

代谢工程改造马克斯克鲁维酵母生产 L-乳酸

王雨欣¹, 李晓敏², 刘佳², 高聪^{2*}, 刘立明^{1,2*}

¹ 安徽科技学院 食品工程学院, 安徽 滁州 233100

² 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 214122

王雨欣, 李晓敏, 刘佳, 高聪, 刘立明. 代谢工程改造马克斯克鲁维酵母生产 L-乳酸[J]. 生物工程学报, 2025, 41(5): 2010-2025.

WANG Yuxin, LI Xiaomin, LIU Jia, GAO Cong, LIU Liming. Metabolic engineering of *Kluyveromyces marxianus* for L-lactic acid production[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(5): 2010-2025.

摘要: L-乳酸作为一种重要的有机酸, 在食品、医药和生物塑料等领域广泛应用。传统的 L-乳酸生产主要依赖乳酸菌, 但由于乳酸菌对底物要求高且对酸性环境的耐受性差, 导致其工业化应用面临一定挑战。相比之下, 马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)因其快速生长、耐高温、底物利用广泛等优势, 成为了乳酸生产的潜在宿主。为了优化马克斯克鲁维酵母的 L-乳酸生产能力, 本研究对其进行了代谢工程改造。首先, 筛选并表征了高效的乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDH), 然后利用 CRISPR 基因编辑技术在不同基因位点过表达 LDH 并敲除编码丙酮酸脱羧酶的基因 *PDC1*, 构建了菌株 LA2.1, 其 L-乳酸产量达到 72.55 g/L。通过筛选并组合耐酸靶点, 进一步提升了菌株的耐酸性和乳酸产量。最终, 通过工艺优化, 菌株 LA4.3 发酵 72 h 积累了 112.41 g/L 的 L-乳酸, 得率为 84.00%。在降低 CaCO₃ 使用量的条件下, L-乳酸产量达到 101.50 g/L, 发酵结束后的 pH 值为 3.52。本研究为 L-乳酸的高效生产提供了理论基础和技术支持。

关键词: L-乳酸; 马克斯克鲁维酵母; 耐酸性; 代谢工程

Metabolic engineering of *Kluyveromyces marxianus* for L-lactic acid production

WANG Yuxin¹, LI Xiaomin², LIU Jia², GAO Cong^{2*}, LIU Liming^{1,2*}

¹ School of Food Engineering, Anhui Science and Technology University, Chuzhou 233100, Anhui, China

² Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: L-lactic acid is a vital organic acid with broad applications in food, pharmaceutical,

资助项目: 榆林中科洁净能源创新研究院能源革命专项(E411040705)

This work was supported by the Energy Revolution S&T Program of Yulin Innovation Institute of Clean Energy (E411040705).

*Corresponding authors. E-mail: GAO Cong, conggao@jiangnan.edu.cn; LIU Liming, mingll@jiangnan.edu.cn

Received: 2024-12-10; Accepted: 2025-01-24; Published online: 2025-02-05

and bioplastic industries. The conventional production of L-lactic acid predominantly relies on lactic acid bacteria, which are limited in the industrial application due to their strict substrate requirements and poor tolerance to acidic environments. *Kluyveromyces marxianus* has gained attention as a potential host for lactic acid production due to its rapid growth, acid tolerance, and ability to utilize inexpensive substrates. In this study, we aimed to enhance the lactic acid production capacity of *K. marxianus* through metabolic engineering and process optimization. We first overexpressed the lactate dehydrogenase (LDH) gene and employed CRISPR to knock out the pyruvate decarboxylase gene (*PDC1*), thus obtaining the engineered strain LA2.1, which achieved the L-lactic acid production of 72.55 g/L. By screening and combining acid tolerance targets, we improved the acid tolerance and lactic acid production of this strain. Through process optimization, the strain LA4.3 achieved the L-lactic acid production of 112.41 g/L and a yield of 84.00% within 72 h of fermentation. Additionally, in the case of reducing the calcium carbonate dosage, the L-lactic acid production reached 101.50 g/L, with pH 3.52 after fermentation. These findings highlight the potential of *K. marxianus* as a promising host for efficient L-lactic acid production and provide a solid theoretical and technical foundation for the industrial application of *K. marxianus* in bio-based chemical production.

Keywords: L-lactic acid; *Kluyveromyces marxianus*; acid tolerance; metabolic engineering

乳酸(lactic acid, LA)是一种具有广泛应用价值的天然有机酸,存在 L-和 D-这 2 种光学异构体^[1]。L-乳酸因其优越的生物降解性、低毒性及较高的光学纯度,在食品、医药、化妆品以及生物基塑料(如聚乳酸)生产中被广泛应用^[2]。在食品领域中,L-乳酸作为重要的酸味剂和 pH 调节剂,不仅可以增强食品的风味,还能通过其抗菌作用延长食品的保质期;在医药领域中,L-乳酸的生物相容性使其成为药物缓释材料和医用植入体的理想选择,同时也被用于医用消毒剂及药物辅料,发挥抗菌、调节酸碱平衡的作用;在化妆品行业,L-乳酸被广泛用于护肤品、去角质产品以及其他美容用品中;在工业领域,L-乳酸是生产生物塑料聚乳酸的关键原料。聚乳酸(poly lactic acid, PLA)因其可降解性被广泛应用于环保包装材料、一次性餐具以及 3D 打印等^[3]。

目前乳酸的生产方式主要为化学合成法和微生物发酵法。在化学合成法中,研究者利用乙醛与氰化氢为原料,通过催化水解制备乳腈再转化为乳酸^[4]。然而,该方法因使用有毒的氰化物且反应条件能耗高,在工业上应用受限^[5]。

相反,微生物发酵法因其原料来源广泛、生产成本低廉、安全性高而成为乳酸工业化生产的重要方法。在微生物发酵法中,研究者通常采用代谢工程策略,通过对酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、乳酸菌(*Lactobacillus* spp.)以及米根霉(*Rhizopus oryzae*)等工业微生物进行基因改造,以增强其代谢通路,实现高效生产 L-乳酸。这些改造策略包括:优化糖代谢途径、敲除竞争性代谢支路、引入高效乳酸脱氢酶基因^[6]以及通过适应性进化策略提高菌株的酸耐受性^[7],从而显著提升乳酸产量和光学纯度。其中,Liu 等^[8]通过引入 *LacLDH*,同时敲除副产物代谢途径,得到 *S. cerevisiae* TAM-L17 菌株,该菌株在 pH 值为 4.5 的 15 L 生物反应器中产生了 192.3 g/L 的 L-乳酸,得率为 0.78 g/g,是迄今为止 *S. cerevisiae* 中报道的最高水平。Tian 等^[9]采用适应性进化方法筛选了一株在 45 °C 高温下高效产 L-乳酸的乳酸菌 NCBI001-M2-*ldhL1*-HT,在高初始葡萄糖浓度的发酵条件下,该菌株 L-乳酸产量达到 221 g/L。此外,Zhu 等^[10]以米根霉为宿主菌株,通过敲除多个副产物基因,同时过表达异源 *pfkB*

基因, 将乳酸产量提升至 110.8 g/L。

马克斯克鲁维酵母作为一种非传统酵母, 能够高效利用多种底物, 特别是在乳制品废弃物和植物性废弃物的利用方面, 展现出巨大的经济潜力^[11]。此外, 该酵母具有良好的耐热性和低乙醇积累量, 使其在高糖发酵过程中更具优势。例如, Charoensopharat 等^[12]构建了一株使用菊芋进行发酵的马克斯克鲁维酵母 DBKKUY-102, 在 40 °C 条件下的乙醇产量达到了 97.46 g/L。Zhang 等^[13]通过过表达假定的转录调节因子 *KmMsr*, 提高了马克斯克鲁维酵母对多种抑制剂的耐受性, 在不进行碱处理的玉米芯同步糖化共发酵中, 其乙醇产量在 42 °C 下提高了 5 倍, 在 37 °C 下提高了 2 倍。马克斯克鲁维酵母也被用于构建 L-乳酸细胞工厂。例如, Bae 等^[14]敲除了马克斯克鲁维酵母中的 *PDC1* 基因与 *CYB2* 基因, 通过过表达 L-LDH 获得了生产 L-乳酸的菌株, 该菌株利用菊芋发酵生产 L-乳酸, 其产量达到了 130 g/L, 光学纯度超过 99%, 是迄今为止马克斯克鲁维酵母中报道的最高水平。然而, 这一成果是基于较高的接种量($OD_{600}=25$)实现的, 同时发酵温度也较低(35 °C), 限制了其在工业化生产中的实际应

用潜力。而王冬梅等^[15]则在 42 °C 和低接种量 ($OD_{600}=1.0$) 的条件下进行木糖/葡萄糖共发酵 (simultaneous saccharification, SSCF) 时, 实现了直接利用菊芋生产 L-乳酸, 其产量为 125.93 g/L。尽管利用马克斯克鲁维酵母已经实现了 L-乳酸的发酵生产, 但重组菌株耐酸能力普遍较弱, 导致在发酵过程中需要加入大量中和剂, 提高了生产成本。因此, 如何提升 L-乳酸的产量及酸耐受性, 成为工程化马克斯克鲁维酵母生产 L-乳酸的重点研究方向。

本研究通过引入乳酸脱氢酶并通过代谢工程策略, 构建了一株重组马克斯克鲁维酵母 LA4.3, 该菌株在 5 L 发酵罐中发酵 72 h, L-乳酸产量为 112.41 g/L, 得率为 84.00%。在降低 $CaCO_3$ 使用量至 75 g/L 时, L-乳酸产量仍达 101.50 g/L, 发酵后 pH 降至 3.52, 显示出了良好的耐酸性和工业应用潜力。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和引物

本研究所使用的重组质粒、工程菌株及引物分别见表 1–3。

表 1 本研究所使用的质粒

Table 1 Plasmids used in this study

Plasmids	Relevant characteristics	Sources
pY26	2 μ ori, Amp ^R , <i>P_{GPD}</i> , <i>T_{CYC1}</i>	Lab store
pET28a	pBR322 ori, Kan ^R , <i>P_{T7-lac}</i> operator, 6 $\times$ His	Lab store
PUC001	panARS operator, <i>P_{TEF}</i> -Cas9- <i>T_{PHO5}</i> , Amp ^R , <i>P_{GPD}</i> -N20- <i>T_{CYC1}</i>	Lab store
pY26- <i>LpLDH</i>	2 μ ori, Amp ^R , <i>P_{GPD}</i> - <i>LpLDH</i> - <i>T_{CYC1}</i>	This study
pY26- <i>PsLDH</i>	2 μ ori, Amp ^R , <i>P_{GPD}</i> - <i>PsLDH</i> - <i>T_{CYC1}</i>	This study
pY26- <i>RoLDH</i>	2 μ ori, Amp ^R , <i>P_{GPD}</i> - <i>RoLDH</i> - <i>T_{CYC1}</i>	This study
pET28a- <i>LpLDH</i>	pBR322 ori, Kan ^R , <i>P_{T7}</i> - <i>LpLDH</i>	This study
pET28a- <i>PsLDH</i>	pBR322 ori, Kan ^R , <i>P_{T7}</i> - <i>PsLDH</i>	This study
pET28a- <i>RoLDH</i>	pBR322 ori, Kan ^R , <i>P_{T7}</i> - <i>RoLDH</i>	This study
PUC001- <i>PDC1</i>	panARS operator, <i>P_{TEF}</i> -Cas9- <i>T_{PHO5}</i> , Amp ^R , <i>P_{GPD}</i> -N20 (<i>PDC1</i>)- <i>T_{CYC1}</i>	This study
pPcT	panARS operator, <i>P_{TEF}</i> -URA3, Amp ^R , <i>P_{PGK}</i> , <i>T_{CYC1}</i>	This study
pPHcT	panARS operator, <i>P_{TEF}</i> -URA3, Amp ^R , <i>P_{PGK}</i> -HAA1- <i>T_{CYC1}</i>	This study
pPScT	panARS operator, <i>P_{TEF}</i> -URA3, Amp ^R , <i>P_{PGK}</i> -SFP1- <i>T_{CYC1}</i>	This study
pPWcT	panARS operator, <i>P_{TEF}</i> -URA3, Amp ^R , <i>P_{PGK}</i> -WHI1- <i>T_{CYC1}</i>	This study
pPPcT	panARS operator, <i>P_{TEF}</i> -URA3, Amp ^R , <i>P_{PGK}</i> -PDR3- <i>T_{CYC1}</i>	This study
pPEcT	panARS operator, <i>P_{TEF}</i> -URA3, Amp ^R , <i>P_{PGK}</i> -ESBP6- <i>T_{CYC1}</i>	This study
pPACt	panARS operator, <i>P_{TEF}</i> -URA3, Amp ^R , <i>P_{PGK}</i> -ACE2- <i>T_{CYC1}</i>	This study
pPCCt	panARS operator, <i>P_{TEF}</i> -URA3, Amp ^R , <i>P_{PGK}</i> -ACS2- <i>T_{CYC1}</i>	This study

表 2 本研究所使用的菌株

Table 2 Strains used in this study

Strains	Relevant characteristics	Sources
LA1	Wild-type <i>K. marxianus</i> NBRC 1777 strain	Lab store
LA1.1	LA1 $\Delta ADE2::LpLDH$	This study
LA1.2	LA1 $\Delta ADH1::PsLDH$	This study
LA1.3	LA1 $\Delta ADH2::RoLDH$	This study
LA2.1	LA1.1 $\Delta PDC1$	This study
LA3	LA2.1 carrying pPCt	This study
LA3.1	LA2.1 carrying pPHCt	This study
LA3.2	LA2.1 carrying pPSCt	This study
LA3.3	LA2.1 carrying pPWCt	This study
LA3.4	LA2.1 carrying pPPCt	This study
LA3.5	LA2.1 carrying pPECt	This study
LA3.6	LA2.1 carrying pPACt	This study
LA3.7	LA2.1 carrying pPCCt	This study
LA4.1	LA2.1 $\Delta ADH1::PDR3$	This study
LA4.2	LA2.1 $\Delta ADH2::ESBP6$	This study
LA4.3	LA2.1 $\Delta ADH1::PDR3+ESBP6$	This study

1.1.2 仪器和试剂

凝胶成像仪、恒温金属浴、凝胶电泳仪、PCR 扩增仪购自 Applied Biosystems 公司；超净工作台购自北京丽健源生物科技有限公司；生物传感器购自 Bertin Technologies 公司；恒温培养箱购自北京京科瑞达科技发展有限公司；紫外分光光度计购自岛津公司；高效液相色谱仪购自安捷伦科技(上海)有限公司；酶标仪购自 BioTek 公司；流式细胞仪购自 ThermoFisher Scientific 公司；5 L 发酵罐购自迪必尔生物工程(上海)有限公司。

本研究所用试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司；PCR 引物由亦欣生物科技(上海)有限公司合成；L-乳酸标品购自上海麦克林生化科技股份有限公司；其他试剂购自国药集团化学试剂有限公司。

1.1.3 培养基

酵母氮源基础培养基(yeast nitrogen base medium, YNB) (g/L)：酵母基础氮源 6.7，葡萄糖 20。

酵母浸出粉胨葡萄糖培养基(yeast extract

peptone dextrose medium, YPD) (g/L)：蛋白胨 20，酵母粉 10，葡萄糖 20。

合成培养基(ZWYP) (g/L)：硫酸铵 5，磷酸二氢钾 3，七水合硫酸镁 0.5，葡萄糖 100。

ZWYP 培养基微量元素溶液(mg/L)：乙二胺四乙酸 15，七水合硫酸锌 4.5，六水合氯化钴 0.3，四水合氯化锰 1，五水合硫酸铜 0.3，二水合氯化钙 4.5，七水合硫酸亚铁 3，二水合钼酸钠 0.4，硼酸 1，碘化钾 0.1，过滤除菌；生物素 0.05，泛酸钙 1，尼克酸 1，肌醇 25，维生素 B11，吡哆醇 1，对氨基苯甲酸 0.2，尿嘧啶 20。

发酵培养基(ZWSG) (g/L)：硫酸铵 2，磷酸二氢钾 0.5，七水合硫酸镁 1，酵母粉 5，葡萄糖 100。

ZWSG 培养基微量元素溶液(mg/L)：七水合硫酸亚铁 10，五水合硫酸锰 0.05，二水合氯化钙 0.2，五水合硫酸铜 0.1，七水合硫酸锌 0.2，四水合钼酸铵 0.01，十水合硼砂 0.02，肌醇 100，烟酰胺 50，组氨酸 50，色氨酸 100，苏氨酸 100，亮氨酸 100，缬氨酸 100，泛酸钙 50，尿嘧啶 100。

表3 本研究所用引物

Table 3 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')
pY26- <i>Lp</i> LDH-F	TCGACGGATTCTAGAACTAGTGGATCCATGACTGATGTCAAATTGCA
pY26- <i>Lp</i> LDH-R	ATAAGCTTGATATCGAATTCTTACTTAACGGCTGACTTAAATTCTTCTTGAG
pY26- <i>Ps</i> LDH-F	ATTCTAGAACTAGTGGATCCATGTCAGTCAAGGAATTGTTGATCCAA
pY26- <i>Ps</i> LDH-R	ATAAGCTTGATATCGAATTCTTAGAATTGCAATTCCTTTTGAATACCCCA
pY26- <i>Ro</i> LDH-F	ATTCTAGAACTAGTGGATCCATGGTTTTGCACTCCAAGGT
pY26- <i>Ro</i> LDH-R	ATAAGCTTGATATCGAATTCTTAACAAGAGGACTTAGAGAAGGAAGTAGC
pET28a- <i>Lp</i> LDH-F	AGCAAATGGGTCGCGGATCCATGACTGATGTCAAATTGCAC
pET28a- <i>Lp</i> LDH-R	GGTGGTGGTGGTGGCTCGAGCTTAACGGCTGACTTAAATTC
pET28a- <i>Ps</i> LDH-F	GTGGACAGCAAATGGGTCGCATGTCAGTCAAGGAATTGTT
pET28a- <i>Ps</i> LDH-R	CGGAGCTCGAATTCGGATCCTTAGAATTGCAATTCCTTTT
pET28a- <i>Ro</i> LDH-F	GTGGACAGCAAATGGGTCGCATGGTTTTGCACTCCAAGGT
pET28a- <i>Ro</i> LDH-R	CGGAGCTCGAATTCGGATCCTTAACAAGAGGACTTAGAGA
ADE2-N20-R	CGAGTAAGCTCGTCCTCAATTCGAAGCCCATATCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT
ADH1-N20-R	AACCTTGCTATTTCTAGCTCTAAAACCCCAACCAATGGCAACTTGGTGACGAGCTTACTCG
ADH2-N20-R	AACCTTGCTATTTCTAGCTCTAAAACCCGACCAATGGCAACTTGGTGACGAGCTTACTCG
N20-F	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAATAAGGCTAGTCCG
ADE2-UP-F	AATTTTTTCCCTCATTGTATCTCATACGCG
ADE2-UP-R	TGCAATTGACATCAGTCATGATTAACAAGGTTTATATTGTTGTAGTACTATCACTA
ADE2-Down-F	TTAAGTCAGCCGTTAAGTAAGTATTCAACTATCTCCAACAAGAAGCG
ADE2-Down-R	ATTAAATTACATTGTTTTTTTCAAATTTATGAAGTTTGTGCCA
ADE2-F	CAATATAAACCTTGTTAATCATGACTGATGTCAAATTGCACAAGAAG
ADE2-R	TGTTGGAGATAGTTGAATACTTACTTAACGGCTGACTTAAATTCTTCTT
ADH1-UP-F	AGCACGAATCCACTATACACCACC
ADH1-UP-R	AACAATTCCTTGACTGACATTGTGTTGTGTATGATTTTGTTTTTAAATGTAGTAACC
ADH1-Down-F	AAAAGGAATTGCAATTCTAAGCAAGGACCCTTTTGATATGGT
ADH1-Down-R	TCCGAGGCAGCTTCTTCTTCTT
ADH1-F	ACAAAATCATACACAACACAATGTCAGTCAAGGAATTGTTGATCCA
ADH1-R	CATATCAAAAGGGTCCTTGCTTAGAATTGCAATTCCTTTTGAATACCCCA
ADH2-UP-F	AATTTTTTCCCTCATTGTATCTCATACGCG
ADH2-UP-R	ACCTTGAGGTGCAAAACCATGATTAACAAGGTTTATATTGTTGTAGTACTATCACT
ADH2-Down-F	TCTCTAAGTCCTCTTGTTAAGTATTCAACTATCTCCAACAAGAAGCG
ADH2-Down-R	ATTAAATTACATTGTTTTTTTCAAATTTATGAAGTTTGTGCCA
ADH2-F	CAATATAAACCTTGTTAATCATGGTTTTGCACTCCAAGGTTG
ADH2-R	TGTTGGAGATAGTTGAATACTTAACAAGAGGACTTAGAGAAGGAAGTAGC
PDC1-UP-F	GAAGGCTGCCAGTGACTGCTA
PDC1-UP-R	GAGTATTGATAATGATAAACTGCAATTATTTGGTTTGGGTGTGGAG
PDC1-Down-F	CCTATAGTGAGTCGTATTACAGAGGGAGAGGATAAAGAGATAAATTACGA
PDC1-Down-R	GAAGTCGATCTCGTCTCCTTCAAAG
PDC1- <i>Lp</i> LDH-F	ACCCAAACCAAATAATTGCAGTTTATCATTATCAATACTCGCCATTTCAAAG
PDC1- <i>Lp</i> LDH-R	TCTCTTTATCCTCTCCCTCTGTAATACGACTCACTATAGGGCGA

以上培养基均在 115 °C 条件下灭菌 15 min, 微量元素溶液过滤除菌。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒的构建

以质粒 PUCC001 为模板, 通过 N20-F 与 ADE2-N20-R 引物反向扩增具有靶向识别基因 *PDC1* 的向导 RNA (small guide RNA, sgRNA), 随后将扩增后的产物经 *Dpn* I 消化酶消化后, 以同源重组的方法连接至 PUCC001 质粒中。连接产物采用化学转化方法转化转至大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109 感受态细胞中, 在含有氨苄抗生素的 LB 平板上进行筛选, 挑取阳性转化子, 采用菌落 PCR 进行验证, 提取质粒后进行测序验证。经测序验证, 成功构建靶向识别基因 *PDC1* 的重组质粒 PUCC001-*PDC1*。其余重组质粒的构建方法均与此相同。

1.2.2 基因组整合菌株的构建

基因组整合基因采用 CRISPR-Cas9 系统^[16]。以菌株 LA1 基因组为模板, 通过 *PDC1*-UP-F/R 与 *PDC1*-Down-F/R 引物分别扩增 *PDC1* 上下游各 500 bp 同源臂。以扩增出的 *PDC1*-up 与 *PDC1*-down 胶回收产物为模板, 通过 *PDC1*-UP-F 与 *PDC1*-Down-R 引物进行扩增, 得到 *PDC1* 敲除框。将带有 Cas9 蛋白的重组质粒 PUCC001-*PDC1* 与 *PDC1* 敲除框通过醋酸锂化学转化的方法导入菌株 LA1 中, 在 YNB 平板上进行筛选, 使用 20 mmol/L NaOH 煮沸验证, 提取基因组后进行测序验证。其中敲除 *PDC1* 的片段长度为 1 000 bp, 未敲除 *PDC1* 的片段长度为 2 695 bp。将阳性转化子转入 YPD 培养基中进行传代培养, 在添加 5-氟乳清酸和尿嘧啶的 YNB 平板上菌体正常生长, 在 YNB 平板上菌体不生长, 说明质粒已成功消除, 得到敲除菌株 LA1.1。其余整合菌株的构建方法均与此相同。

1.2.3 马克斯克鲁维酵母转化

将菌液于 YNB 固体培养基中进行三区划线, 37 °C 培养 24 h。挑取酵母单菌落于 30 mL

YPD 培养基中, 37 °C 培养 12 h, 随后转接至新的 YPD 培养基中至 $OD_{600}=0.4-0.6$ 。将菌液置于无菌的 50 mL 离心管中, 4 °C、5 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 用预冷的无菌水洗涤 2 次。加入 10 mL 100 mmol/L 醋酸锂(lithium acetate, LiAc)重悬, 于 37 °C 摇床中培养 10 min。分装于 1.5 mL EP 管中, 5 000 r/min 离心 2 min 收集菌体, 弃去上清。加入 50 μ L 100 mmol/L LiAc、10 μ L 5 mg/mL 鲑鱼精 DNA (salmon sperm DNA, ssDNA)、340 μ L 40% 聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG)、2 μ g DNA 及 1 μ g PUCC001-*PDC1* 进行重悬。37 °C 培养 30 min 后, 42 °C 继续培养 25 min。5 000 r/min 离心 2 min, 弃去上清, 涂布于 YNB 固体培养基中, 37 °C 培养 48 h。

1.2.4 酶活及动力学参数测定

乳酸脱氢酶酶活测定方法: 利用 NADH 在 340 nm 波长下的吸光度变化来反映酶活性。反应体系由 100 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0)、20 mmol/L 丙酮酸、0.2 mmol/L NADH 及 0.2 mg/L 纯酶组成。酶活定义为: 37 °C 条件下, 每 min 催化 1 μ mol NADH 生成乳酸所需要的酶量为 1 个酶活力单位(U)。

乳酸脱氢酶动力学参数测定方法: 在不添加纯酶的条件下, 测定不同浓度(0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3 mmol/L)时 NADH 的吸光度变化, 随即绘制标准曲线。通过改变底物丙酮酸浓度(1、2、3、4、5、10、15、20、25、30 mmol/L), 测定不同浓度下的反应速度, 采用 Michaelis-Menten 方程拟合得到动力学参数。

1.2.5 乳酸脱氢酶纯化方法

将质粒 pET28a-LpLDH 接种于含 50 mg/mL 的卡那霉素的 LB 培养基中, 37 °C 过夜培养。以 1% (体积比)接种量接种至含 50 mg/mL 的卡那霉素的新鲜 LB 培养基中, 往复式摇床 200 r/min、37 °C 恒温培养, 当 $OD_{600}=0.6-0.8$ 时, 加入 200 μ L 1 mol/L 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG), 并于 16 °C

诱导培养 16 h。4 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 收集菌体。加入 buffer A (25 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5、150 mmol/L NaCl) 重悬菌体, 用超声波细胞破碎仪破碎菌体细胞, 将破碎后的菌液于 4 °C、12 000 r/min 离心 5 min, 保留上清, 即为粗酶液。基于重组蛋白中的 His 标签, 选择 Ni^{2+} -NTA 柱亲和层析的方法进行纯化。利用 buffer B (25 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5、150 mmol/L NaCl、50 mmol/L 咪唑) 洗涤杂蛋白, 然后用 buffer C (25 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5、150 mmol/L NaCl、500 mmol/L 咪唑) 洗脱, 获得目标蛋白。最终利用 buffer D (25 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5、150 mmol/L NaCl、5% 甘油) 通过超滤对目标蛋白进行脱盐及浓缩, 4 °C 保存备用。利用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分析蛋白样品的表达与纯化水平。

1.3 菌体培养

1.3.1 种子培养

从保藏管中接种一环菌液, 于 YNB 固体培养基上进行四区划线, 37 °C 培养 24 h。

一级种子液: 挑取单菌落, 接种至装有 50 mL YPD 培养基的 250 mL 三角瓶中, 往复式摇床 200 r/min、37 °C 恒温培养 12 h, 至一级种子液 $OD_{600}=5-6$ 。

二级种子液: 将一级种子液以 10% 接种量接种至装有 100 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中, 往复式摇床 200 r/min、37 °C 恒温培养约 12 h, 至二级种子液 $OD_{600}=10$ 。

1.3.2 摇瓶发酵

取 $OD_{600}=1$ 的种子液至 100 mL/500 mL 发酵培养基的摇瓶中, 200 r/min、37 °C 发酵 72 h, 每 12 h 测定 L-乳酸产量, pH 值控制在 5.0 以上。

1.3.3 5 L 罐补料分批发酵

发酵罐的装液量为 3 L, 将二级种子液以发酵罐总体积的 10% 接种至发酵罐中。将发酵初始条件控制为: pH 5.0, 转速为 300 r/min, 通气量为 1 vvm, 温度控制在 37 °C。当 pH 降低

至 5.0 以下时, 使用碳酸钙控制 pH 值。

1.4 分析方法

1.4.1 L-乳酸产量测定方法

产物的测定: 色谱柱为 Aminex HPX-87H 柱 (Bio-Rad 公司), 柱温 52 °C, 流动相为 5 mmol/L H_2SO_4 , 流速为 0.6 mL/min, 检测器为紫外检测器, 进样量为 20 μL 。将发酵液稀释适宜倍数后 12 000 r/min 离心 10 min, 上清液过膜处理后进行测定。

标准曲线的绘制: 配制 10 g/L L-乳酸及丙酮酸溶液, 分别用水稀释至 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 g/L, 使用 HPLC 进行检测。根据得到的峰面积和相应的浓度绘制标准曲线。

1.4.2 细胞密度测定方法

取 1 mL 发酵液, 加入 2 mol/L 稀盐酸稀释后振荡均匀, 用紫外分光光度计于 600 nm 处测定吸光度 (OD)。

1.4.3 葡萄糖浓度测定方法

使用生物传感器分析仪进行测定, 将发酵液稀释适宜倍数后 12 000 r/min 离心 2 min, 取上清液进行测定。

1.4.4 L-乳酸光学纯度测定方法

光学纯度的测定参考文献[17]的方法: 色谱柱为 MCI GEL CRS10W 手性分离柱, 柱温 25 °C, 流动相为 2 mmol/L CuSO_4 , 流速为 0.5 mL/min, 检测器为紫外检测器, 进样量为 20 μL 。将发酵液稀释适宜倍数后 12 000 r/min 离心 10 min, 上清液过膜处理后进行测定。

1.4.5 L-乳酸光学纯度计算方法

L-乳酸光学纯度的计算如式(1)所示。

$$\text{L-乳酸光学纯度 (\%)} = \frac{\text{L-乳酸}}{\text{L-乳酸} + \text{D-乳酸}} \times 100\% \quad (1)$$

2 结果与分析

2.1 高效乳酸脱氢酶的筛选与表征

为了筛选出高效合成 L 型乳酸的乳酸脱氢酶, 首先对不同来源的 LDH 基因进行了筛选。

通过文献调研和数据库搜索，确定了 3 种潜在的 LDH，分别是来源于米根霉(*Rhizopus oryzae*) 的 RoLDH、鳖(*Pelodiscus sinensis*)的 PsLDH 和植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 的 LpLDH。将这 3 种 LDH 的编码基因经过密码子优化后，克隆至 pY26 表达质粒中，构建了重组质粒 pY26-RoLDH、pY26-PsLDH 和 pY26-LpLDH。SDS-PAGE 分析显示，3 种 LDH 均为可溶性表达。对纯化后的 LDH 进行动力学参数测定(表 4)，结果表明 LpLDH 具有最低的 K_m 值和最高的 k_{cat} ，催化效率 k_{cat}/K_m 达到 (709.41 ± 118.31) mmol/(s·L)，相较于 RoLDH 和 PsLDH，分别提高了 94.97%和 62.55%。

尽管 D-乳酸与 L-乳酸的化学性质相似，但生物功能差异明显。为了准确检测产物的立体构象，采用手性柱辅助的高效液相色谱(HPLC)进行分析。结果显示，3 种来源的 LDH 均能催化丙酮酸生成 L-乳酸，且光学纯度均超过 99% (图 1)。综上所述，LpLDH 表现出最高的催化效率和优越的 L 型立体选择性。

2.2 代谢工程改造马克斯克鲁维酵母合成 L-乳酸

为构建高产 L-乳酸的马克斯克鲁维酵母，选择野生型马克斯克鲁维酵母 LA1 作为起始菌株，利用 CRISPR 基因组编辑技术在 ADE2、ADH1 和 ADH2 位点分别过表达 LpLDH、PsLDH 和 RoLDH，构建了菌株 LA1.1-1.3。随后，在含有 100 g/L 葡萄糖的 YPD 发酵培养基中进行摇瓶发酵。结果如图 2B 所示，对照菌株 LA1 未检测到 L-乳酸的生成。菌株 LA1.1 在发酵 72 h 后，L-乳酸的产量、得率和生产强度分别为 49.31 g/L、37.64%和 0.68 g/(h·L)。而

表 4 乳酸脱氢酶的动力学参数

Table 4 Kinetic parameters of different LDHs			
Organisms	K_m (mmol/L)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m (mmol/(s·L))
<i>Rhizopus oryzae</i>	6.80±2.33	242.67±21.67	35.69±9.43
<i>Pelodiscus sinensis</i>	1.35±0.25	358.67±13.33	265.68±53.32
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0.90±0.13	638.47±15.38	709.41±118.31

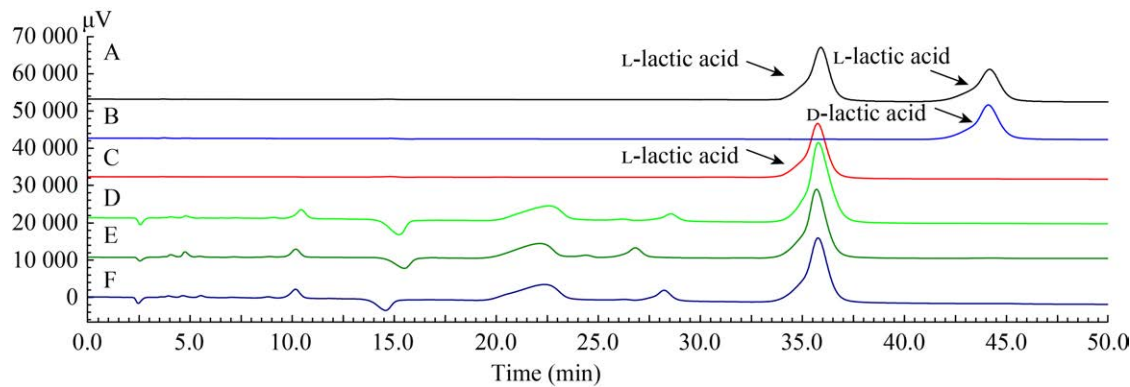


图 1 L-乳酸脱氢酶光学纯度分析 A: L-乳酸与 D-乳酸标准品; B: D-乳酸标准品; C: L-乳酸标准品; D: 植物乳杆菌来源的 L-LDH 催化丙酮酸的产物分析; E: 鳖来源的 L-LDH 催化丙酮酸的产物分析; F: 米根霉来源的 L-LDH 催化丙酮酸的产物分析。

Figure 1 Optical purity analysis of L-lactate dehydrogenase. A: The mixed standard of L-lactic acid and D-lactic acid; B: The standard of D-lactic acid; C: The standard of L-lactic acid; D: The products from pyruvate by L-LDH from *Lactobacillus plantarum*; E: The products from pyruvate by L-LDH from *Pelodiscus sinensis*; F: The products from pyruvate by L-LDH from *Rhizopus oryzae*.

LA1.2 与 LA1.3 的 L-乳酸产量分别为 36.44 g/L 和 26.46 g/L, 较菌株 LA1.1 分别降低了 26.10% 和 46.34%, 这一结果与体外酶学参数一致。

虽然菌株 LA1.1 的 L-乳酸产量较高, 但发酵结束时副产物乙醇积累了 19.92 g/L。为降低菌株 LA1.1 的乙醇积累, 敲除了编码丙酮酸脱羧酶的 *PDC1* 基因, 构建了菌株 LA2.1。菌株 LA2.1 在摇瓶发酵 72 h 后, L-乳酸的产量、得率和生产强度分别为 72.55 g/L、52.19% 和

1.01 g/(h·L), 较菌株 LA1.1 分别提高了 47.13%、38.66% 和 48.53%。与菌株 LA1 相比, 菌株 LA2.1 的最大 OD_{600} 降低了 30.15%, 表明 *PDC1* 基因的敲除对细胞生长产生了一定抑制。同时, LA2.1 未生成乙醇, 主要副产物是 13.24 g/L 丙酮酸。上述研究表明, 通过阻断乙醇代谢途径(图 2A), 增加了流向 L-乳酸合成路径的碳流, 有效提升了菌株 LA2.1 的 L-乳酸的产量。

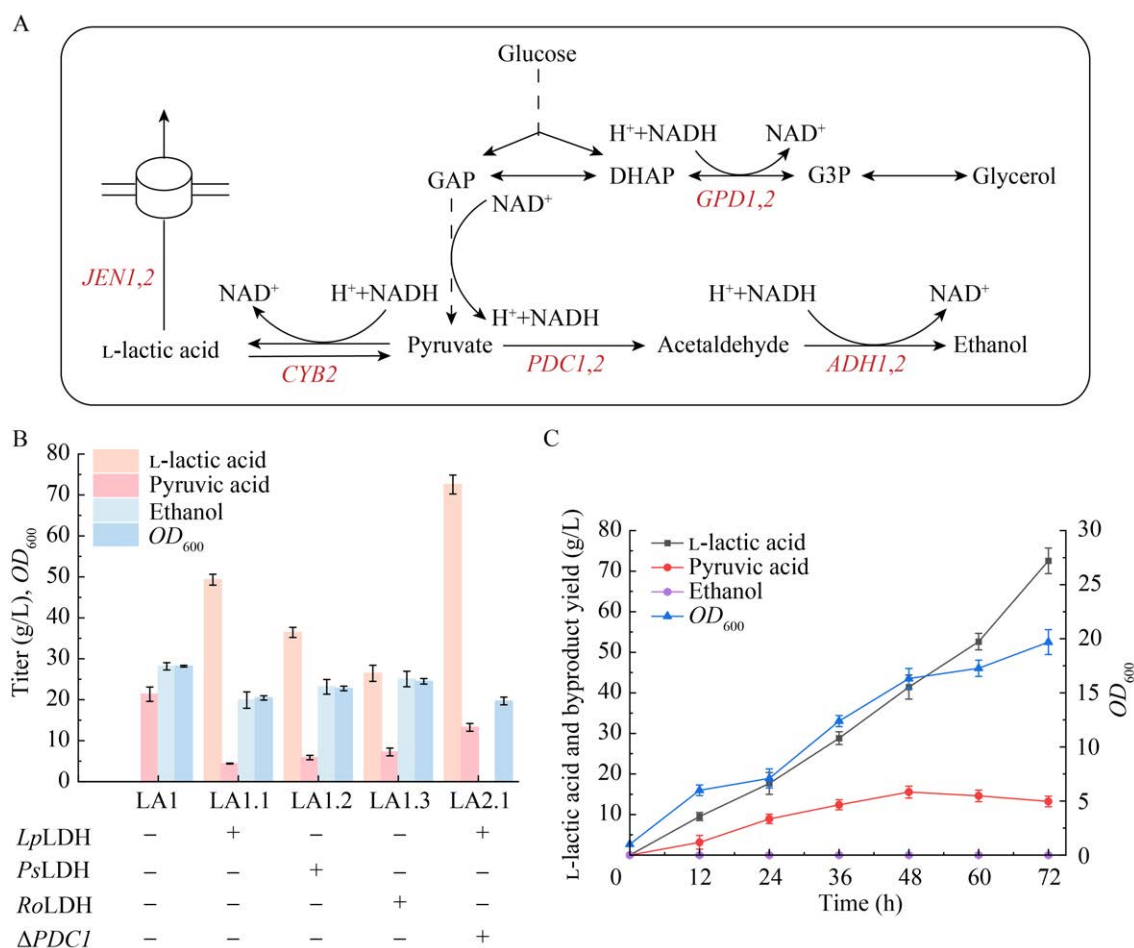


图 2 工程菌株构建与评估 A: 马克斯克鲁维酵母 L-乳酸合成路径; B: 工程菌株 L-乳酸的生产情况; C: 菌株 LA2.1 的发酵曲线。

Figure 2 Construction and evaluation of different engineered strains. A: L-lactic acid synthesis pathway in *Kluyveromyces marxianus*; B: Production of L-lactic acid by engineered strains; C: Fermentation curves of strain LA2.1; GAP: Glyceraldehyde-3-phosphate; DHAP: Dihydroxyacetone phosphate; G3P: Glyceraldehyde-3-phosphate; *GPD1,2*: Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1,2; *PDC1,2*: Pyruvate decarboxylase 1,2; *ADH1,2*: Alcohol dehydrogenase 1,2; *CYB2*: L-lactate cytochrome-c oxidoreductase; *JEN1,2*: Lactate transporter gene 1,2.

2.3 提升工程菌株的乳酸耐受性

马克斯克鲁维酵母的耐酸能力较弱,因此,在摇瓶发酵生产 L-乳酸的过程中,菌株 LA2.1 需全程添加 150 g/L 的 CaCO_3 ,以维持发酵体系 pH 值在 5.0 以上。为了提高工程菌株的耐酸性并减少中和剂 CaCO_3 的使用量,选择了 7 个潜在的耐酸靶点: HAA1、SPF1、WHI1、PDR3、ESBP6、ACE2 和 ACS2。这些靶点主要是转录调节因子、转运蛋白以及一些已知的耐酸相关基因。将这些靶点克隆到表达质粒 pPCt 中,分别构建了质粒 pPACt、pPSCt、pPWct、pPPCt、pPECt、pPACt 和 pPCct。然后,分别将上述质粒转入菌株 LA2.1,构建出菌株 LA3.1-3.7,其中含有空白质粒 pPCt 的菌株 LA3 设为对照菌株。

在全程不添加中和剂的摇瓶发酵中,根据 L-乳酸生产、细胞生长、细胞死亡率和形态变化这 4 个指标对耐酸靶点进行筛选。结果如图 3A 所示: (1) 在 L-乳酸生产方面,菌株 LA3.5 (含 ESBP6)、LA3.4 (含 PDR3)和 LA3.6 (含 ACE2)的 L-乳酸产量分别为 11.21 g/L、10.74 g/L 和 8.35 g/L,较对照菌株 LA3 (7.88 g/L)分别提高了 27.52%、26.63%和 5.96%。最优菌株 LA3.5 发酵终点的 pH 值为 2.59,其余菌株的 L-乳酸产量差别不明显; (2) 在细胞生长方面,菌株 LA3.5 和 LA3.4 的最大菌浓分别较对照菌株 LA3 提高了 16.33%和 12.24%,而菌株 LA3.6 的最大菌浓较对照菌株 LA3 下降了 5.50%。其余菌株的生长性能差别不明显; (3) 在细胞死亡率方面,发酵 12 h 后,菌株 LA3.4 与 LA3.5 的细胞死亡率分别为 82.20%和 85.40%,较对照菌株 LA3 (92.13%)降低了 9.93%和 6.73%,其余菌株的死亡率无显著改善; (4) 在细胞形态变化方面,发酵 12 h 后,菌株 LA3.4 与 LA3.5 的细胞完整度优于对照菌株 LA3 (图 3B)。

在此基础上,在菌株 LA2.1 的 ADH1、ADH2 位点单独或组合插入了 PDR3 与 ESBP6 基因,构建了菌株 LA4.1 (含 PDR3)、LA4.2 (含

ESBP6)和 LA4.3 (含 PDR3+ESBP6)。在 5 L 发酵罐中对上述菌株进行 L-乳酸生产测试,结果如图 3C 所示,在降低全程 CaCO_3 添加量至 75 g/L 的条件下,发酵 72 h 后,菌株 LA3 的 L-乳酸产量、得率和生产强度分别为 65.33 g/L、49.5%和 0.91 g/(h·L)。引入耐酸靶点后的工程菌株 LA4.1、LA4.2 和 LA4.3 在 72 h 后 L-乳酸产量分别为 78.10 g/L、81.22 g/L 和 88.25 g/L,较对照菌株 LA3 分别提高了 19.55%、24.32%和 35.08%。最优菌株 LA4.3 的 L-乳酸得率和生产强度分别达到了 77.5%和 1.23 g/(h·L),较对照菌株 LA3 分别提高了 56.57%和 35.16%。在发酵终点,菌株 LA4.3 的 pH 值达到了 3.66,主要副产物为 6.60 g/L 的丙酮酸。

2.4 L-乳酸发酵工艺优化

为了优化工程菌株 LA4.3 生产 L-乳酸的工艺条件,分别对搅拌转速、pH 中和剂类别、初始接种量和培养基种类进行了调整。

搅拌转速直接影响发酵罐的溶氧水平,从而影响菌株的生长和乳酸的合成。为确定最适宜的转速条件,设置了 200、300、400 r/min 这 3 种不同转速进行发酵测试。结果如图 4A 所示: (1) 在 L-乳酸产量方面,当发酵全程转速为 300 r/min 时,菌株 LA4.3 的 L-乳酸产量为 87.00 g/L,较 400 r/min 和 200 r/min 条件下的产量分别提高了 34.61% (64.63 g/L)和 57.67% (55.18 g/L); (2) 在细胞最大菌浓度方面,提高转速至 400 r/min 条件下,菌株的最大菌浓度分别较 200 r/min 和 300 r/min 提高了 55%和 23%; (3) 在产物得率方面,当发酵全程转速为 300 r/min 时,菌株 LA4.3 的 L-乳酸得率达到 77%,较 400 r/min 和 200 r/min 条件下分别提高了 15%和 31%。以上结果表明,300 r/min 为最优搅拌转速。

选择合适的 pH 中和剂对于控制发酵体系的酸碱度和降低发酵成本至关重要。本研究选择了 NH_4OH 、 NaOH 、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 和 CaCO_3 这 4 种 pH 中和剂以维持发酵体系 pH 值在 5.0 以上。结果如图 4B 所示,使用 CaCO_3 作为 pH 中和剂

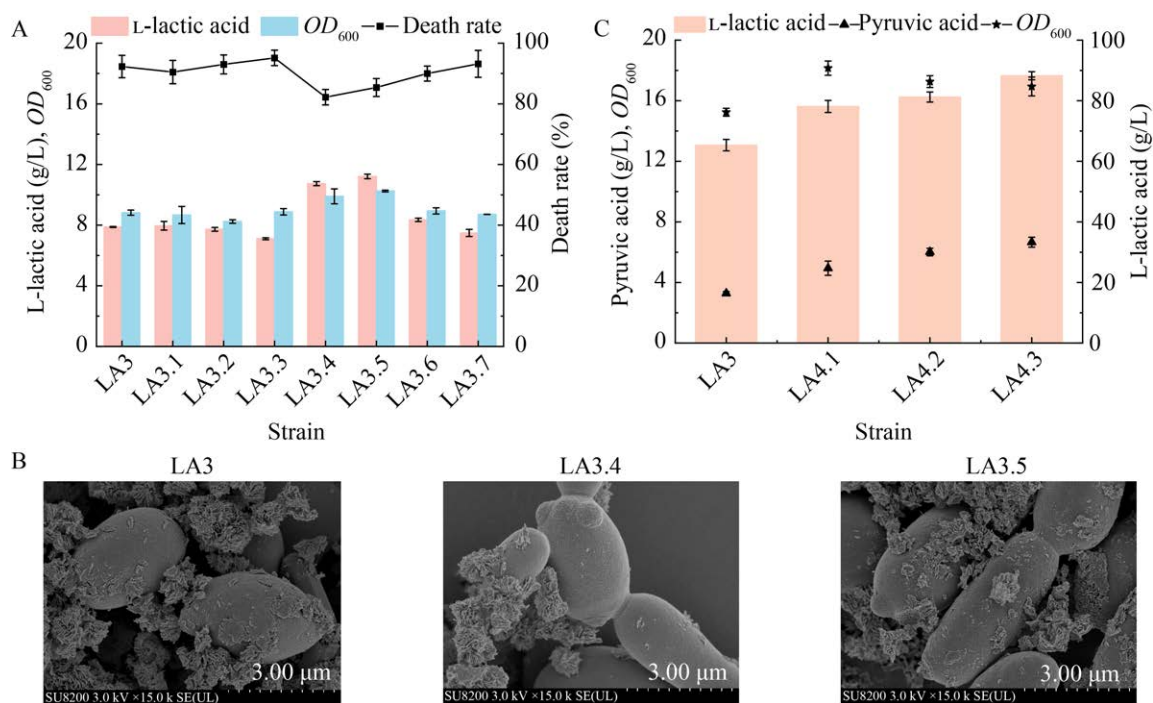


图3 耐酸 L-乳酸生产菌株的筛选与表征 A: 质粒水平上耐酸菌株的 L-乳酸生产情况; B: 发酵 12 h 菌体形态变化情况; C: 菌株 LA4.1、LA4.2、LA4.3 在 5 L 发酵罐中的发酵曲线。

Figure 3 Screening and characterization of acid-resistant L-lactic acid production strains. A: Production of L-lactic acid in acid-resistant strains at plasmid level; B: Morphological changes of yeast cells after 12 h of fermentation; C: Fermentation curves of strains LA4.1, LA4.2, LA4.3 in a 5 L fermenter.

时, 菌株 LA4.3 发酵 72 h 后 L-乳酸产量达 88.20 g/L。尽管 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 和 NaOH 在维持 pH 稳定性方面表现优于 CaCO_3 , 但由于添加体积较多, 最终 L-乳酸产量分别为 76.49 g/L 和 61.46 g/L。NH₄OH 虽然增加了氮源, 但 L-乳酸产量未明显提升, 仅为 52.73 g/L。因此, 综合考虑 L-乳酸的实际产量及 pH 中和剂的成本, 最终选择 CaCO_3 作为最优 pH 中和剂。

初始接种量对细胞活力和最终发酵周期有显著影响。本研究选取 5%、10% 和 15% 这 3 种不同的初始接种量进行测试。结果表明, 当初始接种量为 10% 时, 尽管菌株 LA4.3 的生长较 15% 接种量降低了 17.22%, 但 L-乳酸产量相对提高了 31.75%, 达到 90.00 g/L, 得率与生产强度分别为 68.18%、1.25 g/(h·L) (图 4C)。而 5% 接种量条件下, 菌株 LA4.3 的生长较慢, 细胞最大菌浓度为 12.59, L-乳酸产量仅达到 64.15 g/L。

15% 接种量条件下, 尽管细胞最大菌浓度升高至 23.99, 但 L-乳酸产量下降至 69.55 g/L。上述结果表明, 适宜的接种量能够平衡细胞活力与代谢效率, 而过低或过高的接种量均会导致乳酸产量下降。因此, 选择 10% 接种量为最优初始接种量。

培养基种类直接影响细胞的代谢途径和生产性能。测试了 YPD、ZWSG、ZWYP 和 YNB 这 4 种培养基对菌株 LA4.3 生产 L-乳酸的影响。结果如图 4D 所示, 当使用 ZWSG 作为培养基时, 菌株 LA4.3 发酵 72 h 后的 L-乳酸产量最高, 为 105.80 g/L, 得率与生产强度分别为 75.57%、1.47 g/(h·L)。其中, YPD 与 YNB 培养基由于缺少微量元素及氮源, 其 L-乳酸产量仅达到 ZWSG 培养基的 0.89 倍 (94.34 g/L) 与 0.48 倍 (51.16 g/L)。而 ZWYP 培养基尽管提供了全面的营养元素, 但由于氮源含量较低, 导致其

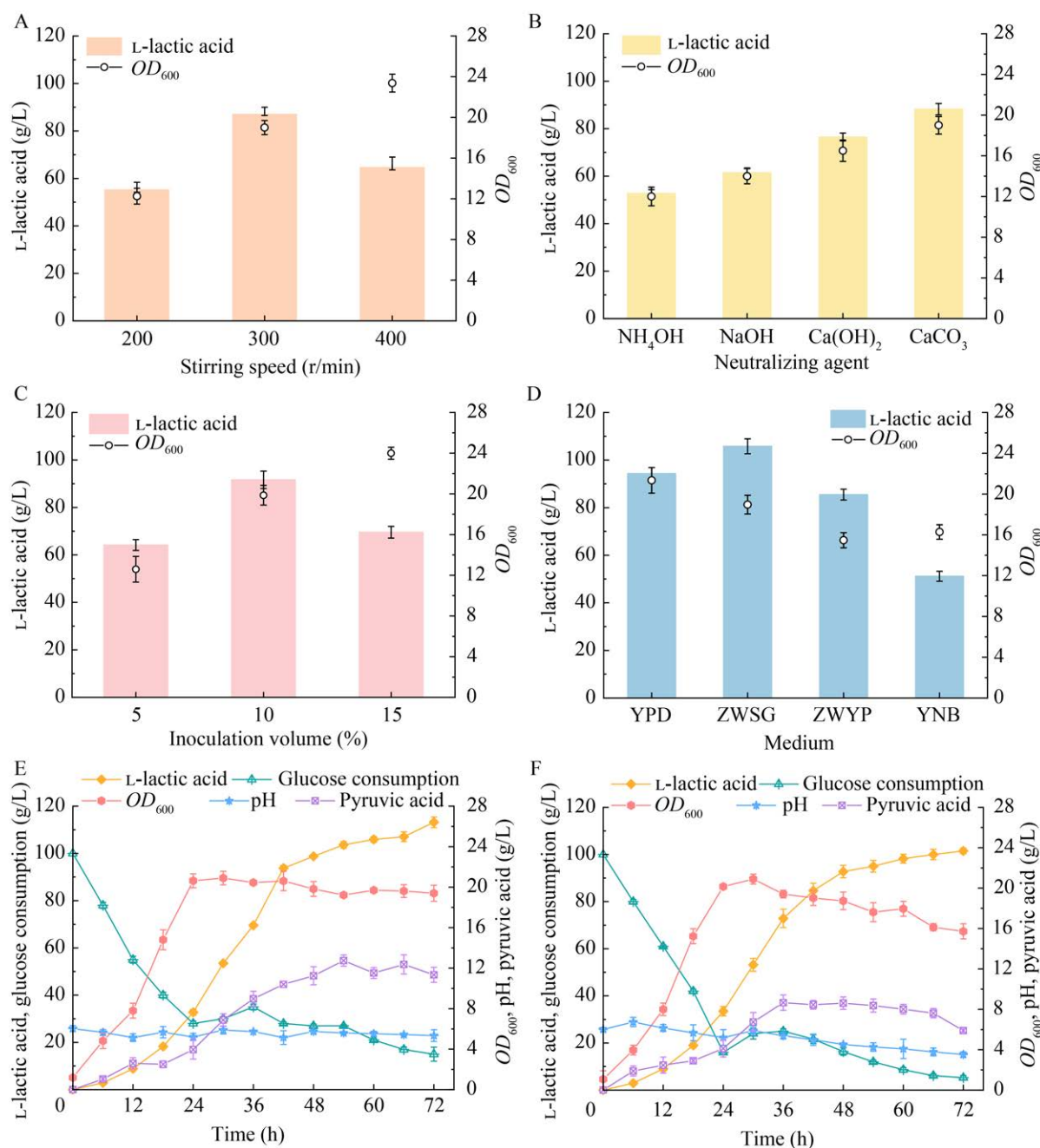


图 4 L-乳酸的罐上发酵优化 A: 不同搅拌转速对 L-乳酸产量及 OD_{600} 的影响; B: 不同中和剂对 L-乳酸产量及 OD_{600} 的影响; C: 不同接种量对 L-乳酸产量及 OD_{600} 的影响; D: 不同培养基对 L-乳酸产量及 OD_{600} 的影响; E: 最佳发酵条件下菌株 LA4.3 在 5 L 发酵罐上的变化曲线; F: 低 $CaCO_3$ 条件下菌株 LA4.3 在 5 L 发酵罐上的变化曲线。

Figure 4 Fermentation optimization for L-lactic acid production in a 5 L fermenter. A: Effect of different stirring speeds on L-lactic acid production and OD_{600} ; B: Effects of different neutralizer agents on L-lactic acid production and OD_{600} ; C: Effects of different inoculation volumes on L-lactic acid production and OD_{600} ; D: Effects of different media on L-lactic acid production and OD_{600} ; E: Variation curves of strain LA4.3 in a 5 L fermenter under optimal fermentation conditions; F: Variation curves of strain LA4.3 in a 5 L fermenter with decreased $CaCO_3$ addition.

L-乳酸产量(85.47 g/L)较 ZWSG 培养基降低了 19%。相较于其他培养基, ZWSG 培养基提供了平衡的碳源、氮源及必需的微量元素, 支持酵母的快速生长并促进乳酸的积累。因此, 确定 ZWSG 培养基为最优培养基。

基于上述平行优化实验, 确定菌株 LA4.3 生产 L-乳酸的最优工艺条件为: 搅拌转速 300 r/min, pH 中和剂为 CaCO_3 , 初始接种量为 10%, 培养基为 ZWSG 培养基。在最优条件下进行发酵验证实验, 结果显示 L-乳酸的产量、得率和生产强度分别为 112.41 g/L、84.00%和 1.57 g/(h·L), 证明了该优化组合的有效性(图 4E)。

进一步将 CaCO_3 的使用量降低至 75 g/L 时, L-乳酸的产量、得率和生产强度分别为 101.50 g/L、79.10%和 1.41 g/(h·L), 发酵终点的体系 pH 为 3.52 (图 4F)。上述结果为工业化生产食品级 L-乳酸提供了重要的参考。

3 讨论与结论

本研究以实验室保藏的 LA1 为底盘菌株, 通过表达异源乳酸脱氢酶、敲除副产物代谢支路以及提高菌株的酸耐受性, 成功构建了一株工程菌株 LA4.3。该菌株在 5 L 发酵罐中经分批补料发酵, L-乳酸的产量、得率和生产强度分别达到 112.41 g/L、84.00%和 1.57 g/(h·L)。同时, 降低中和剂 CaCO_3 使用量至 75 g/L 时, L-乳酸的产量、得率和生产强度分别为 101.50 g/L、79.10%和 1.41 g/(h·L), 发酵终点的体系 pH 值为 3.52。

在乳酸发酵过程中, 高浓度乳酸会降低胞内 pH 值, 从而抑制细胞生长和乳酸合成效率。因此, 在传统发酵工艺中, 通常需要添加大量强酸或强碱以维持 pH 稳定。然而, 这一方法显著增加了发酵成本及下游分离的复杂性。目前, 提高菌株耐酸性的策略有 3 种: (1) 通过基因组编辑, 改造细胞膜结构以增强耐酸性^[18]; (2) 过表达耐酸相关基因以改善胞内 pH 调节能

力^[19]; (3) 通过适应性进化提高菌株的环境适应性^[20]。马克斯克鲁维酵母作为一种食品安全级酵母, 具有较高的发酵速率和广谱的糖利用能力, 是乳酸发酵的潜在优良菌株。然而, 文献报道的马克斯克鲁维酵母菌株用于乳酸生产时, 尽管其 L-乳酸产量达到 130 g/L, 但发酵过程中需要全程添加大量 NaOH 以维持较高的 pH 值(pH 6.0), 增加了发酵成本^[14]。本研究首先筛选了不同的潜在耐酸基因, 结果显示 *PDR3* 和 *ESBP6* 基因的表达显著降低了菌株的死亡率, 维持了较高的细胞完整性。随后, 将 *PDR3* 和 *ESBP6* 基因稳定整合至基因组中, 发现双基因的协同表达可显著提高乳酸产量和细胞耐受性。最后, 在 5 L 发酵罐中, 将中和剂使用量由 150 g/L 降低至 75 g/L, L-乳酸产量仍达到 101.50 g/L, 发酵终点 pH 值为 3.52。这表明, 通过改造菌株耐酸性, 可以显著减少中和剂的使用量, 同时不影响乳酸生产效率, 为未来的工业化应用提供了重要参考。

尽管本研究取得了一定进展, 但该工程菌株的 L-乳酸产量与其他菌株相比仍存在差距(表 5)。导致这一结果可能的原因有 4 个: (1) 乳酸脱氢酶的酶催化活性不足。本研究仅引入了乳酸脱氢酶基因, 尚未对其进行蛋白质工程改造。 (2) L-乳酸的合成路径未充分优化。乳酸脱氢酶基因的表达量虽有所提高, 但未对相关关键代谢通路进行全面增强, 限制了 L-乳酸合成效率^[28]。 (3) 副产物生成路径未完全抑制。尽管乙醇副产物有所减少, 但丙酮酸和甘油等副产物的生成仍会对碳流的分布产生一定的影响^[29]。 (4) 菌株酸耐受性低。尽管通过过表达耐酸基因提高了马克斯克鲁维酵母的酸耐受性, 但在发酵过程中仍需添加适量的中和剂, 尚未做到不添加中和剂进行发酵^[30]。为了进一步提升 L-乳酸的产量与酸耐受性, 后续的研究可以从以下 4 个方面进行改造: (1) 提高乳酸脱氢酶的活性。通过蛋白工程手段对乳酸脱氢酶进行改造, 增强其催化效率和底物亲和性^[31-32]。

(2) 强化 L-乳酸的合成路径。提高乳酸脱氢酶表达并强化相关代谢通路，进一步提高 L-乳酸产量^[33]。(3) 阻断副产物生成的代谢路径。通过敲除或下调乙醇脱氢酶基因 *ADH* 和细胞色素氧化酶基因 *CYB2*，进一步减少碳流损失^[34-35]。此外，通过优化葡萄糖转运蛋白的表达，增强菌株对高浓度底物的吸收能力，以提高转化率^[36]。(4) 提高菌株耐受性。通过适应性进化或随机突变的方法，筛选出适应酸性环境的菌株，进而改善菌株的生产性能^[37-39]。

表 5 不同酵母产乳酸发酵工艺

Table 5 Lactic acid fermentation process with different yeast production

Strains	Substrates	pH control strategies	Fermentation process	Titer (g/L)	Yield (%)	Productivity (g/(h·L))	References
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Glucose	CaCO ₃ was utilized for the first 36 h to control the pH to 5.0	<i>OD</i> ₆₀₀ =1 1 vvm 37 °C 300 r/min	101.50	79.10	1.41	This study
<i>Kluyveromyces lactis</i> strains	Glucose	NH ₄ OH was used throughout to control pH 4.5	0.14 vvm 30 °C 800 r/min	109.00	60.00	0.80	[21]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Glucose	After 24 h of fermentation, the pH was controlled at 3.5 using 5 mol/L Ca(OH) ₂	0.05 vvm 30 °C 320 r/min	117.00	58.00	2.40	[22]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Glucose	5 mol/L Ca(OH) ₂ was utilized for the first 20 h to control the pH to 4.7	1 vvm 36 °C 475 r/min	142.00	89.00	3.50	[23]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Glucose	CaCO ₃ was used throughout to control pH 4.5	10% inoculation volumes 30 °C 300–800 r/min	192.30	78.00	1.60	[8]
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Glucose+ Xylose	Without neutralizers, pH 4.6 at the end of fermentation	10% inoculation volumes 42 °C 300 r/min	110.40	61.00	1.50	[24]
<i>Pichia kudriavzevii</i>	Glucose	Without neutralizers	20% inoculation volumes 1 vvm 35 °C 300 r/min	74.57	93.00	2.08	[25]
<i>Pichia kudriavzevii</i>	Glucose	Ca(OH) ₂ was utilized for the first 20 h to control the pH to 4.7	<i>OD</i> ₆₀₀ =4 1 vvm 30 °C 350 r/min	154.00	72.00	4.16	[26]
<i>Issatchenkia orientalis</i>	Glucose+ Xylose	4 mol/L KOH was utilized for the first 41 h to control the pH to 6.0	1 vvm 30 °C 100 r/min	67.10	59.00	0.56	[27]

作者贡献说明

王雨欣：方案设计、实验操作、初稿写作；
李晓敏：数据管理、方案设计、经费支持、稿件润色修改；刘佳：数据管理、实验操作、提供材料；高聪、刘立明：监督指导、稿件润色修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明没有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。

REFERENCES

- [1] WU XY, REN YY, CHEN SS, CAI P, ZHOU YJ. Production of L-lactic acid from methanol by engineered yeast *Pichia pastoris*[J]. *Bioresource Technology*, 2025, 415: 131730.
- [2] MELO NTM, de OLIVEIRA JUNQUEIRA AC, LIMA LF, de OLIVEIRA KBS, dos REIS MCG, FRANCO OL, PAES HC. Just around the corner: advances in the optimization of yeasts and filamentous fungi for lactic acid production[J]. *Journal of Fungi*, 2024, 10(3): 207.
- [3] MYBURGH MW, FAVARO L, van ZYL WH, VILJOEN-BLOOM M. Engineered yeast for the efficient hydrolysis of polylactic acid[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 378: 129008.
- [4] FUKUZUMI S, LEE YM, NAM W. Catalytic recycling of NAD(P)H[J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2019, 199: 110777.
- [5] HIGASHI M, TOYODOME T, KANO K, AMAO Y. Photoelectrochemical lactate production from pyruvate via in situ NADH regeneration over a hybrid system of CdS photoanode and lactate dehydrogenase[J]. *Electrochimica Acta*, 2023, 460: 142590.
- [6] CHOI B, TAFUR RANGEL A, KERKHOVEN EJ, NYGÅRD Y. Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced metabolic robustness and L-lactic acid production from lignocellulosic biomass[J]. *Metabolic Engineering*, 2024, 84: 23-33.
- [7] PEREIRA R, MOHAMED ET, RADY MS, HERRGÅRD MJ, FEIST AM, NIELSEN J, CHEN Y. Elucidating aromatic acid tolerance at low pH in *Saccharomyces cerevisiae* using adaptive laboratory evolution[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(45): 27954-27961.
- [8] LIU TT, SUN L, ZHANG C, LIU YF, LI JH, DU GC, LV XQ, LIU L. Combinatorial metabolic engineering and process optimization enables highly efficient production of L-lactic acid by acid-tolerant *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 379: 129023.
- [9] TIAN XW, LIU XH, ZHANG YF, CHEN Y, HANG HF, CHU J, ZHUANG YP. Metabolic engineering coupled with adaptive evolution strategies for the efficient production of high-quality L-lactic acid by *Lactobacillus paracasei*[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 323: 124549.
- [10] ZHU HD, WANG H, WANG L, ZHENG ZM. CRISPR/Cas9-based genome engineering in the filamentous fungus *Rhizopus oryzae* and its application to L-lactic acid production[J]. *Biotechnology Journal*, 2024, 19(9): e2400309.
- [11] INOKUMA K, ISHII J, HARA KY, MOCHIZUKI M, HASUNUMA T, KONDO A. Complete genome sequence of *Kluyveromyces marxianus* NBRC1777, a nonconventional thermotolerant yeast[J]. *Genome Announcements*, 2015, 3(2): e00389-15.
- [12] CHAROENSOPHARAT K, THANONKEO P, THANONKEO S, YAMADA M. Ethanol production from Jerusalem artichoke tubers at high temperature by newly isolated thermotolerant inulin-utilizing yeast *Kluyveromyces marxianus* using consolidated bioprocessing[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2015, 108(1): 173-190.
- [13] ZHANG KH, JIANG ZY, LI XJ, WANG DM, HONG J. Enhancing simultaneous saccharification and co-fermentation of corn cob by *Kluyveromyces marxianus* through overexpression of putative transcription regulator[J]. *Bioresource Technology*, 2024, 399: 130627.
- [14] BAE JH, KIM HJ, KIM MJ, SUNG BH, JEON JH, KIM HS, JIN YS, KWEON DH, SOHN JH. 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.
- [15] 王冬梅, 洪洞. 在耐热的马克斯克鲁维酵母中构建微生物细胞工厂[J]. *生物学杂志*, 2020, 37(1): 1-10. WANG DM, HONG J. Constructing microbial cell factory with thermo-tolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*[J]. *Journal of Biology*, 2020, 37(1): 1-10 (in Chinese).
- [16] RAJKUMAR AS, VARELA JA, JUERGENSEN H, DARAN JG, MORRISSEY JP. Biological parts for *Kluyveromyces marxianus* synthetic biology[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2019, 7: 97.
- [17] LI Y, WANG LM, JU JS, YU B, MA YH. Efficient production of polymer-grade D-lactate by *Sporolactobacillus laevolacticus* DSM442 with agricultural waste cottonseed as the sole nitrogen source[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 142: 186-191.
- [18] GUERREIRO JF, MUIR A, RAMACHANDRAN S, THORNER J, SÁ-CORREIA I. Sphingolipid biosynthesis upregulation by TOR complex 2-Ypk1 signaling during yeast adaptive response to acetic acid stress[J]. *Biochemical Journal*, 2016, 473(23): 4311-4325.
- [19] YAMADA R, KUMATA Y, MITSUI R, MATSUMOTO T, OGINO H. Improvement of lactic acid tolerance by cocktail δ -integration strategy and identification of the transcription factor PDR3 responsible for lactic acid tolerance in yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2021, 37(2): 19.

- [20] BAEK SH, KWON EY, KIM YH, HAHN JS. Metabolic engineering and adaptive evolution for efficient production of D-lactic acid in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(6): 2737-2748.
- [21] PORRO D, BIANCHI MM, BRAMBILLA L, MENGHINI R, BOLZANI D, CARRERA V, LIEVENSE J, LIU CL, RANZI BM, FRONTALI L, ALBERGHINA L. Replacement of a metabolic pathway for large-scale production of lactic acid from engineered yeasts[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(9): 4211-4215.
- [22] LEE JY, KANG CD, LEE SH, PARK YK, CHO KM. Engineering cellular redox balance in *Saccharomyces cerevisiae* for improved production of L-lactic acid[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2015, 112(4): 751-758.
- [23] SONG JY, PARK JS, KANG CD, CHO HY, YANG D, LEE S, CHO KM. Introduction of a bacterial acetyl-CoA synthesis pathway improves lactic acid production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Metabolic Engineering, 2016, 35: 38-45.
- [24] LI ZB, ZHANG LX, ZHANG B, BAO J. pH shifting adaptive evolution stimulates the low pH tolerance of *Pediococcus acidilactici* and high L-lactic acid fermentation efficiency[J]. Bioresource Technology, 2025, 416: 131813.
- [25] ZHANG B, LI RQ, YU LH, WU CC, LIU Z, BAI FY, YU B, WANG LM. L-lactic acid production via sustainable neutralizer-free route by engineering acid-tolerant yeast *Pichia kudriavzevii*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(29): 11131-11140.
- [26] PARK HJ, BAE JH, KO HJ, LEE SH, SUNG BH, HAN JI, SOHN JH. Low-pH production of D-lactic acid using newly isolated acid tolerant yeast *Pichia kudriavzevii* NG7[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2018, 115(9): 2232-2242.
- [27] LEE YG, KANG NK, KIM C, TRAN VG, CAO MF, YOSHIKUNI Y, ZHAO HM, JIN YS. Self-Buffering system for cost-effective production of lactic acid from glucose and xylose using acid-tolerant *Issatchenkia orientalis*[J]. Bioresource Technology, 2024, 399: 130641.
- [28] 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.
- [29] 黄玉堃. 代谢工程改造热带假丝酵母生产 D-乳酸[D]. 无锡: 江南大学, 2021.
HUANG YK. Metabolic engineering of *Candida tropicalis* to produce D-lactic acid[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021 (in Chinese).
- [30] SUN L, ZHANG QW, KONG X, LIU YF, LI JH, DU GC, LV XQ, LEDESMA-AMARO R, CHEN J, LIU L. Highly efficient neutralizer-free L-malic acid production using engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Bioresource Technology, 2023, 370: 128580.
- [31] KONG X, ZHANG B, HUA Y, ZHU YL, LI WJ, WANG DM, HONG J. Efficient L-lactic acid production from corn cob residue using metabolically engineered thermo-tolerant yeast[J]. Bioresource Technology, 2019, 273: 220-230.
- [32] JACKSON E, LÓPEZ-GALLEGÓ F, GUISAN JM, BETANCOR L. Enhanced stability of L-lactate dehydrogenase through immobilization engineering[J]. Process Biochemistry, 2016, 51(9): 1248-1255.
- [33] 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.
- [34] ILMÉN M, KOIVURANTA K, RUOHONEN L, RAJGARHIA V, SUOMINEN P, PENTTILÄ M. Production of L-lactic acid by the yeast *Candida sonorensis* expressing heterologous bacterial and fungal lactate dehydrogenases[J]. Microbial Cell Factories, 2013, 12: 53.
- [35] TURNER TL, ZHANG GC, OH EJ, SUBRAMANIAM V, ADIPUTRA A, SUBRAMANIAM V, SKORY CD, JANG JY, YU BJ, PARK I, JIN YS. Lactic acid production from cellobiose and xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2016, 113(5): 1075-1083.
- [36] MITSUI R, YAMADA R, MATSUMOTO T, YOSHIHARA S, TOKUMOTO H, OGINO H. Construction of lactic acid-tolerant *Saccharomyces cerevisiae* by using CRISPR-Cas-mediated genome evolution for efficient D-lactic acid production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(21): 9147-9158.
- [37] LENNEN RM, LIM HG, JENSEN K, MOHAMMED ET, PHANEUF PV, NOH MH, MALLA S, BÖRNER RA, CHEKINA K, EMRE Ö, BONDE I, KOZA A, MAURY J, PEDERSEN LE, SCHÖNING LY, SONNENSCHN N, PALSSON BO, NIELSEN AT, SOMMER MOA, HERRGÅRD MJ, et al. Laboratory evolution reveals general and specific tolerance mechanisms for commodity chemicals[J]. Metabolic Engineering, 2023, 76: 179-192.
- [38] LIU JQ, HAN X, TAO F, XU P. Metabolic engineering of *Geobacillus thermoglucosidasius* for polymer-grade lactic acid production at high temperature[J]. Bioresource Technology, 2024, 393: 130164.
- [39] 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.