

代谢工程改造大肠杆菌生产四碳二羧酸

唐永圣, 丁德阳, 张哲, 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

唐永圣, 丁德阳, 张哲, 陈修来. 代谢工程改造大肠杆菌生产四碳二羧酸[J]. 微生物学报, 2026, 66(5): 2159-2173.

TANG Yongsheng, DING Deyang, ZHANG Zhe, CHEN Xiulai. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of four-carbon dicarboxylic acids[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2026, 66(5): 2159-2173.

摘要:【目的】四碳二羧酸是一类重要的平台化学品, 在食品、医药及化工领域应用广泛。然而, 微生物发酵法生产四碳二羧酸的效率仍面临挑战, 主要受限于中心碳代谢通量不足和副产物积累等问题。【方法】以大肠杆菌(*Escherichia coli*)为底盘菌株, 采用理性代谢工程与非理性改造相结合的策略, 系统优化 *E. coli* 的四碳二羧酸合成能力。【结果】通过重构非循环乙醛酸支路、优化路径关键酶的表达水平, 提高了四碳二羧酸代谢通量; 借助常压室温等离子体诱变 (atmospheric and room-temperature plasma, ARTP) 技术提升了四碳二羧酸的合成能力。敲除乙酸、甲酸和乳酸代谢途径的相关基因有效减少了碳代谢流的损耗, 提高了四碳二羧酸合成前体草酰乙酸的供给效率。进一步通过特异性改造终端代谢路径构建了生产富马酸的工程菌株 *E. coli* Fum02。在 5 L 发酵罐中, 工程菌株 *E. coli* Fum02 的富马酸产量、得率和生产强度分别达到 45.2 g/L、0.45 g/g 和 0.23 g/(L·h)。在此基础上, 通过阻断琥珀酸脱氢酶基因 (*sdhAB*) 和发酵优化等策略可进一步用于生产琥珀酸。【结论】本研究为代谢工程改造细菌生产有机酸提供了参考, 同时也为四碳二羧酸的工业化生物制造奠定了基础。

关键词: 大肠杆菌; 四碳二羧酸; 代谢工程; 细胞工厂

资助项目: 国家自然科学基金(32571712); 江苏省合成生物基础研究中心基础 Research 计划(BK20233003); 中央高校基本科研业务费专项资金(JUSRP124023)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32571712), the Basic Research Program of Jiangsu and Jiangsu Basic Research Center for Synthetic Biology (BK20233003), and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (JUSRP124023).

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

Received: 2025-11-05; Accepted: 2025-12-24; Published online: 2026-01-12

Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of four-carbon dicarboxylic acids

TANG Yongsheng, DING Deyang, ZHANG Zhe, CHEN Xiulai*

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

Abstract: [Objective] Four-carbon dicarboxylic acids are a class of important platform chemicals widely used in the food, pharmaceutical, and chemical industries. However, the efficiency of microbial fermentation for producing four-carbon dicarboxylic acids still faces challenges, mainly limited by insufficient central carbon metabolic flux and byproduct accumulation. [Methods] This study used *Escherichia coli* as the chassis strain and adopted a strategy combining rational metabolic engineering and non-rational modification to systematically optimize the four-carbon dicarboxylic acid synthesis capacity of *E. coli*. [Results] The non-cyclic glyoxylate shunt was reconstructed and the expression of key pathway enzymes was optimized to enhance the metabolic flux toward four-carbon dicarboxylic acids. The synthesis capacity of four-carbon dicarboxylic acids was enhanced by employing atmospheric and room-temperature plasma (ARTP) mutagenesis. The knockout of key genes in the acetate, formate, and lactate synthesis pathways effectively minimized carbon flux diversion, thereby enhancing the availability of oxaloacetate, the central precursor to four-carbon dicarboxylic acids. On this basis, through specific modification of terminal metabolic pathways, the engineering strain *E. coli* Fum02 for fumaric acid production were constructed. Finally, in a 5 L fermenter, the fumaric acid titer, yield, and productivity of the engineering strain *E. coli* Fum02 reached 45.2 g/L, 0.45 g/g, and 0.23 g/(L·h), respectively. Furthermore, by blocking the succinate dehydrogenase gene (*sdhAB*) and implementing fermentation optimization strategies, this platform strain could also be redirected toward efficient succinate production. [Conclusion] This study provides a reference for the metabolic engineering modification of bacteria to produce organic acids and also lays a foundation for the industrial biomanufacturing of four-carbon dicarboxylic acids.

Keywords: *Escherichia coli*; four-carbon dicarboxylic acids; metabolic engineering; cell factory

四碳二羧酸是一类含有 4 个碳原子且具有 2 个酸性官能团的低分子量有机化合物, 以富马酸、琥珀酸、苹果酸为代表, 广泛应用于食品、医药、农业及生物可降解材料等领域^[1]。目前, 为应对传统化学合成法对石化资源的依赖以及高能耗、高污染问题, 利用可再生资源通过微生物发酵法生产四碳二羧酸已成为国内外的研究热点^[2]。目前, 多种微生物已被开发用于四碳二羧酸的生物制造。常用原核宿主包括

大肠杆菌(*Escherichia coli*)、产琥珀酸曼氏杆菌(*Mannheimia succiniciproducens*)、谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*); 真核宿主则主要有解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)、东方伊萨酵母(*Issatchenkia orientalis*)和光滑球拟酵母(*Candida glabrata*)^[3]。其中, *E. coli* 因其遗传背景清晰、易操作、培养要求简单且生长快速等优势, 仍是当前四碳二羧酸代谢工程研究中最具潜力的宿主。

为了提高 *E. coli* 生产四碳二羧酸的产量、得率及生产强度, 已应用多种代谢工程策略, 主要有以下 4 个方面。(1) 阻断冗余代谢路径。在微好氧发酵过程中, *E. coli* 会积累乙酸、乳酸和甲酸等副产物, 严重影响四碳二羧酸的产量及得率。阻断冗余代谢路径可有效提高目标产品的积累量。例如, 在 *E. coli* NZN111 中敲除 *pflB* 和 *ldhA* 并过表达苹果酸脱氢酶 (malate dehydrogenase, MDH), 琥珀酸产量和得率分别达到 31.9 g/L 和 0.78 g/g^[4]; 在敲除 *pflB*、*ldhA* 和 *pta-ackA* 的 *E. coli*-N-26 中经蛋白质稳定性改造, 琥珀酸产量、得率及生产强度分别达到 153.36 g/L、0.90 g/g 和 2.13 g/(L·h)^[5]。(2) 强化合成路径代谢通量。在 *E. coli* 中过表达 *pyc*、*ppc* 以提高三羧酸循环 (tricarboxylic acid cycle, TCA) 的代谢通量, 例如在 *E. coli* EF01 中过表达 *ppc*、*aceAB*, 改造菌株利用甘油生产富马酸的产量、得率及生产强度分别达到 41.5 g/L、0.45 g/g 和 0.51 g/(L·h)^[6]; 在 *E. coli* CWF41 中通过强启动子 *tac* 过表达 *ppc*, *ppc* 的酶活较出发菌株提高 4.7 倍, 富马酸产量提高 2.8 倍^[7]。(3) 优化辅因子供应。胞内适当的 NADH/NAD⁺ 比例对四碳二羧酸生物合成过程至关重要。在 *E. coli* Suc-P01 中引入转氢酶基因 (*sthA*), 琥珀酸转化率达到 1.61 mol/mol, 接近理论转化率的 94%^[8]。(4) 强化四碳二羧酸外排能力。发酵过程中, 胞内积累过多四碳二羧酸会抑制菌株生长和代谢活力。通过在 *E. coli* W3110Δ4 中表达 *dcuBC*, 富马酸最高产量达到 18.9 g/L, 较出发菌株提高 16.2%^[9]。尽管上述策略有效提高了 *E. coli* 生产四碳二羧酸的产量和得率, 但其发酵效率仍受限于中心碳代谢通量不足和副产物积累等问题。因此, 构建一株高性能的平台底盘菌株仍是实现四碳二羧酸工业生物制造的核心挑战。

本研究以 *E. coli* 为出发菌株, 系统构建了高效合成四碳二羧酸的平台底盘菌株, 并实现了特定目标产物的定向生物合成。首先, 重构

非循环乙醛酸支路, 并优化路径关键酶的表达水平, 以提高四碳二羧酸的代谢通量。其次, 采用常压室温等离子体诱变 (atmospheric and room-temperature plasma, ARTP) 筛选琥珀酸、富马酸和苹果酸积累量显著提升的突变株。进一步, 系统敲除冗余路径构建低副产物的平台底盘菌株。最后, 针对富马酸与琥珀酸两类终端产物分别进行终端路径改造: 在富马酸合成中, 通过代谢流定向重构策略构建工程菌株 *E. coli* Fum02, 旨在提升富马酸的合成效率。在此基础上, 通过阻断琥珀酸降解途径并优化微好氧发酵工艺, 进一步提高琥珀酸的合成能力。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

E. coli BL21、*E. coli* CICC 23846 分别用于表达载体的构建和代谢工程改造的底盘, *E. coli* MG1655 的基因组用作扩增目标基因的模板, 其中 *E. coli* CICC 23846 购自中国工业微生物菌种保藏管理中心 (CICC)。本研究使用的菌株见表 1, 重组质粒见表 2, 引物见表 3。

1.1.2 主要试剂和仪器

限制性内切酶、PrimeSTAR Max 高保真酶、T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶等分子生物学基因操作相关酶, 宝生物工程 (大连) 有限公司; 一步同源重组酶, 南京巨匠生物科技有限公司; 质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、产物纯化试剂等分子生物学基因操作相关试剂盒, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 细菌基因组提取试剂盒, 天根生化科技 (北京) 有限公司; PCR 引物, 亦欣生物科技 (上海) 有限公司; 琥珀酸、富马酸、苹果酸、 α -酮戊二酸、乳酸、乙酸、甲酸, Sigma-Aldrich 公司; 其他试剂, 国药集团化学试剂有限公司。

PCR 扩增仪、核酸电泳仪、凝胶成像仪、高速离心机, 艾本德股份公司; Criterion 型电转

表1 本研究所用菌株

Table 1 Strains used in this study

| Strains | Descriptions | Sources |
|------------------------------|--|------------|
| <i>E. coli</i> SG01 | <i>E. coli</i> CICC 23846 (fumarate-producing strain) | CICC |
| <i>E. coli</i> SG02 | <i>E. coli</i> SG01 Δ yg Δ Y::Ec Δ ppc | This study |
| <i>E. coli</i> SG03 | <i>E. coli</i> SG01 Δ ilvG::Af Δ pyc | This study |
| <i>E. coli</i> SG04 | <i>E. coli</i> SG02 Δ ilvG::Af Δ pyc | This study |
| <i>E. coli</i> SG05 | <i>E. coli</i> SG04 Δ l Δ fhA::Ec Δ gltA Δ yjiT::Ec Δ acN | This study |
| <i>E. coli</i> SG06 | <i>E. coli</i> SG05 Δ iclR | This study |
| <i>E. coli</i> SG06-L | <i>E. coli</i> SG06 Δ ylbE::P Δ trc-RBS31-aceA-RBS11-aceB | This study |
| <i>E. coli</i> SG06-M | <i>E. coli</i> SG06 Δ ylbE::P Δ trc-RBS31-aceA-RBS29-aceB | This study |
| <i>E. coli</i> SG07 (SG06-H) | <i>E. coli</i> SG06 Δ ylbE::P Δ trc-RBS31-aceA-RBS34-aceB | This study |
| <i>E. coli</i> SG08 | <i>E. coli</i> SG07, ARTP mutagenesis | This study |
| <i>E. coli</i> SG09 | <i>E. coli</i> SG08 Δ pflB | This study |
| <i>E. coli</i> SG10 | <i>E. coli</i> SG08 Δ poxB | This study |
| <i>E. coli</i> SG11 | <i>E. coli</i> SG08 Δ pta-ackA | This study |
| <i>E. coli</i> SG12 | <i>E. coli</i> SG08 Δ pflB Δ poxB Δ pta-ackA | This study |
| <i>E. coli</i> SG13 | <i>E. coli</i> SG12 Δ ldhA | This study |
| <i>E. coli</i> SG14 | <i>E. coli</i> SG13 Δ adhE | This study |
| <i>E. coli</i> Fum01 | <i>E. coli</i> SG13 Δ fumA | This study |
| <i>E. coli</i> Fum02 | <i>E. coli</i> SG13 Δ fumA Δ frdBC | This study |
| <i>E. coli</i> SA01 | <i>E. coli</i> SG13 Δ sdhAB | This study |

表2 本研究所用质粒

Table 2 Plasmids used in this study

| Plasmids | Descriptions | Sources |
|----------|---|------------|
| pCAS | pMB1 ori, Kan ^r , P Δ cas-cas9, P Δ araB-Red, P Δ trc-sgRNA | This study |
| pTargetF | pMB1 ori, Spe ^r , P Δ J23119 promoter | This study |
| pTrc01 | pMB1 ori, Amp ^r , P Δ trc-RBS31-aceA-RBS11-aceB | This study |
| pTrc02 | pMB1 ori, Amp ^r , P Δ trc-RBS31-aceA-RBS31-aceB | This study |
| pTrc03 | pMB1 ori, Amp ^r , P Δ trc-RBS31-aceA-RBS34-aceB | This study |

仪, Bio-Rad 公司; 恒温培养箱, 上海跃进医疗器械有限公司; 恒温调速摇床, 上海知楚仪器有限公司; 高压蒸汽灭菌锅, 致微(厦门)仪器有限公司; 分光光度计, 岛津公司; 精密 pH 计、分析天平, 梅特勒-托利多公司; 液相色谱仪, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 生物传感器分析仪, 深圳市西尔曼科技有限公司; 多功能酶标仪, 美谷分子仪器(上海)有限公司; 常压室温等离子体诱变育种仪, 无锡源清天木生物科技有限公司; 5 L 发酵罐, 迪必尔生物工程(上海)有限公司。

1.2 分子操作方法

1.2.1 重组质粒的构建

采用吉布森(Gibson)组装法构建质粒^[10]。利用设计的上、下游引物从 *E. coli* MG1655 基因组上扩增 *aceB* 基因, 将它们分别连接到线性化载体 pTrc 上得到重组质粒 pTrc01、pTrc02、pTrc03, 以获取整合框片段。

1.2.2 工程菌株构建

采用 CRISPR-Cas9 技术^[11], 在底盘菌株 *E. coli* CICC 23846 基因组中的中性位点 *yg Δ Y*、*ilvG*、*lafU*、*yjiT*、*ylbE*, 分别插入 *Ec Δ ppc*、*Af Δ pyc*、*Ec Δ gltA*、*Ec Δ acN*、*Ec Δ aceAB* 基因, 依次获

表3 本研究所用引物

Table 3 Primers used in this study

| Primer names | Primer sequences (5'→3') |
|----------------------|-----------------------------|
| <i>ppc</i> -U-F | ATGAACGAACAATATCCGCATTGC |
| <i>ppc</i> -U-R | TTAGCCGGTATTACGCATACCTG |
| <i>pyc</i> -D-F | ATGGCGGCTCCGTTTCGTCAG |
| <i>pyc</i> -D-R | TTACGCTTTGACGATCTTGCAGAC |
| <i>iclR</i> -U-F | TTTCGCCGCCGCAAAGTTGATTT |
| <i>iclR</i> -U-R | GACAGTCTCTTTTTTCTGTATCGT |
| <i>iclR</i> -D-F | CTTTTTCTGGCGGGCAGAGGCA |
| <i>iclR</i> -D-R | GATATGACGACCATTTTGTCTAC |
| <i>aceA</i> -U-F | ATGAAAACCCGTACACAACAAATT |
| <i>aceA</i> -U-R | TTAGAACTGCGATTCTTCAGTGG |
| <i>aceB</i> -D-F | ATGACTGAACAGGCAACAACAAC |
| <i>aceB</i> -D-R | TTACGCTAACAGGCGGTAGCCTG |
| <i>pflB</i> -U-F | ATATGACCGCAAATGGTCAATGGG |
| <i>pflB</i> -U-R | GTAACACCTACCTTCTTAAGTGG |
| <i>pflB</i> -D-F | TTAGATTTGACTGAAATCGTACA |
| <i>pflB</i> -D-R | ACAGGTATGAATGCCTTCTTTTT |
| <i>poxB</i> -U-F | TACCTGACTTAGCTTCACGTACCG |
| <i>poxB</i> -U-R | AAGTTTAGTTCATCTGACGGAGG |
| <i>poxB</i> -D-F | AAAGGGTGGCATTTCGCCGTCAT |
| <i>poxB</i> -D-R | AATCCCATGCTTCTTTCAGGTA |
| <i>pta-ackA</i> -U-F | CAATCTGCCAGCAGAGAGTAAATACG |
| <i>pta-ackA</i> -U-R | AAAAAAACGTCAGGGAGCCATAGA |
| <i>pta-ackA</i> -D-F | TCTCGTCATCATCCGCAGCTT |
| <i>pta-ackA</i> -D-R | GATCCTGAGGTTAATCCTTCAAAC |
| <i>ldhA</i> -U-F | CAAGCAGAATCAAGTTCTACCG |
| <i>ldhA</i> -U-R | AAGACTTTCTCCAGTGATGTTGA |
| <i>ldhA</i> -D-F | TGCATTCCAGGGGAGCTGATTC |
| <i>ldhA</i> -D-R | AAGTTAATGTCTGTTTTGCGGT |
| <i>adhE</i> -U-F | AAAATCAAAAAAGGCTGAATCACG |
| <i>adhE</i> -U-R | AATGCTCTCCTGATAATGTTAAACTT |
| <i>adhE</i> -D-F | TCAGTAGCGCTGTCTGGCAACAT |
| <i>adhE</i> -D-R | AATGGCAAAAAGTTGCAGGCCG |
| <i>fumA</i> -U-F | TTTGATGAACCTGAATGGAGAGT |
| <i>fumA</i> -U-R | TGTTCTCTCACTTACTGCCTGGT |
| <i>fumA</i> -D-F | GGGGCGGTTTTTTTACATGGCA |
| <i>fumA</i> -D-R | GGTGAACCTTACGTTCCATCCCCG |
| <i>frdBC</i> -U-F | ACAACGTCTGAAAGATCTGGTTAACC |
| <i>frdBC</i> -U-R | TCGCCTTCTCCTTCTTATTGGCTG |
| <i>frdBC</i> -D-F | GGAGCCTGAGATGATTAATCCAAATCC |
| <i>frdBC</i> -D-R | TGTTGAGGGGCGAGCAAATGTGG |
| <i>sdhAB</i> -U-F | CCTTACCGCTCTGGCGTATCACG |
| <i>sdhAB</i> -U-R | CACACACCCACACCACAACGAATC |
| <i>sdhAB</i> -D-F | ACCGTAGGCCTGATAAGACGCG |
| <i>sdhAB</i> -D-R | CGGAAATATTCACGCGTTTGAGAG |

得菌株 *E. coli* SG02、*E. coli* SG03、*E. coli* SG04、*E. coli* SG05 和 *E. coli* SG07。以 *E. coli* SG02 构建过程为例, 采用融合 PCR 方法将 *ygaY* 上、下游同源臂和带有 P_{J23119} 启动子的基因 *Ecppc* 进行连接, 获得 *Ecppc* 整合框, 将其与质粒 pTargetF 和 pCas 共同转入菌株 *E. coli* CICC 23846 中筛选获得阳性克隆, 消除质粒后获得 *Ecppc* 基因整合的菌株 *E. coli* SG02。采用相同的方法构建 *Afpyc*、*EcglA*、*EcacN* 和 *EcaceAB* 基因过表达的菌株 *E. coli* SG03、*E. coli* SG04、*E. coli* SG05 和 *E. coli* SG07。另外, 采用上述方法获得 *pflB*、*poxB*、*pta-ackA*、*ldhA*、*adhE*、*fumA*、*frdBC* 和 *sdhAB* 基因敲除盒, 将其与质粒 pCas 和 pTargetF 共同转入菌株中, 获得菌株 *E. coli* SG09、*E. coli* SG10、*E. coli* SG11、*E. coli* SG12、*E. coli* SG13、*E. coli* SG14、*E. coli* Fum01、*E. coli* Fum02 和 *E. coli* SA01。

1.3 培养基及培养条件

1.3.1 培养基

种子培养基(g/L): NaCl 10.0, 酵母提取物 5.0, 蛋白胨 10.0。

固体筛选培养基(g/L): 葡萄糖 15.0, 酵母粉 5.0, 蛋白胨 5.0, NaCl 1.5, KH₂PO₄ 1.16, K₂HPO₄ 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.3, 溴甲酚绿 0.05, 琥珀酸 5.0, 琼脂粉 20.0。

发酵培养基(g/L): 葡萄糖 40.0, 玉米浆 10.0, 糖蜜 5.0, KH₂PO₄ 0.6, K₂HPO₄ 1.4, NaCl 1.5, MgSO₄·7H₂O 0.3。

1.3.2 培养条件

平板培养: 取保存于-80 °C 装有菌液的甘油管, 接种于装有 30 mL 液体 LB 培养基的 100 mL 锥形瓶中, 37 °C、200 r/min 培养 9 h; 然后划线于固体 LB 培养基中, 37 °C 恒温箱中培养 16 h, 得到大小相近且分布均匀的单菌落。

一级种子培养: 挑取单菌落接种于装有 30 mL 液体 LB 培养基的 100 mL 锥形瓶中, 37 °C、200 r/min 培养 9 h。

二级种子培养：转接 100 μL 一级种子液至装有 50 mL 液体 LB 培养基的 500 mL 锥形瓶中，37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 7.5 h。

摇瓶发酵：按接种体积分数 10% 的接种量将二级种子液转接到 80 mL 发酵培养基中，好氧阶段 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 12 h，降低转速至 100 r/min 进入微好氧阶段，葡萄糖浓度控制在 5–10 g/L，通过加入 CaCO_3 来维持 pH 在 6.0–7.0，60 h 结束发酵。

发酵罐发酵：在 5 L 发酵罐中进行分批补料发酵。以体积分数 10% 的接种量将二级种子液接入 2.7 L 发酵培养基，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 60 h。发酵过程分为 2 个阶段：好氧阶段(0–12 h)控制搅拌转速为 600–800 r/min，通气量为 3 vvm；随后转入微好氧阶段(12–60 h)，将转速降至 200 r/min，通气量调整为 1 vvm。通过添加 CaCO_3 维持 pH 在 6.0–7.0，并通过流加 800 g/L 葡萄糖控制残糖浓度低于 5 g/L。

1.4 ARTP 诱变

1.4.1 菌悬液制备

从甘油管中蘸取菌液在 LB 平板划线，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 24 h，挑取单菌落接种于 50 mL/250 mL 的 LB 培养基，37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 条件下培养 10 h。将菌液 4 $^{\circ}\text{C}$ 、6 000 r/min 离心 5 min，弃去培养基，菌体用 PBS 溶液洗涤 3 次，再用生理盐水重悬，采用细菌计数板计数，调整菌悬液浓度约为 10^8 个/mL，备用。

1.4.2 ARTP 诱变

取 10 μL 上述菌悬液滴在灭菌后的金属载片中央(ARTP 仪专用配件)，并置于 ARTP 诱变育种仪中进行诱变。诱变工作参数设置为：100 W、纯氮流量为 10 NL/min、照射距离 2 mm。然后以 15、30、45、60、75、90 s 不同辐照时间进行 ARTP 诱变。诱变结束后，立即用无菌镊子将金属载片转移至装有 850 μL LB 的 1.5 mL 离心管中，振荡 2–3 min 洗脱菌体，然后培养 3 h，培养条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min。将获得的洗脱液

按 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 进行梯度稀释，分别涂布于固体筛选培养基上^[12]。

1.5 分析方法

1.5.1 发酵过程参数分析

生物量测定：取适量发酵液进行适当稀释，使用紫外分光光度计在波长 600 nm 条件下测定吸光度，用 OD_{600} 表示。

葡萄糖浓度测定：取适量发酵液进行适当稀释，使用生物传感器分析仪进行测定。

吸光度测定：取适量细胞培养物，使用 96 孔板在多功能酶标仪中检测细胞培养物的吸光度，pH 指示剂溴甲酚绿的特征吸收峰为 615 nm^[13]。

1.5.2 有机酸浓度测定

发酵液于 12 000 r/min 离心 10 min，取上清液进行适当稀释，使用超高效液相色谱仪测定发酵液中有有机酸含量，分析条件为：色谱柱为 Aminex HPLC-87H (300 mm \times 7.8 mm)；流动相为 5 mmol/L H_2SO_4 ，检测器为紫外检测器，检测波长 210 nm，进样量 10 μL ，柱温 52 $^{\circ}\text{C}$ ，流速 0.6 mL/min。

1.5.3 发酵性能指标的计算

在 *E. coli* 以葡萄糖为底物发酵生产四碳二羧酸的过程中，富马酸、琥珀酸的得率计算方式为：发酵过程中消耗单位质量葡萄糖所生成目标物质的质量占比。

在 *E. coli* 发酵生产四碳二羧酸的过程中，富马酸、琥珀酸的生产强度的计算方式为：单位时间内，单位体积发酵液所生产的富马酸、琥珀酸的质量，单位为 g/(L \cdot h)。

2 结果与分析

2.1 构建四碳二羧酸合成途径

为构建高效合成四碳二羧酸的微生物细胞工厂，本研究以产富马酸菌株 *E. coli* SG01 作为出发菌株，采用分步代谢工程策略增强四碳二羧酸代谢通量。首先，强化 TCA 循环的碳流输入^[14-15]。利用 CRISPR/Cas9 技术，在 *E. coli* SG01 中分别过表达内源磷酸烯醇式丙酮酸羧化

酶基因(*Ecppc*)及黄曲霉(*Aspergillus flavus*)来源的丙酮酸羧化酶基因(*Afpyc*), 构建了工程菌株 *E. coli* SG02 (过表达 *Ecppc*)、*E. coli* SG03 (过表

达 *Afpyc*)与 *E. coli* SG04 (共表达 *Ecppc* 与 *Afpyc*) (图 1A)。摇瓶发酵显示, 尽管逐步强化路径基因有效提升了四碳二羧酸的产量, 但在共表达

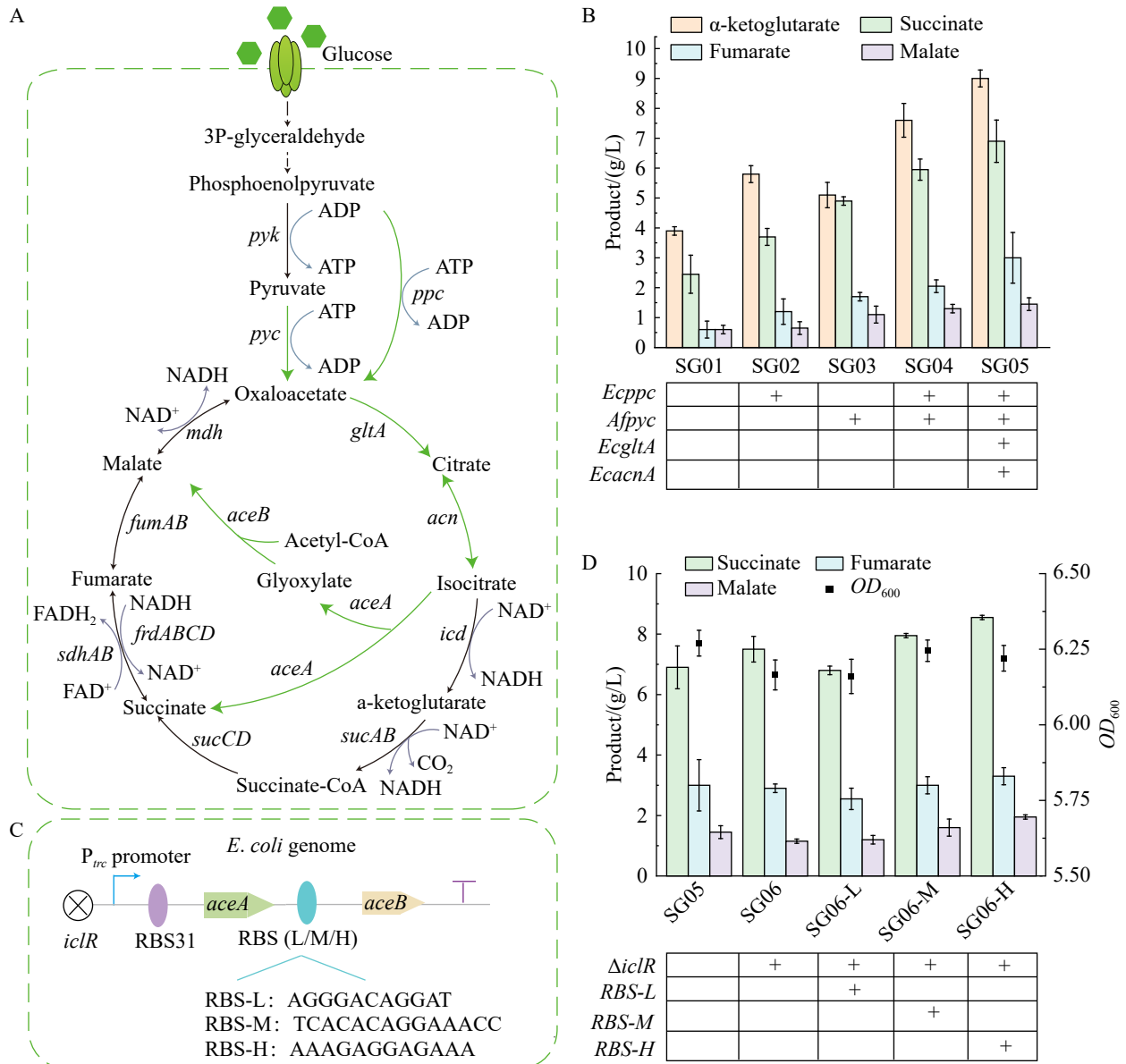


图1 构建四碳二羧酸合成路径

Figure 1 Construction of the four-carbon dicarboxylic acid biosynthetic pathway. A: Rewiring the TCA cycle for four-carbon dicarboxylic acid production; B: Enhancing carbon flux into the TCA cycle for improved production of four-carbon dicarboxylic acid; C: Metabolic engineering design of the non-cyclic glyoxylate shunt; D: Engineering a non-cyclic glyoxylate shunt to produce four-carbon dicarboxylic acids. *Ecppc*: Phosphoenolpyruvate carboxylase gene; *Afpyc*: Pyruvate carboxylase gene; *EcglTA*: Citrate synthase gene; *EcacnA*: *cis*-aconitase gene; *EcacnA*: *cis*-aconitase gene; *EcaceA*: Isocitrate lyase gene; *EcaceB*: Malate synthase gene.

菌株 *E. coli* SG04 中, 其琥珀酸、富马酸和苹果酸产量较 *E. coli* SG03 仅分别提高 14.0%、37.5% 和 33.5%, 表明该策略对产量的提升作用仍然有限。这表明, 仅强化 TCA 循环的碳流输入尚不足以驱动碳流高效转向目标产物, 需同步增强 TCA 循环内部通量^[9]。为此, 在 *E. coli* SG04 中共表达了柠檬酸合酶基因(*Ecglta*)与顺乌头酸酶基因(*EcacN*), 获得菌株 *E. coli* SG05。经 60 h 发酵, *E. coli* SG05 的 α -酮戊二酸、琥珀酸、富马酸和苹果酸产量分别达到了 8.8、7.4、3.6、1.6 g/L, 较出发菌株 *E. coli* SG01, 分别提高了 120%、270%、350% 和 220% (图 1B), 四碳二羧酸合成通量显著增加。该结果证实, 四碳二羧酸合成路径的协同强化可有效提升中心碳代谢通量。然而, 碳流仍主要导向 α -酮戊二酸, 需进一步引导代谢流向四碳二羧酸转化。最后, 为减少 α -酮戊二酸的积累量并绕过 TCA 循环中的脱羧步骤, 设计并构建了一条非循环乙醛酸支路。该途径受阻遏蛋白 *iclR* 的严格调控, 为此, 首先在 *E. coli* SG05 中敲除了 *iclR* 基因, 解除其对 *aceBAK* 操纵子的抑制, 获得 *E. coli* SG06^[16]。发酵结果显示, 菌株生长未受影响, 表明其对 TCA 循环无负面作用^[17]。进而, 以 *E. coli* SG06 为底盘, 采用组成型 P_{irc} 启动子共表达异柠檬酸裂解酶基因(*aceA*)与苹果酸合酶基因(*aceB*)^[18], 并借助 RBS 工程策略调控二者表达比例: 为 *aceA* 选用中等强度 RBS31, 为 *aceB* 分别配制弱、中、强 3 种 RBS 序列, 构建菌株 *E. coli* SG06-L、*E. coli* SG06-M 与 *E. coli* SG06-H (图 1C)。摇瓶发酵显示, 3 株菌生长无明显差异, 四碳二羧酸产量却差异显著。其中, *E. coli* SG06-H (即 SG07) 表现最优, 琥珀酸、富马酸和苹果酸产量分别达到了 8.5、3.1、1.9 g/L, 显著高于其他菌株 (图 1D)。上述结果表明, *aceA* 与 *aceB* 的协调表达是调控乙醛酸支路通量的关键, 适当的酶活比例有助于避免中间代谢物积累, 从而显著提升四碳二羧酸的合成能力。

2.2 ARTP 诱变增强四碳二羧酸生产

为增强工程菌株四碳二羧酸合成能力, 采用常压室温等离子体 (ARTP) 诱变作为非理性改造手段, 结合高通量筛选方法, 实现高产突变株的快速选育^[19-20]。鉴于富马酸溶解度限制及实际发酵中苹果酸积累量有限, 因此选择琥珀酸作为四碳二羧酸的代表性产物, 建立基于 pH 变化的快速筛选方法。首先, 使用发酵培养基配制 (0–10 g/L) 琥珀酸溶液, 其 pH 介于 4.39–7.06 之间。溴甲酚绿指示剂 (pH 3.8–5.4) 在此范围内呈现绿-蓝的颜色变化, 反应灵敏、易于识别, 因此选用为显色剂。其次, 在 96 孔板中加入 20 μ L 溴甲酚绿, 添加样品补足至 200 μ L, 并用 pH 3.0–7.0 的标准缓冲溶液为参照进行全波长扫描, 结果显示 615 nm 处存在明显吸收峰。最后, 结合 HPLC 定量分析, 发现琥珀酸浓度与 615 nm 处吸光度呈负相关 (图 2A), 拟合方程为 $y = -0.1576x + 2.6933$ ($R^2 = 0.975$), 表明该方法可用于四碳二羧酸产量的快速半定量评估。基于上述显色反应与吸光度定量关系, 建立了高产菌株的高通量筛选流程。首先, 对出发菌株 *E. coli* SG07 进行了不同时长 (15–90 s) 的 ARTP 诱变处理, 孵育后稀释涂布于含溴甲酚绿与琥珀酸的初筛平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养 2–3 d。挑选显色圈大、颜色变化明显的单菌落接种至 48 孔板中进行初筛。发酵过程分 2 阶段: 前 12 h 于 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 条件下好氧生长; 之后降低转速至 100 r/min 为微好氧发酵。过程中每 24 h 补加 800 g/L 葡萄糖溶液至终浓度 40 g/L, 以维持碳源供给。发酵 72 h 后取样测定 615 nm 吸光度。初筛共筛选 960 株突变株, 其吸光度分布于 0.85–4.50 之间 (图 2B), 从中选取吸光度较低的 165 株候选菌转接至 24 孔板中进行复筛, 发酵结束后复测吸光度。最终选取 8 株性能最优的突变株进行摇瓶验证, 并采用 HPLC 精确分析代谢产物 (图 2C)。结果表明, 突变株 AR-6 的四碳二羧酸合成能力最为突出 (图 2D), 琥珀酸、富马酸和苹果酸的产量分别达到了 11.0、5.1、

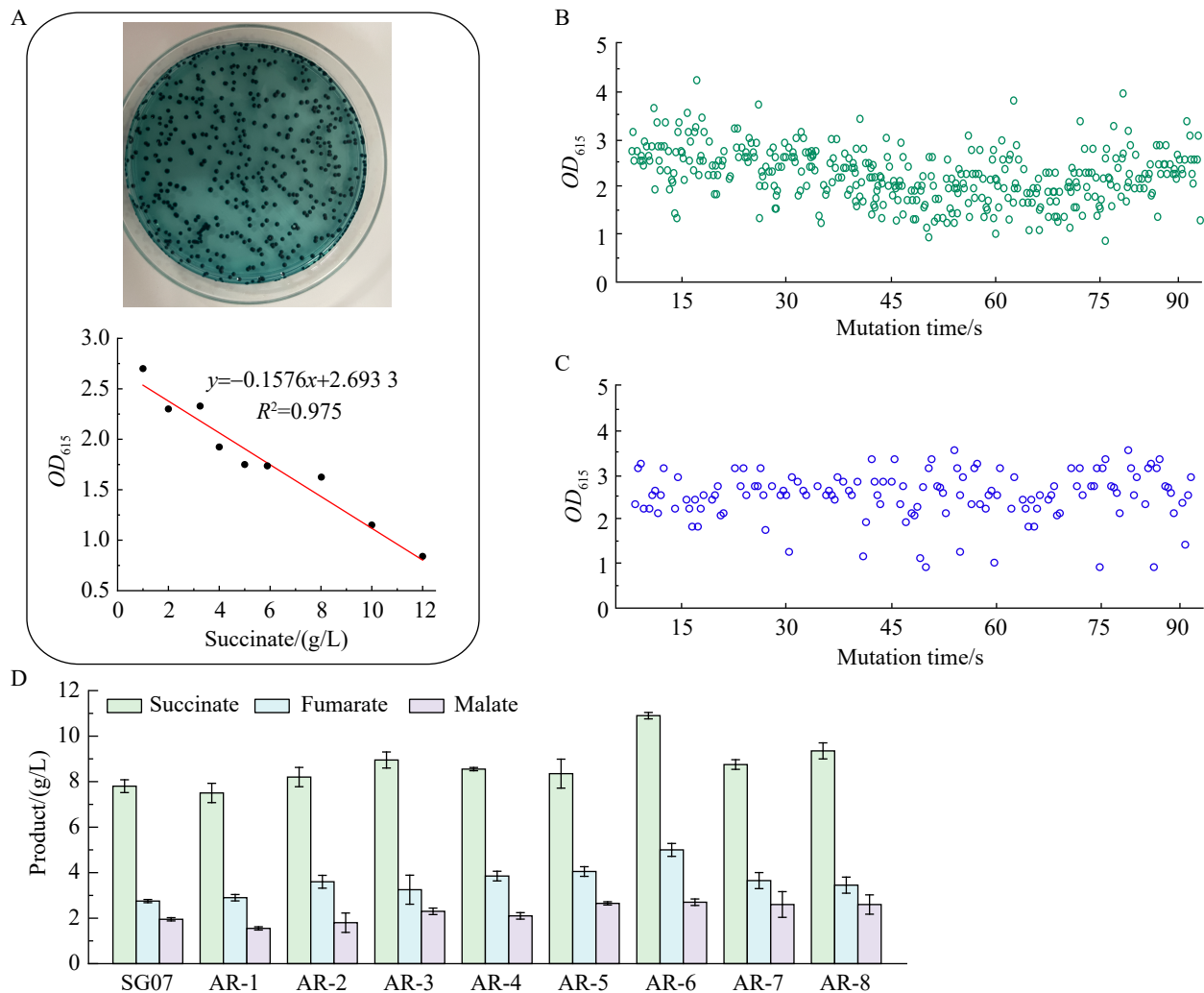


图2 ARTP诱变增强四碳二羧酸生产

Figure 2 ARTP mutagenesis for enhancing the production of four-carbon dicarboxylic acid. A: Standard curve of succinate concentration versus bromocresol green absorbance; B: Effect of ARTP mutagenesis on four-carbon dicarboxylic acid production through primary screen; C: Effect of ARTP mutagenesis on four-carbon dicarboxylic acid production through secondary screen; D: Production of four-carbon dicarboxylic acid by mutant strains validated by shake-flask cultivation.

2.8 g/L, 较出发菌株 *E. coli* SG07 分别提升了 37.5%、85.0% 和 47.0%。因此选用 AR-6 菌株 (命名为 *E. coli* SG-08) 以用于后续研究。

2.3 优化四碳二羧酸合成前体供给

通过 ARTP 诱变获得的突变株 *E. coli* SG08 在提升四碳二羧酸产量的同时, 也伴随大量副产物生成。5 L 发酵罐中, 该菌株在积累 25.5 g/L

琥珀酸、18.3 g/L 富马酸和 3.8 g/L 苹果酸的同时, 产生了 14.8 g/L 乳酸、16.4 g/L 乙酸和 8.2 g/L 甲酸(图 3B)。为引导碳流向目标产物富集, 系统敲除了关键副产物合成途径。具体而言, 为降低甲酸积累, 敲除了丙酮酸甲酸裂解酶基因 (*pf1B*); 为降低乙酸合成, 分别敲除了丙酮酸氧化酶基因(*poxB*)、磷酸转乙酰酶基因(*pta*)和乙酸

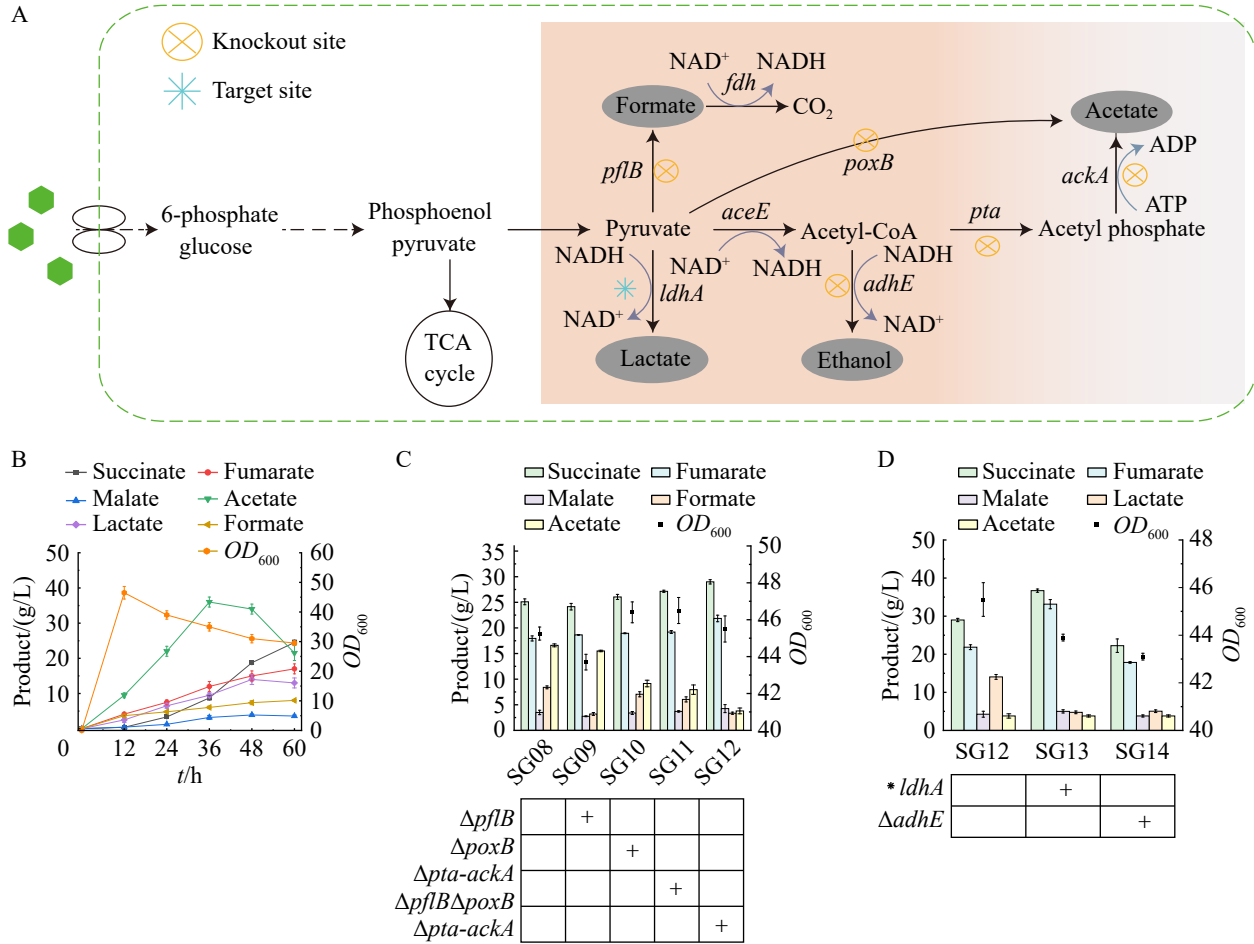


图3 优化四碳二羧酸合成前体供应

Figure 3 Optimizing precursor supply for four-carbon dicarboxylic acid synthesis. A: Rewiring the metabolic pathways of by-products for four-carbon dicarboxylic acid production; B: Metabolite profile analysis in a 5 L bioreactor; C: Effect of gene deletion on the production of four-carbon dicarboxylic acid; D: Effect of redox potential regulation on the production of four-carbon dicarboxylic acid. *ldhA*: Lactate dehydrogenase gene; *pflB*: Pyruvate formate-lyase gene; *poxB*: Pyruvate oxidase gene; *pta*: Phosphotransacetylase gene; *ackA*: Acetate kinase gene; *adhE*: Alcohol dehydrogenase gene.

激酶基因(*ackA*) (图 3A)。构建了系列突变株：*E. coli* SG09 ($\Delta pflB$)、*E. coli* SG10 ($\Delta poxB$)、*E. coli* SG11 ($\Delta pta-ackA$)及 *E. coli* SG12 ($\Delta poxB\Delta pta-ackA\Delta pflB$)。5 L 发酵罐数据显示，副产物合成得到有效抑制：*E. coli* SG09 的甲酸产量低于 3.0 g/L；*E. coli* SG10、*E. coli* SG11 和 *E. coli* SG12 的乙酸产量分别为 8.7、7.3、3.4 g/L，较 *E. coli* SG08 分别下降 46.9%、55.4% 和 79.2%。尽管多重敲除

菌株 *E. coli* SG12 四碳二羧酸总产量最高 (图 3C)，琥珀酸、富马酸及苹果酸产量分别达到了 28.7、21.4、4.8 g/L，但提升幅度仍不理想，推测可能受限于 NADH 供应不足与胞内氧化还原(NADH/NAD⁺)失衡。为进一步优化氧化还原平衡并控制乳酸合成，在 *E. coli* SG12 中对 *ldhA* 进行截短型改造^[21]，获得菌株 *E. coli* SG13。摇瓶发酵显示(图 3D)，*E. coli* SG13 在维持生长

速率的同时, 乳酸产量降至 5.0 g/L, 琥珀酸、富马酸和苹果酸产量显著提升, 分别达到了 36.7、33.2、5.2 g/L。后续尝试敲除乙醇脱氢酶 (*adhE*) 来构建 *E. coli* SG14, 反而导致四碳二羧酸积累量下降。上述结果表明, 通过敲除副产物积累相关代谢途径, 有利于增加四碳二羧酸合成前体供给, 进而提高四碳二羧酸产量。最终, 选定 *E. coli* SG13 作为四碳二羧酸生产的通用底盘菌株。

2.4 发酵生产富马酸

为精准重构终端代谢路径, 以实现富马酸的高效合成。本研究在通用底盘菌株 *E. coli* SG13 基础上采用代谢流定向重构策略, 阻断富马酸的竞争和降解途径。首先, 对菌株 *E. coli* SG13 进行了连续传代的遗传稳定性验证, 确认其遗传性状与发酵性能稳定。随后, 依次敲除富马酸酶基因 (*fumA*) 与富马酸还原酶核心亚基 (*frdBC*), 分别构建了工程菌株 *E. coli* Fum01 (SG13 Δ *fumA*) 与双敲除菌株 *E. coli* Fum02 (SG13 Δ *fumA* Δ *frdBC*) (图 4A)。为系统评估工程菌株的工业化潜力, 在 5 L 发酵罐上比较了 2 个工程菌株的富马酸生产性能。采用分批补料发酵策略, 好氧生长阶段结束后转入微好氧发酵 (200 r/min、1 vvm), 通过流加葡萄糖控制残糖浓度低于 5.0 g/L, 并用 CaCO₃ 维持 pH 稳定。发酵 60 h 后, HPLC 分析表明, 工程菌株 *E. coli* Fum02 的富马酸产量、得率及生产强度分别达到了 45.2 g/L、0.45 g/g 和 0.23 g/(L·h) (图 4C)。与 *E. coli* Fum01 相比 (图 4B), 其富马酸产量提高了 12%, 琥珀酸产量显著降低至 8.4 g/L, 乙酸、乳酸等积累量均低于 5.0 g/L (图 4D)。上述结果充分验证了双重阻断策略的有效性, 成功将代谢流锁定在富马酸节点, 实现其高效积累。

2.5 发酵生产琥珀酸

琥珀酸作为另一类高附加值四碳二羧酸, 其生产路径区别于富马酸, 琥珀酸合成需保留 *frdAB* 的活性, 同时阻断琥珀酸脱氢酶催化的氧

化反应, 以避免碳流损失^[22]。基于此, 在 *E. coli* SG13 中敲除 *sdhAB* 操纵子, 构建了工程菌株 *E. coli* SA01 (SG13 Δ *sdhAB*) (图 5A)。为适配琥珀酸合成对还原力的高需求, 在 5 L 发酵罐中对 *E. coli* SA01 的发酵工艺进行了系统优化。首先, 评估微好氧条件下不同溶氧水平的影响, 设定了 4 种不同的搅拌速率与通气量组合: 100 r/min 和 0.5 vvm, 200 r/min 和 0.5 vvm, 300 r/min 和 0.5 vvm, 200 r/min 和 1 vvm。结果表明, 在 200 r/min 和 0.5 vvm 条件下效果最优, 琥珀酸产量及得率分别达到了 42.5 g/L 和 0.72 g/g (图 5B)。随后, 分析微好氧条件下培养基中残糖浓度对生产的影响, 分别测试了 1、3、5 g/L 的残糖浓度。当残糖浓度维持在 3 g/L 时琥珀酸产量及得率分别达到了 43.8 g/L 和 0.74 g/g, 优于 1 g/L 与 5 g/L 条件 (图 5C)。因此, 确定最优微好氧工艺参数为: 搅拌速率 200 r/min、通气量 0.5 vvm、残糖浓度 3 g/L。最后, 在此优化条件下, *E. coli* SA01 菌株在 5 L 发酵罐中表现出优异的琥珀酸生产性能, 琥珀酸产量、得率及生产强度分别达到了 52.3 g/L、0.78 g/g 和 0.87 g/(L·h) (图 5D), 验证了代谢重构与工艺调控协同策略在琥珀酸生产中的有效性。

3 讨论与结论

本研究整合了理性设计、非理性改造和系统代谢工程策略, 成功构建了高效合成四碳二羧酸的 *E. coli* 细胞工厂。通过构建非循环乙醛酸支路并优化路径酶的表达, 显著提高了四碳二羧酸的代谢通量; 结合 ARTP 诱变与高通量筛选, 进一步增强了菌株生产潜力; 通过敲除关键副产物通路以汇聚碳流, 获得了四碳二羧酸生产的通用底盘菌株。在 5 L 发酵罐中, 富马酸工程菌株 *E. coli* Fum02 的富马酸产量、得率及生产强度分别达到了 45.2 g/L、0.45 g/g 和 0.23 g/(L·h); 琥珀酸工程菌株 *E. coli* SA01 的琥珀酸产量、得率及生产强度达到了 52.3 g/L、0.78 g/g 和 0.87 g/(L·h)。上述结果证实了理性与

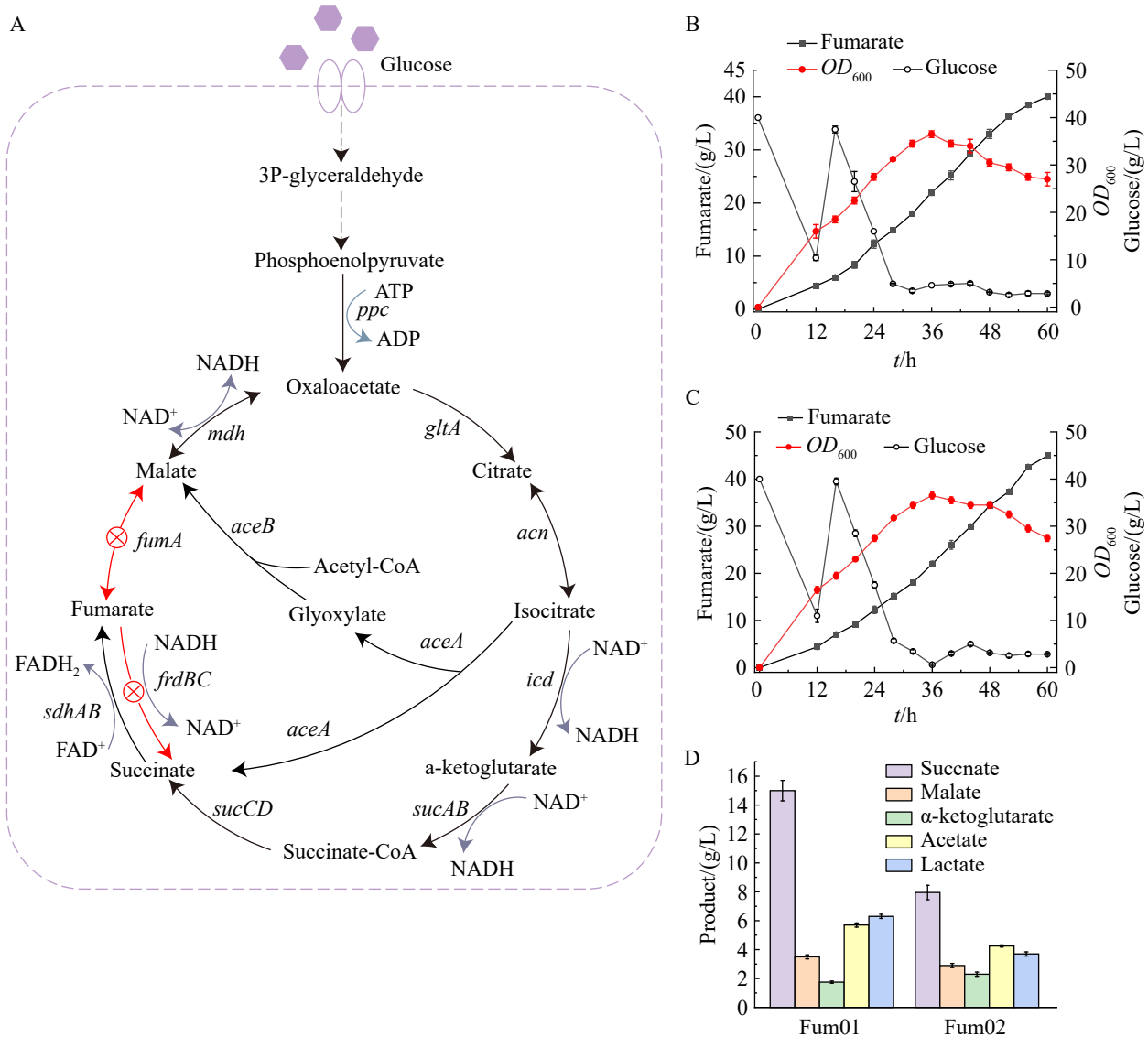


图4 发酵生产富马酸

Figure 4 Production of fumarate by fermentation. A: Rewiring the metabolic pathways of fumarate degradation; B: Production of fumarate with *E. coli* Fum01 in a 5 L fed-batch bioreactor; C: Production of fumarate with *E. coli* Fum02 in a 5 L fed-batch bioreactor; D: The accumulation of byproducts during the fermentation. *fumA*: Fumarase gene; *frdBC*: Fumarate reductase gene.

非理性改造的协同效应，所构建的通用底盘与筛选平台也为代谢工程改造 *E. coli* 生产其他有机酸提供了借鉴。

本研究通过构建非循环乙醛酸支路重塑 *E. coli* 中心代谢，并结合非理性诱变策略优化代谢网络，成功构建了一株高效合成四碳二羧酸的

平台型底盘菌株。首先，设计并构建了非典型代谢路径——非循环乙醛酸支路。通过精细调控 *aceAB* 的表达比例，成功绕过了 TCA 循环的脱羧步骤，实现了碳流向目标产物的高效定向转化，提高了碳源利用率和四碳二羧酸产量。其次，将理性代谢工程与非理性 ARTP 诱变策

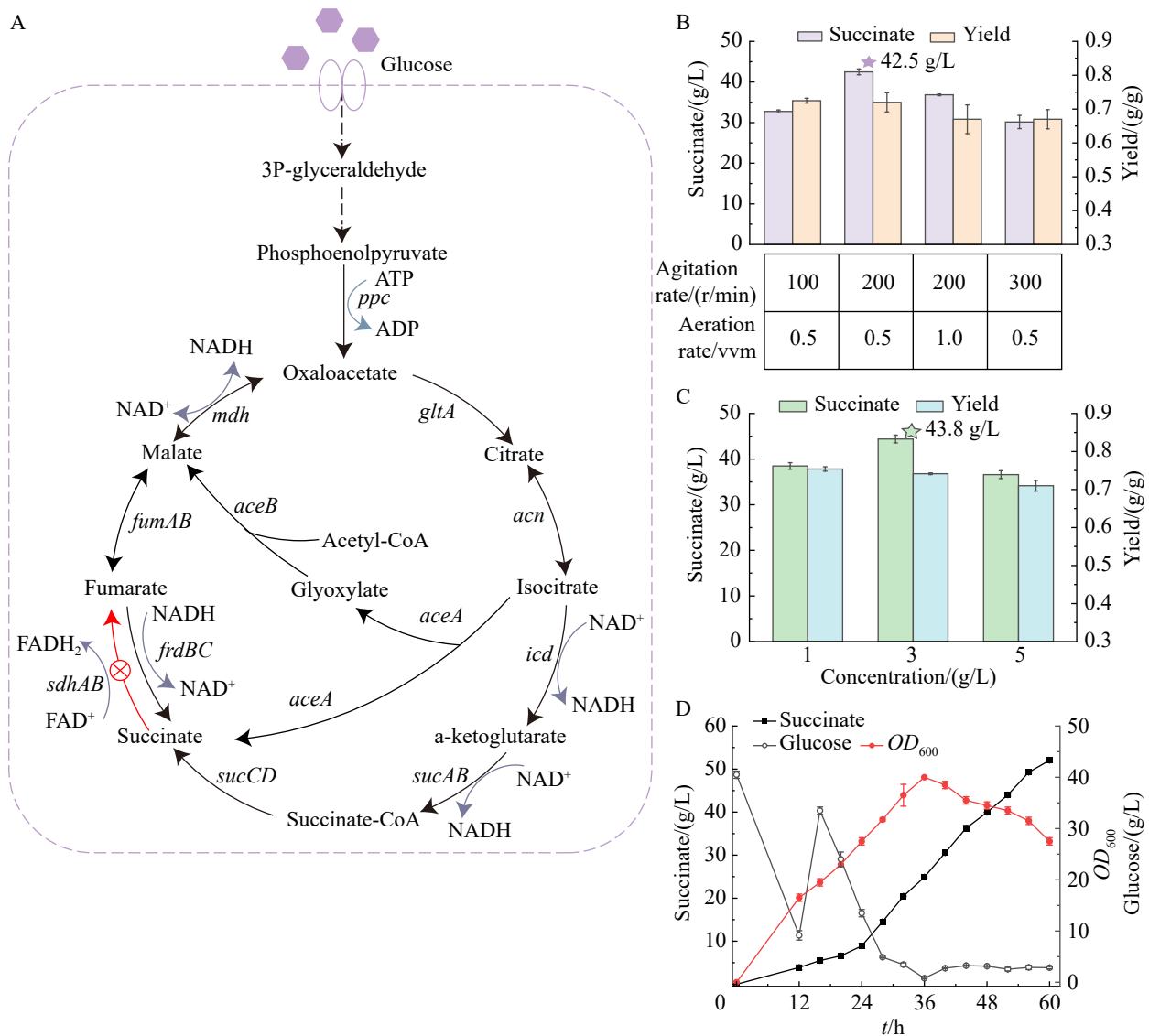


图5 发酵生产琥珀酸

Figure 5 Production of succinate by fermentation. A: Rewiring the metabolic pathways of succinate degradation; B: Effect of oxygen supply on succinate production; C: Effect of residual glucose concentration on succinate production under micro-aerobic conditions; D: Production of succinate with *E. coli* SA01 in a 5 L fed-batch bioreactor. *sdhAB*: Succinate dehydrogenase gene.

略相结合，突破了单一理性设计对复杂代谢网络调控的局限，获得了代谢网络全局优化的高性能菌株。最后，系统敲除了副产物途径并优化胞内氧化还原电位，成功构建了模块化、通用化的平台底盘菌株，并通过终端路径的精准改造，实现了富马酸和琥珀酸的高效合成，为

四碳二羧酸的绿色生物制造提供了可复制、可推广的技术平台。尽管目前已有一系列高性能的四碳二羧酸工程菌株被开发，但微生物发酵法整体的经济竞争力较传统石化路线仍处于劣势。当前面临的挑战是多维的：首先，菌株的综合性能仍有提升空间，不仅体现在产量、得

率与生产强度上,更包括菌株对工业环境(如低pH、高渗透压、产物耐受)的鲁棒性。其次,原料与工艺成本是制约工业化的关键瓶颈。发酵周期长导致设备利用率低,而使用粮食基碳源(如葡萄糖)则面临“与人争粮”的伦理与价格波动风险。最后,下游分离纯化过程复杂且能耗高昂,发酵体系复杂,分离成本高^[23]。

为实现四碳二羧酸生物制造的经济可行性与工业化应用,后续研究应关注以下几个方面。(1) 动态调控。传统基于“过表达”或“敲除”的静态代谢工程策略难以实现细胞生长与产物合成的解耦联,从而不能实现对碳流、还原力等资源的最优分配。未来应致力于构建具有时序解耦联与环境感知-反馈调控能力的动态系统,通过对代谢网络进行时空调控,自主协调不同生理阶段对关键物质与能量等代谢资源的竞争,从而系统优化产物合成效率,实现产量、得率与生产强度的同步提升^[24-26]。(2) 强化菌株工业鲁棒性与底盘适应性。利用适应性实验室进化与全局调控因子工程,赋予工程菌应对实际工业发酵中pH、温度、渗透压波动的强大耐受性^[27-28]。特别是开发耐低pH菌株,可从源头减少中和剂的使用,大幅降低下游分离的难度与成本^[29]。(3) 拓宽原料谱与碳流转化效率。系统开发工程菌株利用非粮原料(如木质纤维素水解液、可降解塑料、甲醇甚至CO₂)的能力^[30-32]。通过整合合成生物学工具,设计新的代谢途径,将一碳或混合碳源高效同化为四碳二羧酸的前体,是实现绿色、可持续制造的根本出路。(4) 推进“发酵-分离耦合”过程集成。打破传统“先发酵,后分离”的线性模式,探索将电渗析、吸附或萃取装置与发酵过程在线耦合,实时从发酵液中移出产物,从而解除产物抑制、提高转化效率,并大幅降低终端分离的能耗与成本^[33]。最终推动微生物细胞工厂从实验室迈向工业化应用,为绿色生物制造的实现贡献关键力量。

作者贡献声明

唐永圣: 研究构思和设计、实验操作、论文撰写;
丁德阳: ARTP 诱变与筛选; 张哲: 支路代谢途径敲除;
陈修来: 研究设计、实验指导、论文指导与修改。

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] Liu H, Jin YH, Zhang RW, Ning YC, Yu Y, Xu P, Deng L, Wang F. Recent advances and perspectives on production of value-added organic acids through metabolic engineering[J]. *Biotechnology Advances*, 2023, 62: 108076.
- [2] Li K, Zhang X, Li C, Liang YC, Zhao XQ, Liu CG, Sinskey AJ, Bai FW. Systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* to assimilate formic acid for biomass accumulation and succinic acid production[J]. *Bioresource Technology*, 2024, 402: 130774.
- [3] 王颖珊, 郭峰, 严伟, 信丰学, 章文明, 姜岷. 四碳有机酸生物合成的代谢工程研究进展[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(5): 1697-1720.
Wang YS, Guo F, Yan W, Xin FX, Zhang WM, Jiang M. Advances in the metabolic engineering for the production of tetracarbon organic acids[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(5): 1697-1720 (in Chinese).
- [4] Wang W, Li ZM, Xie JL, Ye Q. Production of succinate by a pflB ldhA double mutant of *Escherichia coli* overexpressing malate dehydrogenase[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2009, 32(6): 737-745.
- [5] Pan JY, Tang YS, Liu J, Gao C, Song W, Wu J, Liu LM, Chen XL. Reprogramming protein stability in *Escherichia coli* to improve four-carbon dicarboxylic acids production[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2024, 493: 152893.
- [6] Li N, Zhang B, Wang ZW, Tang YJ, Chen T, Zhao XM. Engineering *Escherichia coli* for fumaric acid production from glycerol[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 174: 81-87.
- [7] Wen S, Liu L, Nie KL, Deng L, Tan TW, Wang F. Enhanced fumaric acid production by fermentation of xylose using a modified strain of *Rhizopus arrhizus*[J]. *BioResources*, 2013, 8(2): 2186-2194.
- [8] Tan ZG, Chen J, Zhang XL. Systematic engineering of pentose phosphate pathway improves *Escherichia coli* succinate production[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9: 262.
- [9] Chen XL, Ma DL, Liu J, Luo QL, Liu LM. Engineering the transmission efficiency of the noncyclic glyoxylate pathway for fumarate production in *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2020, 13(1): 132.

- [10] Gibson DG, Young L, Chuang RY, Venter JC, Hutchison CA, Smith HO. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases[J]. *Nature Methods*, 2009, 6(5): 343-345.
- [11] Jiang Y, Chen B, Duan CL, Sun BB, Yang JJ, Yang S. Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(7): 2506-2514.
- [12] Gu ZY, Chai TT, Chen XL. Evolutionary engineering of *Pichia pastoris* for α -farnesene biosynthesis from methanol[J]. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, 2025, 5(3): 1039-1049.
- [13] 孙文清, 赵运英, 周胜虎, 邓禹. 定向进化产琥珀酸放线杆菌高产丁二酸[J]. *生物工程学报*, 2025, 41(5): 1994-2009.
- Sun WQ, Zhao YY, Zhou SH, Deng Y. Directed evolution of *Actinobacillus succinogenes* for high succinic acid production[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2025, 41(5): 1994-2009 (in Chinese).
- [14] Ghiffary MR, Prabowo CPS, Adidjaja JJ, Lee SY, Kim HU. Systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the efficient production of β -alanine[J]. *Metabolic Engineering*, 2022, 74: 121-129.
- [15] Liu H, Song RR, Liang Y, Zhang T, Deng L, Wang F, Tan TW. Genetic manipulation of *Escherichia coli* central carbon metabolism for efficient production of fumaric acid[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 270: 96-102.
- [16] Noh MH, Lim HG, Park S, Seo SW, Jung GY. Precise flux redistribution to glyoxylate cycle for 5-aminolevulinic acid production in *Escherichia coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 43: 1-8.
- [17] Yang JG, Wang ZW, Zhu NQ, Wang BY, Chen T, Zhao XM. Metabolic engineering of *Escherichia coli* and in silico comparing of carboxylation pathways for high succinate productivity under aerobic conditions[J]. *Microbiological Research*, 2014, 169(5/6): 432-440.
- [18] Jo M, Noh MH, Lim HG, Kang CW, Im DK, Oh MK, Jung GY. Precise tuning of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli* for efficient tyrosine production from acetate[J]. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1): 57.
- [19] Zhao K, Liu HY, Song W, Wu J, Gao C, Guo L, Chen XL. Combinatorial mutagenesis of *Bacillus amyloliquefaciens* for efficient production of protease[J]. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, 2023, 3(3): 457-468.
- [20] 朱攀, 孙馨怿, 李雨菲, 陈佳颖, 方雨婷. 代谢工程改造大肠杆菌生产 α -酮戊二酸[J]. *微生物学报*, 2026, 66(1): 364-376.
- Zhu P, Sun XY, Li YF, Chen JY, Fang YT. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for α -ketoglutarate production[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2026, 66(1): 364-376 (in Chinese).
- [21] Yang H, Zhang B, Wu ZD, Xiu XL, Liu ZQ, Zheng YG. Metabolic reprogramming in *Escherichia coli* for efficient-cysteine production by metabolic node engineering[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2025, 13(12): 4778-4789.
- [22] Yang HN, Zhou SH. Rewiring the reductive TCA pathway and glyoxylate shunt of *Escherichia coli* for succinate production from corn stover hydrolysate using a two-phase fermentation strategy[J]. *Bioresource Technology*, 2024, 412: 131364.
- [23] Morales M, Ataman M, Badr S, Linster S, Kourlimpinis I, Papadokonstantakis S, Hatzimanikatis V, Hungerbühler K. Sustainability assessment of succinic acid production technologies from biomass using metabolic engineering[J]. *Energy & Environmental Science*, 2016, 9(9): 2794-2805.
- [24] Liu MM, Lv Y, Niu X, Liao Y, Xu S, Wang X, Feng J, Chen KQ. Effective coproduction of bio-based polyamide 54 monomers cadaverine and succinic acid by dynamic regulatory and ORP strategy[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2025, 524: 169159.
- [25] Ding DQ, Zhu YR, Bai DY, Wan TX, Lee SY, Zhang DW. Monitoring and dynamically controlling glucose uptake rate and central metabolism[J]. *Nature Chemical Engineering*, 2025, 2(1): 50-62.
- [26] Hou JS, Gao C, Guo L, Nielsen J, Ding Q, Tang WX, Hu GP, Chen XL, Liu LM. Rewiring carbon flux in *Escherichia coli* using a bifunctional molecular switch[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 61: 47-57.
- [27] Zhang WM, Zhu JR, Zhu XG, Song M, Zhang T, Xin FX, Dong WL, Ma JF, Jiang M. Expression of global regulator IrrE for improved succinate production under high salt stress by *Escherichia coli*[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 254: 151-156.
- [28] 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 ZY, Tang YS, Chen XL. Advances in metabolic engineering of yeast for succinic acid production[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(2): 467-488 (in Chinese).
- [29] Gu ZY, Ding DY, Shan ZP, Tang YS, Chen XL. Metabolic engineering of the non-conventional yeast *Kluyveromyces marxianus* for enhancing the biosynthesis of succinic acid[J]. *Biofuel Research Journal*, 2025, 12(3): 2503-2516.
- [30] Zhang WM, Zhang T, Song M, Dai ZX, Zhang SJ, Xin FX, Dong WL, Ma JF, Jiang M. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for high yield production of succinic acid driven by methanol[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(12): 2803-2811.
- [31] Ahn JH, Bang J, Kim WJ, Lee SY. Formic acid as a secondary substrate for succinic acid production by metabolically engineered *Mannheimia succiniciproducens*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2017, 114(12): 2837-2847.
- [32] Lai MJ, Tsai JC, Lan EI. CRISPRi-enhanced direct photosynthetic conversion of carbon dioxide to succinic acid by metabolically engineered cyanobacteria[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 366: 128131.
- [33] Korke V, Petropoulos A, Ioannidou SM, Lin CSK, Koutinas A, Fickers P. Harnessing yeasts for sustainable succinic acid production: advances in metabolic engineering and biorefinery integration[J]. *FEMS Yeast Research*, 2025, 25: foaf052.