

代谢工程改造酵母生产琥珀酸的研究进展

顾子蕴, 唐永圣, 陈修来*

江南大学 生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡

顾子蕴, 唐永圣, 陈修来. 代谢工程改造酵母生产琥珀酸的研究进展[J]. 微生物学报, 2025, 65(2): 467-488.

GU Ziyun, TANG Yongsheng, CHEN Xiulai. Advances in metabolic engineering of yeast for succinic acid production[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(2): 467-488.

摘要: 琥珀酸是一种重要的四碳二羧酸, 广泛应用于食品、医药和化工等行业。与传统基于石化原料的化学合成方法相比, 微生物发酵法生产琥珀酸是一种更具经济性和环境友好性的替代方案, 具有较大的应用潜力。酵母具有良好的环境耐受性, 因此酵母细胞工厂生产琥珀酸逐渐成为研究热点。本文以酵母生产琥珀酸为出发点, 综述了构建酵母细胞工厂生产琥珀酸的相关代谢工程与调控策略, 包括琥珀酸合成路径构建、辅因子供应优化、跨膜转运改造等, 总结了利用廉价原料进行琥珀酸生物合成的最新研究进展, 探讨了增强酵母菌株抗逆性的方法, 最后展望了酵母在琥珀酸生物合成中的未来发展前景。

关键词: 代谢工程; 微生物细胞工厂; 酵母; 琥珀酸

Advances in metabolic engineering of yeast for succinic acid production

GU Ziyun, TANG Yongsheng, CHEN Xiulai*

Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu, China

Abstract: Succinic acid is an important four-carbon dicarboxylic acid widely used in the food, pharmaceutical, and chemical industries. Compared with petrochemical-based chemical synthesis methods, microbial fermentation offers an economical and environmentally friendly alternative for

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2103500); 中央高校基本科研业务费专项资金(JUSRP622001)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2103500) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (JUSRP622001).

*Corresponding author. E-mail: xlchen@jiangnan.edu.cn

Received: 2024-09-28; Accepted: 2024-11-11; Published online: 2024-12-13

succinic acid production, presenting significant potential for industrial applications. Due to the robust environmental tolerance, yeast cell factories for succinic acid production have gradually become a research focus. This review centers on succinic acid production in yeast, providing an overview of metabolic engineering and regulatory strategies for constructing yeast cell factories. The research hotspots in this field include the development of succinic acid biosynthetic pathways, optimization of cofactor supply, and modification of transmembrane transport systems. Additionally, recent advances in cost-effective succinic acid biosynthesis and approaches to enhance yeast strain robustness are discussed. Finally, the review provides the prospects of yeast in succinic acid biosynthesis.

Keywords: metabolic engineering; microbial cell factories; yeast; succinic acid

琥珀酸(succinic acid, SA), 又称丁二酸, 是一种重要的平台化合物, 被美国能源部列为 12 种最重要的平台化合物之一^[1-2], 被广泛地应用于清洁剂、表面活性剂、食品添加剂、抗菌剂以及制药行业^[3]。琥珀酸还可用作生产 1,4-丁二醇和四氢呋喃等高价值化学品的前体, 以及合成生物可降解塑料(如聚丁二酸丁二醇酯)的单体^[4-5], 其全球需求量不断增加, 预计 2026 年全球琥珀酸销售额将达到 2.056 亿美元, 年均复合增长率约为 7%^[6]。目前, 全球范围内采用的琥珀酸生产路线主要分为两条: 一条是传统的化学合成路线, 即从原油炼油厂的 C4 馏分获得的马来酸酐的氢化来合成, 还有一条是基于微生物发酵的生物合成路线^[7]。化学合成方法虽然工艺成熟并具备一定的成本优势, 但存在多种缺陷: (1) 它们严重依赖于不可再生的石油资源, 随着资源的逐渐枯竭, 生产成本将显著增加; (2) 化学合成过程通常需要高温高压等苛刻的反应条件, 生产过程能耗大, 环境污染严重, 副产物多且难以控制^[8]。由于这些原因, 近年来, 研究人员逐渐将目光转向更具可持续性和环保性的生物合成法。通过微生物代谢途径从可再生生物质中合成琥珀酸, 不仅能降低对化石资源的依赖, 还能实现绿色工艺和可持续发展目标^[9]。

目前, 琥珀酸生物法合成宿主主要是细菌, 包括产琥珀酸放线杆菌 (*Actinobacillus succinogenes*)^[10-12]、曼海姆产琥珀酸菌 (*Mannheimia succiniciproducens*)^[13-14]、谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)^[15-16]和大肠杆菌(*Escherichia coli*)^[17]等。近年来, 通过对细菌遗传改造, 已经获得了一些能够高产琥珀酸的工业菌株。例如, 对 *M. succiniciproducens* 进行代谢工程改造, 通过优化镁离子(Mg²⁺)转运系统以提高琥珀酸产量, 最终工程菌株在高密度接种的分批补料发酵条件下, 琥珀酸产量达到 152.23 g/L, 转化率达到 1.30 mol/mol 葡萄糖, 最大生产强度为 39.64 g/(L·h), 达到了目前细菌生产琥珀酸的最高水平^[14]。尽管这些细菌宿主具有较高的生长速率和代谢通量, 然而它们在实际应用中仍然面临诸如专性厌氧、潜在致病性或者耐酸性差等问题^[18-19]。细菌发酵过程中需要不断添加 CaCO₃ 及 MgCO₃ 等中和剂调节 pH, 这导致在后续纯化过程中需要添加大量硫酸酸化, 增加了下游工业处理成本, 也使发酵过程更易染菌^[20]。酵母作为一种真核生物, 由于其较强的低 pH 耐受性, 更适合应用于有机酸的生产^[21]。随着基因编辑技术的快速发展, 酵母的遗传操作技术已日趋成熟, 目前已有一些研究通过改造模式微生物酿酒酵母

(*Saccharomyces cerevisiae*)及非常规酵母库德里阿兹威毕赤酵母(*Pichia kudriavzevii*)、解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)等实现了酵母细胞工厂中琥珀酸的高效生产,从长远来看,酵母比细菌更适合用于琥珀酸的发酵生产,表现出极大的潜力^[22]。

本综述围绕酵母产琥珀酸细胞工厂的构建与优化,总结了琥珀酸合成路径构建及代谢调控策略,介绍了拓展底物谱利用低成本碳源进行琥珀酸生产的研究成果,概述了提高酵母工程菌株抗逆性的策略,最后探讨了进一步提高酵母中琥珀酸合成效率的策略,并对酵母生物合成琥珀酸的未来前景进行了展望。

1 酵母产琥珀酸细胞工厂的合成路径构建与优化

琥珀酸作为一种重要的 C4 平台化合物,广泛应用于化工、食品及医药等领域,具有极高的工业价值。利用微生物细胞工厂进行琥珀酸的绿色生产,尤其是通过代谢工程改造的酵母菌株,逐渐成为替代传统石化工艺的重要手段^[23]。酵母由于其发酵特性优良、遗传操作技术成熟、耐高浓度产物等优势,已成为研究琥珀酸生物合成的重要宿主^[24]。然而,天然酵母菌株的代谢路径并不以琥珀酸为主要产物,琥珀酸的高效合成需通过代谢途径的重构与优化来实现^[25]。为了提升琥珀酸的产量,通常采用的策略包括构建合成路径、调控辅因子供应以及提升跨膜转运效率等。

1.1 琥珀酸生物合成路径构建

琥珀酸是三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA)的重要中间产物,也是多种兼性厌氧菌和严格厌氧菌的末端代谢产物。目前琥珀酸的天然生物合成途径主要有 3 条(图 1),分别为氧化三羧酸循环(oxidative tricarboxylic acid

cycle, oTCA)路径、还原三羧酸循环(reductive tricarboxylic acid cycle, rTCA)路径以及乙醛酸循环路径^[26]。在酵母中,3 条途径已被证明均能有效合成琥珀酸,在实际应用中这些路径可以协同参与琥珀酸的合成^[27]。

1.1.1 oTCA 循环路径构建

oTCA 循环作为细胞呼吸的重要部分,通过氧化乙酰辅酶 A 生成电子载体还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NADH)和还原黄素腺嘌呤二核苷酸(flavin adenine dinucleotide, FADH₂)并进入电子传递链,驱动氧化磷酸化过程,最终产生腺嘌呤核苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP),提供细胞所需的能量,在细胞生长中起到不可替代的作用^[28]。琥珀酸是三羧酸循环的中间产物,通常无法通过三羧酸循环大量积累,而是被琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase, SDH)进一步氧化为富马酸并向下游继续转化,当琥珀酸脱氢酶失活时,琥珀酸无法继续进入三羧酸循环,作为最终产物积累^[29]。因此,敲除琥珀酸脱氢酶 SDH(由 *sdh* 基因编码)是酵母在有氧环境下积累琥珀酸的最有效的代谢工程改造策略之一,琥珀酸脱氢酶复合体由 5 个亚基 SDH1、SDH2、SDH3、SDH4 和 SDH5 组成,亚基 SDH1 和 SDH2 共同形成催化二聚体,SDH3 和 SDH4 将复合体定位到线粒体内膜,保守蛋白 SDH5 负责维持复合体稳定性及活性^[30-31]。

在 *S. cerevisiae* 中探索 *sdh* 敲除对琥珀酸生物合成的影响,当 *sdh1* 和 *sdh2* 或 *sdh1b* 同时被敲除时, *S. cerevisiae* 完全失去 SDH 活性,且无法在甘油为唯一碳源的培养基上生长;与野生型菌株相比, *sdh1* 和 *sdh1b* 双敲除株的琥珀酸产量提高了 1.9 倍,同时 TCA 循环的中断也导致下游产物苹果酸的积累量减少^[32]。类似地,敲除 *sdh1* 和 *sdh2* 的 *S. cerevisiae* 菌株和野生型

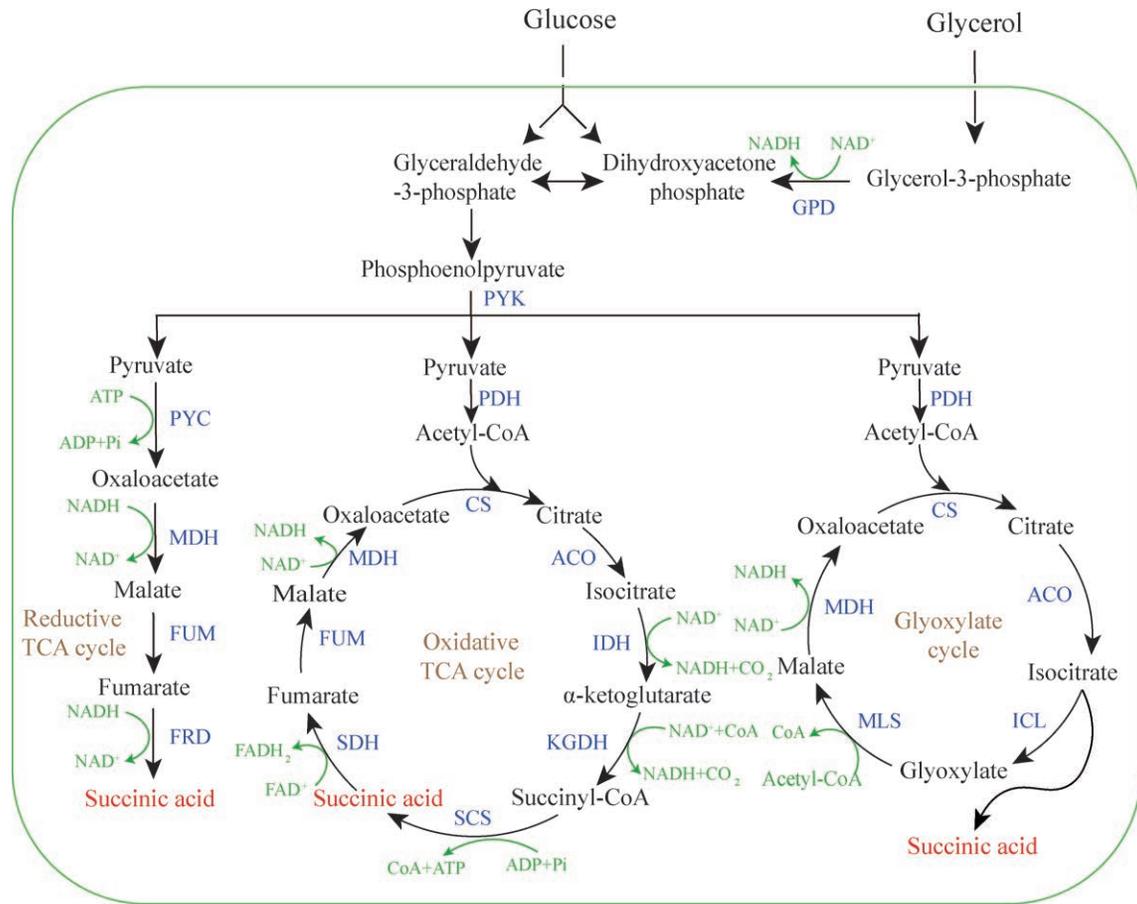


图1 琥珀酸生物合成的不同代谢途径

Figure 1 Different metabolic pathways of microbial succinic acid production. GPD: Glycerol-3-phosphate dehydrogenase; PYK: Pyruvate kinase; PDH: Pyruvate dehydrogenase; ACO: Aconitase; IDH: Isocitrate dehydrogenase; KGDH: α -ketoglutarate dehydrogenase; SDH: Succinate dehydrogenase; SCS: Succinyl-CoA synthetase; FUM: Fumarate hydratase; MDH: Malate dehydrogenase; CS: Citrate synthase; ICL: Isocitrate lyase; MLS: Malate synthase; PYC: Pyruvate carboxylase; FRD: Fumarate reductase.

菌株相比，该突变体在发酵过程中产生的琥珀酸水平提高了2倍^[33]。

相似的策略同样也被应用于 *Y. lipolytica* 中，*Y. lipolytica* 是一种严格好氧的酵母，当呼吸作用完全消失时无法生长，因此不能完全消除 SDH 的活性，使用诱导型启动子替换 *Y. lipolytica* 的 *sdh2* 启动子区域，能够使 SDH 活性降低 40%–64%，在摇瓶发酵中，该 *sdh* 敲低菌株的琥珀酸产量从 5.00 g/L 提高到 15.40 g/L，同时苹果酸和富马酸分别减少到 1/2 和 1/3^[34]。

在另一项研究中，通过敲除 *Y. lipolytica* 的 *sdh5* 基因，构建了菌株 PGC01003，该菌株在 2.5 L 发酵罐中分批补料发酵，琥珀酸产量达到 160.20 g/L，转化率为 0.40 g/g 甘油，这是酵母生产琥珀酸首次在产量上取得的重大突破^[31]。

1.1.2 rTCA 循环路径构建

rTCA 路径天然存在于大部分厌氧细菌中，是细菌天然积累琥珀酸的主要途径，然而多数酵母由于富马酸酶的不可逆催化或胞质富马酸还原酶的缺失，不具备天然的反向 TCA 路径^[35-36]。

由于经 rTCA 路径催化丙酮酸生成琥珀酸的过程中固定同琥珀酸等摩尔的 CO₂, 因此 rTCA 循环拥有 3 条琥珀酸主要合成路径中最高理论转化率, 当辅因子供应充足时最高理论转化率达到 1.31 g/g 葡萄糖^[19]。

为了在 *S. cerevisiae* 中构建 rTCA 路径, 首先在一株丙酮酸脱羧酶(pyruvate decarboxylase, PDC)缺陷型 *S. cerevisiae* 中过表达丙酮酸羧化酶基因 *pyc*、苹果酸脱氢酶基因 *mdh*、异源延胡索酸酶基因 *fum* 和延胡索酸还原酶(fumarate reductase, FRD)基因 *frd*, 构建了一株工程菌株 *S. cerevisiae* PMCFf, 该菌株最终琥珀酸产量为 12.97 g/L^[37]。类似地, 一个琥珀酸合成-转运基因通路被插入到 *S. cerevisiae* TAM 基因组中, 该通路包含 *pyc2*、*pckA*、*mdh3*、*fumC*、*frdS* 及 *mae1* 基因, 能实现丙酮酸到琥珀酸的催化及转运, 在敲除甘油 3 磷酸脱氢酶(由 *gpd* 基因编码)和富马酸酶(由 *fum* 基因编码)并进一步提高 *pyc2* 拷贝数后, 工程菌株 *S. cerevisiae* FA1 采用两阶段发酵法, 最终积累了 1.96 g/L 琥珀酸^[38]。上述研究均证明, 通过 rTCA 循环路径在酵母体内积累琥珀酸的可行性, 然而, *S. cerevisiae* 由于 Crabtree 效应及内源富马酸酶的不可逆催化等负面特性, 所达到的琥珀酸产量并不能满足产业化的需求^[39]。为此, 利用 *P. kudriavzevii* 等非常规酵母还原合成琥珀酸获得了越来越多的关注。Finley 等^[40]筛选出了一株具有高糖耗及生长速率的 *P. kudriavzevii* 11-1 菌株, 在敲除 *pdcl* 并引入 *Candida krusei* 来源的 *pyc1* 和 *fum*、*Leishmania mexicana* 来源的 *frd*、*Rhizopus delemar* 来源的 *mdh*, 以及 *Schizosaccharomyces pombe* 来源的苹果酸转运蛋白基因 *mae1* 后, 获得的工程菌株 *P. kudriavzevii* 13723, 在 pH 3.0 的条件下合成了 48.20 g/L 琥珀酸, 转化率达到 0.45 g/g 葡萄糖^[5]。近期, 美国伊利诺伊州立大学香槟分校的

赵惠民团队对 *Issatchenkia orientalis* 合成琥珀酸进行了深入研究, 首先在野生型 *I. orientalis* 中用强启动子过表达了内源 *pyc*、*mdh*、*fum* 及 *Trypanosoma brucei* 来源的 *frd*, 工程菌株 SD108 在摇瓶发酵中积累了 11.63 g/L 的琥珀酸^[41]。在此基础上, 首先整合了转运蛋白 *SpMAE1*, 随后敲除了副产物乙醇和甘油路径基因 *pdcl* 和 *gpd1*, 进一步敲除 *Pkjen2-1* 减少琥珀酸内转运并敲除 NADH 脱氢酶编码基因 *nde* 减少 NADH 消耗, 最后过表达甘油脱氢酶 GDH 及脱氧胞苷激酶 DAK 并敲除己糖激酶基因 *g3837* 强化菌株对甘油的利用, 最终工程菌株 *I. orientalis* g3473 Δ /*PaGDH-DAK/g3837 Δ 在 pH 3.0 的基本培养基中分批补料发酵, 琥珀酸产量达到 109.50 g/L, 转化率达到 0.59 g/g, 是目前已报道的工程酵母通过 rTCA 路径合成琥珀酸达到的最高水平^[42]。*

1.1.3 乙醛酸循环路径构建

乙醛酸循环途径主要存在于一些好氧细菌及真菌中, 这些微生物通常具有能利用乙酸盐为唯一碳源生长的能力^[43]。与 oTCA 循环中异柠檬酸经两步脱羧释放 2 mol CO₂ 生成琥珀酸不同, 异柠檬酸在乙醛酸循环中直接被异柠檬酸裂合酶(由 *icl* 基因编码)催化分裂为乙醛酸和琥珀酸, 绕过了 TCA 循环中的脱羧反应, 从而避免了碳损失, 因此在有氧条件下具有更高的理论得率^[44]。Raab 等^[45]在一株敲除了 *sdh1* 和 *sdh2* 的 *S. cerevisiae* 基础上, 进一步敲除异柠檬酸脱氢酶线粒体同工酶(由 *idp* 基因编码)、异柠檬酸脱氢酶(由 *idh* 基因编码)来阻止异柠檬酸进入三羧酸循环, 成功将碳代谢流导向到乙醛酸循环, 并使琥珀酸作为最终氧化产物大量积累, 所获得工程菌株在摇瓶发酵中琥珀酸产量提高了 1.3 倍, 达到 3.62 g/L, 证明了酵母通过乙醛酸循环积累琥珀酸的可行性。

1.1.4 互补路径组合优化

在琥珀酸的 3 条常见生物合成途径中, oTCA 循环和乙醛酸循环均为氧化途径, 需要细胞在有氧条件下进行发酵, 合成过程中不可避免地会出现碳流的损耗, 并且通过氧化途径积累琥珀酸均需要抑制 SDH 活性以阻断三羧酸循环, 该策略会导致菌株在利用葡萄糖等底物时出现生长缺陷^[46]。rTCA 循环则是一条还原性合成路径, 通过还原途径合成琥珀酸的过程伴随着 CO₂ 的固定, 因此 rTCA 循环途径具有最高的理论转化率, 然而, 仅通过糖酵解无法提供琥珀酸合成需要的全部还原力^[47]。同时, rTCA 循环在细胞处于厌氧或微耗氧的发酵环境下时才拥有较高的活性, 酵母在厌氧条件下偏向于生产乙醇及甘油等还原性副产物, 因此, 通过还原途径生产琥珀酸面临着包括氧化还原失衡和竞争性副产物的形成在内的问题^[39]。将氧化途径与还原途径相结合可以在将琥珀酸理论转化率提高到最大值 1.71 mol/mol 葡萄糖的同时避免还原途径相关的能量及氧化还原失衡问题, 是琥珀酸生物合成的理论最优改造策略^[48], 该策略已在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中成功实施。例如, Gao 等^[49]在 *E. coli* 中设计 O₂ 依赖型双功能开关, 动态调控 rTCA 与 oTCA 的琥珀酸合成通量, 最终 *E. coli* 工程菌株的琥珀酸产量、得率和生产强度分别达到了 119.50 g/L、1.10 g/g 和 1.70 g/(L·h)。该研究为在酵母中实施代谢路径动态调控提供了重要启示, 尤其在如何协调代谢流方向以优化琥珀酸的合成。然而, 将该策略应用于酵母时, 可能面临菌株构建方面的困难, 包括酵母代谢流分配不均衡、NADH/NAD⁺ 的氧化还原状态难以稳定等问题。此外, 在发酵工艺控制方面, 酵母需克服高酸环境的生长抑制及发酵条件难以长期稳定等挑战^[50]。

最近, Rendulić 等尝试在 *S. cerevisiae* 中将

琥珀酸的氧化和还原合成路径相结合, 从一株通过 rTCA 路径合成琥珀酸的 *S. cerevisiae* 菌株出发, 敲除线粒体丙酮酸载体 MPC (由 *mpc3* 基因编码), 从而减少丙酮酸从细胞质向线粒体内的转运, 同时敲除 *sdh1*, 使工程菌株利用 oTCA 循环和 rTCA 循环积累琥珀酸, 最终工程菌株在摇瓶发酵中积累了 45.50 g/L 琥珀酸, 转化率达到 0.66 g/g, 产量与转化率均为目前在 *S. cerevisiae* 中报道的较高水平^[51]。

基于氧化及还原路径组合策略, 山东大学祁庆生团队提出了一种 *Y. lipolytica* 高产琥珀酸的改造策略, 以构建的一株敲除了 *sdh5*、副产物乙酸合成关键基因 *ach1* 并强化表达了 *pyc* 的琥珀酸高产菌株 PGC91 为出发菌株^[52], 首先在细胞质中表达了 rTCA 循环路径基因, 该菌株在微耗氧条件下摇瓶发酵, 转化率增加到 0.72 g/g, 超越了通过 oTCA 循环合成琥珀酸的最高理论转化率。此时菌株在葡萄糖培养基上出现生长缺陷, 为此, 对该菌株进行了适应性进化, 恢复了该菌株在葡萄糖培养基上的生长能力并大幅提高了琥珀酸产量, 最后在进化菌株中构建了线粒体定位的 rTCA 循环, 恢复了线粒体中的氧化还原稳态, 平衡了 NADH 的供应与消耗, 实现了 oTCA 途径与 rTCA 途径的耦联, 最终工程菌株 *Y. lipolytica* Hi-SA2 在中试规模发酵中达到了最大产量 111.90 g/L, 转化率为 0.79 g/g 葡萄糖, 具有极大的工业化应用前景^[53]。

1.2 辅因子供应优化

辅因子是细胞内能量传递的重要载体, 辅因子供应与消耗的平衡对于维持细胞生长和提高细胞转化效率至关重要^[54]。当辅因子的产生与消耗相接近时, 氧化还原达到平衡, 不平衡的氧化还原状态会浪费代谢能量、消耗碳代谢流甚至引起代谢紊乱导致细胞凋亡^[55]。琥珀酸

生物合成中研究和改造优化的辅因子主要集中在 NADH, NADH 作为主要的生物还原当量, 可以保护细胞免受氧化应激和延长碳-碳骨架, 也是琥珀酸合成的主要限速因素^[56], 研究人员已开发了多种策略用于维持酵母产琥珀酸细胞工厂的辅因子平衡。

1.2.1 抑制辅因子竞争途径

代谢流分析能够帮助研究者定量分析不同代谢途径中碳流的分布, 从而识别出哪些途径对辅因子的生成和消耗具有关键影响^[57]。通过对一株以 rTCA 路径合成琥珀酸的 *I. orientalis* 工程菌株进行 ¹³C 代谢流分析, 鉴定出了与 rTCA 路径竞争 NADH 的关键靶点线粒体 NADH 脱氢酶(由 *nde* 基因编码); NDE 负责将细胞质中的 NADH 氧化并将电子转运到线粒体电子传递链上以合成 ATP; 敲除 *nde* 将琥珀酸产量显著提升到 46.40 g/L, 但与此同时, 葡萄糖的消耗速率出现了一定程度的下降, 可能是由于 NDE 位于电子传递链上, 敲除 *nde* 可能会导致线粒体电子传递链效率降低并导致氧化磷酸化过程产生的 ATP 减少, 从而影响整体代谢^[42]。

1.2.2 调整胞内辅因子比例

可溶性吡啶核苷酸转氢酶 STH (由 *sth* 基因编码)是细菌中一种重要的酶, 参与 NADH 和还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)之间的还原当量的交换, 通过调节 NADH 和 NADPH 的相对水平, 帮助维持细胞内的还原力平衡, 这对细胞的正常代谢和抗氧化能力非常重要^[58]。*EcsthA* 在 *I. orientalis* 中表达能够缓解低 pH 值下 MDH 的 NADH 供应不足的问题, 转录组学和代谢组学数据表明, 过表达 *EcsthA* 可以激活戊糖磷酸途径, 并将酵母细胞质中的 NADPH 转化为 NADH 以满足 MDH 对辅因子的需求, 最

终将丙酮酸的积累量减少 63.3%^[59]。

Rush 等^[60]通过敲除野生型 *I. orientalis* 的 *pdc1* 及 *gpd1* 基因, 过表达 rTCA 循环相关路径酶及转运蛋白 *SpMAE1*, 构建了一株高产琥珀酸的工程菌株 P-8a, 该菌株发酵 96 h 能够积累 57.60 g/L 琥珀酸; 为了探究转氢酶 STH 对酵母宿主合成琥珀酸能力的影响, 在 P-8a 的基础上分别过表达 *E. coli* 来源的 *EcsthA*、温氏固氮菌 (*Azotobacter vinelandii*)来源的 *AvsthA* 及荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)来源的 *PfsthA*, 研究表明 3 个来源的转氢酶均将 *I. orientalis* P-8a 的琥珀酸产量提高 50% 以上, 其中 *PfsthA* 过表达菌株 96 h 琥珀酸产量达到 89.00 g/L, 生产强度达到 0.93 g/(L·h); 该研究进一步证明了将胞内 NADPH 转化为 NADH 能够减轻甚至消除通过 rTCA 路径合成琥珀酸导致的氧化还原失衡, 为维持酵母细胞稳态提供了重要策略。

1.2.3 合成路径区室化定位

酵母中不同细胞器可以提供不同的微环境(如 pH、氧化还原状态), 某些底物和辅酶在一些细胞器中更容易被获得或消耗, 例如, NADH 和 ATP 更容易在线粒体内获得; 乙酰辅酶 A 在过氧化物酶体中含量更高^[61]。通过将合成路径整体或部分定位到这些细胞器, 可以更有效地利用这些底物和能量, 提高路径的代谢通量和生产效率^[62]。在线粒体中, NADH 通过丙酮酸脱氢和三羧酸循环生成, 在敲除 *sdh* 的酵母中, 氧化磷酸化部分受损, 完整的三羧酸循环无法正常运作, 导致 NADH 在线粒体中大量积累, 进而造成氧化还原失衡, 影响了酵母的葡萄糖代谢^[46]。在近期的一项研究中, rTCA 循环被定位于 *Y. lipolytica* 的线粒体中, 通过鉴定 *Y. lipolytica* 的线粒体靶向序列, 成功在 *sdh* 缺陷型 *Y. lipolytica* 菌株的线粒体及细胞质中分别过表达 rTCA 循环关键基因 *frd*, 研究数据显示,

FRD 的线粒体定位显著提高了琥珀酸的合成能力, 琥珀酸产量和转化率分别提升了 45.3% 和 33.9%, 而在细胞质中的表达导致了琥珀酸产量和细胞生长能力的下降; 随后将 NADH 依赖型 MDH 定位到线粒体后, 琥珀酸产量达到 41.40 g/L, 产量进一步提升了 35.7%; 接着将 TCA 路径涉及的其他基因, 即 *pyc*、*fum*, 定位到线粒体中并过表达转运蛋白基因 *mae*, 最终获得的工程菌株在摇瓶发酵中琥珀酸的产量和转化率分别为 74.40 g/L 和 0.94 g/g 葡萄糖, 比出发菌株高出 295.7% 和 42.4%, 证明 TCA 路径的线粒体定位能够消耗线粒体内积累的 NADH, 平衡氧化还原状态, 对提高琥珀酸产量有显著的效果^[53]。

1.2.4 改变路径酶的辅因子偏好性

不同的辅因子(如 NADH 和 NADPH)在细胞内的供应和需求是不同的, 通过改变酶的辅因子偏好性, 可以更好地利用细胞内的现有辅因子, 减少途径间的代谢流竞争, 从而减少副产物的积累, 增强目标产物的生成^[63]。目前已开发出一系列改变 NADH/NADPH 偏好性的方法, 并被用于提高微生物的生产能力。NADH 供应不足是通过 TCA 循环生物合成琥珀酸的重要限制性因素, 让代谢路径优先使用 NADPH 而非 NADH 作为辅因子可以有助于缓解 NADH 的缺乏, 平衡氧化还原状态^[64]。中国科学院天津工业生物技术研究所张学礼团队在一株从水果表皮分离得到的 *P. kudriavzevii* 中过表达了 *Sorghum bicolor* 来源的 *mdh*, 该苹果酸脱氢酶依赖 NADPH 为辅因子而非 NADH, 进一步过表达 NADH 依赖型 *frd* 后, 所构建的重组 TCA 循环生成 1 mol 琥珀酸的过程中消耗 1 mol NADH 和 1 mol NADPH, 减少了路径对 NADH 的需求; 在此菌株基础上敲除 *PDC1* 和 *GPD1* 基因、过表达 TCA 路径基因 *Aopyc* 及 *Pkfum1* 并过表

达转运蛋白 *SpMAE1* 后, 所构建的工程菌株 *P. kudriavzevii* SA122 发酵 36 h 琥珀酸产量达到 96.08 g/L, 转化率为 0.89 g/g, 在已报道的酵母产琥珀酸细胞工厂中具有极大的生产强度优势^[65]。

1.3 琥珀酸跨膜转运工程

在有机酸的生产过程中, 如果有有机酸在细胞内积累过多, 可能会对细胞造成毒性, 导致胞内 pH 下降并抑制细胞的代谢活性, 同时, 中间产物或终产物的积累可能会导致代谢途径受到反馈抑制, 抑制关键酶的活性, 从而降低生产效率^[66-67]。因此, 通过异源或本源转运蛋白调控生产过程中底物输入、细胞器之间的中间产物运输和产品输出对有机酸的生物合成至关重要^[68]。

1.3.1 表达异源转运蛋白

细胞中产生的琥珀酸主要是以其共轭碱形式即琥珀酸二价阴离子存在, 琥珀酸是一种四碳二羧酸, 在生理 pH 条件下几乎完全解离, 因此, 琥珀酸无法通过简单的扩散通过细胞质膜, 必须通过特定的转运蛋白实现跨膜转运^[69]。目前, 已有多种琥珀酸转运蛋白被应用于琥珀酸的合成中, 其中 *S. pombe* 来源的二羧酸转运蛋白 *SpMAE1* 被认为是最有效的四碳二羧酸转运蛋白之一, 能够提高酵母细胞对苹果酸、富马酸及琥珀酸等二羧酸的外排能力^[70]。在 *S. cerevisiae* 中表达 *SpMAE1*, 使得琥珀酸产量提高了 5 倍^[71], 在 *Y. lipolytica* 及 *I. orientalis* 中表达 *SpMAE1* 同样极大地提高了琥珀酸的合成能力^[42,53], 作为酵母产琥珀酸细胞工厂常见代谢改造靶点已被广泛应用。通过对 *SpMAE1* 进行蛋白质工程改造能够进一步提升其转运效率, Chen 等^[72]通过蛋白质工程改造, 解除了 *SpMAE1* 的泛素化修饰, 在优化 *SpMAE1*^{K395R/K409R/K416R} 表达水平后, 工程菌株 *S. cerevisiae*

W4209 的苹果酸产量达到 30.20 g/L, 比表达野生型 *SpMAE1* 的工程菌株产量提高了 86.6%。黑曲霉来源的二羧酸转运蛋白 DCT-02 (由 *dct* 基因编码) 与 *SpMAE1* 同为 SLAC1 家族的转运蛋白, 二者具有 36.8% 的蛋白质序列相似性, *AnDCT-02* 与琥珀酸合成相关基因 *mdh*、*fum*、*frd* 在 *S. cerevisiae* UBR2_{CBS}-DHA 中一同表达, 将琥珀酸产量从 1.60 g/L 提升到 10.70 g/L, 证明了 *AnDCT-02* 在琥珀酸合成中的有效性^[73]。根据与 *SpMAE1* 的氨基酸序列的同源性分析, 一系列真核生物来源的四碳二羧酸转运蛋白被预测具有特异性转运琥珀酸的能力, 并在琥珀酸高产菌株 *Y. lipolytica* PGC62 中表达, 研究结果显示 *SpMAE1*、*YMAE1*、*AfMAE1*、*ScMAE1* 和 *VpMAE1* 均成功将琥珀酸产量提高了 33% 以上, 其中 *SpMAE1* 表达菌株的产量提高到 25.20 g/L^[74]。据报道, *SpMAE1* 在转运二羧酸过程中不涉及任何质子梯度并且细胞内 pH 值保持恒定, 使其驱动的跨膜转运过程不依赖 pH 梯度且比其他大部分羧酸转运蛋白耗能更少^[75]。因此, 虽然已经鉴定出了一些有潜力的琥珀酸转运蛋白, 但 *SpMAE1* 目前依然是酵母产琥珀酸细胞工厂中转运蛋白的最广泛选择。

1.3.2 鉴定与调控内源转运蛋白

虽然异源转运蛋白可能提供更高的转运效率, 但通常更容易受到反馈抑制, 因此, 酵母中内源转运蛋白的鉴定与整合得到了越来越多的关注。近期, 一系列 AceTr 家族的内源转运蛋白在 *S. cerevisiae* 中对琥珀酸的转运能力被鉴定, *AnDCT-02* 和 AceTr 家族的 *ATO1*^{L219A}、*ATO1*^{E144A, L219A}、*SATP*^{L131A} 在琥珀酸合成菌株 *S. cerevisiae* SA 的基础上分别被表达, 然而, 与 *AnDCT-02* 的表达完全相反的是, AceTr 家族同源蛋白的表达并未损害细胞生长, 只是降低了琥珀酸的产量, 证明 *S. cerevisiae* 中该家族的转

运蛋白更偏向于琥珀酸的内转运而非外排^[76]。

除 *S. cerevisiae* 外, *P. kudriavzevii* 中琥珀酸转运蛋白同样得到了鉴定, Xi 等^[77]在一株耐酸的 *P. kudriavzevii* 中预测了 2 个可能参与羧酸转运的 JEN2 家族蛋白, 分别命名为 PkJEN2-1 和 PkJEN2-2, 为了鉴定 JEN2 家族蛋白对琥珀酸积累的影响, 敲除了野生型菌株 CY902 的 *sdh5* 基因, 构建了一株琥珀酸合成菌株, 在此基础上同时敲除了 *Pkjen2-1* 和 *Pkjen2-2*, 该菌株发酵 24 h 和 36 h 后分别积累了 3.20 g/L 及 3.60 g/L 琥珀酸, 比未敲除前提高了 10% 和 12%, 且葡萄糖耗尽后 SA 产量未降低, 而在琥珀酸合成菌株基础上分别过表达 *Pkjen2-1* 和 *Pkjen2-2* 后, 菌株琥珀酸产量降低了 27% 和 24%, 表明 PkJEN 转运蛋白介导琥珀酸的向内转运。Tran 等^[42]在一株通过 TCA 路径合成琥珀酸的 *I. orientalis* 工程菌株中敲除了 *Pkjen2-1* 同源基因 *g3473*, 将琥珀酸产量提高了 8.8%, 进一步证明了调控内源转运蛋白对琥珀酸合成的作用。

在 *Y. lipolytica* 中, 琥珀酸通常在线粒体基质中进行合成, 琥珀酸必须依次通过线粒体内膜和细胞质膜才能被分泌至胞外, 因此在 *Y. lipolytica* 的琥珀酸合成中, 位于线粒体内膜的线粒体载体(mitochondrial carriers, MCs)起着不可忽视的作用^[78-79]。5 个假定的可以转运羧酸的线粒体载体在工程菌株 *Y. lipolytica* PGC62 中表达, 5 株 MCs 表达菌株的琥珀酸产量均高于对照, 其中二羧酸转运蛋白 *YIDIC* 表现出最强的琥珀酸转运能力, 将琥珀酸产量提高了 29%, 而抑制 *YIDIC* 的活性使菌株生物量和琥珀酸产量分别下降了 58.9% 和 26.4%, 表明线粒体羧酸转运蛋白在琥珀酸分泌中起着关键作用^[74]。

除了上述研究外, 一些其他研究同样鉴定了部分不同来源的转运蛋白在酵母细胞中对琥珀酸的转运作用, 例如 Dulermo 等^[80]鉴定了

6个 *Y. lipolytica* 内源 JEN 家族羧酸转运蛋白, 其中 JEN1 及 JEN6 展现出了对琥珀酸的运输能力。类似地, 将德巴利汉逊酵母(*Debaryomyces hansenii*)的4个 ScJEN1 同源蛋白在 *S. cerevisiae* 中进行功能表征, 其中 DH18 和 DH24 编码琥珀酸转运蛋白, 在 *S. cerevisiae jen1Δady2Δ* 中表达后展现出了对琥珀酸的特异性运输能力^[81]。虽然这些研究未能进一步将已鉴定的转运蛋白应用到琥珀酸的合成中, 但同样推动了酵母中羧酸转运机制的研究, 并为调控酵母中琥珀酸的跨膜转运提供了可行的策略。

2 酵母产琥珀酸细胞工厂的底物谱拓展

微生物大规模发酵中底物的选择直接影响

菌体的生长及生产, 并在生产成本中占有较高比例。酵母常用的碳源主要包括以葡萄糖为代表的一系列单糖以及甘油, 各酵母由于自身代谢特性会有相应的优势利用碳源, 不同的底物在前体合成以及能量供应上也会有所差异, 因此, 实现酵母利用廉价和丰富的底物生产琥珀酸是降低生产成本及提高生产效率的重要策略(图2)。

2.1 以非食品原料为底物发酵生产琥珀酸

目前大部分研究中, 葡萄糖是琥珀酸发酵的首选碳源, 能被微生物迅速代谢并提供充足的能量与前体^[82]。然而, 葡萄糖通常来源于可食用的农作物(如玉米、甘蔗), 大量使用会与食品供应产生竞争, 推高粮食价格并提高生产成

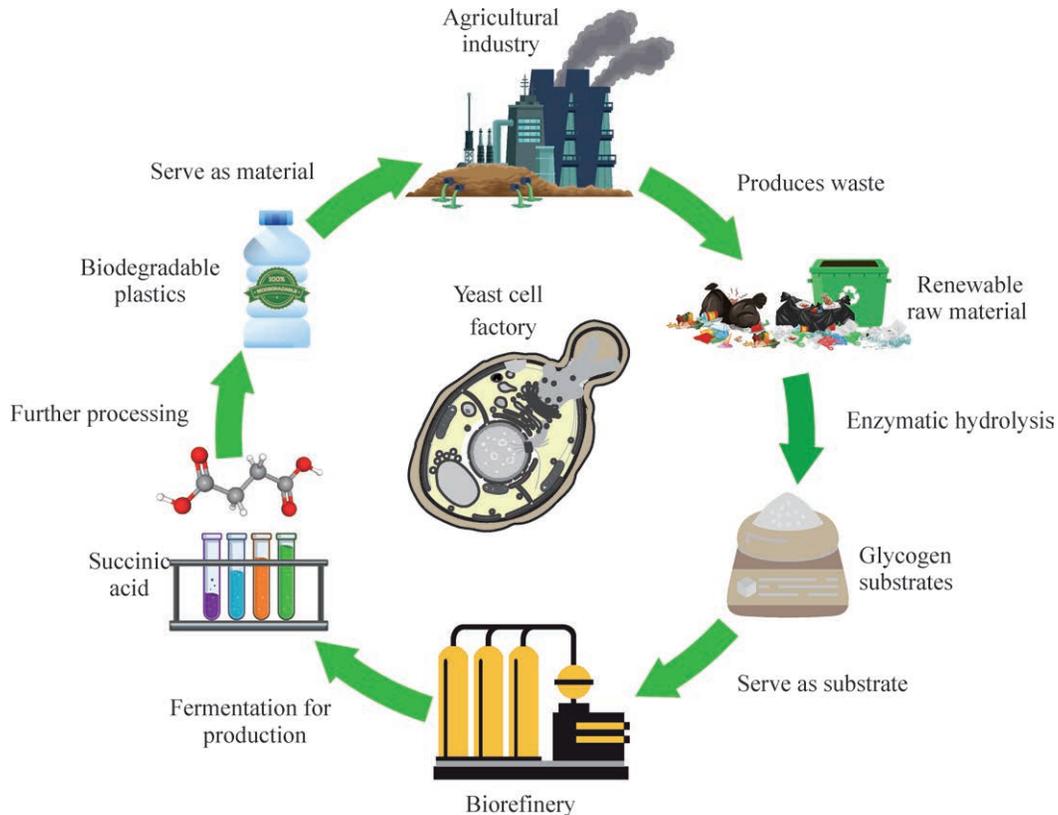


图2 酵母细胞工厂利用可再生原料合成琥珀酸

Figure 2 Yeast cell factory synthesizes succinic acid from renewable resource.

本。使用甲醇、甘油等非食品原料为碳源, 可避免这一问题, 从而促进生产的可持续性。

2.1.1 甲醇

甲醇是一种低成本、可再生的非食品原料, 具有广泛的应用前景, 有望成为替代糖基化合物的主要生物生产原料。与葡萄糖相比, 甲醇具有更强的还原性和更高的能量含量, 更有利于细胞生长和生物合成, 因此作为发酵底物展现出了巨大的潜力^[83]。设计高效的甲基营养型酵母作为细胞工厂, 从甲醇中生产高附加值平台化合物至关重要。Zhang 等^[84]在 *Y. lipolytica* 的过氧化物酶体中引入了甲醇同化模块, 构建了人工甲基营养型 *Y. lipolytica*, 为了解决前体供应不足问题, 引入辅助碳源木糖利用途径并在过氧化物酶体中重构了木酮糖 5-磷酸 (xylulose 5-phosphate, Xu5P) 循环途径, 重组菌株在添加了 20 g/L 木糖和 20 g/L 甲醇的培养基中表现出强大的生长能力和底物消耗速率; 进一步过表达 *hsp70* 提高菌株对甲醇的耐受性并敲除 *sdh5* 后, 工程菌株在甲醇为唯一碳源的培养基中积累了 0.92 g/L 琥珀酸。该研究为以甲醇为原料生物合成高附加值平台化学品奠定了基础。

2.1.2 甘油

甘油作为生物燃料行业不可避免的副产物, 原本会增加生物柴油厂的处理成本, 将甘油转化为增值化学品是提高生物燃料经济可行性的必要方案^[85]。与葡萄糖相比, 甘油具有更强的还原性, 因此可以产生更多的还原力, 从而在生产琥珀酸等还原性化学品时更具优势^[86]。由于葡萄糖为单一碳源无法产生足够的细胞质 NADH, 使用甘油和葡萄糖共底物发酵能够提高发酵过程中 NADH 的供应。例如, *Y. lipolytica* 菌株在含有 50 g/L 葡萄糖和 20 g/L 甘油的培养基中进行琥珀酸发酵时, 产量及生产强度均超过了使用等量葡萄糖为唯一底物的培养基, 然

而, *Y. lipolytica* 在厌氧条件下甘油消耗速率缓慢, 琥珀酸产量仅提高到 30.50 g/L, 在好氧条件下甘油代谢速率得到改善, 琥珀酸产量提高到 38.60 g/L; 为了进一步提高甘油利用速率, 在工程菌株中过表达了 *PaGDH* 和 *DAK*, 虽然未能提高琥珀酸产量, 但是显著提高了琥珀酸的生产强度, 最终该菌株利用葡萄糖和甘油共底物发酵琥珀酸产量达到 109.50 g/L, 转化率为 0.65 g/g 等量葡萄糖^[42]。甘油是 *Y. lipolytica* 的常用发酵底物之一, Gao 等构建了 *sdh5* 缺陷的琥珀酸合成菌株 *Y. lipolytica* PGC01003, 能够在 5 L 发酵罐中以粗甘油为底物积累 160.00 g/L 琥珀酸, 然而, 该菌株的主要缺陷是其代谢甘油的能力较弱^[31]。为了进一步提高工程菌株的甘油摄取能力, 甘油激酶 *GUT1* 在 *Y. lipolytica* PGC01003 中过表达, 工程菌株在摇瓶中甘油摄取速率比出发菌株提高了 13.5%, 最终在补料分批发酵 400 h 后, 琥珀酸产量达到 178.00 g/L, 提高了 11%^[87]。上述研究证明了强化甘油利用在琥珀酸生物合成中的优势及甘油在琥珀酸生产中的潜力。

2.1.3 木糖

木质纤维素是自然界中最丰富的原材料, 每年全球木质纤维素产量超过 2 200 亿 t, 木糖是木质纤维素半纤维素部分中最普遍的糖, 占总体的 30%–40%, 木糖的高效利用是实现将木质纤维素水解物生物转化为生物燃料或增值化学品的先决条件^[88]。然而, 大部分酵母如 *S. cerevisiae* 和 *Y. lipolytica* 等无法天然利用木糖为唯一碳源发酵, 因此需要通过代谢工程改造实现木糖同化^[89]。通过过表达木糖还原酶 *XR*、木糖醇脱氢酶 *XDH* 及木酮糖激酶 *XK*, 在 *Y. lipolytica* PSA02004 中引入了一条戊糖利用途径, 重组菌株能够在木糖为唯一碳源的培养基中生长, 且生长与产物积累方面与葡萄糖培养

基中相比均未表现出明显劣势；在补料分批发酵中，该菌株在木糖培养基中发酵积累了 22.30 g/L 琥珀酸，同时也积累了 25.00 g/L 乙酸盐，证明 *Y. lipolytica* 利用木糖进行琥珀酸发酵的可行性，为木质纤维素的生物转化提供了参考^[90]。

2.2 以可再生原料为底物发酵生产琥珀酸

甘蔗渣、葵花籽粕等农业副产物或食品废弃物，成本低廉，丰富易得。使用这些原料可以显著降低琥珀酸生产的原料成本，提高经济效益，将工业废弃物转化为有价值的化学品，实现废物资源化，减少环境污染和资源浪费^[91]。农业残留物等可再生原料在生长过程中吸收二氧化碳，生产过程中产生的碳排放相对较低，有助于减少温室气体排放，符合绿色化工和循环经济的发展方向^[92]。

2.2.1 食物废弃物

食物废弃物在城市固体垃圾中占很大一部分，目前，除了被回收作为动物饲料和堆肥的部分外，食品废弃物的主要处理方法是焚烧并废弃在垃圾填埋场，这会导致温室气体的大量排放，并浪费土地、水、劳动力等生产资源^[93]。食物废弃物通常由碳水化合物、蛋白质、脂肪和有机酸组成，其中碳水化合物和蛋白质组分可以被水解为糖和低聚物等发酵底物，在发酵生产增值化学品中有极大潜力^[94]。2017 年，Yang 等^[46]首次将食物垃圾作为底物用于 *Y. lipolytica* 的琥珀酸合成，通过对敲除 *Ylsdh5* 的 *Y. lipolytica* 工程菌株 PGC01003 进行适应性进化，获得了进化菌株 PSA02004，该菌株能够以食物垃圾经商业酶水解后的水解液为底物，发酵 126 h 后将水解液中的葡萄糖完全耗尽，琥珀酸产量达到 87.80 g/L，达到了理论最高产量的 85%。Li 等^[95]探索了 PSA02004 菌株将果蔬

废弃物(fruit and vegetable waste, FVW)作为琥珀酸发酵原料的可行性，在对水解条件进行了一系列优化后，从果蔬废弃物水解液中得到了 56.70 g/L 葡萄糖、16.40 g/L 果糖和 0.20 g/L 游离氨基酸，最终该菌株在果蔬废弃物水解液中琥珀酸产量达到 43.10 g/L，为理论最高产量的 70%。Li 等^[96]进一步探究了在不控制 pH 的条件下 *Y. lipolytica* 利用不同废弃物流发酵琥珀酸的可能性，通过敲除 *Ylsdh5*、*Ylach1* 并过表达 *Scpck*、*Ylscs2*，构建了菌株 *Y. lipolytica* PGC202，在该菌株基础上分别评估了菌株 PGC202 使用混合食物废弃物(mixed food waste, MFW)、果蔬废弃物(fruit and vegetable waste, FVW)及农业废弃物(agricultural waste, AW)水解物为底物对琥珀酸发酵的影响，在优化后的最佳发酵条件下，以浓缩的 MFW 水解物为底物，积累了 71.60 g/L 琥珀酸，并从最终 pH 2.8 的发酵液中回收了 68.3% 的琥珀酸晶体^[96]。

2.2.2 农业残留物

农业残留物是指农业生产中产生的副产物，每年全国生产数亿吨农业残留物，这些废弃物排放量大、成分复杂，但未得到及时有效的处理，大量农业残留物仅经过简单处理或焚烧就被排放到自然界中，造成了严重的资源浪费和环境污染问题^[97]。甘蔗渣是一种典型的农业残留物，含有大量可转化为糖基化合物的纤维素和半纤维素，可作为生物基琥珀酸生产的原料之一。例如，*Y. lipolytica* PSA02004 可以利用葡萄糖和木糖共底物发酵生产琥珀酸，在甘蔗渣水解物中发酵所得琥珀酸产量和转化率分别为 33.20 g/L 和 0.58 g/g，产量相比于该菌株利用成分明确的培养基(含有 50 g/L 葡萄糖和 20 g/L 木糖)高出了 17.7%^[98]。葵花籽粕是葵花籽压榨成油后的副产物，其组分中含有 27.8%–37.2% 的蛋白质，同时富含纤维素和半纤维素，适用于

大规模发酵生产^[99]。*Y. lipolytica* PSA02004 利用葵花籽粕水解物发酵获得了 69.10 g/L 琥珀酸, 转化率为 1.26 g/g, 验证了酵母不添加商业营养原料完全利用葵花籽粕积累琥珀酸的可行性^[100]。棕榈油行业会产生大量的生物质副产物, 每 100 t 新鲜油棕果产生 20–22 t 油棕果空果壳(oil palm empty fruit bunch, OPEFB), 大部分工厂将这些生物质用作种植园的覆盖物或锅炉的固体燃料, 其利用率较低且环境污染较大, 需要开发更加高效且绿色的应用方向^[101]。Zevallos 等^[102]使用咪唑为预处理溶剂酶解 OPEFB, 并评估了 *S. cerevisiae* 和 *Pichia stipitis* 利用 OPEFB 酶解液合成琥珀酸的能力, 发酵 48 h 后 *S. cerevisiae* 和 *P. stipitis* 的最高琥珀酸产量分别为 2.50 g/L 和 1.83 g/L; 从生物精炼厂的角度来看, 从 1 hm² 的棕榈田中可以获得 94.1 kg 的琥珀酸, 该结果证明了 OPEFB 生物精炼厂的经济可行性和可持续性。

3 酵母产琥珀酸细胞工厂的抗逆性强化

微生物细胞工厂能够将各种原料转化为各种化学品, 在实验室和工业规模下的发酵过程中, 宿主通常会暴露在高温、低 pH 值、高渗透压等恶劣外部环境下。如果微生物对这些环境条件应激敏感, 可能会影响细胞活性和整体代谢, 提高微生物细胞工厂抗逆性可以让微生物在不利条件下维持较高的生产速率, 从而满足预期的生产期望。因此, 提高宿主对这些外界干扰的抗逆性成为微生物细胞工厂设计和构建中的主要考虑因素之一(图 3)。

3.1 增强底物耐受性

为了提高发酵效率和经济性, 工业发酵通常采用高浓度的底物(如高浓度葡萄糖或蔗糖)进行发酵, 然而, 高浓度的底物或底物的降解产

物往往会对微生物造成渗透压和毒性压力, 利用可再生资源或废弃物作为底物时也会产生一些微生物不易降解的组分或毒性物质^[103]。提高底物耐受性能够增强微生物的生长和代谢能力, 提升产物的产量和生产效率, 减少发酵过程中的抑制效应, 从而实现更高的经济效益; 为了实现底物耐受性的提高, 通常采用的策略包括理性的代谢工程改造和半理性的适应性实验室进化^[104]。

3.1.1 适应性进化

适应性实验室进化是一种基于自然选择的策略, 通常通过长时间反复将微生物暴露于逐步增加的底物浓度中, 让它们自发进化出适应高底物浓度或有毒底物的能力, 该策略不需要对微生物的基因组进行明确的基因编辑或改造, 进化过程通常是无指导的, 让微生物在特定条件下随机发生突变, 然后筛选出耐受性更强的菌株^[105]。*Y. lipolytica* 在敲除 *sdh* 后, TCA 循环中断且氧化磷酸化受到破坏, 导致 ATP 供应不足, 失去在葡萄糖为唯一碳源的培养基上生长的能力, 为了恢复 *sdh2* 缺陷型菌株在葡萄糖培养基上的生长能力, Yuzbashev 等^[106]对该菌株进行了化学诱变和筛选, 并结合适应性进化, 最终分离出能高效利用葡萄糖的菌株 Y-4215, 该菌株在不控制 pH 的条件下 54 h 积累了 50.20 g/L 琥珀酸。同样的策略也被应用到了一项最近的研究中, 该研究以不断增加的葡萄糖浓度为进化压力, 对 *Y. lipolytica sdh5* 缺陷菌株适应性实验室进化, 在传代 40 次后所有 3 组进化菌株都表现出在葡萄糖培养基上更好地生长和更高的琥珀酸产量。随后对进化菌株基因组重测序, 观察到 6-磷酸葡萄糖酸内酯酶 PGL (由 *pgl1* 基因编码)的错义突变在所有 3 组中均出现, 进一步对 PGL1 的蛋白质结构进行模拟并测试了体外酶活, 证明了糖酵解途径通量不足是出发

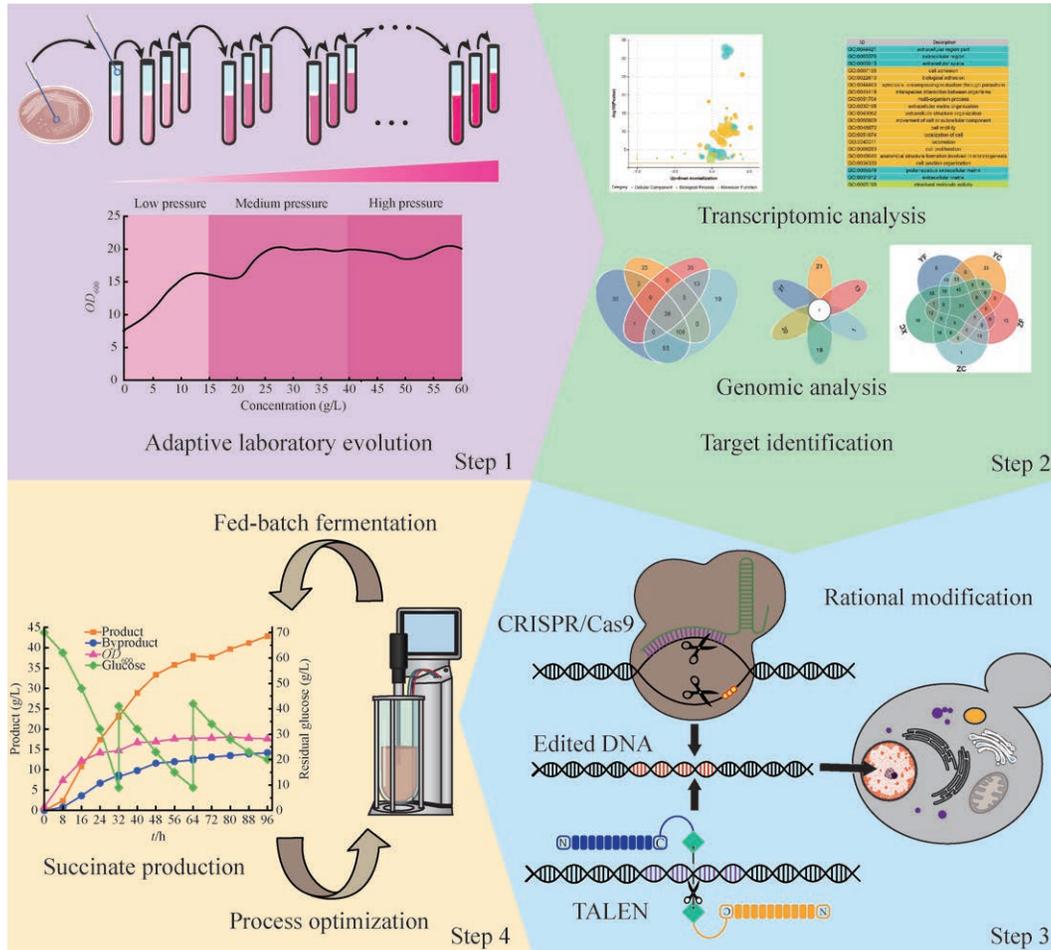


图3 适应性实验室进化提高酵母工程菌株抗逆性

Figure 3 Adaptive laboratory evolution enhances the stress tolerance of engineered yeast strains. SNG1: Protein involved in resistance to nitrosoguanidine and 6-azauracil; FIT3: Facilitator of iron transport; FZF1: Five zinc fingers; CBP3: Cytochrome b mRNA processing; PGL1: Polygalacturonase; GND2: 6-phosphogluconate dehydrogenase; SWF1: Glucose-6-phosphate dehydrogenase; GSH2: Glutathione synthase; TALEN: Transcription activator-like effector nucleases.

菌株以葡萄糖为底物时代谢紊乱的原因^[53]。

酵母对可再生原料底物预处理过程中产生的抑制剂非常敏感，需要大量的代谢工程改造使其适应这类原料，酵母对可再生原料水解物的抗性是一个复杂的现象，虽然已有研究鉴定出一些解毒抗逆靶点，但其复杂机制仍未完全了解^[107]。因此，Stovicek等^[108]在不断提高亚硫酸盐废液(spent sulfite liquor, SSL)浓度的条件下对 *S. cerevisiae* 菌株进行适应性进化，进化菌株

在添加酵母粉的 SSL 中不到 90 h 就消耗完了包括木糖在内的所有碳源；对进化菌株基因组进行测序并分析发现的突变，确定了 *sng1*、*fit3*、*fzf1*、*cbp3* 这 4 个候选基因，这些基因的突变可能在 SSL 胁迫条件下提高菌株的耐受性，并通过反向代谢工程验证了这些基因对提高耐受性的积极作用；进一步对进化菌株进行代谢工程改造，过表达 TCA 循环相关基因及转运蛋白 SpMAE1，最终工程菌株 EV6-4 MA 能够在木糖

为唯一碳源的培养基和 SSL 培养基中高效积累苹果酸和琥珀酸。

3.1.2 代谢工程改造

提高微生物细胞工厂的底物耐受性可以通过多种策略实现, 适应性实验室进化依赖自然选择, 操作简单且适用广泛, 但时间成本较高; 而理性改造通过基因编辑进行定向优化, 效率高、精度高, 在已对底物毒性机制有清晰了解的条件下方能够更精准高效地增强菌株的抗逆性^[109]。Efthymiou 等的研究探索了 *Y. lipolytica* 对木质纤维素水解液中不同抑制剂的耐受性, 确定了甲酸、松柏醛和糠醛为水解物中主要的生长抑制剂^[110]。糠醛的抑制机制是其活性醛基团产生活性氧导致 DNA 突变、蛋白质错误折叠和膜损伤, 引起胞内能量及辅因子水平降低, 最终导致抑制生长^[111]。在 *S. cerevisiae* 中, 过表达参与 NADPH 供应和谷胱甘肽合成的基因已被证明能够增强菌株对糠醛的耐受性^[112]。为了增强构建的 *Y. lipolytica* 产琥珀酸细胞工厂对木质纤维素水解液的耐受性, 内源醛脱氢酶(由 *faldh2* 基因编码)以及戊糖磷酸途径的相关基因 *Ylpgl*、6-磷酸葡萄糖脱氢酶(由 *gnd2* 基因编码)和葡萄糖 6 磷酸脱氢酶(由 *zwf1* 基因编码)在 *Y. lipolytica* 工程菌株 Hi-SA2 中过表达, 然而这些基因的过表达未能显著改善细胞生长; 进一步尝试过表达谷胱甘肽合成酶(由 *gsh2* 基因编码), 在糠醛压力下, 工程菌株的细胞生长和琥珀酸产量均得到了提高, 分别提高了 20.3% 和 39.1%, 证明还原性谷胱甘肽的合成能降低细胞内活性氧水平, 缓解糠醛毒性并提高 *Y. lipolytica* 对木质纤维素水解物的耐受性^[113]。

结合多种策略, 例如适应性进化与理性改造的协同使用, 可以进一步优化微生物的底物耐受性, 使其适应工业生产中的复杂环境和底物毒性, 提升发酵效率。

3.2 增强酸耐受性

在微生物发酵过程中经常会积累大量酸性产物或副产物, 当外界 pH 过低时, 过量的质子会通过跨膜运输, 影响细胞内部 pH 稳态, 导致宿主生长受限和最终产量下降, 维持细胞内 pH 需要排出质子, 这会消耗大量 ATP^[114]。为了维持胞外 pH 稳定, 通常会在发酵过程中添加碳酸钙、氨水等碱性物质以中和发酵液中的酸性物质, 这造成了额外的生产成本和下游分离成本, 且增加了发酵过程的染菌风险^[115]。酵母宿主在低 pH 条件下表现出更强的稳定性, Zhong 等探索了多种酵母宿主在不控制 pH 或低 pH 条件下合成琥珀酸的可能性, 然而, 在低 pH 或高琥珀酸浓度条件下如何维持酵母细胞活性和生产能力仍是亟待解决的问题^[116]。高浓度琥珀酸影响酵母生产的具体机制仍不明确, 很难通过理性设计获得耐酸酵母底盘, 为了解决这一问题, Xie 等^[117]探究了 5 株 *S. cerevisiae* 对琥珀酸的耐受性, 并选择了 3 株代表菌株比较转录水平差异, 发现当琥珀酸浓度为 20 g/L 时, 3 株 *S. cerevisiae* 菌株均未表现出明显调节机制; 而当处于 60 g/L 的琥珀酸环境下时, 3 株菌株表现出不同的反应机制: KF7 菌株下调了与乙醇酸循环相关的基因(如 *icl1*), 而上调了糖异生、戊糖磷酸途径(pentose phosphate pathway, PPP)和蛋白质折叠相关的基因, 其通过抑制内源琥珀酸的合成, 转向糖异生和 PPP 以应对琥珀酸应激, 此外, KF7 还增强了蛋白质质量控制系统的活动; NBRC 1958 菌株则下调了维生素 B6、硫胺素和嘌呤的生物合成途径相关的基因, 同时上调了蛋白质折叠、毒素排出和细胞壁重塑相关的基因, 这表明通过增强细胞壁完整性和排出有害物质能够促进酵母适应琥珀酸应激; 而琥珀酸耐受能力较弱的 NBRC 2018 菌株显著上调了与戊糖磷酸途径、糖异生、脂肪酸利用和蛋

白质折叠相关的基因,但其 *hsp26* 基因的下调可能削弱了其蛋白质质量控制 (protein quality control, PQC) 系统,使其对琥珀酸应激的耐受性减弱。该研究证明了宿主的选择及 PQC 系统对琥珀酸耐受性的影响,选择表现出更强耐酸性能的菌株并过表达 PQC 系统中 *hsp26* 及 *hsp42* 等热休克蛋白编码基因可能显著提高酵母的抗逆性及琥珀酸合成效率。近期,非常规耐热酵母 *Cluyveromyces marxianus* 对琥珀酸的反应机制引起了研究人员的关注,通过对 *K. marxianus* 在不同浓度琥珀酸胁迫下的转录组分析,揭示了琥珀酸抑制 TCA 循环和乙醛酸循环,激活糖酵解和麦角固醇合成途径的机制。此外,发现了几个响应琥珀酸的启动子(如 IMTCP2、KLMA_50123)及关键转录因子(如 Gcr1、Upc2、Ndt80),它们的过表达显著提高了酵母的耐酸性^[118]。*K. marxianus* 具有快速生长和高温耐受等优良特性,结合这项研究中提供的动态调控元件和耐酸性能关键靶点,可为开发高效的琥珀酸工业生产菌株提供坚实的基础。

4 总结与展望

琥珀酸作为重要的平台化合物,其微生物发酵生产技术已成为代谢工程领域的研究热点。酵母在合成琥珀酸方面具有多重优势:(1) 酵母遗传背景明确,易于基因工程改造,通过调控其关键代谢途径可以增加琥珀酸的产量;(2) 酵母能够利用多种碳源,包括葡萄糖、木糖、食品废物及农业副产物等,使非传统碳源的高效利用成为可能,为实现可持续生产提供了更多选择;此外,某些酵母菌种如 *P. kudriavzevii*、*K. marxianus* 等具有较强的耐高温或耐酸性,适合工业发酵条件。

虽然酵母具有比细菌宿主更优秀的表型,

但酵母宿主目前达到的琥珀酸生物合成效率仍和细菌宿主存在一定差距,合成琥珀酸的过程中仍然面临着一系列待解决的瓶颈问题。TCA 循环、乙醛酸循环等途径的复杂调控导致代谢流分配不平衡,要提高琥珀酸合成效率必须实现 3 条主要合成路径间代谢流的合理分配,以及氧化还原状态的稳定。在琥珀酸的发酵过程中,酵母往往会生成大量的副产物,如乙醇、乙酸和乳酸。这些副产物的产生不仅浪费了碳源,还可能与琥珀酸竞争辅因子和能量,高浓度的副产物还会对细胞造成毒害,进一步降低琥珀酸产量。尽管酵母可以利用多种碳源生物合成琥珀酸,但对于复杂的生物质底物或廉价的工业废料(如木质纤维素水解物)的利用效率仍然较低,酵母对非传统碳源的转化存在代谢阻碍,影响生产的经济性。高浓度的琥珀酸会对细胞产生毒性,导致细胞内 pH 降低,损害细胞膜完整性和酶活性。这种酸胁迫对生产菌株的生长和代谢效率有显著的抑制作用,限制了琥珀酸的高效生产。

为了实现琥珀酸高效生物合成,针对酵母生产琥珀酸存在的问题和瓶颈,未来可以通过以下策略逐步解决。(1) 代谢瓶颈的优化:通过代谢工程,重构关键途径的代谢流,平衡 3 条合成路径的碳流分配,结合还原与氧化路径,实现辅因子和能量供需平衡。同时,可以通过增强糖酵解或葡萄糖转运等途径提高琥珀酸的合成速率。针对参与琥珀酸合成的关键酶,如 PYC 和 FRD,应用蛋白质工程技术提高酶的活性和稳定性,优化其催化效率,减少副产物的生成。(2) 提高菌株耐酸性:通过基因工程手段增强细胞膜的合成和修复途径,例如提高麦角固醇和脂肪酸合成,增强细胞对酸性环境的适应性,改善细胞膜的完整性和功能。通过过表达与酸性胁迫响应相关的转录因子,增强细胞

的耐酸性。此外, 还可以通过提高热休克蛋白 HSP 等蛋白的表达, 增强蛋白质的折叠和修复能力, 减轻琥珀酸对细胞内环境的破坏。通过实验室进化, 筛选出适应酸性环境的高耐受性菌株。长期培养或适应高琥珀酸浓度的环境, 可以获得更具耐酸性的生产菌株。(3) 减少副产物生成: 通过代谢工程, 优化琥珀酸合成途径, 同时敲除或抑制与乙醇、乳酸等副产物合成相关的酶, 避免副产物的生成。例如, 抑制乙醇脱氢酶或乳酸脱氢酶的表达, 优先将碳源用于琥珀酸合成。利用动态代谢控制策略, 根据发酵过程中不同阶段的需求调节不同代谢途径的活性。通过设计响应琥珀酸浓度或 pH 的动态调控系统, 可以在需要时增强琥珀酸合成, 而减少副产物的生成。(4) 提高碳源利用效率: 通过引入或优化能够代谢木糖等非传统碳源的代谢途径, 提升酵母对多种碳源的利用能力。通过代谢工程设计, 使酵母能够高效利用廉价且丰富的工业副产物(如木质纤维素水解物), 降低生产成本。提高酵母对不同糖类的转运和代谢效率, 增强糖转运蛋白的表达或活性, 以提高底物的吸收速率, 确保高效的琥珀酸生产。(5) 发酵工艺优化: 开发无需中和剂的低 pH 发酵工艺, 或者通过动态调控系统自动调节发酵过程中的 pH, 减少对外部中和剂的依赖, 通过耐酸性菌株的开发, 可以显著降低发酵过程中 pH 调节的复杂性和成本。优化发酵条件, 实现细胞的高密度培养, 从而提高琥珀酸的产量。在此过程中, 可以优化营养供给、溶氧水平和搅拌速率等参数, 使发酵效率达到最大化。通过整合连续发酵或灌流发酵技术, 维持较高的生产速率和稳定的代谢流, 减少副产物积累, 提高琥珀酸的生产效率。结合产物分离技术(如膜分离或萃取)实现发酵与产品回收的同步进行, 进一步提高工艺的经济性。(6) 系统生物学指导:

系统生物学结合多组学数据(如基因组、转录组、代谢组)能够构建琥珀酸合成的代谢网络。通过计算机建模, 可以模拟代谢流分布、能量代谢和物质平衡, 揭示代谢瓶颈和关键节点。这为代谢工程提供了精准的靶点, 帮助优化代谢途径以提高琥珀酸产量。机器学习算法可以分析大量实验数据, 预测特定基因敲除或过表达对琥珀酸产量的影响, 从而设计更高效的工程菌株。此外, 机器学习能够识别复杂多基因网络中的协同作用, 为多基因工程提供指导, 进一步提升合成效率。

总之, 生物基合成琥珀酸是目前生物基生产大宗化学品最有前途的案例之一, 未来经过代谢工程、发酵工艺优化和细胞耐受性增强的多层面改进, 酵母生产琥珀酸的瓶颈将逐步解决, 推动其在工业化生产中的广泛应用。

作者贡献声明

顾子蕴: 负责文献调研、文章撰写与修改; 唐永圣: 协助文献整理、内容补充和校对; 陈修来: 指导文章设计, 审阅并修改终稿。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] BOZELL JJ, PETERSEN GR. 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.
- [2] WERP T, PETERSEN G, ADEN A, BOZELL J, HOLLADAY JJSF. Top value added chemicals from biomass: I. results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas[J]. *Office of Scientific and Technical Information*, 2004, 69: 1-65.
- [3] COK B, TSIROPOULOS I, ROES AL, PATEL MK. 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.

- [4] CHOI S, SONG CW, SHIN JH, LEE SY. Biorefineries for the production of top building block chemicals and their derivatives[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 28: 223-239.
- [5] AHN JH, JANG Y-S, LEE SY. Production of succinic acid by metabolically engineered microorganisms[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2016, 42: 54-66.
- [6] LEE JA, AHN JH, LEE SY. Organic acids: Succinic and malic acids[M]//*Comprehensive Biotechnology*. Amsterdam: Elsevier, 2019: 172-187.
- [7] LA JANSEN M, van GULIK WM. Towards large scale fermentative production of succinic acid[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2014, 30: 190-197.
- [8] LIU X, ZHAO G, SUN S, FAN C, FENG X, XIONG P. Biosynthetic pathway and metabolic engineering of succinic acid[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022, 10: 1-16.
- [9] 刘嵘明, 梁丽亚, 吴明科, 姜岷. 微生物发酵生产丁二酸研究进展[J]. *生物工程学报*, 2013, 29(10): 1386-1397.
- LIU RM, LIANG LY, WU MK, JIANG M. Progress in microbial production of succinic acid[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2013, 29(10): 1386-1397 (in Chinese).
- [10] YANG Q, WU M, DAI ZX, XIN FX, ZHOU J, DONG WL, MA JF, JIANG M, ZHANG WM. 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.
- [11] GUARNIERI MT, CHOU YC, SALVACHÚA D, MOHAGHEGHI A, ST JOHN PC, PETERSON DJ, BOMBLE YJ, BECKHAM GT. Metabolic engineering of *Actinobacillus succinogenes* provides insights into succinic acid biosynthesis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(17): e00996-17.
- [12] OREOLUWA JOKODOLA E, NARISSETTY V, CASTRO E, DURGAPAL S, COULON F, SINDHU R, BINOD P, RAJESH BANU J, KUMAR G, KUMAR V. Process optimisation for production and recovery of succinic acid using xylose-rich hydrolysates by *Actinobacillus succinogenes*[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 344: 126224.
- [13] LEE JW, YI J, KIM TY, CHOI S, AHN JH, SONG H, LEE M-H, LEE SY. Homo-succinic acid production by metabolically engineered *Mannheimia succiniciproducens*[J]. *Metabolic Engineering*, 2016, 38: 409-417.
- [14] KIM JY, LEE JA, AHN JH, LEE SY. 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.
- [15] CHUNG SC, PARK JS, YUN J, PARK JH. Improvement of succinate production by release of end-product inhibition in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 40: 157-164.
- [16] LI K, LI C, ZHAO XQ, LIU CG, BAI FW. 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.
- [17] ZHU XN, TAN ZG, XU HT, CHEN J, TANG JL, ZHANG XL. Metabolic evolution of two reducing equivalent-conserving pathways for high-yield succinate production in *Escherichia coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2014, 24: 87-96.
- [18] LEE PC, LEE WG, LEE SY, CHANG HN. Effects of medium components on the growth of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* and succinic acid production[J]. *Process Biochemistry*, 1999, 35(1/2): 49-55.
- [19] 钟驭涛, 尚长宇, 王言东, 李建华, 刘成才, 崔志勇, 祁庆生. 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 YT, SHANG CY, WANG YD, LI JH, LIU CC, CUI ZY, QI QS. Advances in synthesis of succinic acid using yeast cell factories[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2024, 40(8): 2644-2665 (in Chinese).
- [20] KUMAR R, BASAK B, JEON BH. Sustainable production and purification of succinic acid: a review of membrane-integrated green approach[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2020, 277: 123954.
- [21] YADAV VG, DE MEY M, GIAW LIM C, KUMARAN AJIKUMAR P, STEPHANOPOULOS G. The future of metabolic engineering and synthetic biology: towards a systematic practice[J]. *Metabolic Engineering*, 2012, 14(3): 233-241.
- [22] CAVALLO E, CHARREAU H, CERRUTTI P, FORESTI ML. *Yarrowia lipolytica*: a model yeast for citric acid production[J]. *FEMS Yeast Research*, 2017, 17(8). DOI: 10.1093/femsyr/fox084.
- [23] WAHL SA, BERNAL MARTINEZ C, ZHAO Z, VAN GULIK WM, JANSEN MLA. Intracellular product recycling in high succinic acid producing yeast at low pH[J]. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16(1): 90.
- [24] KIM JY, LEE JA, LEE SY. Biobased production of succinic acid and its derivatives using metabolically engineered microorganisms[J]. *Industrial Biotechnology*, 2023, 19(3): 125-137.
- [25] OTERO JM, CIMINI D, PATIL KR, POULSEN SG, OLSSON L, NIELSEN J. Industrial systems biology of *Saccharomyces cerevisiae* enables novel succinic acid cell factory[J]. *PLOS One*, 2013, 8(1): e54144.
- [26] CHENG KK, ZHAO XB, ZENG J, ZHANG JA. Biotechnological production of succinic acid: current state and perspectives[J]. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2012, 6(3): 302-318.
- [27] TORRES GUARDADO R, ROZÈS N, ESTEVE ZARZOSO B, REGUANT C, BORDONS A. Succinic acid production by wine yeasts and the influence of GABA and glutamic acid[J]. *International Microbiology*, 2024, 27(2): 505-512.
- [28] RYAN DG, APOS, NEILL LAJ. Krebs cycle reborn in macrophage immunometabolism[J]. *Annual Review of Immunology*, 2020, 38: 289-313.
- [29] SZETO SSW, REINKE SN, SYKES BD, LEMIRE BD. Ubiquinone-binding site mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase generate superoxide and lead to the accumulation of succinate[J]. *Journal of*

- Biological Chemistry, 2007, 282(37): 27518-27526.
- [30] HAO HX, KHALIMONCHUK O, SCHRADERS M, DEPHOURE N, BAYLEY JP, KUNST H, DEVILEE P, CREMERS CWRJ, SCHIFFMAN JD, BENTZ BG, GYGI SP, WINGE DR, KREMER H, RUTTER J. *SDH5*, a gene required for flavination of succinate dehydrogenase, is mutated in paraganglioma[J]. Science, 2009, 325(5944): 1139-1142.
- [31] GAO CJ, YANG XF, WANG HM, RIVERO CP, LI C, CUI ZY, QI QS, LIN CSK. Robust succinic acid production from crude glycerol using engineered *Yarrowia lipolytica*[J]. Biotechnology for Biofuels, 2016, 9(1): 179.
- [32] KUBO Y, TAKAGI H, NAKAMORI S. Effect of gene disruption of succinate dehydrogenase on succinate production in a sake yeast strain[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2000, 90(6): 619-624.
- [33] REZAEI MN, ASLANKOOHI E, VERSTREPEN KJ, COURTIN CM. Contribution of the tricarboxylic acid (TCA) cycle and the glyoxylate shunt in *Saccharomyces cerevisiae* to succinic acid production during dough fermentation[J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 204: 24-32.
- [34] JOST B, HOLZ M, AURICH A, BARTH G, BLEY T, MÜLLER RA. The influence of oxygen limitation for the production of succinic acid with recombinant strains of *Yarrowia lipolytica*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(4): 1675-1686.
- [35] STEYN A, VILJOEN-BLOOM M, VAN ZYL WH. Constructing recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains for malic-to-fumaric acid conversion[J]. FEMS Microbiology Letters, 2023, 370: fnad003.
- [36] ENOMOTO K, OHKI R, MURATSUBAKI H. Cloning and sequencing of the gene encoding the soluble fumarate reductase from *Saccharomyces cerevisiae*[J]. DNA Research, 1996, 3(4): 263-267.
- [37] YAN DJ, WANG CX, ZHOU JM, LIU YL, YANG MH, XING JM. Construction of reductive pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for effective succinic acid fermentation at low pH value[J]. Bioresource Technology, 2014, 156: 232-239.
- [38] ZAHOOR A, KÜTTNER FTF, BLANK LM, EBERT BE. Evaluation of pyruvate decarboxylase-negative *Saccharomyces cerevisiae* strains for the production of succinic acid[J]. Engineering in Life Sciences, 2019, 19(10): 711-720.
- [39] 徐国强, 蒋伶俐, 苏珂, 李佳雨, 刘维瑾, 范欧洋, 赵祯. 一种产琥珀酸的酿酒酵母基因工程菌及其应用: CN105838632A[P]. 2016-08-10.
- [40] FINLEY KR, HURYTA JM, MASTEL BM, MCMULLIN TW, POYNTER GM, RUSH BJ, WATTS KT, FOSMER AM, MCINTOSH VL, BRADY KM. Compositions and methods for succinate production: US20130302866[P]. 2013-11-14.
- [41] XIAO H, SHAO ZY, JIANG Y, DOLE S, ZHAO HM. Exploiting *Issatchenkia orientalis* SD108 for succinic acid production[J]. Microbial Cell Factories, 2014, 13(1): 121.
- [42] TRAN VG, MISHRA S, BHAGWAT SS, SHAFAEI S, SHEN YH, ALLEN JL, CROSLY BA, TAN SI, FATMA Z, RABINOWITZ JD, GUEST JS, SINGH V, ZHAO HM. An end-to-end pipeline for succinic acid production at an industrially relevant scale using *Issatchenkia orientalis*[J]. Nature Communications, 2023, 14(1): 6152.
- [43] KORNBERG HL, KREBS HA. Synthesis of cell constituents from C2-units by a modified tricarboxylic acid cycle[J]. Nature, 1957, 179(4568): 988-991.
- [44] KORNBERG HL. The role and control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli*[J]. Biochemical Journal, 1966, 99(1): 1-11.
- [45] RAAB AM, GEBHARDT G, BOLOTINA N, WEUSTER-BOTZ D, LANG C. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the biotechnological production of succinic acid[J]. Metabolic Engineering, 2010, 12(6): 518-525.
- [46] YANG XF, WANG HM, LI C, LIN CSK. Restoring of glucose metabolism of engineered *Yarrowia lipolytica* for succinic acid production via a simple and efficient adaptive evolution strategy[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(20): 4133-4139.
- [47] LEE SJ, SONG H, LEE SY. Genome-based metabolic engineering of *Mannheimia succiniciproducens* for succinic acid production[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(3): 1939-1948.
- [48] 王学明, 潘静宇, 吴静, 陈修来, 高聪, 宋伟, 魏婉清, 刘佳, 刘立明. 调控大肠杆菌胞内ATP和NADH水平促进琥珀酸生产[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3236-3252.
- WANG XM, PAN JY, WU J, CHEN XL, GAO C, SONG W, WEI WQ, LIU J, LIU LM. Regulation of intracellular level of ATP and NADH in *Escherichia coli* to promote succinic acid production[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3236-3252 (in Chinese).
- [49] GAO C, TANG WX, GUO L, HU GP, LIU J, LIU LM, CHEN XL. Improving succinate production by engineering oxygen-dependent dynamic pathway regulation in *Escherichia coli*[J]. Systems Microbiology and Biomanufacturing, 2022, 2(2): 331-344.
- [50] RAAB AM, LANG C. Oxidative versus reductive succinic acid production in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Bioengineered Bugs, 2011, 2(2): 120-123.
- [51] RENDULIĆ T, PERPELEA A, ORTIZ JPR, CASAL M, NEVOIGT E. 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.
- [52] CUI ZY, GAO CJ, LI JJ, HOU J, LIN CSK, QI QS. Engineering of unconventional yeast *Yarrowia lipolytica* for efficient succinic acid production from glycerol at low pH[J]. Metabolic Engineering, 2017, 42: 126-133.
- [53] CUI ZY, ZHONG YT, SUN ZJ, JIANG ZN, DENG JY, WANG Q, NIELSEN J, HOU J, QI QS. Reconfiguration of the reductive TCA cycle enables high-level succinic acid production by *Yarrowia lipolytica*[J]. Nature Communications, 2023, 14(1): 8480.
- [54] WANG YP, SAN KY, BENNETT GN. Cofactor engineering for advancing chemical biotechnology[J].

- Current Opinion in Biotechnology, 2013, 24(6): 994-999.
- [55] 陈修来, 刘佳, 罗秋玲, 刘立明. 微生物辅因子平衡的代谢调控[J]. 生物工程学报, 2017, 33(1): 16-26.
CHEN XL, LIU J, LUO QL, LIU LM. Manipulation of cofactor balance in microorganisms[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2017, 33(1): 16-26 (in Chinese).
- [56] 钱芷兰, 宋丽丽, 刘启, 龚秀龙, 康艺嘉, 何子雨, 龙浩雨, 蔡孟浩. 非常规酵母天然产物合成[J]. 生物工程学报, 2023, 39(6): 2284-2312.
QIAN ZL, SONG LL, LIU Q, GONG XL, KANG YJ, HE ZY, LONG HY, CAI MH. Biosynthesis of natural products by non-conventional yeasts[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(6): 2284-2312 (in Chinese).
- [57] SAUER U. Metabolic networks in motion: ^{13}C -based flux analysis[J]. Molecular Systems Biology, 2006, 2(1): 62.
- [58] NISSEN TL, ANDERLUND M, NIELSEN J, VILLADSEN J, KIELLAND-BRANDT MC. Expression of a cytoplasmic transhydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae* results in formation of 2-oxoglutarate due to depletion of the NADPH pool[J]. Yeast, 2001, 18(1): 19-32.
- [59] XI YY, XU HT, ZHAN T, QIN Y, FAN FY, ZHANG XL. 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.
- [60] RUSH BJ, WATTS KT, JR VLM, FOSMER AM, POYNTER GM, MCMULLIN TW. Yeast cells having reductive tca pathway from pyruvate to succinate and overexpressing an exogenous nad(p) + transhydrogenase enzyme: EP2877568[P]. 2014-01-30.
- [61] 栾韬, 尹梦琦, 王明, 康秀龙, 赵建志, 鲍晓明. 酿酒酵母细胞器区室化合成化学品的研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(6): 2334-2358.
LUAN T, YIN MQ, WANG M, KANG XL, ZHAO JZ, BAO XM. Advances in the production of chemicals by organelle compartmentalization in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(6): 2334-2358 (in Chinese).
- [62] ZHU ZT, DU MM, GAO B, TAO XY, ZHAO M, REN YH, WANG FQ, WEI DZ. Metabolic compartmentalization in yeast mitochondria: Burden and solution for squalene overproduction[J]. Metabolic Engineering, 2021, 68: 232-245.
- [63] KATZBERG M, SKORUPA-PARACHIN N, GORWA-GRAUSLUND MF, BERTAU M. Engineering cofactor preference of ketone reducing biocatalysts: z mutagenesis study on a γ -diketone reductase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* serving as an example[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2010, 11(4): 1735-1758.
- [64] SLIVINSKAYA EA, PLEKHANOVA NS, ALTMAN IB, YAMPOLSKAYA TA. Engineering of *Escherichia coli* glyceraldehyde-3-Phosphate dehydrogenase with dual NAD⁺/NADP⁺ cofactor specificity for improving amino acid production[J]. Microorganisms, 2022, 10(5): 976.
- [65] ZHANG XL, FAN FY, XI YY, XU HT. Acid-resistant yeast strain for high yield of succinic acid, and construction method and application thereof: CN118475683A[P]. 2024-08-09.
- [66] 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.
- [67] BOYARSKIY S, TULLMAN-ERCEK D. Getting pumped: membrane efflux transporters for enhanced biomolecule production[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2015, 28: 15-19.
- [68] 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.
- [69] CASAL M, PAIVA S, QUEIRÓS O, SOARES-SILVA I. Transport of carboxylic acids in yeasts[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2008, 32(6): 974-994.
- [70] ZELLE RINTZE M, de HULSTER E, van WINDEN WOUTER A, de WAARD P, DIJKEMA C, WINKLER AARON A, GEERTMAN JAN-MAARTEN A, van DIJKEN JOHANNES P, PRONK JACK T, van MARIS ANTONIUS JA. 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.
- [71] VERWAAL R, WU L, DAMVELD RA, SAGT CMJ. Succinic acid production in a eukaryotic cell: US20120165569[P]. 2012-06-28.
- [72] CHEN XL, WANG YC, DONG XX, HU GP, LIU LM. Engineering rTCA pathway and C4-dicarboxylate transporter for L-malic acid production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(10): 4041-4052.
- [73] XIBERRAS J, KLEIN M, DE HULSTER E, MANS R, NEVOIGT E. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for succinic acid production from glycerol and carbon dioxide [J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8: 566.
- [74] JIANG ZN, CUI ZY, ZHU ZW, LIU YH, TANG YJ, HOU J, QI QS. Engineering of *Yarrowia lipolytica* transporters for high-efficient production of biobased succinic acid from glucose[J]. Biotechnology for Biofuels, 2021, 14(1): 145.
- [75] 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.
- [76] RENDULIĆ T, MENDONÇA BAHIA F, SOARES-SILVA I, NEVOIGT E, CASAL M. The dicarboxylate transporters from the AceTr family and dct-02 oppositely affect succinic acid production in *S. cerevisiae*[J]. Journal of Fungi, 2022, 8(8): 822.
- [77] XI YY, ZHAN T, XU HT, CHEN J, BI CH, FAN FY, ZHANG XL. Characterization of JEN family carboxylate transporters from the acid-tolerant yeast *Pichia kudriavzevii* and their applications in succinic acid production[J]. Microbial Biotechnology, 2021, 14(3): 1130-1147.

- [78] TAYLOR EB. Functional properties of the mitochondrial carrier system[J]. Trends in Cell Biology, 2017, 27(9): 633-644.
- [79] YUZBASHEVA EY, SCARCIA P, YUZBASHEV TV, MESSINA E, KOSIKHINA IM, PALMIERI L, SHUTOV AV, TARATYNOVA MO, AMARO RL, PALMIERI F, SINEOKY SP, AGRIMI G. Engineering *Yarrowia lipolytica* for the selective and high-level production of isocitric acid through manipulation of mitochondrial dicarboxylate-tricarboxylate carriers[J]. Metabolic Engineering, 2021, 65: 156-166.
- [80] DULERMO R, GAMBOA-MELÉNDEZ H, MICHELY S, THEVENIEAU F, NEUVÉGLISE C, NICAUD JM. The evolution of Jen3 proteins and their role in dicarboxylic acid transport in *Yarrowia*[J]. MicrobiologyOpen, 2015, 4(1): 100-120.
- [81] SOARES-SILVA I, RIBAS D, FOSKOLOU IP, BARATA B, BESSA D, PAIVA S, QUEIRÓS O, CASAL M. The *Debaryomyces hansenii* carboxylate transporters Jen1 homologues are functional in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. FEMS Yeast Res, 2015, 15(8): fov094.
- [82] JIANG M, MA JF, WU MK, LIU RM, LIANG LY, XIN FX, ZHANG WM, JIA HH, DONG WL. Progress of succinic acid production from renewable resources: metabolic and fermentative strategies[J]. Bioresource Technology, 2017, 245: 1710-1717.
- [83] ANTONIEWICZ MR. Synthetic methylotrophy: Strategies to assimilate methanol for growth and chemicals production[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2019, 59: 165-174.
- [84] ZHANG SJ, GUO F, YANG Q, JIANG YJ, YANG SH, MA JF, XIN FX, HASUNUMA T, KONDO A, ZHANG WM, JIANG M. Improving methanol assimilation in *Yarrowia lipolytica* via systematic metabolic engineering combined with compartmentalization[J]. Green Chemistry, 2023, 25(1): 183-195.
- [85] CHEN Z, LIU DH. Toward glycerol biorefinery: metabolic engineering for the production of biofuels and chemicals from glycerol[J]. Biotechnology for Biofuels, 2016, 9(1): 205.
- [86] YAZDANI SS, GONZALEZ R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2007, 18(3): 213-219.
- [87] ONG KL, FICKERS P, LIN CSK. Enhancing succinic acid productivity in the yeast *Yarrowia lipolytica* with improved glycerol uptake rate[J]. Science of The Total Environment, 2020, 702: 134911.
- [88] KWAK S, JO JH, YUN EJ, JIN YS, SEO JH. Production of biofuels and chemicals from xylose using native and engineered yeast strains[J]. Biotechnology Advances, 2019, 37(2): 271-283.
- [89] ATTFIELD PV, BELL PJL. Use of population genetics to derive nonrecombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains that grow using xylose as a sole carbon source[J]. FEMS Yeast Research, 2006, 6(6): 862-868.
- [90] PRABHU AA, LEDESMA-AMARO R, LIN CSK, COULON F, THAKUR VK, KUMAR V. Bioproduction of succinic acid from xylose by engineered *Yarrowia lipolytica* without pH control[J]. Biotechnology for Biofuels, 2020, 13(1): 113.
- [91] YAFETTO L, ODAMTTEN GT, WIAFE-KWAGYAN M. Valorization of agro-industrial wastes into animal feed through microbial fermentation: a review of the global and Ghanaian case[J]. Heliyon, 2023, 9(4): e14814.
- [92] GINNI G, KAVITHA S, YUKESH KR, BHATIA SK, ADISH KS, RAJKUMAR M, KUMAR G, PUGAZHENDHI A, CHI NTL, RAJESH BJ. Valorization of agricultural residues: different biorefinery routes[J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2021, 9(4): 105435.
- [93] PHAM TPT, KAUSHIK R, PARSHETTI GK, MAHMOOD R, BALASUBRAMANIAN R. Food waste-to-energy conversion technologies: current status and future directions[J]. Waste Management, 2015, 38: 399-408.
- [94] ORTIZ-SANCHEZ M, INOCENCIO-GARCÍA PJ, ALZATE-RAMÍREZ AF, ALZATE CAC. Potential and restrictions of food-waste valorization through fermentation processes[J]. Fermentation, 2023, 9(3): 274.
- [95] LI C, YANG XF, GAO S, CHUH AH, LIN CSK. Hydrolysis of fruit and vegetable waste for efficient succinic acid production with engineered *Yarrowia lipolytica*[J]. Journal of Cleaner Production, 2018, 179: 151-159.
- [96] LI C, ONG KL, YANG XF, LIN CSK. Bio-refinery of waste streams for green and efficient succinic acid production by engineered *Yarrowia lipolytica* without pH control[J]. Chemical Engineering Journal, 2019, 371: 804-812.
- [97] ZHANG MQ, SHI AP, AJMAL M, YE LH, AWAIS M. Comprehensive review on agricultural waste utilization and high-temperature fermentation and composting[J]. Biomass Conversion and Biorefinery, 2023, 13(7): 5445-5468.
- [98] ONG KL, LI C, LI XT, ZHANG Y, XU JL, LIN CSK. Co-fermentation of glucose and xylose from sugarcane bagasse into succinic acid by *Yarrowia lipolytica*[J]. Biochemical Engineering Journal, 2019, 148: 108-115.
- [99] DHARMAKAR P, AANAND S, KUMAR JSS, ANDE MP, PADMAVATHY P, PEREIRA JJ. Solid-state fermentation of sunflower meal using commercial yeast for use as an improved nutrient source in aquafeed[J]. International Journal of Applied Research, 2022, 8(3): 375-378.
- [100] EFTHYMIU MN, PATERAKI C, PAPAPOSTOLOU H, LIN CSK, KOUTINAS A. Restructuring the sunflower-based biodiesel industry into a circular bio-economy business model converting sunflower meal and crude glycerol into succinic acid and value-added co-products[J]. Biomass and Bioenergy, 2021, 155: 106265.
- [101] HASSAN MA, AHMAD FARID MA, SHIRAI Y, ARIFFIN H, OTHMAN MR, SAMSUDIN MH, HASAN MY. Oil palm biomass biorefinery for sustainable production of renewable materials[J].

- Biotechnology Journal, 2019, 14(6): e1800394.
- [102] ZEVALLOS TORRES LA, LORENCI WOICIECHOWSKI A, NISHIDA VS, VALLADARES-DIESTRA KK, PORTO DE SOUZA VANDENBERGHE L, ZANDONA FILHO A, SOCCOL CR. Imidazole pretreatment of oil palm empty fruit bunches for ethanol and succinic acid co-production by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*[J]. *BioEnergy Research*, 2023, 16(2): 990-1000.
- [103] GOMAR-ALBA M, MORCILLO-PARRA MÁ, OLMO ML. Response of yeast cells to high glucose involves molecular and physiological differences when compared to other osmotic conditions[J]. *FEMS Yeast Research*, 2015, 15(5): fov039.
- [104] YUN JH, ZABED HM, ZHANG YF, ZHANG GY, ZHAO M, QI XH. Improving tolerance and 1, 3-propanediol production of *Clostridium butyricum* using physical mutagenesis, adaptive evolution and genome shuffling[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 363: 127967.
- [105] EOM GE, LEE HB, KIM SK. Development of a genome-targeting mutator for the adaptive evolution of microbial cells[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 50(7): e38.
- [106] YUZBASHEV TV, BONDARENKO PY, SOBOLEVSKAYA TI, YUZBASHEVA EY, LAPTEV IA, KACHALA VV, FEDOROV AS, VYBORNAYA TV, LARINA AS, SINEOKY SP. Metabolic evolution and ¹³C flux analysis of a succinate dehydrogenase deficient strain of *Yarrowia lipolytica*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2016, 113(11): 2425-2432.
- [107] AYEPA E, LI Q, ZHANG ZY, WANG HY, HERMAN RA, OUYANG YD, KUANG XL, TAFERE GA, MA MG. Molecular mechanism of tolerance evolution in *Candida tropicalis* to inhibitory compounds derived from corn stover hydrolysis[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2024, 181: 107031.
- [108] STOVICEK V, DATO L, ALMQVIST H, SCHÖPPING M, CHEKINA K, PEDERSEN LE, KOZA A, FIGUEIRA D, TJSÅS F, FERREIRA BS, FORSTER J, LIDÉN G, BORODINA I. Rational and evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of dicarboxylic acids from lignocellulosic biomass and exploring genetic mechanisms of the yeast tolerance to the biomass hydrolysate[J]. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 2022, 15(1): 22.
- [109] MOSER JW, PRIELHOFER R, GERNER SM, GRAF AB, WILSON IBH, MATTANOVICH D, DRAGOSITS M. Implications of evolutionary engineering for growth and recombinant protein production in methanol-based growth media in the yeast *Pichia pastoris*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16(1): 49.
- [110] KONZOCK O, ZAGHEN S, NORBECK J. Tolerance of *Yarrowia lipolytica* to inhibitors commonly found in lignocellulosic hydrolysates[J]. *BMC Microbiology*, 2021, 21(1): 77.
- [111] ALMEIDA JRM, BERTILSSON M, GORWA-GRAUSLUND MF, GORSICH S, LIDÉN G. Metabolic effects of furaldehydes and impacts on biotechnological processes[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 82(4): 625-638.
- [112] LIU ZL, MA MG, SONG MZ. Evolutionarily engineered ethanologenic yeast detoxifies lignocellulosic biomass conversion inhibitors by reprogrammed pathways[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2009, 282(3): 233-244.
- [113] ZHONG YT, GU JH, SHANG CY, DENG JY, LIU YH, CUI ZY, LU XM, QI QS. Sustainable succinic acid production from lignocellulosic hydrolysates by engineered strains of *Yarrowia lipolytica* at low pH[J]. *Bioresource Technology*, 2024, 408: 131166.
- [114] JIANG T, LI CY, TENG YX, ZHANG RH, YAN YJ. Recent advances in improving metabolic robustness of microbial cell factories[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2020, 66: 69-77.
- [115] CAO WF, CAO WL, SHEN F, LUO J, YIN JQ, QIAO CS, WAN YH. A sustainable pH shift control strategy for efficient production of β -poly(L-malic acid) with CaCO₃ addition by *Aureobasidium pullulans* ipe-1[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(20): 8691-8703.
- [116] ZHONG YT, SHANG CY, TAO HL, HOU J, CUI ZY, QI QS. Boosting succinic acid production of *Yarrowia lipolytica* at low pH through enhancing product tolerance and glucose metabolism[J]. *Microbial Cell Factories*, 2024, 23(1): 291.
- [117] XIE CY, SU RR, WU B, SUN ZY, TANG YQ. Response mechanisms of different *Saccharomyces cerevisiae* strains to succinic acid[J]. *BMC Microbiology*, 2024, 24(1): 158.
- [118] ZENG DW, YANG YQ, WANG Q, ZHANG FL, ZHANG MD, LIAO S, LIU ZQ, FAN YC, LIU CG, ZHANG L, ZHAO XQ. Transcriptome analysis of *Kluyveromyces marxianus* under succinic acid stress and development of robust strains[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2024, 108(1): 293.