，相较于 *K. marxianus* SA003 降低了 57.0%，见图 3(b)。上述结果表明，过表达 *Spmae* 有效改善了 *K. marxianus* SA008 的琥珀酸外转运能力，从而提高了琥珀酸产量。

在此基础上，利用启动子优化策略调控了 *Spmae* 的表达水平，进一步提高了琥珀酸的产量。首先，在 *K. marxianus* Km003 中以 eGFP 为报告蛋白，测试了 6 个不同强度的启动子 P_{adh1}、P_{eno1}、P_{pgk}、P_{pdc1}、P_{mdh1}、P_{gpd2}，并将其划分为强启动子、中启动子和弱启动子。其中，P_{adh1} 和 P_{pdc1} 为强启动子，P_{gpd2} 和 P_{pgk} 为中启动子，P_{eno1} 和 P_{mdh1} 为弱启动子，见图 3(c)。随后，根据上述筛选的 3 类不同强度启动子，在 *K. marxianus* SA008 中分别过表达 *Spmae* 基因，获得工程菌株 *K. marxianus* SA009、*K. marxianus* SA010、*K. marxianus* SA011。其中，*K. marxianus* SA009、*K. marxianus* SA010 和 *K. marxianus* SA011 的琥珀酸产量分别达 3.54、3.87、4.03 g/L，相较于 *K. marxianus* SA008 分别提高了 10.0%、20.2% 和 25.2%，见图 3(d)。上述结果表明，采用强启动子 P_{adh1} 过表达 *Spmae* 可以提高转运蛋白的表达水平，从而增加琥珀酸产量。综上所述，通过二羧酸转运蛋白 *Spmae* 的表达与优化，*K. marxianus* SA011 的琥珀酸产量达到了 4.03 g/L，相较于优化前的菌株 *K. marxianus* SA003 提高了 74.5%。



(a) 过表达转运蛋白对琥珀酸产量的影响　(b) 过表达*Spmae*对胞内琥珀酸质量摩尔浓度的影响

(c) 启动子强度评价　(d) 启动子工程调控*Spmae*表达对琥珀酸产量的影响

图 3　强化琥珀酸跨膜转运系统

Fig. 3　Enhancement of transmembrane transport system of succinic acid

2.4　发酵优化生产琥珀酸

为了提高琥珀酸的合成效率，在摇瓶中优化了 *K. marxianus* SA011 生产琥珀酸的发酵条件。本研究评价了培养基配方对 *K. marxianus* SA011 合成琥珀酸的影响，测试的培养基包括 YPD、SC 和 SD 培养基以及 2 种无机盐培养基 IM1 和 IM2。如图 4(a)所示，当 *K. marxianus* SA011 在 YPD 培养基中发酵时，琥珀酸的产量和得率达到最高，分

别为 4.17 g/L 和 6.9%。当 *K. marxianus* SA011 在 IM2 培养基中发酵时，菌株生长情况最好（OD_{600} 值= 30.4），但琥珀酸产量和得率仅为 3.40 g/L 和 5.6%，相较于 YPD 培养基降低了 18.5% 和 18.8%。上述结果表明，YPD 培养基更有利于 *K. marxianus* SA011 积累琥珀酸。因此，选择 YPD 培养基作为后续发酵试验的培养基。

为了更准确地调控发酵过程，在 5 L 发酵罐中对菌株 *K. marxianus* SA011 的发酵控制策略进行了优化。首先，分析了培养基中初始葡萄糖质量浓度（40、60、80 g/L）对琥珀酸生物合成的影响。当初始葡萄糖质量浓度为 40 g/L 时，琥珀酸产量达到最高，为 6.38 g/L，见图 4（b）。其次，探索了不同溶氧条件对琥珀酸生物合成的影响，设定了 4 种不同的搅拌速率与通气量的组合：300 r/min 和 0.5 min^{-1}（组合 1）、400 r/min 和 0.5 min^{-1}（组合 2）、300 r/min 和 1.0 min^{-1}（组合 3）以及 400 r/min 和 1.0 min^{-1}（组合 4）。结果表明，组合 3 条件最优，琥珀酸产量达到 8.84 g/L，得率为 10.1%，见图 4（c）。综上所述，初始葡萄糖质量浓度为 40 g/L、搅拌速率为 300 r/min、通气量为 1.0 min^{-1} 时，最有利于琥珀酸的积累。

最后，基于上述最优发酵条件，在 5 L 发酵罐上评估了菌株 *K. marxianus* SA011 的琥珀酸发酵生产能力，见图 4（d）。发酵 72 h 后，菌株 *K. marxianus* SA011 的琥珀酸产量、得率和生产强度分别为 10.06 g/L、11.4 % 和 0.15 g/（L·h）。

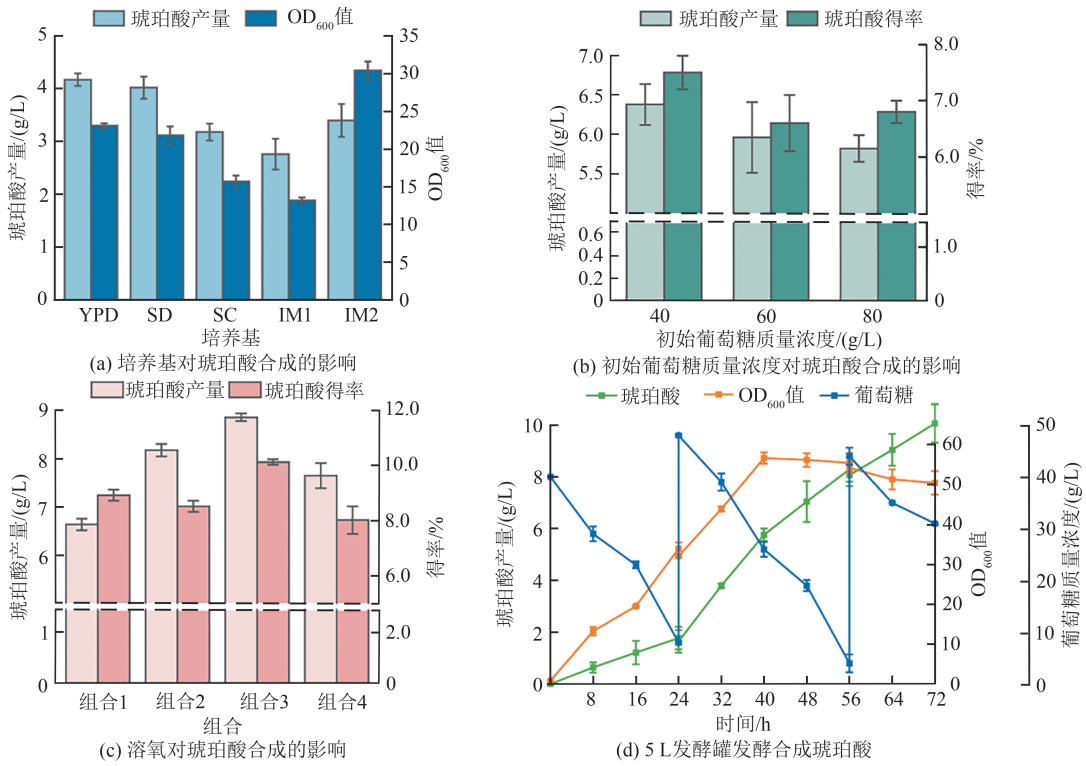


图 4　发酵优化生产琥珀酸

Fig. 4　Fermentation optimization for succinic acid production

3　结论

本研究通过多种代谢工程策略优化了琥珀酸生物合成途径，构建了合成琥珀酸的马克斯克鲁维酵母工程菌株，并通过发酵工艺优化显著提升了琥珀酸的生物合成效率。首先，通过阻断副产物代谢途径与强化糖酵解途径相结合，构建了高产丙酮酸的底盘菌株，从而提高了琥珀酸合成前体的供应能力。其次，设计并构建了还原性琥珀酸合成途径，实现了琥珀酸的高效积累，并通过优化关键酶的表达量，平衡了合成途径的代谢通量，进一步增强了琥珀酸的合成能力。此外，通过转运工程策略强化了发酵过程中琥珀酸的外转运效率，并结合启动子工程进一步提高了琥珀酸产量。最终，在 5 L 发酵罐中，工程菌株 *K. marxianus* SA011 的琥珀酸产量、得率和生产强度分别达到了 10.06

g/L、11.4%和0.15 g/(L·h)。本研究成果不仅为基于酵母的琥珀酸生产菌株改造与工业化生产奠定了基础，同时也为代谢工程改造马克斯克鲁维酵母生产其他有机酸提供了参考。虽然通过代谢路径和发酵工艺优化可显著提升琥珀酸产量，但是微耗氧条件下酵母的生长速度可能限制了琥珀酸的产量和生产强度。未来的研究可以通过开发解耦生长与生产的两阶段发酵工艺，解决细胞生长与琥珀酸生产之间的平衡问题，进一步提高琥珀酸的生产强度和产量，以实现工业化生产。

参考文献

[1] COK B，TSIROPOULOS I，ROES A L，et al. Succinic acid production derived from carbohydrates：an energy and greenhouse gas assessment of a platform chemical toward a bio-based economy [J]. Biofuels，Bioproducts and Biorefining，2014，8(1)：16-29.

[2] CHOI S，SONG C W，SHIN J H，et al. Biorefineries for the production of top building block chemicals and their derivatives [J]. Metabolic Engineering，2015，28：223-239.

[3] AHN J H，JANG Y S，LEE S Y. Production of succinic acid by metabolically engineered microorganisms [J]. Current Opinion in Biotechnology，2016，42：54-66.

[4] BOZELL J J，PETERSEN G R. Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates：the US Department of Energy's "Top 10" revisited[J]. Green Chemistry，2010，12(4)：539-554.

[5] THANAHIRANYA P，CHAROENSUPPANIMIT P，SADHUKHAN J，et al. Succinic acid production from glycerol by *Actinobacillus succinogenes*：techno-economic，environmental，and exergy analyses [J]. Journal of Cleaner Production，2023，404：136927.

[6] YANG Q，WU M，DAI Z X，et al. Comprehensive investigation of succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*：a promising native succinic acid producer[J]. Biofuels，Bioproducts and Biorefining，2020，14(5)：950-964.

[7] GUARNIERI M T，CHOU Y C，SALVACHÚA D，et al. Metabolic engineering of *Actinobacillus succinogenes* provides insights into succinic acid biosynthesis [J]. Applied and Environmental Microbiology，2017，83(17)：e00996-e00917.

[8] OREOLUWA JOKODOLA E，NARISETTY V，CASTRO E，et al. Process optimisation for production and recovery of succinic acid using xylose-rich hydrolysates by *Actinobacillus succinogenes*[J]. Bioresource Technology，2022，344：126224.

[9] CHUNG S C，PARK J S，YUN J E，et al. Improvement of succinate production by release of end-product inhibition in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Metabolic Engineering，2017，40：157-164.

[10] LI K，LI C，ZHAO X Q，et al. Engineering *Corynebacterium glutamicum* for efficient production of succinic acid from corn stover pretreated by concentrated-alkali under steam-assistant conditions[J]. Bioresource Technology，2023，378：128991.

[11] KIM J Y，LEE J A，AHN J H，et al. High-level succinic acid production by overexpressing a magnesium transporter in *Mannheimia succiniciproducens* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America，2024，121(37)：e2407455121.

[12] ZHU X N，TAN Z G，XU H T，et al. Metabolic evolution of two reducing equivalent-conserving pathways for high-yield succinate production in *Escherichia coli* [J]. Metabolic Engineering，2014，24：87-96.

[13] LEE P C，LEE W G，LEE S Y，et al. Effects of medium components on the growth of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* and succinic acid production [J]. Process Biochemistry，1999，35(1/2)：49-55.

[14] 钟驭涛，尚长宇，王言东，等. 利用酵母细胞工厂合成丁二酸的研究进展[J]. 生物工程学报，2024，40(8)：2644-2665.
ZHONG Y T，SHANG C Y，WANG Y D，et al. Advances in synthesis of succinic acid using yeast cell factories[J]. Chinese Journal of Biotechnology，2024，40(8)：2644-2665.(in Chinese)

[15] YADAV V G，DE MEY M，LIM C G，et al. The future of metabolic engineering and synthetic biology：towards a systematic practice[J]. Metabolic Engineering，2012，14(3)：233-241.

[16] TRAN V G，MISHRA S，BHAGWAT S S，et al. An end-to-end pipeline for succinic acid production at an industrially relevant scale using *Issatchenkia orientalis* [J]. Nature Communications，2023，14：6152.

[17] BABAEI M，RUEKSOMTAWIN KILDEGAARD K，NIAEI A，et al. Engineering oleaginous yeast as the host for fermentative succinic acid production from glucose [J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology，2019，7：361.

[18] CUI Z Y，ZHONG Y T，SUN Z J，et al. Reconfiguration of the reductive TCA cycle enables high-level succinic acid production by *Yarrowia lipolytica* [J]. Nature Communications，2023，14：8480.

[19] CUI Z Y，GAO C J，LI J J，et al. Engineering of unconventional yeast *Yarrowia lipolytica* for efficient succinic acid production from glycerol at low pH [J].

Metabolic Engineering，2017，42：126-133.

[20] YAN D J，WANG C X，ZHOU J M，et al. Construction of reductive pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for effective succinic acid fermentation at low pH value[J]. Bioresource Technology，2014，156：232-239.

[21] RENDULIĆ T，PERPELEA A，ORTIZ J P R，et al. Mitochondrial membrane transporters as attractive targets for the fermentative production of succinic acid from glycerol in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. FEMS Yeast Research，2024，24：foae009.

[22] 刘甜甜，徐显皓，孔晓，等. 酿酒酵母代谢调控合成功能营养品：进展与挑战[J]. 食品与生物技术学报，2022，41(8)：10-21.
LIU T T，XU X H，KONG X，et al. Metabolic regulation and synthesis of functional nutrients in *Saccharomyces cerevisiae*：progress and challenges[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2022，41(8)：10-21.(in Chinese)

[23] RUSH B J，WATTS K T，MCINTOSH V L，et al. Yeast cells having reductive TCA pathway from pyruvate to succinate and overexpressing an exogenous NAD(P)$^+$ transhydrogenase enzyme：WO2014018757[P]. 2013-07-25.

[24] 李昌凡，林铭鑫，卢雪瑶，等. 线粒体代谢物转运及其在微生物细胞工厂应用中的研究进展[J]. 食品与生物技术学报，2022，41(7)：32-43.
LI C F，LIN M X，LU X Y，et al. Research progress in mitochondrial metabolite transport and its application in microbial cell factories[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2022，41(7)：32-43.(in Chinese)

[25] SUN L，ZHANG Q W，KONG X，et al. Highly efficient neutralizer-free *L*-malic acid production using engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Bioresource Technology，2023，370：128580.

[26] GIBSON D G，YOUNG L，CHUANG R Y，et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases[J]. Nature Methods，2009，6(5)：343-345.

[27] BESTEIRO S，BIRAN M，BITEAU N，et al. Succinate secreted by *Trypanosoma brucei* is produced by a novel and unique glycosomal enzyme，NADH-dependent fumarate reductase[J]. Journal of Biological Chemistry，2002，277(41)：38001-38012.

[28] DUNN W B，WINDER C L. Sample preparation related to the intracellular metabolome of yeast methods for quenching，extraction，and metabolite quantitation[J]. Methods in Enzymology，2011，500：277-297.

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

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

[31] 徐国强，蒋伶活，苏珂，等. 一种产琥珀酸的酿酒酵母基因工程菌及其应用：CN105838632B[P]. 2019-05-10.

[32] KELL D B，SWAINSTON N，PIR P，et al. Membrane transporter engineering in industrial biotechnology and whole cell biocatalysis[J]. Trends in Biotechnology，2015，33(4)：237-246.

[33] ZELLE R M，DE HULSTER E，VAN WINDEN W A，et al. Malic acid production by *Saccharomyces cerevisiae*：engineering of pyruvate carboxylation，oxaloacetate reduction，and malate export[J]. Applied and Environmental Microbiology，2008，74(9)：2766-2777.

[34] 陈修来，王元彩，董晓翔，等. 代谢工程改造酿酒酵母生产*L*-苹果酸[J]. 食品与生物技术学报，2019，38(2)：72-80.
CHEN X L，WANG Y C，DONG X X，et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for *L*-malic acid production[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2019，38(2)：72-80.(in Chinese)