齐鲁工业大学学报 第40卷 第4期 2026年8月出版
JOURNAL OF QILU UNIVERSITY OF TECHNOLOGY Vol.40 No.4 Aug.2026
DOI:10.16442/j.cnki.qlgydxxb.2026.04.002 【食品与生物工程】

马克斯克鲁维酵母 KM-502 底盘细胞开发

陈文超,李忠海*
齐鲁工业大学(山东省科学院) 生物工程学部,山东 济南 250353

摘要:马克斯克鲁维酵母是一种耐高温的非常规酵母。丙酮酸脱羧酶催化丙酮酸生成乙醛,是马克斯克鲁维酵母进行乙醇发酵的关键因素。本研究自藏灵菇筛选出一株马克斯克鲁维酵母 KM-502。基因组测序预测有 6 801 个基因。生长性状分析显示该菌株在 37 ℃时生长最快,最适生长 pH 为 3~5,NaCl 耐受阈值在 8%,并且可以利用葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖、半乳糖、木糖、木糖醇等碳源。随后基于 CRISPR-Cas9 和 Cre-loxP 技术建立了马克斯克鲁维酵母菌株的遗传操作体系,并进一步构建了马克斯克鲁维酵母 *Pdc1* 基因缺失菌株 KMΔ*Pdc1* 和尿嘧啶缺陷型菌株 KMΔ*Ura3*。KMΔ*Pdc1* 菌株乙醇产生能力消失,并且生长出现了明显的滞后。将 KMΔ*Pdc1* 连续传代培养,获得驯化菌株 KMΔ*Pdc1*D。KMΔ*Pdc1*D 的生长滞后现象得到缓解,恢复至接近野生型菌株水平。相比 KMΔ*Pdc1*,KMΔ*Pdc1*D 的乙酸和甘油的产量增加。本研究为马克斯克鲁维酵母的开发利用提供了参考。

关键词:马克斯克鲁维酵母;表达系统;代谢工程;丙酮酸脱羧酶;尿嘧啶缺陷型
中图分类号:Q819 **文献标志码**:A **文章编号**:2097-2792(2026)04-10-10

Development of *Kluyveromyces marxianus* chassis cells

CHEN Wenchao, LI Zhonghai*
School of Bioengineering, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250353, China

Abstract: *Kluyveromyces marxianus* is a thermotolerant, non-conventional yeast. Pyruvate decarboxylase (Pdc1) catalyzes the conversion of pyruvate to acetaldehyde and is a key factor for ethanol fermentation in *K. marxianus*. In this study, a *K. marxianus* strain, KM-502, was isolated from kefir grains. Genomic sequencing predicted 6 801 genes. Growth trait analysis revealed that this strain grew fastest at 37 ℃, had an optimal growth pH from 3 to 5, a NaCl tolerance threshold of 8%, and could utilize carbon sources including glucose, fructose, sucrose, lactose, galactose, xylose, and xylitol. Subsequently, a genetic manipulation system for *K. marxianus* strains was established based on CRISPR-Cas9 and Cre-loxP technologies. This system was used to construct the *Pdc1* gene deletion strain KMΔ*Pdc1* and a uracil auxotrophic strain KMΔ*Ura3*. The KMΔ*Pdc1* strain lost its ethanol production capability and exhibited significant growth lag. After continuous subculturing of KMΔ*Pdc1*, an adapted strain, KMΔ*Pdc1*D, was obtained. The growth lag in KMΔ*Pdc1*D was alleviated, recovering to a level close to that of the wild-type strain. Compared to KMΔ*Pdc1*, KMΔ*Pdc1*D showed increased production of acetate and glycerol. This study serves as a reference for the utilization and development of *Kluyveromyces marxianus*.

Key words: *Kluyveromyces marxianus*; expression system; metabolic engineering; pyruvate decarboxylase; uracil auxotrophic

收稿日期:2025-03-31 **网络出版时间**:2026-08-31
基金项目:山东省自然科学基金(ZR2023MC052);齐鲁工业大学(山东省科学院)重点创新项目(2024ZDZX03)
作者简介:陈文超,硕士生;研究方向:酵母表达系统的构建及其应用
* **通信作者**:李忠海,博士、副教授;研究方向:丝状真菌纤维素酶表达调控机制研究及产酶高活性菌株构建,酵母菌外源蛋白高产菌株构建及应用,食、药用菌菌种的筛选、推广应用、种植示范及活性产物;lzhlzh@vip.126.com

马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)是一种极具工业潜力的食品安全级酵母。马克斯克鲁维酵母具有较快的生长速率(倍增时间可短至 1 h)[1],广谱碳源利用能力[2-7](可代谢葡萄糖、木糖、乳糖及菊糖等),卓越的环境耐受性(耐高温达 52 ℃[8],以及较宽的 pH 适应范围为 2.5~9.0)。马克斯克鲁维酵母还能高效合成乙醇、乳酸及芳香族化合物[9-12],转化乳清等廉价原料生产高附加值产物[13-15]。因此,马克斯克鲁维酵母成为了生物制造领域的新兴底盘细胞。目前,CRISPR-Cas9 等基因编辑技术的引入加速了其成为生物制造平台的重要表达体系[17-21]。

丙酮酸脱羧酶(Pyruvate decarboxylase,Pdc1)是酵母糖酵解-发酵途径的核心酶,负责催化丙酮酸不可逆脱羧生成乙醛和 CO_2,进而通过乙醇合成途径形成乙酰辅酶 A[22]。该反应不仅为细胞提供能量前体,还调控碳代谢流向,对酵母的生长增殖与代谢稳态具有决定性作用[23]。丙酮酸脱羧酶基因(*Pdc1*)敲除株在代谢工程和工业生物技术中具有重要应用价值。丙酮酸脱羧酶敲除株通过阻断丙酮酸向乙醛和乙醇的代谢路径,重新分配了碳代谢流[24],提高了乳酸、琥珀酸、2,3-丁二醇、2-苯乙醇等产物的合成产率[25-28]。

本研究分析了马克斯克鲁维酵母 KM-502 的生物学特性,建立了高效遗传操作体系,并证实靶向 *Pdc1* 的代谢改造可重塑碳代谢流分配,为理性构建马克斯克鲁维酵母高效的细胞工厂提供了技术支撑和理论依据。

1　材料与方法

1.1　菌种、材料、试剂、培养基

马克斯克鲁维酵母 KM-502 在含有 15 g/L 琼脂粉的 YPD 培养基(10 g/L 酵母提取物,20 g/L 蛋白胨,20 g/L葡萄糖)上保存。马克斯克鲁维酵母的液体培养在 30 ℃、200 r/min 的条件下振荡培养。*E.coli* 在 LB 琼脂培养基(5 g/L 酵母提取物,10 g/L 胰蛋白胨,10 g/L NaCl,15 g/L 琼脂)上培养。MD 培养基(6.7 g/L YNB,20 g/L 葡萄糖)用于筛选营养缺陷型菌株。*E.coli* 液体培养条件为 37 ℃、200 r/min。质粒转化细菌和酵母细胞分别通过热激转化和电穿孔转化方式进行。质粒 pUCC001 用于马克斯克鲁维酵母 CRISPR-Cas9 的 gRNA 基因打靶[17]。限制性内切酶 *Bsa* Ⅰ用于重组质粒构建的金门组装。表 1 为本实验所用引物。

表 1　本实验所用引物

引物	Sequences(5'-3')
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
g*Ura3*-1-F	CGTCGACACATGTAGATATCTTGG
g*Ura3*-1-R	AAACCCAAGATATCTACATGTGTC
g*Ura3*-2-F	CGTCGACAGGAAGTTTGCCGACAT
g*Ura3*-2-R	AAACATGTCGGCAAACTTCCTGTC
Ura3cx-F	CTGCTCATAGAAGTCCAGTTGC
Ura3C-R	GTTGTCCAACACGTTCACTATG
D10A-R	TGCCGATAGCTAAGCCTATTGAGTATTTCTTATCGACC
gPDC1-1-F	CGTCACGAAGTCCCAGGTATGAGA
gPDC1-1-R	AAACTCTCATACCTGGGACTTCGT
gPDC1-3-F	CGTCAACGCTGCTTACGCTGCTGA
gy-F	CATCAGTTCATAGGTCCATTC
gPDC1-3-R	AAACTCAGCAGCGTAAGCAGCGTT
PDC1U-F	GTACGTCGCTTCAAGATCCCTCTAC
PDC1U-R	AGAGGGAGAGGATAAAGAG
PDC1DU-F	CTCTTTATCCTCTCCCTCTTGCAATTATTTGGTTTGGGTGTG
PDC1D-R	CACACTTACCCGCACTCCACC

表 1 （续）

引物	Sequences(5'-3')
PDC1C-F	GCTCATGGGAATCCTGTTCGCCTTG
PDC1C-R	AATCGGGTGAATATGCAACTAGC
Ura3-Bglll-F	GGAAGATCTATGTCGACTAAGAGTTACTC
Ura3-Xba1-R	TGCTCTAGATTAAGCGGATCTGCCTACTCTCTTC
TEFt-Xba1-F	TGCTCTAGAGACAATAAAAAGATTCTTGTTTTCAAG
TEFp-Bglll-R	GGAAGATCTTTGTTTATGTTCGGATGTGATGTG
TEF3p-F	TGGTACTGGAACTACTAGTTTCACC
TEF3p-R	GGTTCTTTTCTTATCTATCCTCGGATC
TEF3p+PDC1-F	CCGAGGATAGATAAGAAAAGAACCATGTCTGAAATTACTCTAGGTCGTT
PDC1t+LOX71-R	GTATAATGTATGCTATACGAACGGTACTTCCTGGTAACTTGTAACTTGTAAC
LOX71-F	TACCGTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATCGGATTAGAAGCCGCCGAGCGGGTG
CYC1t-R	GCAAATTAAAGCCTTCGAGCGTCC
CYC1t+TEFt-F	GGACGCTCGAAGGCTTTAATTTGCTTGAACATTCTTAGGCTGGTCGAATC
LOX66-R	TACCGTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTAC

1.2 全基因组测序

马克斯克鲁维酵母 KM-502 全基因组测序由上海生工完成。基因组测序采用 Illumina 二代双端测序技术，通过 Fastp 对原始数据进行质量控制，包括接头去除、低质量碱基修剪（Q20/Q30 过滤）、模糊碱基（N）及短读长（<35 bp）过滤，并利用 NCBI NT 数据库进行污染评估。基因组拼接使用 SPAdes 结合 GapFiller 填补间隙，经 Pilon 矫正碱基错误，并通过 K-mer 分析评估基因组大小、杂合度及重复序列比例。基因预测采用 Glimmer 和 GeneMark-ES 识别编码基因，Aragorn 和 RNAmmer 预测非编码 RNA（如 tRNA 和 rRNA），RepeatMasker 鉴定重复序列。功能注释基于 BLAST+和 HMMER3 比对 NR、KEGG、GO、CAZy 等数据库，解析基因代谢通路（如糖酵解、TCA 循环）、毒力因子（VFDB）、耐药基因（CARD）及碳水化合物活性酶（CAZy）；同时基于 ITS 序列构建系统发育树。最终通过 BUSCO 评估基因组完整性（Complete>80%），覆盖度分析验证数据可靠性，形成高质量基因组框架图。

1.3 生长曲线测试

将马克思克鲁维酵母菌株接种于 YPD 培养基，在 30 ℃、200 r/min 条件下过夜培养活化。将培养好的细胞转移到新的 YPD 培养基中，调整菌株培养液起始 OD_{600} 至 0.2，培养 12 h。然后将培养好的细胞转移到新的 YPD 培养基中，调整起始 OD_{600} 至 0.2，细胞在不控制 pH 的条件下，30 ℃、200 r/min 震荡培养，每 12 h 测一次培养液的 OD_{600} 值。

1.4 pH 耐受能力测试

将平板活化的马克思克鲁维酵母菌株接种于 YPD 液体培养基，在 30 ℃、200 r/min 条件下过夜培养活化。然后将培养好的菌株培养液转移到新的 YPD 培养基中，调整菌株培养液起始 OD_{600} 至 0.2，继续于 30 ℃、200 r/min 振荡培养 12 h。然后将培养好的细胞转移到新的不同 pH 的 YPD 培养基中，调整起始 OD_{600} 至 0.1，30 ℃、200 r/min 震荡培养，每 12 h 测一次培养液的 OD_{600} 值。YPD 液体培养基 pH 为 2、3、5、7、9、11，pH 使用 5 mol/L NaOH 溶液和 3 mol/L HCl 溶液进行调节。

1.5 NaCl 耐受能力测试

将平板活化的马克思克鲁维酵母菌株接种于 YPD 液体培养基，在 30 ℃、200 r/min 条件下过夜培养活化。然后将培养好的菌株培养液转移到新的 YPD 培养基中，调整菌株培养液起始 OD_{600} 至 0.2，继续于 30 ℃、200 r/min 振荡培养 12 h。然后将培养好的细胞转移到新的含不同质量分数 NaCl 的 YPD 培养基中，调整起始 OD_{600} 至 0.1，30 ℃、200 r/min 震荡培养，每 12 h 测一次培养液的 OD_{600} 值。NaCl 质量分数为 2%、4%、6%、8%、10%。

1.6　最适生长温度测试

将平板活化的马克思克鲁维酵母菌株接种于 YPD 液体培养基,在 30 ℃、200 r/min 条件下过夜培养活化。然后将培养好的菌株培养液转移到新的 YPD 培养基中,调整菌株培养液起始 OD_{600} 至 0.2,继续于 30 ℃、200 r/min 振荡培养 6 h。然后将培养好的细胞转移到新的的 YPD 液体培养基中,调整起始 OD_{600} 至 0.1,在不同温度下培养 6 h,测 OD_{600}。温度范围 30~50 ℃。

1.7　碳源同化能力测试

将平板活化的马克思克鲁维酵母菌株接种于 YPD 液体培养基,在 30 ℃、200 r/min 条件下过夜培养活化。然后将培养好的菌株培养液转移到新的 YPD 培养基中,调整菌株培养液起始 OD_{600} 至 0.2,继续于 30 ℃、200 r/min 振荡培养 6 h。离心收集菌体,使用无菌水洗涤 2~3 次,接种于无碳源的 YNB 液体培养基(6.7 g/L YNB)中。饥饿培养 4~6 h 后,将菌株培养液进行梯度稀释(原浓度的 10^{-1}、10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}),取 1 μL点接于含不同碳源的 YNB 固体培养基(6.7 g/L YNB,1% 琼脂糖)平板。30 ℃,静置培养 24 h。观察菌株的生长情况。

1.8　抗性筛选

将平板活化的马克思克鲁维酵母 KM-502 菌株接种于 YPD 液体培养基,在 30 ℃、200 r/min 条件下过夜培养活化。然后将培养好的菌株培养液转移到新的 YPD 液体培养基中,调整菌株培养液起始 OD_{600} 至 0.2,继续于 30 ℃、200 r/min 条件下振荡培养 12 h。然后将培养好的细胞涂布含不同浓度潮霉素 B 或 G418 的培养基中,30 ℃静置培养 72 h,观察菌株生长状况。

1.9　基于 Cre-*Loxp* 基因编辑系统的 *Pdc1* 表达盒构建

基于图 1 中所示结构,采用融合 PCR 的方法构建 *Pdc1* 基因表达盒。以 KM-502 基因组 DNA 为模板,TEF3p-F/TEF3p-R 引物对,扩增 TEF3 启动子序列(771 bp),TEF3p+PDC1-F/PDC1t+LOX71-R 为引物对,扩增 *Pdc1* 编码区和终止子区序列(1 995 bp);以质粒 YEP-CH 为模板,LOX71-F/CYC1t-R 为引物对,扩增 Cre 酶表达盒(2 202 bp);以质粒 pUCC001 为模板,CYC1t+TEFt-F/LOX66-R 为引物对扩增筛选标记 *HygR* 序列(1 875 bp)。采用融合 PCR 的方式融合上述片段,融合产物即为 *Pdc1* 基因表达盒(6 769 bp)。半乳糖诱导启动子 GALp 用于诱导 Cre 重组酶表达。将阳性菌株接种于以质量分数 2%半乳糖为唯一碳源的合成培养基中,于30 ℃、200 r/min 振荡培养 24 h,激活 GAL1p 启动子驱动 *Cre* 基因表达,去除潮霉素 B 抗性基因和 *Cre* 基因。

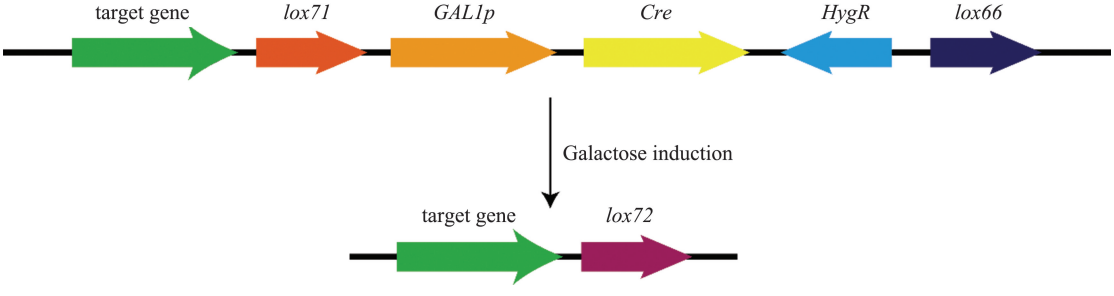


图 1　基于 Cre/*loxp* 系统的基因表达盒构建

1.10　基于 CRISPR-Cas9 基因编辑系统的基因敲除

CRISPR-Cas9 基因编辑操作参照 Rajkumar 的文章进行[17](图 2)。首先针对靶基因编码区起始密码子下游 50~200 bp 区域,设计含 *Bsa* Ⅰ限制性酶切位点兼容黏性末端的 gRNA 引物(表 1),引物经 T4 PNK 磷酸化(37 ℃×30 min)及退火(95 ℃→25 ℃梯度冷却)后,通过 Golden Gate 组装连接至线性化载体 pUCC001,构建 pgRNA 重组质粒。

未提供修复模板时,Cas9/gRNA 复合物诱导靶位点双链断裂(DSB),通过非同源末端连接(NHEJ)产生移码突变,实现基因失活。测序片段经 Sanger 测序验证基因敲除效率。编码区的敲除采用修复片段与质粒 pgRNA-*Pdc1* 的共转化。修复片段含 1.8 kb 同源臂(上下游各 900 bp),通过同源定向修复(HDR)精确删除靶基因。

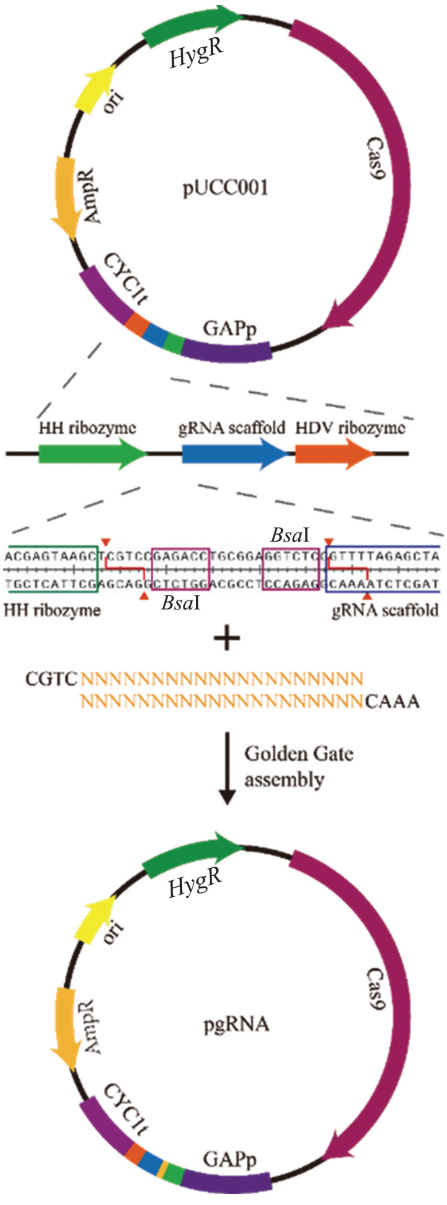


图 2　pgRNA 质粒构建示意图

1.11　发酵产物 HPLC 分析

取 1 mL 发酵液，于 12 000 r/min 离心 10 min，取上清液经 0.22 μm 滤膜过滤后利用 HPLC 进行定量分析。HPLC 分析条件为：示差检测器，Carbomix H-NP：8%色谱柱（7.8 mm×300 mm×10 μm），流动相为 5 mmol/L 硫酸水溶液，流速 0.4 mL/min，柱温为 55 ℃，进样量 20 μL。使用梯度质量浓度标准品（0.1～40.0 g/L）建立标准曲线（R^2>0.99）。所有样品均设定 3 个平行实验，测定数据以均值±标准差表示。

2　结果与讨论

2.1　KM-502 全基因组测序

本研究从藏灵菇中筛选得到了一株酵母菌。提取基因组 DNA 后，扩增 ITS 序列。ITS 序列测序结果显示为马克斯克鲁维酵母，并将其命名为 *Kluyveromyces marxianus* 502（以下简写为 KM-502）（图 3）。

对 KM-502 菌株进行全基因组测序。测序结果显示 KM-502 基因组非重复区域长度为 10 170 381 bp，GC 含量为 39.77%。KM-502 基因组预测有 6 801 个基因，包含 3 个 rRNA、107 个 tRNA。重复 DNA 序列占该菌株基因组的 2.397 4%，有 5 512 个，包括 538 个 Low_complexity（低复杂度序列）、26 个 LTR（长末端重复反转录转座子）以及 4 948 个 Simple_repeat（简单重复序列）。

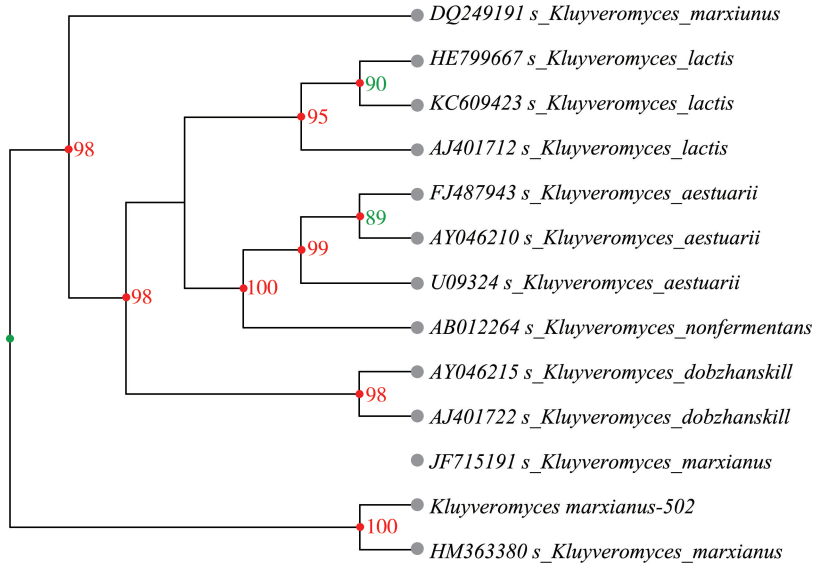
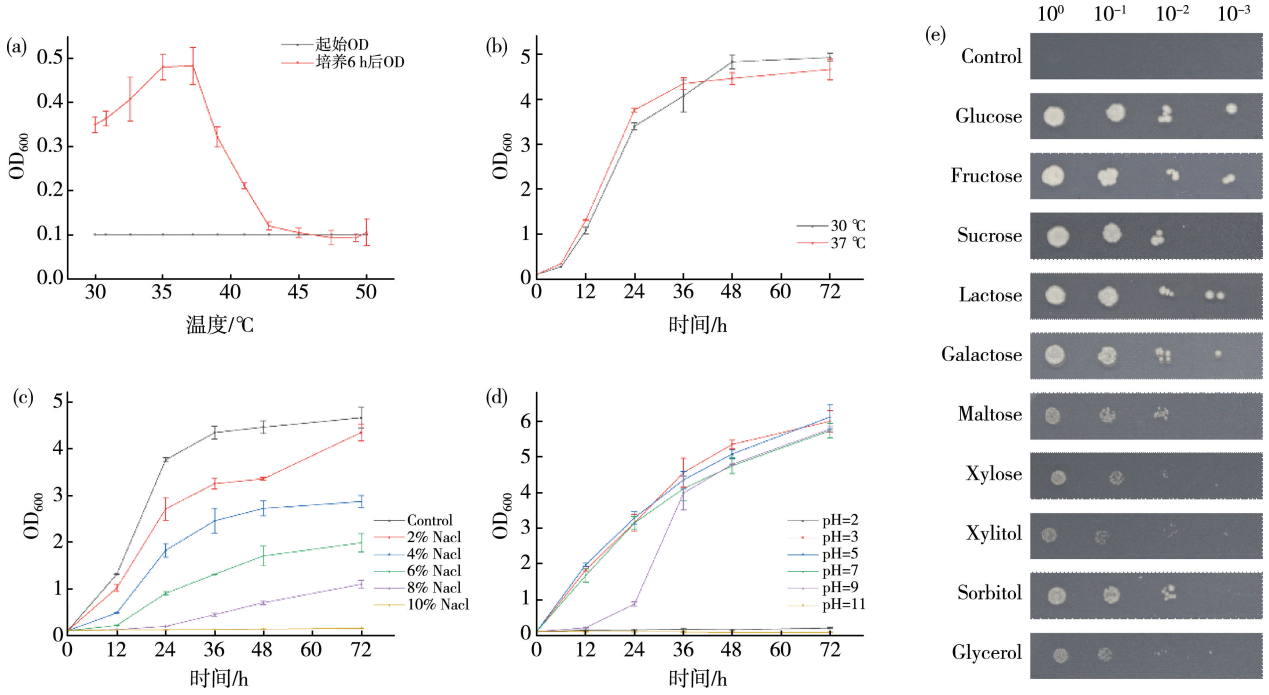


图 3　KM-502 系统发育树

2.2　KM-502 生长性状分析

为了了解 KM-502 的最适生长温度,本研究通过温度梯度实验(30~50 ℃)测试了 KM-502 在不同温度下的生长能力。结果如图 4(a)所示,不同温度培养 6 h 后,在 35~37 ℃时,KM-502 的 OD_{600}的值最高(0.481~0.483),说明 KM-502 的最适生长温度在 35~37 ℃之间。



注:(a)KM-502 不同温度下的生长能力;(b)KM-502 生长曲线;(c)KM-502 不同质量分数 NaCl 条件下的生长曲线;(d)KM-502 不同 pH 条件下的生长曲线;(e)KM-502 不同碳源以及培养基不同稀释份数条件下的生长表型。

图 4　KM-502 不同条件下的生长性状

为了了解 KM-502 在 YPD 液体培养基中的生长状况,测试了该菌株在 30 和 37 ℃条件下 200 r/min 震荡培养的生长曲线。结果如图 4(b)所示,该菌株在 37 ℃培养时表现出更快的生长速率(比 30 ℃时高 3%),但也会更快进入稳定期(36 h 左右)。而 30 ℃培养时虽然生长速率略低于 37 ℃时,但该菌株稳定期的出现时间则延迟至 48 h 左右。

为了了解 KM-502 对 NaCl 的耐受程度,测试了 KM-502 在不同质量分数 NaCl 下的生长曲线。结果如图 4(c)所示,在整个培养周期内,NaCl 质量分数与酵母生长呈负相关,尤其是 NaCl 质量分数达到 10%时,培养

液在 72 h 内未检测到生物量增长(OD_{600}<0.1),表明其 NaCl 耐受阈值介于 8% ~10%。

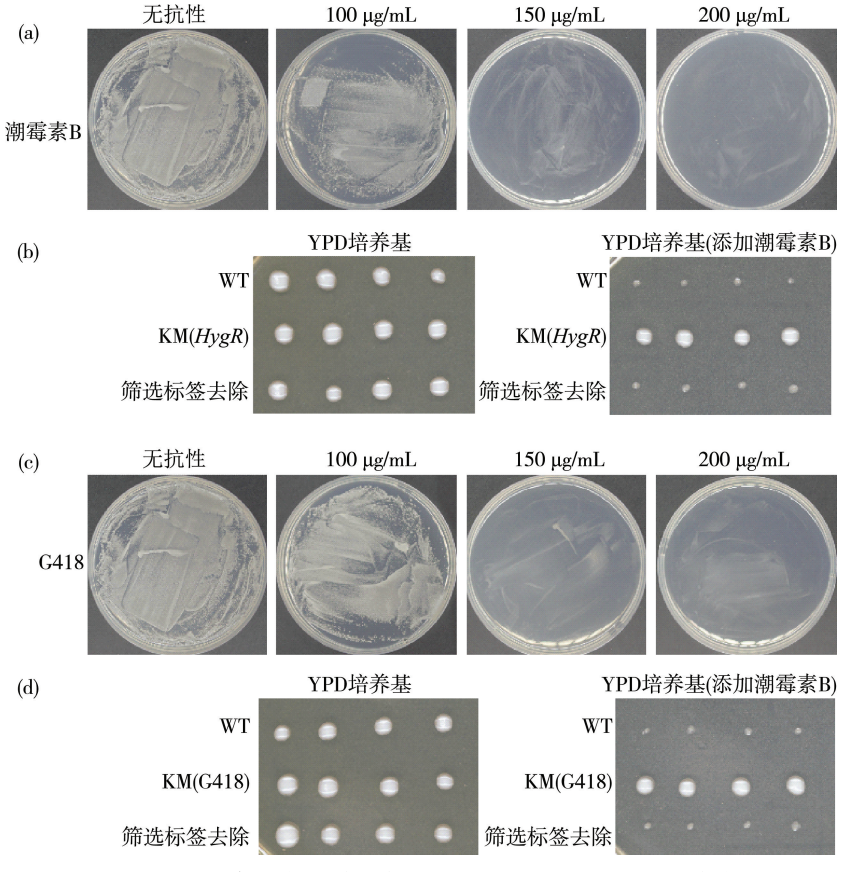
为了了解 KM-502 对不同 pH 的耐受能力,测试了 KM-502 在不同 pH 条件下的生长曲线。结果如图 4(d)所示,pH=11 时该菌株无法生长,pH=9 的碱性环境在 24 h 前也明显抑制了酵母生长,表明该菌株不适宜在碱性环境中生长。pH=2 时该菌株也无法生长,pH 为 3~7 时,生长正常,且 pH 为 3~5 时,生长最快,说明该菌株更偏向在酸性环境中生长。

为了了解 KM-502 对不同碳源的利用能力,将该菌株培养液梯度稀释(10^{-1}、10^{-2}、10^{-3})后点接于分别含有质量分数 2%葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖、半乳糖、麦芽糖、木糖、木糖醇、山梨醇、甘油的 YNB 固体培养基(6.7 g/L YNB,1% 琼脂糖)平板。24 h 后菌株生长状况如图 4(e)所示,KM-502 能高效利用葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖、半乳糖,也能利用麦芽糖、木糖、木糖醇、山梨醇、甘油作为单一碳源进行生长。

2.3 马克斯克鲁维酵母抗性筛选标记筛选

KM-502 涂布潮霉素 B 质量浓度梯度平板,30 ℃,静置培养 72 h 后,含 200 μg/mL 潮霉素 B 的平板上,KM-502完全无法生长,确定 200 μg/mL 潮霉素 B 即可完全抑制 KM-502 的生长(图 5(a))。随后基于 Cre/*loxp* 系统构建 *HygR* 筛选标记表达盒,并转化至 KM-502,转化子 KM(*HygR*)获得在添加 200 μg/mL 潮霉素 B 的 YPD 培养基中正常生长的能力,确定所选择的 *HygR* 基因可以在 KM-502 中正常表达;随后通过半乳糖诱导 Cre 酶表达,成功去除 *HygR* 筛选标记,使菌株失去抵抗潮霉素 B 的能力,证明 *HygR* 筛选标记可以重复利用(图 5(b))。

KM-502 涂布 G418 浓度梯度平板,30 ℃,静置培养 72 h 后,含 200 μg/mL G418 的平板上,KM-502 完全无法生长,确定 200 μg/mL G418 即可完全抑制 KM-502 的生长(图 5(c))。随后基于 Cre/*loxp* 系统构建 G418 筛选标记表达盒,并转化至 KM-502,转化子 KM(G418)获得在添加 200 μg/mL G418 的 YPD 培养基中正常生长的能力,确定所选择的 G418 基因可以在 KM-502 中正常表达;随后通过半乳糖诱导 Cre 酶表达,成功去除 G418 筛选标记,使菌株失去抵抗 G418 的能力,证明 G418 筛选标记可以重复利用(图 5(d))。

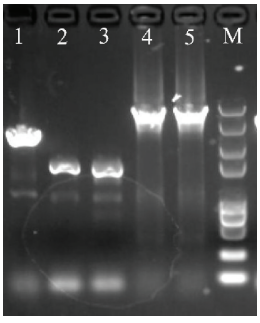


注:WT 代表野生菌株。(a)KM-502 涂布潮霉素 B 质量浓度梯度平板;(B)KM-502 与 KM(*HygR*)点接含 200 μg/mL 潮霉素 B 的 YPD 培养基;(C)KM-502 涂布 G418 浓度梯度平板;(D)KM-502 与 KM(G418)点接含 200 μg/mL G418 的 YPD 培养基。

图 5 KM-502 筛选标记筛选

2.4　马克斯克鲁维酵母遗传操作体系建立

马克斯克鲁维酵母遗传操作体系的建立是对其基因工程改造的基础。本研究中,首先选取丙酮酸脱羧酶 *Pdc1* 为靶基因,利用 CRISPR-Cas9 技术对马克斯克鲁维酵母 KM-502 进行 *Pdc1* 基因敲除。以质粒 pUCC001 为骨架,构建了打靶质粒 pgRNA-*Pdc1*,并将 pgRNA-*Pdc1* 质粒、*Pdc1* 修复片段共转化 KM-502,成功敲除了 *Pdc1* 基因的编码区,得到突变株 KMΔ*Pdc1*,引物对 PDC1U-F/PDC1D-R 用于验证 *Pdc1* 基因编码区是否被敲除。随后本研究设计并构建了一个基于 Cre/*loxp* 基因编辑系统的 *Pdc1* 表达盒,分别转化野生型菌株 KM-502 和 KMΔ*Pdc1*,得到了 *Pdc1* 敲除株的回补菌株和 *Pdc1* 的过表达菌株,并将菌株分别命名为 KMC*Pdc1* 和 KMOE*Pdc1*,引物对 TEF3p-F/LOX66-R 用于验证 *Pdc1* 基因表达盒转化子。图 6 为上述基因验证电泳图。

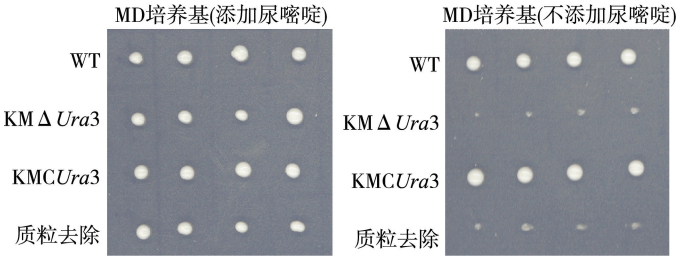


注:M:Trans2K© Plus II DNA Marker;泳道 1:引物对 PDC1U-F/PDC1D-R 验证 WT *Pdc1* 基因,3 730 bp;泳道 2:引物对 PDC1U-F/PDC1D-R 验证 KMΔ*Pdc1* 的 *Pdc1* 基因,2 038bp;泳道 3:引物对 PDC1U-F/PDC1D-R 验证 KMΔ*Pdc1*D 的 *Pdc1* 基因,2 038 bp;泳道 4:引物对 TEF3p-F/LOX66-R 验证 *Pdc1* 基因表达盒转化 KMΔ*Pdc1* 转化子,6 769 bp;泳道 5:引物对 TEF3p-F/LOX66-R 验证 *Pdc1* 基因表达盒转化 KM-502 转化子,6 769 bp。

图 6　PCR 验证电泳图

2.5　马克斯克鲁维酵母尿嘧啶缺陷型菌株构建

为更有利于多基因的迭代操作和筛选标记的高效循环利用,本研究构建了马克斯克鲁维酵母营养缺陷型突变株。首先,选取了乳清酸核苷-5′-磷酸脱羧酶 *Ura3*,基于 pUCC001 质粒,构建了携带有靶向 *Ura3* 基因的重组质粒 pgRNA-*Ura3*,将质粒 pgRNA-*Ura3* 转入 KM-502,得到了 *Ura3* 编码区移码突变的突变株 KMΔ*Ura3*。KMΔ*Ura3* 失去了尿嘧啶合成能力,无法在 MD 培养基中生长。进一步以质粒 pUCC001 为基础,成功构建了将筛选标记 *HygR* 替换为 *Ura3* 筛选标记的质粒 pUCC002。随后,将质粒 pUCC002 转化到尿嘧啶缺陷型菌株 KMΔ*Ura3* 中,得到了能够恢复尿嘧啶代谢能力的转化子 KMC*Ura3*(图 7)。结果表明成功获得尿嘧啶缺陷型菌株,并获得了可循环利用的尿嘧啶筛选标记。



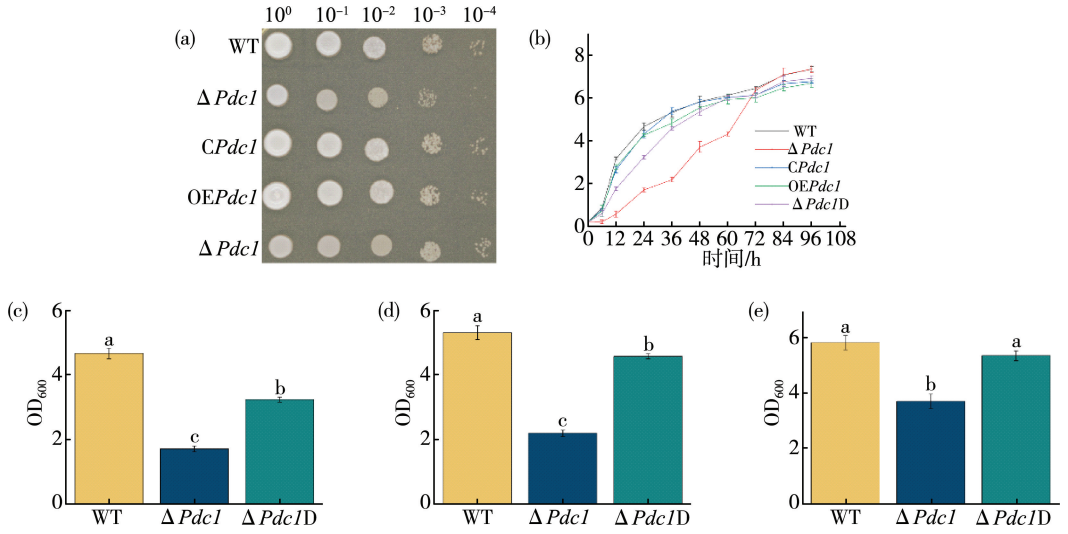
注:纵向为 4 种菌株,横向为每个菌株的 4 个平行样本。

图 7　*Ura3* 相关菌株在 MD 培养基中的生长状况

2.6　马克斯克鲁维酵母菌株生长表型分析

对 KMΔ*Pdc1* 进行了 22 代的传代驯化培养,得到了一株生长能力回升且不生产乙醇的菌株,并将其命名为 KMΔ*Pdc1*D。为了了解各菌株的生长状况,测试了 KMΔ*Pdc1*、KMC*Pdc1*、KMOE*Pdc1*、KMΔ*Pdc1*D 和马克斯克鲁维酵母野生型菌株 KM-502 的生长表型(图 8)。*Pdc1* 敲除菌株在 YPD 培养基中的生长均出现了滞后现象,生长速率明显慢于野生型菌株;回补菌株的生长速率恢复到与野生型菌株相同的水平。*Pdc1* 的过表达菌株生长速率与野生型一致。KMΔ*Pdc1* 菌株生长速度的明显下降,不利于 *Pdc1* 缺失背景下菌株的系统

改造。经对 KMΔ*Pdc1* 传代驯化培养后,得到驯化菌株 KMΔ*Pdc1*D。KMΔ*Pdc1*D 的生长滞后现象得到了缓解,其生物量相比出发菌株 KMΔ*Pdc1* 显著提高,在培养 48 h 时达到了与野生型菌株 KM-502 相当的水平。在培养到第 24、36 以及 48 h 时,KMΔ*Pdc1*D 的生长速率较 KMΔ*Pdc1* 分别提升了 29.99%、31.08%和 12.60%。

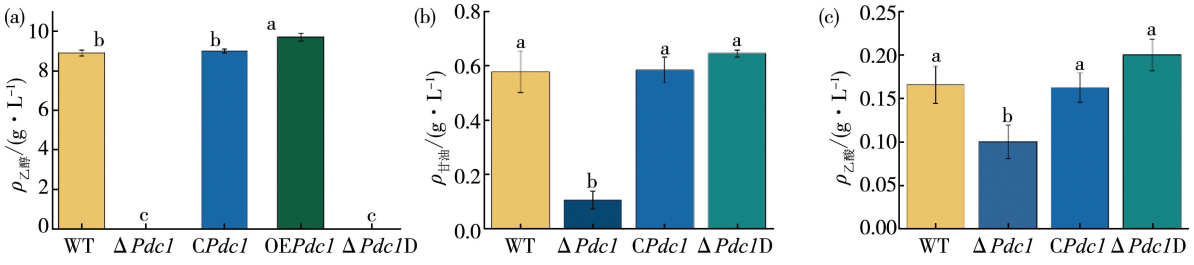


注:(a)生长表型板;(b)KM-502、KMΔ*Pdc1*、KMC*Pdc1*、KMOE*Pdc1*、KMΔ*Pdc1*D 生长曲线;(c)KM-502、KMΔ*Pdc1*、KMΔ*Pdc1*D 液体培养 24 h;(d)KM-502、KMΔ*Pdc1*、KMΔ*Pdc1*D 液体培养 36 h;(e)KM-502、KMΔ*Pdc1*、KMΔ*Pdc1*D 液体培养 48 h。不同字母表示各组间的显著性差异水平(P<0.05)。

图 8 *Pdc1* 基因修饰对马克斯克鲁维酵母 KM-502 生长的影响

2.7 马克斯克鲁维酵母菌株液体发酵产物 HPLC 分析

为测定 *Pdc1* 对马克斯克鲁维酵母菌株碳代谢产物的影响,对 KMΔ*Pdc1*、KMC*Pdc1*、KMOE*Pdc1*、KMΔ*Pdc1*D 和野生型菌株 KM-502 分别进行发酵培养。通过 HPLC 检测了各菌株乙醇、甘油和乙酸的产量(图 9)。野生型菌株 KM-502 在 20 h 时产生 8.9 g/L 的乙醇、0.58 g/L 甘油以及 0.17 g/L 的乙酸。*Pdc1* 基因敲除菌株 KMΔ*Pdc1* 的发酵液中未检测出乙醇生产。KMΔ*Pdc1* 的甘油质量浓度相比野生菌株 KM-502 下降 81.6%,乙酸质量浓度下降 39.3%。结果表明,丙酮酸脱羧酶 *Pdc1* 的敲除切断了 KMΔ*Pdc1* 的乙醇生产途径,并显著影响了菌株整体发酵代谢效率。经过传代驯化后的 KMΔ*Pdc1*D 依旧未恢复乙醇生产能力,但相对于 *Pdc1* 敲除株,其甘油和乙酸的产量均出现了显著提高,甘油产量提高了 5.1 倍,乙酸产量提高了 98.9%。



注:(a)KM-502、KMΔ*Pdc1*、KMC*Pdc1*、KMOE*Pdc1*、KMΔ*Pdc1*D 乙醇质量浓度;(b)KM-502、KMΔ*Pdc1*、KMC*Pdc1*、KMΔ*Pdc1*D 甘油质量浓度;(c)KM-502、KMΔ*Pdc1*、KMC*Pdc1*、KMΔ*Pdc1*D 乙酸质量浓度。

图 9 *Pdc1* 基因修饰对马克斯克鲁维酵母 KM-502 关键碳代谢产物的影响

3 总 结

马克斯克鲁维酵母具有高生长速率、高生物量、耐高温、能利用多种碳源等特征,被视为一种极具潜力的新型酵母表达系统,在工业发酵和生物制造领域展现出广阔的应用前景。本研究从藏灵菇中筛选获得了一株马克斯克鲁维酵母 KM-502,并对其进行了全基因组测序分析,该菌株基因组非重复区域长度为 10 170 381 bp,共预测到 6 801 个基因,包含 3 个 rRNA、107 个 tRNA。同时对 KM-502 进行了生长性状分析,确定了该菌株在 37 ℃时生长最快,最适生长 pH 为 3~5,NaCl 耐受阈值在 8% ~ 10%,并且 KM-502 可以利用葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖、半乳糖、麦芽糖、木糖、木糖醇、山梨醇、甘油作为单一碳源生长。

随后对 KM-502 进行了抗性筛选,并建立了马克斯克鲁维酵母 KM-502 的 CRISPR/Cas9 和 Cre-*Loxp* 遗传操作体系,以及筛选标记循环利用操作体系。针对 KM-502 的 *Pdc1*、*Ura3* 基因进行了改造,获得了 KMΔ*Pdc1*、KMC*Pdc1*、KMOE*Pdc1*、KMΔ*Ura3*、KMC*Ura3*,并对 KMΔ*Pdc1* 进行了连续传代驯化获得了 KMΔ*Pdc1*D,随后测试了各菌株的生长性状,并对 KMΔ*Pdc1*、KMC*Pdc1*、KMOE*Pdc1*、KMΔ*Pdc1*D 和野生型菌株 KM-502 分别进行发酵培养。*Pdc1* 基因敲除菌株 KMΔ*Pdc1* 生长严重受损,敲除株 KMΔ*Pdc1* 驯化后的菌株 KMΔ*Pdc1*D 生长速率恢复至接近野生型菌株水平,同时甘油、乙酸的产量也出现了提升。

本研究所建立的马克斯克鲁维酵母 KM-502 的 CRISPR/Cas9 和 Cre-*Loxp* 遗传操作体系以及筛选标记循环利用操作体系为定向改造马克斯克鲁维酵母菌株提供了技术参考,通过对 *Pdc1* 突变株的分析,为理性构建高效的细胞工厂提供了关键靶点,为进一步构建马克斯克鲁维酵母底盘细胞的基因工程菌奠定了基础。

参考文献:

[1] Groeneveld P, Stouthamer A H, Westerhoff H V. Super life - How and why 'cell selection' leads to the fastest-growing eukaryote[J]. FEBS Journal, 2009, 276(1):254-270.

[2] Pattanakittivorakul S, Tsuzuno T, Kosaka T, et al. Evolutionary adaptation by repetitive long-term cultivation with gradual increase in temperature for acquiring multi-stress tolerance and high ethanol productivity in *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042[J]. Microorganisms, 2022, 10(4):798.

[3] Pentjuss A, Stalidzans E, Liepins J, et al. Model-based biotechnological potential analysis of *Kluyveromyces marxianus* central metabolism[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2017, 44(8):1177-1190.

[4] Lane M M, Burke N, Karreman R, et al. Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus*[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2011, 100(4):507-519.

[5] Bae J H, Kim H J, Kim M J, et al. Direct fermentation of Jerusalem artichoke *Tuber powder* for production of l-lactic acid and d-lactic acid by metabolically engineered *Kluyveromyces marxianus*[J]. Journal of Biotechnology, 2018, 266:27-33.

[6] Park Y, Sunwoo I Y, Yang J, et al. Comparison of ethanol yield coefficients using *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida lusitaniae*, and *Kluyveromyces marxianus* adapted to high concentrations of galactose with *Gracilaria verrucosa* as substrate[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2020, 30(6):930-936.

[7] Koukoumaki D I, Papanikolaou S, Ioannou Z, et al. Single-cell protein and ethanol production of a newly isolated *Kluyveromyces marxianus* strain through cheese whey valorization[J]. Foods, 2024, 13(12):1892.

[8] Baptista M, Domingues L. *Kluyveromyces marxianus* as a microbial cell factory for lignocellulosic biomass valorisation[J]. Biotechnology Advances, 2022, 60:108027.

[9] Cernak P, Estrela R, Poddar S, et al. Engineering *Kluyveromyces marxianus* as a robust synthetic biology platform host[J]. mBio, 2018, 9(5):e01410-e01418.

[10] Rajkumar A S, Morrissey J P. Protocols for marker-free gene knock-out and knock-down in *Kluyveromyces marxianus* using CRISPR/Cas9[J]. FEMS Yeast Research, 2022, 22(1):foab067.

[11] Li Mengwan, Lang Xuye, Moran Cabrera M, et al. CRISPR-mediated multigene integration enables Shikimate pathway refactoring for enhanced 2-phenylethanol biosynthesis in *Kluyveromyces marxianus*[J]. Biotechnology for Biofuels, 2021, 14(1):3.

[12] Bever D, Wheeldon I, Da Silva N. RNA polymerase II-driven CRISPR-Cas9 system for efficient non-growth-biased metabolic engineering of *Kluyveromyces marxianus*[J]. Metabolic Engineering Communications, 2022, 15:e00208.

[13] Ishida N, Saitoh S, Onishi T, et al. The effect of pyruvate decarboxylase gene knockout in *Saccharomyces cerevisiae* on L-lactic acid production[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2006, 70(5):1148-1153.

[14] Flikweert M T, Van Der Zanden L, Janssen W M, et al. Pyruvate decarboxylase: An indispensable enzyme for growth of *Saccharomyces cerevisiae* on glucose[J]. Yeast, 1996, 12(3):247-257.

[15] van Maris A J, Geertman J M, Vermeulen A, et al. Directed evolution of pyruvate decarboxylase-negative *Saccharomyces cerevisiae*, yielding a C2-independent, glucose-tolerant, and pyruvate-hyperproducing yeast[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(1):159-166.

[16] Hong Ruru, Tong Sheng, Chai Mengdan, et al. Enhancing mycoprotein yield: Metabolic modulation of chitin synthase in *Fusarium venenatum*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(49)27274-27283.

[17] Gosalawit C, Khunnonkwao P, Jantama K. Genome engineering of *Kluyveromyces marxianus* for high D-(−)-lactic acid production under low pH conditions[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2023, 107(16):5095-5105.

[18] Ishii J, Morita K, Ida K, et al. A pyruvate carbon flux tugging strategy for increasing 2, 3-butanediol production and reducing ethanol subgeneration in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnology for Biofuels, 2018, 11(1):180.

(责任编辑:王亚宾;校　对:孙洪清)