

## 双层面调控 *Saccharomyces cerevisiae* 碳流促进 L-乳酸积累

赵亮亮<sup>1</sup>, 汪军<sup>1</sup>, 周景文<sup>2</sup>, 刘立明<sup>1,2\*</sup>, 堵国成<sup>2</sup>, 陈坚<sup>1,2\*</sup>

江南大学<sup>1</sup> 食品科学与技术国家重点实验室,<sup>2</sup> 工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122

**摘要:**【目的】调控 *Saccharomyces cerevisiae* 丙酮酸节点碳流分布促进 L-乳酸积累。【方法】利用同源重组方法, 将来源于 Bovine 的乳酸脱氢酶基因 *LDH* 整合到 *S. cerevisiae* CEN. PK2-1C 基因组中, 同时敲除丙酮酸脱羧酶基因 *PDC1*, 将碳流导向 L-乳酸的积累, 构建了基因工程菌 *S. cerevisiae* CEN. PK2-1C[*LDH*]。在此基础上, 通过分析丙酮酸节点处关键酶对 NADH 的  $K_m$  值不同, 而将来源于 *Streptococcus pneumoniae* 的 NADH 氧化酶(*nox*)过量表达于 CEN. PK2-1C[*LDH*]中, 构建基因工程菌 *S. cerevisiae* CEN. PK2-1C[*LDH*]-*nox*。【结果】与出发菌株 *S. cerevisiae* CEN. PK2-1C 比较, *S. cerevisiae* CEN. PK2-1C[*LDH*]发酵液中 L-乳酸积累量从 0 g/L 增加到 15 g/L, 而乙醇浓度则从 27.3 g/L 降为 16.2 g/L; 过量表达了 *nox* 的 *S. cerevisiae* CEN. PK2-1C[*LDH*]-*nox* 的发酵液中 L-乳酸浓度则进一步从 15 g/L 增加到 20 g/L, 乙醇浓度从 16.2 g/L 降为 8.2 g/L。【结论】本研究通过构建 *S. cerevisiae* L-乳酸合成途径和降低 NADH/NAD<sup>+</sup> 比率, 在引入外源途径和调控辅因子浓度两个层面上成功实现了 *S. cerevisiae* 丙酮酸代谢节点碳流的重新分布, 促进了 L-乳酸的积累。

**关键词:** *S. cerevisiae*, L-乳酸, 碳代谢流, NADH

**中图分类号:** Q935      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2011) 01-0050-09

作为一种重要的平台化合物, L-乳酸的需求随着石油资源的日渐枯竭而不断增加<sup>[1–2]</sup>。在目前的 L-乳酸合成工艺中, 以生物质为原料采用微生物发酵(乳酸菌和霉菌)工艺具有广泛的应用前景。然而由于乳酸菌营养需求高和难以耐受恶劣环境胁迫、霉菌易形成菌丝团和副产物较多等缺陷<sup>[3–5]</sup>, 限制了 L-乳酸发酵产业的快速发展。*S. cerevisiae* 作为单细胞生物, 能利用简单的底物进行快速生长等优点而为有机酸工业所青睐。但其自身不具备合成 L-乳酸的代谢能力, 需要利用代谢工程手段构建具备高效积累 L-乳酸能力的基因。

国内外利用 *S. cerevisiae* 生产 L-乳酸的研究主要集中在两个方面:(1)乳酸脱氢酶基因的游离表达:1995 年 Porro D 等在 *S. cerevisiae* 中游离表达了源于哺乳动物的乳酸脱氢酶基因(*LDHA*), 实现了 *S. cerevisiae* 中乳酸的积累<sup>[6]</sup>, 在此基础上 Adachi E 通过表达 *LDHA* 的同时弱化丙酮酸脱羧酶(*PDC*)的活性, 使乳酸对葡萄糖的产率系数从 0.155 g/g 提高到了 0.2 g/g, 而副产物乙醇对葡萄糖的产率则从 0.35 g/g 降为 0.2 g/g<sup>[7]</sup>。(2)整合表达:为进一步提高 L-乳酸的转化率, Nobuhiro Ishida 等采用整合表达策略将来源于 Bovine 的 *LDH* 替换掉 *S.*

**基金项目:**国家自然科学基金重点项目(20836003);国家自然科学基金(20706025);霍英东教育基金项目(11075);全国优秀博士学位论文作者专项资金(200962)

\* 通信作者。陈坚, Tel: +86-510-85918307, Fax: +86-510-85918309; E-mail: jchen@jiangnan.edu.cn; 刘立明, Tel: +86-510-85918307; Fax: +86-510-85918309; E-mail: Mingli@jiangnan.edu.cn

**作者简介:** 赵亮亮(1986–), 男, 山西晋城人, 硕士研究生。E-mail: liangzhaol@hotmail.com

**收稿日期:** 2010-09-01; **修回日期:** 2010-10-06

*cerevisiae* 中的 *PDC1*, 构建了 *LDH* 双拷贝并缺失 *PDC1* 的突变株, 使乳酸积累量达到 55.6 g/L, 乳酸对葡萄糖的产率系数为 0.625 g/g, 副产物乙醇产量为: 16.9 g/L<sup>[8]</sup>。更进一步, 该研究小组在继续增加两个 *LDH* 拷贝的同时敲除了 *PDC5*, 使 L-乳酸积累量达到 82.3 g/L, L-乳酸对葡萄糖比例达到 0.815 g/g。但是, 随着 *PDC1/5* 的缺失, 细胞生长因丙酮酸脱羧酶代谢旁路的阻断无法提供 C2 代谢物而受阻, 使发酵周期长达 216 h<sup>[9]</sup>。上述研究主要集中于构建 L-乳酸合成途径和阻断副产物乙醇合成途径。实际上, 流向副产物乙醇的碳流不仅取决于关键酶 PDC 活性, 还取决于胞内 NADH 等辅因子浓度, Nielsen 等通过降低 *S. cerevisiae* 胞内 NADH/NAD<sup>+</sup> 的比例成功降低了乙醇的积累量<sup>[10]</sup>。若敲除 *PDC1/5* 则导致 *S. cerevisiae* 生长能力减弱。因此, 进一步降低副产物乙醇积累的策略还应包括调控胞内 NADH 等辅因子的浓度和形式。

基于此, 本研究采用整合表达策略将来源于 Bovine 的 *LDH* 基因整合到 *S. cerevisiae* 的基因组中的同时敲除了 *PDC1*, 构建了具备 L-乳酸积累能力的突变株 CEN. PK2-1C[*LDH*]。在此基础上通过游离表达的方式, 将源于 *Streptococcus pneumoniae* 的 NADH 氧化酶 (nox) 表达于突变株 CEN. PK2-1C[*LDH*] 中, 构建了胞内 NADH/NAD<sup>+</sup> 比率显著降低的突变株 CEN. PK2-1C[*LDH*]-nox。本研究在碳代谢途径和辅因子 2 个层面上, 调控丙酮酸节点碳流的流向和通量, 实现了 L-乳酸的大量积累和副产物乙醇积累的降低。这一研究为以 *S. cerevisiae* 为宿主, 通过调控碳流分配以合成目标代谢产物的代谢工程策略提供借鉴。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种与质粒:** *S. cerevisiae* CEN. PK2-1C (*MATa ura3-52 leu2-3, 112 trp1 - 289 his3Δ MAL2-8<sup>+</sup> SUC2*) 购于 EUROSCARF 菌种保藏中心, 大肠杆菌 JM109 购于宝生物工程(大连)公司; pY13TEF1 购自德尔夫生物技术有限公司, pY14MET25 为作者构建, pLAZ10<sup>[11]</sup> 由意大利罗马大学 Michele Bianchi 教授馈赠, pYX212-nox<sup>[11]</sup> 由丹麦科技大学微生物技术中心的 Jens Nielsen 教授馈赠, 质粒及 pUG73 本实验室所有。

**1.1.2 培养基与培养条件:** *E. coli* 培养与保存培养基为 LB 培养基 (g/L): 酵母膏 5, 蛋白胨 10, 氯化钠 10; 加入氨苄青霉素的 LB 用于筛选转化子, 37℃、200 r/min 震荡培养。 *S. cerevisiae* 感受态制备及保存用培养基为 YPD (g/L): 酵母膏 10, 蛋白胨 20, 葡萄糖 20; *PDC1* 敲除转化子的筛选用培养基 SC (g/L): 葡萄糖 20, YNB (不含 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 1.7, 硫酸铵 4, 所需氨基酸适量; 酵母发酵培养基 YNB (g/L): YNB (不含 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 1.7, 尿素 1, 葡萄糖 100。

**1.1.3 主要试剂和仪器:** 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Ex-Taq DNA 聚合酶、Pyrobest™ DNA 聚合酶、质粒小量抽提试剂盒和胶回收试剂盒等购自宝生物工程(大连)公司; 酵母转化试剂盒、质粒提取试剂盒和基因组提取试剂盒均购自 G-biosciences (St Louis, Mo, USA); LiAc 高效转化用 PEG3359 (p3640sigma) 和载体 DNA (D1626, Sigma-Aldrich) 购于 Sigma 公司; 引物由上海生工生物技术有限责任公司合成; 其它常规试剂采用进口分装或国产分析纯。

### 1.2 *S. cerevisiae* CEN. PK2-1C[*LDH*] 的构建

**1.2.1 Bovine *LDH* 整合表达片段的构建:** 采用融合 PCR 和质粒连接相结合的方法构建双交换片段。Bovine *LDH* 由 PCR 扩增得到, 以质粒 pLAZ10 为模板, 设计引物扩增 *LDH*。引物为: *LDH*-F (下划线为 *Xba*I 酶切位点); *LDH*-R (下划线为 *Cla*I 酶切位点)。用 *Xba*I 和 *Cla*I 对质粒 pY13TEF1 和扩增的 *LDH* 进行双酶切后连接得到 pY13TEF1-*LDH*, 成功实现 *LDH*、CYC1Terminator 和 His3 连在一起, 然后设计引物通过融合 PCR 将质粒上的片段与 *PDC1* Promoter 和 *PDC1* 3' 连接起来, 构建双交换片段。具体操作如下: 以 *S. cerevisiae* 基因组为模板, 设计独立扩增引物 PCR 得到 *PDC1* 启动子片段 (图 1-B), 引物为 *PDC1* Promoter-F 和 *PDC1* Promoter-R, 下划线部分分别是与片段 *LDH*-CYC1terminator-His3 上下游互补的序列 (表 1)。同样以 *S. cerevisiae* 基因组为模板, 设计独立扩增引物 PCR 得到 *PDC1* 3' End (图 1-B), 引物为: *PDC1* 3' End-F (下划线是与片段 *LDH*-CYC1te-rminator-His3 的下游互补的序列), *PDC1* 3' End-R (表 1)。以质粒 pY13TEF1-*LDH* 为模板设计独立扩增引物 PCR 得到 *LDH*-CYC1terminator-His3 片段, 引物为: *LDH*-CYC1

terminator-His3'-F (下划线是与片段 *PDC1* Promoter 的下游互补的序列), *LDH*-CYC1 terminator-His3-R (下划线是与片段 *PDC1* 3'End 的上游互补的序列)。1% 琼脂糖凝胶电泳回收 *PDC1* Promoter、*LDH*-CYC1terminator-His3'和 *PDC1* 3'End 3 种片段,用凝胶回收试剂盒纯化 PCR 片段,纯化后电泳分析 (图 1-B)并用 BIO-RAD 公司 Quantity one 定量,然后将

3 个独立扩增的片段混合 (总浓度 ≤800 ng),加入由 Pyrobest™ DNA 聚合酶、dNTPs 和 MgCl<sub>2</sub> 组成的混合液进行 PCR 扩增。PCR 程序为 94℃, 30 s; 56℃, 1 min; 72℃, 4 min; 进行 5 个循环,然后以该轮 PCR 产物为模板,引物为 *PDC1* Promoter-F, *PDC1* 3' End - R, 按照相同的程序循环 28 次后得到整合表达片段,如图 1-C 所示。

表 1 *LDH* 整合表达片段构建所需引物及其序列

Table 1 The primer used to construct the recombinant fragment for LDH integrated expression

Primer name	Primer sequence(5'→3')
<i>LDH</i> - F	GCTCTAGAATGGCAACTCTCAAGGAT
<i>LDH</i> - R	CCATCGATCTTTAAACTGCAGTTC T
<i>PDC1</i> Promoter-F	GCGTTTATTACCTATC TTTAAACTT
<i>PDC1</i> Promoter-R	GAATCAGCTGATCCTTGAGAGTTGCCATTTTGATTGATTTGACTGTGTTAT
<i>PDC1</i> 3'End-F	GCTCTTAAACGGAATTTATGGTGCATTCTACCCCATTTGAAGCAAGAATA
<i>PDC1</i> 3'End-R	GCGTTGGTAG CAGCAGTCAACTTAG
L-C-H-F	GCAAAATAACACAGTCAAATCAATCAAAATGGCAACTCTCAAGGATCAGCT
L-C-H-R	CATTCTTGCTTCAATGGGGTAGAATGCACCATAAATTCGCTTTTAAGAG

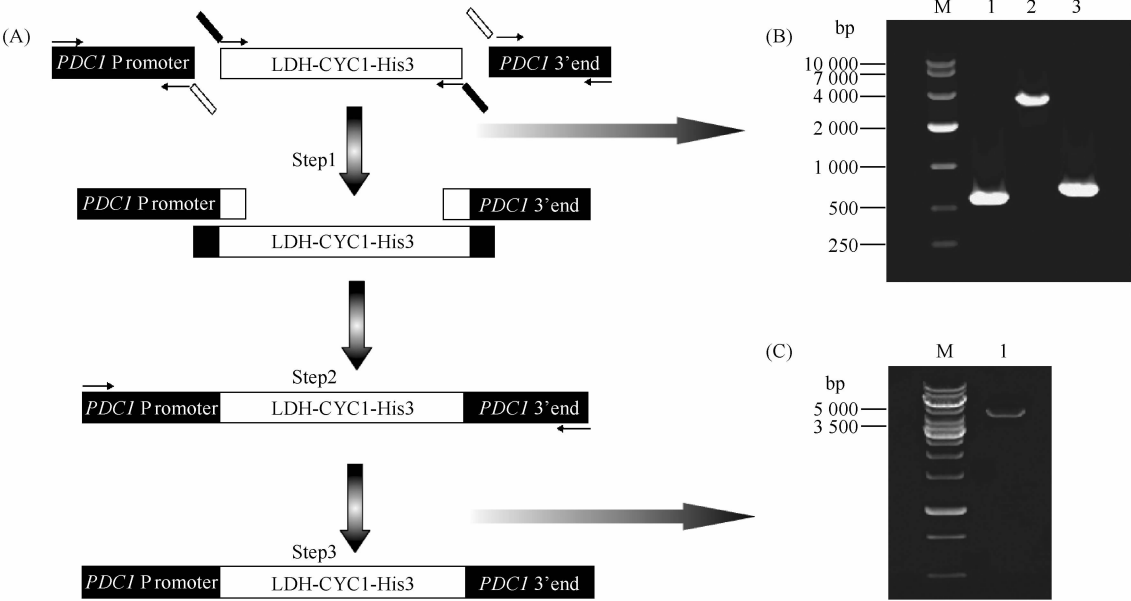


图 1 融合 PCR 构建 *LDH* 整合表达片段

Fig. 1 The construction of recombination fragments for *LDH* integration expression. A: The map for fusion PCR; B: PCR artificial synthesis the *PDC1* Promoter, LDH-CYC1-His3 及 *PDC1* 3' End for Fusion PCR. M: DNA marker; 1: *PDC1* 3' End; 2: LDH-CYC1k-His3; 3: *PDC1* Promoter; C: Fusion PCR artificial synthesis the integrated expression segment for LDH. M: DNA marker; 1: Integrated expression segment for LDH.

**1.2.2 整合表达片段的转化及转化子的验证:**采用 LiAc 转化法<sup>[12]</sup>将纯化的整合片段转化到 *S. cerevisiae* 中,按照双交换的原理,整合片段中与 *S.*

*cerevisiae* 基因组同源的片段在 *PDC1* 位点发生整合,达到敲除 *PDC1* 并整合表达 *LDH* 的目的,其中 *LDH* 受 *PDC1* 启动子的调控。转化时分别以空质粒

和水作对照,验证转化效率和缺陷平板。转化液经后培养后,涂布组氨酸缺陷型 SC 平板,放置于 30℃ 恒温培养箱中,培养 3 至 5 d 后长出转化子,对照则无转化子。挑取其中菌落较大的转化子划线于新的组氨酸筛选平板中进行传代培养,重复同样操作 3 次。针对融合表达片段的特点,采用表 2 的序列合成如图 2 - A 所示的验证引物。针对整合后的基因组设计引物 YZ1、YZ2 和 YZ5、YZ6 (表 2),采用出发菌株基因组和转化子的基因组为模板进行 PCR 扩增,在转化子基因组中获得大小分别为 897 bp (图 2-B,泳道 8)和 1179 bp (图 2-B,泳道 2)的条带。类似地,以出发菌株基因组为模板设计引物 YZ3、YZ7,扩增得到 544 bp (图 2-B,泳道 5)的条带。若控制延伸时间为 1 min,仅以出发菌株基因组为模板设计引物 YZ4、YZ7 扩增得到 1152 bp (图 2-B,泳道 3)的条带,而以整合基因组为模板则无法获得类似片段 (图 2-B,泳道 4)。电泳结果如图 2-B 所示。

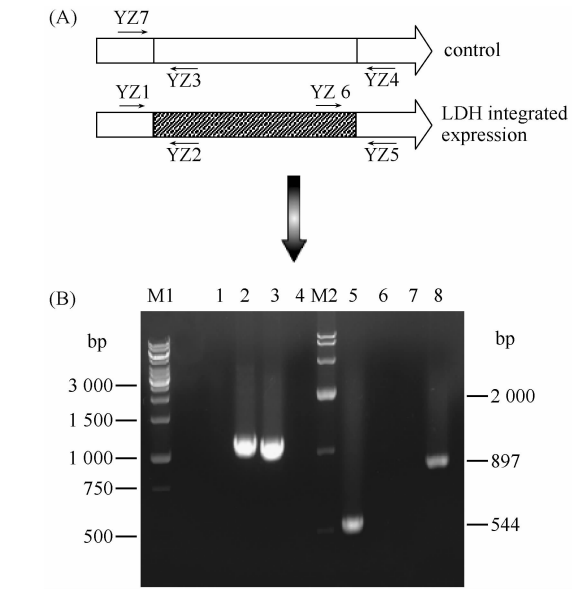


图 2 阳性转化子的 PCR 验证

Fig. 2 PCR verification for positive transformants. A: The primer for PCR diagnostic; B: The results of PCR diagnostic for control and transformants genome. M1: 1kb markers; 1: primer YZ5 and YZ6 for control strain genome; 2: primer YZ5 and YZ6 for positive transformants genome; 3: primer YZ4 and YZ7 for control strain genome; 4: primer YZ4 and YZ7 for positive transformants genome; 5: primer YZ3 and YZ7 for control strain genome; 6: primer YZ3 and YZ7 for positive transformants genome; 7: primer YZ1 and YZ2 for control strain genome; 8: primer YZ1 and YZ2 for positive transformants genome.

表 2 整合表达验证引物

Table 2 The primer for verification

Primer name	Primer sequence(5'→3')
YZ1	CCGGCTTCCTTCCCGATTC
YZ2	TCCCTCTTGCTGACGTGCC
YZ3	CGGCAATACCGTTCAAAGC
YZ4	CAACAAAGCACCGACAGACAA
YZ5	CGCTCTGGAAGTGCCTCATC
YZ6	GCTGGTAGCGACTCTGTGGGTT
YZ7	GACGGTGTCTGTACTTGTCTAT

1.3 *S. cerevisiae* CEN. PK2-1C[LDH]-nox 的构建

提取质粒 pYX212-nox 和 pY14MET25。用 *Bam*HI 和 *Sal*I 酶对两质粒双酶切、回收、纯化,连接 (16℃ 过夜)后将连接产物转化 JM109 感受态细胞中后,涂布带有氨苄抗性的 LB 平板,经 37℃ 过夜培养,挑取转化子提取质粒酶切验证验证,发现均为阳性克隆 (图 3-B)。表明 pY13MET25-nox (图 3-A) 已构建成功。将质粒 pY14MET25-nox 由 LiAc 法转化导入 CEN. PK2-1C[LDH] 中,涂布 Trp 缺陷平板。长出菌落后传代 3 次以上,挑取适量转化子接种于种子培养基,提取质粒酶切验证,得到所需菌株 CEN. PK2-1C[LDH]-nox。

1.4 胞内 NADH/NAD<sup>+</sup> 的测定

取 30 mL 处于对数生长中期的发酵液,于 10000 r/min、4℃ 下离心 10 min,去除上清液,并迅速置于液氮中以阻断微生物代谢,取出置于 -20℃ 保存备用。NADH 提取:向菌体中加入 5 mL 预冷的含有 50 mmol/L KOH, 30 % (v/v) 乙醇和 22 mmol/L 硼酸 (pH 10) 的溶液。冰上放置 30 min 后,剧烈搅拌用 3 mol/L 的 HCl 将 pH 调节到 9.0 - 9.4。10000 r/min、4℃ 离心 10 min,迅速测定上清; NAD<sup>+</sup> 提取:向菌体中加入 5 mL 预冷的含有 70% (v/v) 乙醇的 10 mmol/L pH 6.5 的 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲液,室温放置 30 min。此过程中,用 0.5 mol/L 的 HCl 调节保持 pH 低于 7.0。10000 r/min、4℃ 离心 10 min,迅速测定上清<sup>[13]</sup>。采用高效液相色谱 (HPLC) 测定,色谱分析条件为: Agilent ZORBAX SB-Aq C18 反相柱 (250 mm × 4.6 mm); 流动相: 磷酸盐缓冲液 (10.93 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 和 3.04 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 溶于纯水中,加入四丁基溴化铵 3.22 g,调节 pH 为 6.5,真空抽滤后定容至 1 L) 和乙腈配比为 86: 14;

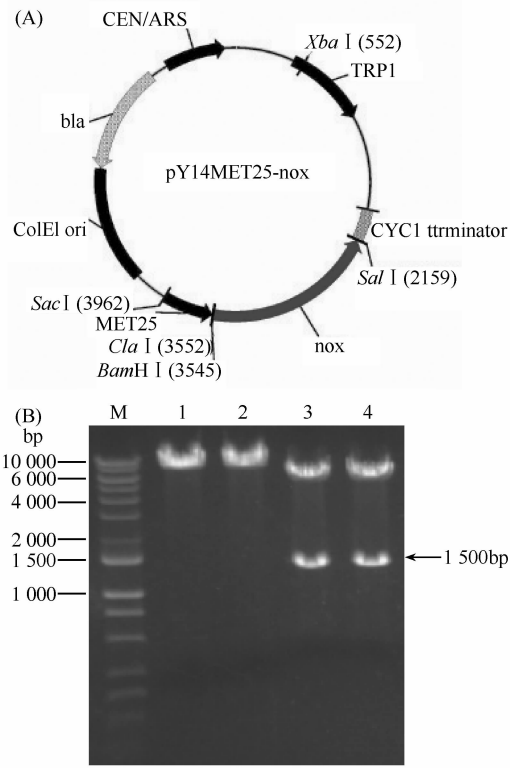


图3 pY14MET25-nox 质粒图谱(A)和 nox (B)酶切验证  
Fig.3 The plasmid map of pY14MET25-nox (A) and enzyme cut electrophoretogram. (B): M; 1 kb marker; 1, 2; pY14MET25-nox without cutting with enzyme; 3, 4; pY14MET25-nox after cutting with enzyme.

流速:1 mL/min;检测波长:254 nm;柱温:35℃。所有样品和标准品均用 0.22 μm 滤膜过滤后进样 10 μL分析。NAD<sup>+</sup>、NADH 在 5 min 内可以得到分离。胞内 NADH 和 NAD<sup>+</sup> 浓度至少是三次独立提取过程的平均值。

1.5 NADH 氧化酶的测定

NADH 氧化酶在紫外分光光度计中测定,取适当处于对数生长中期的发酵液,于 10000 r/min、4℃ 下离心 10 min,去除上清液,超声波破碎细胞。25℃ 条件下,在 pH 为 7.0 的缓冲液 (NADH、EDTA 和 K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 的浓度分别为 0.29 mmol/L、0.3 mmol/L 和 50 mmol/L) 中测定 OD<sub>340</sub> 的吸光度变化<sup>[14]</sup>。

1.6 发酵罐培养

从新鲜斜面接一环 *S. cerevisiae* 入种子培养基 (80 mL SC/250 mL 锥形瓶),于 30℃、200 r/min 摇瓶培养至对数中期 (24 h)后,以 8 % 接种量 (v/v) 接入装有 700 mL YNB 培养基的 1.3 L 发酵罐 (NEW Brun Swick/BLO FLO 110)中。发酵初始 pH 为 5.5,发酵过程中以 8 mol/L 的 NaOH 维持 pH 保

持 5.5。通气量为 1.5 L/min,溶氧控制为 50%。

1.7 分析方法

乳酸、乙醇及葡萄糖的含量采用 Agilent A1200 高效液相色谱 (HPLC) 仪测定<sup>[15]</sup>。色谱柱:Aminex HPX-87H (Bio-Rad);流动相:0.005 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>;流速:0.6 mL/min;保留时间:1 min;柱温:35℃;进样量:5 μL;检测器:示差折光检测器。

2 结果

2.1 LDH 过量表达与 PDC1 缺失对丙酮酸节点代谢流分布的影响

过量表达 LDH 且缺失 PDC1 的突变株 CEN. PK2-1C [LDH] 可积累 15 g/L L-乳酸,而在出发菌株 CENPK2-1C 的发酵液中无法检测到 L-乳酸 (图 4-A)。这一结果表明,外源 LDH 的导入使 *S. cerevisiae* 具备高效积累 L-乳酸的代谢能力;与出发菌株 CEN. PK2-1C 相比,突变株 CEN. PK2-1C [LDH] 的乙醇产量由 27.3 g/L 降为 16.2 g/L,下降了 41 % (图 4-B);进一步研究发现,随着 LDH 的表达,出发菌株和突变株 CEN. PK2-1C 的乙醇对葡萄糖产率分别为 0.31 g/g 和 0.183 g/g。

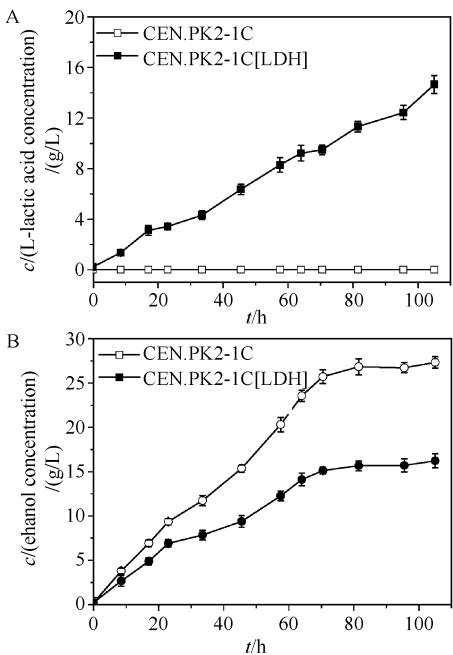


图4 不同菌株中 L-乳酸和乙醇积累过程曲线

Fig. 4 The compariation of L-lactic acid and ethanol accumulation between the parent strain and the mutant strain CEN. PK2-1C [LDH]. A; L-lactic acid; B; Ethanol.

## 2.2 *nox* 表达对丙酮酸节点代谢流分布的影响

*nox* 的过量表达使胞内 NADH 的浓度从 0.48  $\mu\text{mol/g}$  DCW 降为 0.24  $\mu\text{mol/g}$  DCW, 而  $\text{NAD}^+$  的浓度则从 5.94  $\mu\text{mol/g}$  DCW 上升到 8.10  $\mu\text{mol/g}$  DCW, 最终导致胞内  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  比率降为 0.03 (图 5-A)。经酶活测定发现, NADH 氧化酶活性提高到 10.7 U/mg 蛋白, 是 CEN. PK2-1C [LDH] 的 2.9 倍 (图 5-B)。与 CEN. PK2-1C [LDH]

比较, *nox* 的表达使突变株 CEN. PK2-1C [LDH] -*nox* 积累 L-乳酸的能力提高了 33 % (20 g/L, 图 5-C), 而乙醇浓度下降了 49 %, 仅为 8.2 g/L (图 5-D)。分析图 5-C-D 数据, 发现, 随着 *nox* 的过量表达: (1) L-乳酸对葡萄糖产率系数由 0.165 g/g 提高到 0.289 g/g; (2) 而乙醇对葡萄糖的产率系数则从 0.183 g/g 降低为 0.119 g/g; (3) L-乳酸/乙醇的比例提高了 2.6 倍。

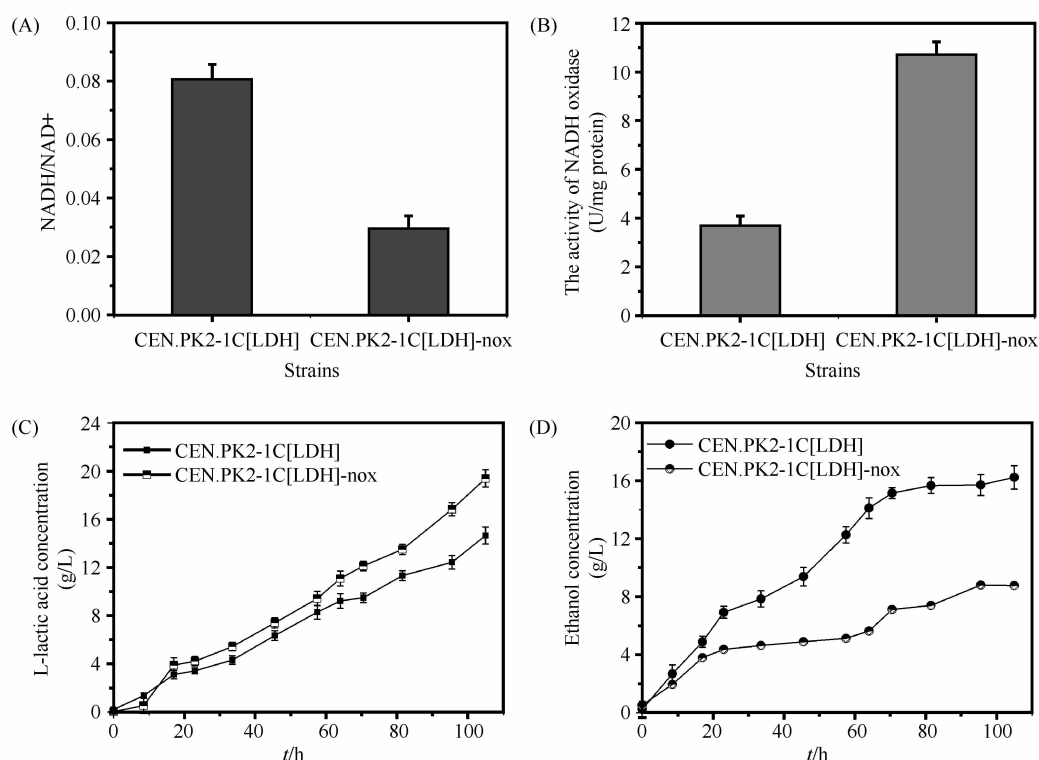


图 5 *nox* 过量表达对 *S. cerevisiae* 生理代谢的影响

Fig. 5 Effect of *nox* over-expression on the physiological behavior of *S. cerevisiae*. A: The value of  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$ ; B: NADH oxidase activity; C: L-lactic acid; D: Ethanol

## 3 讨论

本研究通过在 *S. cerevisiae* 中整合表达 Bovine LDH 基因, 构建了一株缺失 *PDC1* 且具备 L-乳酸积累能力的菌株 CEN. PK2-1C [LDH], 使丙酮酸节点的碳流流向 L-乳酸, 发酵液 L-乳酸浓度为 15 g/L, 而副产物乙醇的产量则从 27.3 g/L (图 6-A) 降低为 16.2 g/L (图 6-B)。通过分析丙酮酸节点处各支路关键酶对 NADH 的  $K_m$  值, 发现来源于 Bovine 的 LDH 比 *S. cerevisiae* 中 ADH 对 NADH 表现出更强的亲和力, 即 LDH 更易于和 NADH 结合。基于这

一发现, 作者异源表达了源于 *S. pneumoniae* 的 *nox*, 显著降低胞内  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  比率。结果表明, 较低的  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  比率使碳流从流向乙醇转向 L-乳酸, L-乳酸浓度达到 20 g/L, 而副产物乙醇浓度则降为 8.2 g/L (图 6-C)。

本研究通过整合表达源于 Bovine 的 LDH 的同时敲除 *PDC1*, 使突变株 CEN. PK2-1C [LDH] 在获得一定的 L-乳酸合成能力的同时, 依然积累高浓度的副产物乙醇。其原因在于: *S. cerevisiae* 中编码丙酮酸脱羧酶 (*PDC*) 的基因有 *PDC1*、*PDC5* 和 *PDC6*, 其中 *PDC1* 发挥主要作用, *PDC6* 的作用甚微, 但当

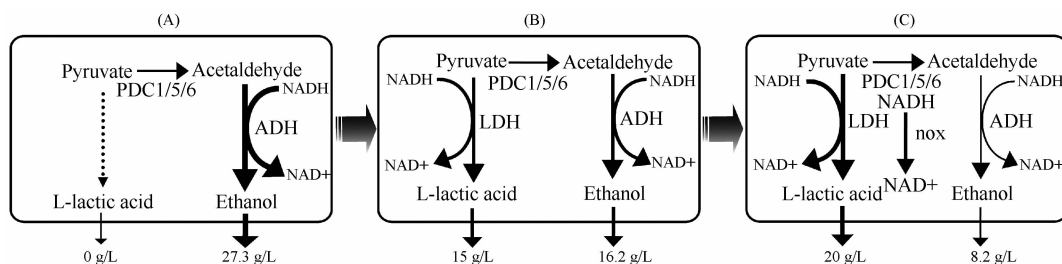


图6 代谢工程策略对碳代谢流分配的影响

Fig. 5 Manipulation of the carbon flux distribution by metabolic engineering strategy on. A: The parent strain CEN. PK2-1C; B: The mutant strain CEN. PK2-1C[LDH], in which LDH was integrated expression with PDC1 knock-out; C: The mutant strain CEN. PK2-1C[LDH]-nox, in which nox was expressed on the basis of CEN. PK2-1C[LDH].

*PDC1* 被敲除后, *PDC5* 发挥替代作用。换句话说, 敲除 *PDC1* 或 *PDC5* 两者中任一基因, 都不会显著降低 *PDC* 活性和流向副产物乙醇的碳流量。但若同时缺失 *PDC1/5*, 虽能有效地阻断流向乙醇的碳流, 但导致 *S. cerevisiae* 无法通过丙酮酸脱氢酶代谢旁路合成乙酰辅酶 A 而在以葡萄糖为唯一碳源上生长<sup>[16]</sup>。在对比分析 *ADH1* 和 *LDH* 对 *NADH* 的  $K_m$  值发现, *ADH* 对 *NADH* 的  $K_m$  为 0.122 mmol/L<sup>[17]</sup>, 而源于 Bovine 的 *LDH* 对 *NADH* 的  $K_m$  值为 0.017 mmol/L<sup>[18]</sup>, 微生物源的 *nox* 对 *NADH* 的  $K_m$  大多介于 0.017m 至 0.122 之间<sup>[19-23]</sup>。因此, *LDH*、*ADH* 和 *nox* 对 *NADH* 的  $K_m$  值大小的关系可能为:  $ADH > nox > LDH$ 。基于这一分析, 若能有效降低胞内  $NADH/NAD^+$  比率, 将有望提升丙酮酸节点流向 L-乳酸的碳代谢流量, 从而促进 L-乳酸的积累。

作者将 *Streptococcus pneumoniae* 的 *nox* 基因表达于突变株 CEN. PK2-1C[LDH] 中, 构建了突变株 CEN. PK2-1C[LDH]-nox, 使  $NADH/NAD^+$  比率从 0.08 降为 0.03 在相同的发酵条件下,  $NADH/NAD^+$  比率的下降使突变株 CEN. PK2-1C[LDH]-nox 的 L-乳酸积累量由 15 g/L 提高到 20 g/L, 提高了 33%。而副产物乙醇积累量则从 16.2 g/L 减少为 8.2 g/L, 下降幅度为 49%。这可能是因为, 胞内较低的 *NADH* 水平抑制了 *ADH* 活性使得流向乙醇的碳流逐渐减少。但较低的 *NADH* 水平没有改变 *LDH* 活性, 因而流向 L-乳酸的碳通量增加, 显著提高了 L-乳酸的产量。通过酶活性与辅因子水平两方面的调控, 构建了具备一定 L-乳酸积累能力的基因工程菌株, 与单独通过基因敲除来提高目的产物途径碳流的代谢工程策略相比, 具备如下优势:

*PDC1/5* 完全缺失时 *S. cerevisiae* 的生长能力很差, 无法在以葡萄糖为唯一碳源的培养基中生长, 但单独敲除 *PDC1* 后再降低 *NADH* 的水平同样可起到降低乙醇积累水平的作用且细胞具备以葡萄糖为唯一碳源的生长能力。然而, 本研究中 L-乳酸的积累量与国外一些利用 *S. cerevisiae* 生产 L-乳酸的研究小组相比, 仍有提高的潜力。增加 L-乳酸脱氢酶的活性可以起到较好的效果, 即利用整合表达手段提高 *LDH* 的拷贝数, Ishida 等在增加 *LDH* 拷贝数后乳酸积累量提高了 60%<sup>[8-9]</sup>, 但要确保细胞的正常生长能力。另一方面, 如何快速地将葡萄糖转化为 L-乳酸, 首先要提高葡萄糖到丙酮酸的转化速率, 因此, 提高糖酵解速率可成为改善 L-乳酸生产强度的手段。

**致谢** 感谢意大利罗马大学细胞与发展生物系的 Michele Bianchi 教授馈赠质粒 pLAZ10LDH。

## 参考文献

- [1] Dequin S, Barre P. Mixed Lactic Acid - CAlcoholic Fermentation by *Saccharomyes cerevisiae* Expressing the *Lactobacillus casei* L ( + ) - CLDH. *Nature Biotechnoogyl*, 1994, 12(2):173-177.
- [2] Hester A. IB market forecast. *Industrial. Bioprocessing*, 2000, 22:4-5.
- [3] Skory CD. Lactic acid production by *Saccharomyces cerevisiae* expressing a *Rhizopus oryzae* lactate dehydrogenase gene. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, 2003, 30(1):22-27.
- [4] 白冬梅, 赵学明. 米根霉发酵生产 L ( + ) - 乳酸研究进展. *现代化工 (Modern Chemical Industry monthly)*, 2002, 22(006):9-13.

- [ 5 ] 古绍彬, 潘仁瑞, 汪青宏, 张洁, 姚建铭, 潘仁瑞. 产 L-乳酸米根霉 PW352 特性及低能离子注入诱变高产菌株研究. *工业微生物 (Industrial Microbiology)*, 2004, 34(001): 12-16.
- [ 6 ] Porro D, Brambilla L, Ranzi B, Martegani E, Alberghina L. Development of metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* cells for the production of lactic acid. *Biotechnoogyl Progress*, 1995, 11(3): 294-298.
- [ 7 ] Adachi E, Torigoe M, Sugiyama M, Nikawa J, Shimizu K. Modification of metabolic pathways of *Saccharomyces cerevisiae* by the expression of lactate dehydrogenase and deletion of pyruvate decarboxylase genes for the lactic acid fermentation at low pH value. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1998, 86(3): 284-289.
- [ 8 ] Ishida N, Saitoh S, Tokuhiko K, Nagamori E, Matsuyama T, Kitamoto K, Takahashi H. Efficient production of L-lactic acid by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* with a genome-integrated L-lactate dehydrogenase gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(4): 1964-1970.
- [ 9 ] Ishida N, Saitoh S, Onishi T, Tokuhiko K, Nagamori E, Kitamoto K, Takahashi H. The effect of pyruvate decarboxylase gene knockout in *Saccharomyces cerevisiae* on L-lactic acid production. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2006, 70(5): 1148-1153.
- [ 10 ] Vemuri GN, Eiteman MA, McEwen JE, Olsson L, Nielsen J. Increasing NADH oxidation reduces overflow metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceeding of the National Academy of Science of United States of America*, 2007, 104(7): 2402-2407.
- [ 11 ] Bianchi M, Brambilla L, Protani F, Liu C, Lievense J, Porro D. Efficient homolactic fermentation by *Kluyveromyces lactis* strains defective in pyruvate utilization and transformed with the heterologous LDH gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(12): 5621-5625.
- [ 12 ] Gietz RD, Woods RA. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Guide to Yeast Genet. Guide to Yeast Genet and Molecular and Cellular Biology. Pt. B*, 2002, 350: 87-96.
- [ 13 ] Stanley P. [2] Extraction of adenosine triphosphate from microbial and somatic cells. *Methods in enzymology*, 1986, 133: 14-22.
- [ 14 ] Lopez de Felipe F, Kleerebezem M, de Vos W, Hugenholtz J. Cofactor engineering: a novel approach to metabolic engineering in *Lactococcus lactis*. *Lactococcus lactis* by controlled expression of NADH oxidase. *The Journal of Bacteriology*, 1998, 180: 3804-3808.
- [ 15 ] Urbance JW, Bratina BJ, Stoddard SF, Schmidt TM. Taxonomic characterization of *Ketogulonigenium vulgare* gen. nov., sp. nov. and *Ketogulonigenium robustum* sp. nov., which oxidize L-sorbose to 2-keto-L-gulonic acid. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, 51(3): 1059.
- [ 16 ] Flikweert M, van der Zanden L, Janssen W, Steensma H, van Dijken J, Pronk J. Pyruvate decarboxylase: an indispensable enzyme for growth of *Saccharomyces cerevisiae* on glucose. *Yeast*, 1998, 12(3): 247-257.
- [ 17 ] Drewke C, Ciriacy M. Overexpression, purification and properties of alcohol dehydrogenase IV from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1988, 950(1): 54-60.
- [ 18 ] Olgati K, Toscano W. Kinetics of gossypol inhibition of bovine lactate dehydrogenase X. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1983, 115(1): 180-185.
- [ 19 ] Thiagalingam S, Yang T. Purification and characterization of NADH dehydrogenase from *Bacillus megaterium*. *Canadian Journal of Microbiology/Revue Canadienne de Microbiologie*, 1993, 39(9): 826-833.
- [ 20 ] Nisimoto Y, Wilson E, Heyl B, Lambeth J. NADH dehydrogenase from bovine neutrophil membranes. Purification and properties. *Journal of Biological Chemistry*, 1986, 261(1): 285.
- [ 21 ] Drews G, Ohshima T. Isolation and Partial Characterization of the Membrane-Bound NADH Dehydrogenase From the Phototrophic Bacterium *Rhodospseudomonas capsulata*. *Zeitschrift fur Naturforschung. Section C: A Journal of Biosciences*, 1981, 36(5): 400-406.
- [ 22 ] Schwartz A, Krause A. Partial purification and properties of NADH dehydrogenase from *Propionibacterium shermanii*. *Zeitschrift f<sup>r</sup> allgemeine Mikrobiologie*, 1975, 15(2): 99-110.
- [ 23 ] Hochstein L, Dalton B. Studies of a halophilic NADH dehydrogenase; I. Purification and properties of the enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, 1973, 302(2): 216-228.



# Modification of carbon flux in *Sacchromyces cerevisiae* to improve L-lactic acid production

Liangliang Zhao<sup>1</sup>, Jun Wang<sup>1</sup>, Jingwen Zhou<sup>2</sup>, Liming Liu<sup>1,2\*</sup>, Guocheng Du<sup>2</sup>, Jian Chen<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University <sup>2</sup> Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

**Abstract:** [ **Objective** ] We developed an engineered *Sacchromyces cerevisiae* strain to produce L-lactic acid efficiently by using glucose as carbon source. [ **Methods** ] For construction of the strain CEN. PK2-1C[ LDH ], we integrated an *LDH* gene coding L-lactic acid dehydrogenase from bovine into the genome of *S. cerevisiae* via homologous recombination and meanwhile knocked out a *PDC1* gene coding pyruvate decarboxylase. The carbon fluxes were led into L-Lactic acid. We analyzed the Km value of these key enzymes to NADH and over-expressed an NADH oxidase (nox) from *Streptococcus pneumoniae* into the cytoplasm for the construction of *S. cerevisiae* CEN. PK2-1C[ LDH ]-nox. [ **Results** ] Compared to the initial strain, the yield of L-lactic acid in CEN. PK2-1C[ LDH ] fermentation broth increased from 0 g/L to 15 g/L and the concentration of ethanol decreased from 27.3 g/L to 16.2 g/L. Compared to CEN. PK2-1C[ LDH ], the yield of L-lactic acid in CEN. PK2-1C[ LDH ]-nox fermentation broth increased from 15 g/L to 20 g/L and the concentration of ethanol decreased from 16.2 g/L to 8.2 g/L. [ **Conclusions** ] The carbon metabolic flux was redistributed to efficient accumulation of L-lactic acid through two-sided control that heterologous expression of the gene *LDH* and decreasing the ratio of NADH/NAD<sup>+</sup>.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*, L-lactic acid, carbon flux, NADH

( 本文责编: 张晓丽 )

Supported by the National Natural Science Foundation Project(20836003), by the National outstanding doctorate paper author special fund in 2009 (200962), by the National Natural Science Foundation of China (20706025) and by the Fok Ying Tung Education Fund(11075)

\* Corresponding author. Jian Chen, Tel: +86-510-85918307, Fax: +86-510-85918309, E-mail: jchen@jiangnan.edu.cn; Liming Liu, Tel: +86-510-85918307, Fax: +86-510-85918309, E-mail: mingll@jiangnan.edu.cn

Received: 1 September 2010/Revised: 6 October 2010