

综述

基因工程菌发酵生产 L-乳酸研究进展

姜旭^{1,2}, 王丽敏², 张桂敏¹, 于波², 曾庆韬¹

1 湖北大学生命科学学院, 湖北 武汉 430062

2 中国科学院微生物研究所 中国科学院微生物生理与代谢工程重点实验室, 北京 100101

姜旭, 王丽敏, 张桂敏, 等. 基因工程菌发酵生产 L-乳酸研究进展. 生物工程学报, 2013, 29(10): 1398-1410.

Jiang X, Wang LM, Zhang GM, et al. Recent developments in L-lactate fermentation by genetically modified microorganisms. Chin J Biotech, 2013, 29(10): 1398-1410.

摘要: 乳酸是重要的工业平台化学品。随着聚乳酸产业的兴起, 对高质量 L-乳酸的需求量也不断增加。为了进一步降低 L-乳酸发酵成本, 提高菌株的工业适应性, 各种现代生物技术已经应用到 L-乳酸发酵菌种的改造上来。文中简要综述了近年来使用乳酸菌、酵母、大肠杆菌及米根霉等基因工程菌株发酵生产 L-乳酸的技术进展。

关键词: L-乳酸, 基因工程菌, 发酵

Recent developments in L-lactate fermentation by genetically modified microorganisms

Xu Jiang^{1,2}, Limin Wang², Guimin Zhang¹, Bo Yu², and Qingtao Zeng¹

1 College of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, Hubei, China

2 CAS Key Laboratory of Microbial Physiological and Metabolic Engineering, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: Lactic acid is an important platform chemical. Especially with rapid development of poly (lactic acid) industry, the demand for L-lactic acid is continuously increasing. To further reduce the fermentation costs and improve the robustness of strains from industrial point of view, many modern biotechnological approaches have been applied to strain

Received: June 17, 2013; **Accepted:** August 20, 2013

Supported by: National High Technology Research and Development Program (863 Program) (No. 2011AA02A202), National Natural Science Foundation of China (No. 31270108).

Corresponding author: Bo Yu. Tel: +86-10-64806132; E-mail: yub@im.ac.cn

Qingtao Zeng. Tel: +86-27-88661746; E-mail: zengqit@hubu.edu.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2011AA02A202), 国家自然科学基金 (No. 31270108) 资助。

网络出版时间: 2013-08-27

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20130827.1558.001.html>

development. In this review, we briefly summarize recent advances in L-lactate fermentation by genetically modified microorganisms, including lactic acid bacteria, yeast, *E. coli* and *Rhizopus* species.

Keywords: L-lactic acid, genetically modified microorganisms, fermentation

乳酸是世界上最早被利用的三大有机酸之一,其分子中有一个不对称碳原子,因此具有旋光性,分为左旋性乳酸(L-乳酸)和右旋性乳酸(D-乳酸)。作为一种传统的多用途精细化学品,乳酸可作为酸味剂、芳香剂、防腐剂、植物生长调节剂、生物可降解性材料和药物等,在化工、医药和食品加工等领域有着广泛的用途^[1]。近年来,国内外学者对微生物发酵法生产乳酸进行了深入的研究,各种现代生物技术已经广泛应用到乳酸发酵菌种的改造上,微生物发酵法生产乳酸的技术已经取得重要进展。本文将重点关注近年来国内外乳酸发酵研究的最新研究,着重介绍采用基因工程改造菌为出发菌株,发酵法生产高光学纯 L-乳酸的技术进展。

1 现有 L-乳酸发酵菌种存在的技术问题

1.1 乳酸光学纯度需要提高

聚乳酸的生产需要聚合级的 L-乳酸,而现在用于 L-乳酸生产的菌株主要为乳杆菌。目前发现的主要 L-乳酸生产菌株包括德氏乳杆菌 *Lactobacillus delbrueckii*、干酪乳杆菌 *Lactobacillus casei*、鼠李糖乳杆菌 *Lactobacillus rhamnosus*、嗜淀粉乳杆菌 *Lactobacillus amylophilus*、瑞士乳杆菌 *Lactobacillus helveticus*、保加利亚乳杆菌 *Lactobacillus bulgaricus* 和植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum* 等,也有使用粪肠球菌 *Enterococcus faecalis* 和米根霉 *Rhizopus oryzae* 进行生产的报

道。其中同型发酵乳杆菌被认为是具有较高应用潜力的生产菌株,如 *Lb. casei*、*Lb. lactis* 和 *Lb. delbrueckii* 的 L-乳酸产量均可以达到 150 g/L 以上^[2]。该类微生物的大多数菌株生产的 L-乳酸光学纯度为 97% 左右,而生产聚乳酸通常需要光学纯度达到 99% 以上;并且发酵温度在 42 °C 左右,容易染菌。嗜热的芽胞杆菌是一种新的可用于 L-乳酸发酵生产的微生物,具有较高的糖酸转化率。由于具有较高的发酵温度 (50~60 °C),大大减少了发酵过程中污染杂菌的机会,生产的 L-乳酸光学纯度高。同时,以较高的温度进行发酵,可降低发酵液粘度,有利于后续处理步骤的操作。也可以在培养基不灭菌的条件下进行发酵生产,避免美拉德反应,降低了能耗和 L-乳酸的生产成本^[3]。

1.2 光学纯 L-乳酸的生产成本需要进一步降低

光学纯 L-乳酸的生产成本和市场价格偏高是聚乳酸市场开拓受阻的一个主要因素,也限制了乳酸在其他重要工业领域中的广泛应用。乳酸生产的成本不降低,作为生物基塑料的 PLA 就难以同传统石油基塑料竞争。聚合级乳酸生物制造的核心挑战是要降低光学纯乳酸的生产成本,提高光学纯乳酸的生产强度,提高产量、产物纯度和提取收率。当前乳酸发酵生产仍以六碳糖中最典型、利用最广泛的葡萄糖为原料,其转化效率也较高。然而自然界中广泛存在的纤维素类物质中包含除葡萄糖以外的

各种五碳糖，它们都属于可发酵糖，在植物纤维材料水解液中，葡萄糖约占 65%，木糖约占 25%，从纤维素水解液中将葡萄糖和木糖分别分离出来非常困难，操作成本昂贵。因此实现纤维素、半纤维素原料的直接转化利用将会进一步简化工艺流程，特别是强化微生物对五碳糖/六碳糖的同步利用，将降低综合利用过程的成本。同时，乳酸生产菌株发酵时往往需要添加大量的有机氮源，造成原料成本的增加和后处理的困难。若能获得具有高效利用纤维素来源的糖类生成乳酸能力的菌株，结合采用廉价的无机氮源，乳酸的生产成本会大大降低。

随着公布的全基因组序列逐年增多，使得人们对乳酸生产菌株的改造更加有针对性^[4]。近年来发展起来的一些新颖的方法将显著拓展已有的常规乳酸菌分子改造工具^[5]。基于生化、遗传和调控等研究取得的巨大进步，旨在确保最优的碳原子和能量流入中心代谢以获得最佳代谢产物的新的工程学方法变得越来越具吸引力。包括酵母、大肠杆菌、芽胞杆菌、乳杆菌、乳酸乳球菌和其他乳酸菌等在内的中心碳代谢工程改造获得了初步的成功^[6]。随着技术的不断进步，我们将开发出更优的工业菌株，提高 L-乳酸的光学纯度并显著降低发酵成本，支撑聚乳酸产业有竞争力的快速发展。

2 基因工程菌发酵生产 L-乳酸

传统乳酸发酵采用的菌种主要为乳酸菌和米根霉等。乳酸菌发酵生产 L-乳酸多为同型发酵，具有较高的转化率，因而成为主要的工业菌种。米根霉生产 L-乳酸的光学纯度较高，也受到一定的关注。目前对部分乳酸菌和米根霉

的遗传操作技术尚不成熟，限制了对其进行基因改造，故有关乳酸生产的文献中，约 90%集中于野生菌发酵。而对于遗传背景相对清楚的酵母和大肠杆菌，已有学者将其改造为乳酸生产菌株。

2.1 乳酸菌 (Lactic acid bacteria)

乳酸菌是一类发酵糖类主要产物为乳酸的革兰氏阳性菌。乳杆菌和芽胞杆菌是目前在乳酸工业发酵上常用的乳酸生产菌株。以具有 L-乳酸高产能力的乳杆菌 *Lactobacillus* 和芽胞杆菌 *Bacillus* 为出发菌株，通过基因工程改造手段可以使原始菌获得更好的发酵能力或更优的性状。对野生型 *Lb. casei* CICC6028 进行氮离子注入突变，获得了一株突变株，在 40 °C 的最适温度下，产出 136 g/L 的 L-乳酸，而其原始菌株的最适温度为 34 °C，乳酸产量仅为 98 g/L^[7]。Adsul 等通过紫外诱变获得一株 *Lb. delbrueckii* 突变株 UC-3，能够有效利用纤维二糖和三糖转化生成 L-乳酸。该突变株从 100 g/L 的纤维二糖中产生 90 g/L 的乳酸，产率为 2.25 g/(L·h)^[8]。对 *Lb. lactis* BME5-18 的产酸研究表明，葡萄糖和乳酸会抑制细胞生长和产酸，对其进行紫外诱变，获得一株高葡萄糖和乳酸钙浓度耐受的突变株 *Lb. lactis* BME5-18M，该突变株在 60 h 内从 100 g/L 的葡萄糖中转化获得 98.6 g/L 的乳酸，比其亲本菌株提高了 73.9%，进一步研究表明，亲本菌株具有高水平的 NADH 氧化酶活性，而突变株可能破坏了该基因，使葡萄糖的摄取速率提升，因此突变株能转化丙酮酸生成更多的乳酸，且产率 (1.76 g/(L·h)) 比亲本 (0.95 g/(L·h)) 更高^[9]。

基因组重排是一种快速构建合适工业菌种

的有效策略。Yu 等以 *Lb. rhamnosus* ATCC 11443 为出发菌株, 利用基因组重排技术, 提高了该菌对葡萄糖的耐受性, 同时提高了 L-乳酸产量。通过紫外照射和亚硝基胍诱变获得出发菌群, 然后对其进行循环的原生质体融合。通过筛选融合灭活的原生质库, 获得在高葡萄糖和 CaCO_3 中生长的阳性克隆。在第二轮基因组重组种群中, 最优菌种的产酸量、细胞生长和葡萄糖消耗, 分别比野生型菌株高 71.4%、44.9% 和 62.2%。此外, 在初始葡萄糖从 160 g/L 增加至 200 g/L 的分批发酵过程中, 工程菌获得了更高的乳酸发酵浓度^[10]。同样地, 他们还获得了一株最适 pH 3.8 的突变株, 其乳酸产量和细胞生长速率分别比野生型提高了 3.1 倍和 2.6 倍, 以 10% 的葡萄糖为底物, CaCO_3 中和的条件下, 最大产率为 5.77 g/(L·h), 比野生型增加了 26.5%^[11]。

芽胞杆菌也是近年来报道较多的乳酸生产菌, 目前, 已报道的具有 L-乳酸生成能力的芽胞杆菌为地衣芽胞杆菌 *Bacillus licheniformis*^[12] 和多株凝结芽胞杆菌, 如 *B. coagulans* 2-6^[3]、*B. coagulans* XZL4^[13]、*B. coagulans* 36D1 和 *B. coagulans* P4-102B^[14] 等。该类菌为嗜热菌, 可以进行不用灭菌的开放式发酵以显著降低生产成本。与报道的其他菌株相比较, L-乳酸的发酵水平也较高, 因此凝结芽胞杆菌在高光学纯 L-乳酸的发酵生产中具有较大的应用前景。然而, 目前对绝大多数的凝结芽胞杆菌还未有成熟的遗传操作系统, 只有少量凝结芽胞杆菌可以进行电转化、基因敲除等遗传操作^[15], 因此也限制了对其进行基因工程改造的研究。开发高效的凝结芽胞杆菌的遗传操作系统将是研发

重点。

2.2 米根霉

除乳酸菌外, 米根霉也是生产 L-乳酸的菌株之一。米根霉生产 L-乳酸的光学纯度高而受到关注, 然而其发酵类型属混合酸发酵, 因而转化率较低, 经济性不够。国内外关于米根霉的研究主要集中在菌种选育、发酵与提取工艺等方面, 而目前遗传操作系统改造米根霉的技术尚不完善, 诱变育种仍是主要方法。

通过单孢子分离技术, 从 *Rhizopus* sp. MK-96 菌落中选择出 *Rhizopus* sp. MK-96-1, 并将其作为亲代菌株。用 1-甲基 3-硝基-1-亚硝基胍 (NTG) 进行诱变, 通过氨浓度梯度平板筛选, 成功获得了一株 *Rhizopus* sp. MK-96-1196, 能在氨水调酸的条件下生产 90 g/L 的 L-乳酸 (气升式生物反应器)。与亲代菌相比, 突变株在相同培养条件下生产了双倍量的 L-乳酸, 并将发酵时间缩短了一半^[16]。Ge 等对 *R. oryzae* PW352 野生型进行氮离子注入诱变, 分离得到 RE3303 和 RF9052 两个突变株, 突变株 L-乳酸的产量比野生型高出 75%, 分析发现, 突变株乳酸脱氢酶的比活力均比野生型高, 且乳酸脱氢酶的最适温度也发生了改变^[17]。

适应性选择也是改良菌种方法之一。Bai 等报道了一种驯化后的米根霉 HZS6, 能显著提高底物利用效率, 增加玉米芯水解生产 L-乳酸的产量。与其亲代菌株相比, 它的 L-乳酸的终浓度, 转化率和体积产率增加超过两倍^[18]。

菌种改良通常经诱变筛选实现, 但突变却存在一个随机过程。对突变株的代谢通量分析能使我们更好地理解体内通量概况的变化和突变形成的机制。对亲代菌株 *R. oryzae* R3017 进

行紫外线、硫酸二乙酯和 ^{60}Co 诱变处理, 分离得到一株高产 L-乳酸的突变株 *R. oryzae* R1021。该突变株在 60 h 内从 120 g/L 的玉米浆中, 生产出 79.4 g/L 的 L-乳酸, 比亲代菌株高出 52%。按 L-乳酸占总乳酸的重量计算, 其 L-乳酸的纯度达 99.05%。突变株 R1021 在形态上也与亲代菌株不同。对亲代菌和突变株的碳通量分析表明, 亲代菌中乳酸形成过程中, 大部分碳都流向乙酰辅酶 A、草酰乙酸和乙醇。尽管突变株中从丙酮酸流向乙醇和乙酰辅酶 A 的碳通量有所减少, 但这两个通路仍很可能改变丙酮酸代谢从而提高乳酸产量^[19]。

2.3 酵母

酵母菌是发酵性能优良的工业菌株, 具有比大肠杆菌更完备的基因表达调控机制及对表达产物的加工修饰和分泌能力, 且不会产生内毒素, 是基因工程中良好的真核基因受体菌。随着生物技术的发展, 基因工程在改造酵母方面获得了很多成功, 使酵母获得了很多对人类有益的性状。在能源匮乏的今天, 利用酵母发酵生物质生产各种化学品已越来越引起重视。已有大量文献报道了使用基因改造的酵母菌进行 L-乳酸的发酵生产的例子。

通过在酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 中异源表达 L-乳酸脱氢酶 (L-LDH) 可以实现光学纯的 L-乳酸的发酵。由于酿酒酵母从丙酮酸生成乙醇的途径具有更大的竞争趋势, 所以 L-乳酸的产量要低于乳酸菌。为了降低乙醇而增加乳酸产量, 需要使丙酮酸至乙醇途径中的基因失活。Tokuhiro 等构建了一株双突变工程酵母, 用牛 L-LDH 替换酿酒酵母中的丙酮酸脱羧

化酶 (PDC1) 和乙醇脱氢酶 (ADH1), 与丙酮酸脱羧化酶单突变株相比, 其 L-乳酸的产量有所提升。与对照菌组相比, 双突变菌的比生长速率在以葡萄糖为碳源的培养基中有所降低, 而在以乙醇或乙酸为碳源的培养基中则不受影响。在低通气速率条件下, 最大转化率可达到 0.75 g 乳酸/葡萄糖^[20]。乳酸盐的 pKa 值为 3.86, 在低 pH 条件下 (如乳酸发酵后期, pH 3.5 左右), 约 70% 的 L-乳酸分子为非游离态。由于非游离态的 L-乳酸分子能够渗透细胞膜进入细胞被代谢, 从而降低 L-乳酸产量。通过在 *S. cerevisiae* W303-1A 中同时表达来自干酪乳杆菌的乳酸脱氢酶基因和单羧酸转运蛋白基因, 在有葡萄糖存在的条件下, 工程菌株获得了较高的 L-乳酸浓度。研究表明单羧酸转运蛋白是 L-乳酸生成的调控物, 并且很可能操纵 L-乳酸转运至酿酒酵母细胞外。但当葡萄糖耗尽时, L-乳酸的消耗也显著增加^[21]。Ookubo 等通过 DNA 微阵列分析, 发现一株产 L-乳酸的重组酿酒酵母中与 L-乳酸代谢相关的基因被上调表达。敲除 L-乳酸脱氢酶基因 *CYB2*, 即减少 L-乳酸的代谢后, 提高了在低 pH 条件下 L-乳酸的产量^[22]。

博伊丁假丝酵母 *Candida boidinii* 具有在富含糖的培养基中生长而不会增加乙醇发酵的优势。日本学者报道构建了一株博伊丁假丝酵母基因工程菌, 它能高效、大量生产 L-乳酸。该工程菌株的乙醇发酵途径已通过破坏丙酮酸脱羧化酶 1 (PDC1) 而改变, 这导致它的乙醇产量下降至野生型的 17%。随后将牛 L-LDH 编码基因整合到 PDC1 启动子上, 使乙醇发酵途径缺陷型菌株可以有效合成 L-乳酸。最适条件下,

分批发酵 48 h, L-乳酸产量达到 85.9 g/L, 其产率 (1.79 g/(L·h)) 是目前文献报道的以基因工程酵母菌为出发菌株产 L-乳酸的最高值^[23]。Tamakawa 等通过在一株丙酮酸脱羧化酶缺陷的产朊假丝酵母中表达 L-乳酸脱氢酶和 NADH 偏好性突变的木糖还原酶、木糖醇脱氢酶和木酮糖激酶, 实现了产朊假丝酵母发酵木糖生产 L-乳酸, 与表达天然木糖还原酶 (NADPH 偏好性) 的对照菌株相比, 该重组菌的 L-乳酸产量提升了 53%^[24]。

Ilmen 等在假丝酵母 *Candida sonorensis* 中分别表达了来源于瑞士乳杆菌、巨大芽胞杆菌和米根霉的 L-乳酸脱氢酶基因。每个基因工程菌都具有 L-乳酸生成能力, 但是不同来源的异源 L-乳酸脱氢酶的性质显著影响了碳元素在 L-乳酸和副产品间的分配。在中和条件下, 表达来源于瑞士乳杆菌 L-乳酸脱氢酶的工程菌在基本培养基中 L-乳酸的浓度达到 92 g/L, 转化率为 0.94 g/g, 没有乙醇生成, 细胞干重为 5 g/L。在丰富培养基中, 积累了 49 g/L 的 L-乳酸, 最终 pH 为 3.8。Ilmen 等通过删除其中之一或同时删除丙酮酸脱羧酶编码基因 (*pdc1* 和 *pdc2*), 对工程菌的发酵途径进行了改良。研究表明同时删除 *PDC* 基因终止了乙醇的产生, 但并没有显著改变酵母的生长特性^[25]。

张勤等以选育低 pH 条件下高产 L-乳酸的酵母菌为目的, 从自然样品中筛选分离得到一株能在 pH 2.5(乳酸调节)的培养基中生长, 且不代谢乳酸的菌株-木兰假丝酵母 *Candida magnolia*。将来源于米根霉 As3.819 的乳酸脱氢酶编码基因 (*ldhA*) 插入含有 G418 抗性基因的酵母穿梭载体, 构建了重组质粒 pYX212-kanMX-*ldhA*, 转

入野生型 *C. magnolia* 中, 筛选获得了一株具有产 L-乳酸能力的重组菌株 *C. magnolia*-2。通过发酵实验表明, 该重组菌产 L-乳酸的最适 pH 为 3.5, 并可在 pH 2.5 的条件下正常发酵产乳酸^[26]。

酵母菌具有生长速度快、可耐受低 pH 值发酵的优势, 因此在 L-乳酸发酵过程中不需要人工调酸, 降低了成本和后处理的费用, 在 L-乳酸发酵中具有较好的应用潜力。目前, 国外已经实现了酵母工程菌株发酵生产高光学纯 L-乳酸的产业化。随着技术的进步, 酵母菌发酵生产 L-乳酸将获得越来越多的关注。

2.4 大肠杆菌

大肠杆菌在以葡萄糖为碳源的培养基中厌氧发酵会生成混合有机酸 (乳酸、乙酸、甲酸和琥珀酸) 和乙醇, 并以此来调节糖酵解中产生的还原当量。从遗传学和生理学角度进行氧化还原调节, 可以提高大肠杆菌的乳酸积累能力。目前, 利用基因改造的大肠杆菌生产乳酸的报道大多集中在 D-乳酸方面, 仅有少量利用大肠杆菌基因工程菌生产 L-乳酸的报道。

Liu 等在厌氧条件下通过减少还原性副产品遗传调控宿主的手段提高了乳酸产量。工程菌 *E. coli* SDU4 能够在严格厌氧条件下积累 100 g/L 的 L-乳酸, 转化率达到 1.97 mol/mol 葡萄糖^[27]。赵锦芳等将来源于乳酸片球菌 *Pediococcus acidilactici* 的 L-乳酸脱氢酶基因导入大肠杆菌, 构建了工程菌 JH12。该菌以 6% 的木糖为唯一碳源, 36 h 葡萄糖的消耗速率为 0.88 g/(L·h), L-乳酸生产强度为 0.60 g/(L·h), L-乳酸的产量达到 34.73 g/L, 纯度达到 98%^[28]。田康明等分别从凝结芽胞杆菌 *B. coagulans* CICIM B1821 和大肠杆菌 *E. coli* CICIM B0013 中克隆了 L-乳

酸脱氢酶基因 *BcoaLDH* 和 D-乳酸脱氢酶基因 (*LdhA*) 的启动子片段 *PldhA*。将两条 DNA 片段连接组成了表达盒 *PldhA-BcoaLDH*。将该表达盒通过同源重组删除原始的以 FMN 为辅酶的 L-乳酸脱氢酶编码基因, 转入 *ldhA* 基因缺失菌株 *E. coli* CICIM B0013-080C (*ack-pta pps pflB dld poxB adhE frdA ldhA*) 的染色体上, 获得了 L-乳酸高产菌株 *E. coli* CICIM B0013-090B。发酵 27 h, L-乳酸产量达到 132.4 g/L, 产酸强度达到 4.90 g/(L·h), L-乳酸的得率为 0.94 g/g 甘油, L-乳酸的光学纯度达到 99.95%^[29]。

面临着地球的化石能源资源不可避免地逐渐枯竭, 利用可再生的碳水化合物通过生物加工生产平台化合物越来越具吸引力。大肠杆菌遗传背景清楚, 便于遗传改造, 同时对营养成分需求低, 已成为生产有价值的化学品的平台微生物。通过代谢工程策略获得理性改造的大肠杆菌菌株, 为生物法高效生产众多高价值化学结构单元提供了新工艺^[30]。

2.5 其他 (藻类等)

CO₂ 作为一种可持续碳源, 能够被蓝藻新陈代谢利用生产生物燃料和生物塑料前体。Joseph 等设计了一株产乳酸的 *Synechocystis* sp. PCC 6803, 考察了表达来源于乳酸乳球菌、植物乳杆菌和鼠李糖乳杆菌的不同乳酸脱氢酶基因对乳酸产量的影响, 并通过表达来源于植物乳杆菌的转运蛋白 (*lldp*) 基因将乳酸分泌至胞外。研究表明, 共表达 *lldp* 和来源于植物乳杆菌或鼠李糖乳杆菌的乳酸脱氢酶的蓝藻具有乳酸发酵能力。经过 18 d 的培养, 培养基中分泌的乳酸浓度分别为 (0.17±0.02) mmol/L 或 (0.14±0.02) mmol/L^[31]。

3 提高工业菌株的适应性

乳酸最重要、最大宗的工业应用是用于生产生物可降解材料聚乳酸。随着全球性的能源和资源供求关系的日益紧张, 发展各种生物基可再生原材料势在必行。由于 L-乳酸是聚乳酸合成的前体, 因此, 降低高光学纯乳酸的生产成本是促进聚乳酸产业化发展的必经之路。这就要求提高乳酸生产菌株利用廉价非粮碳源发酵的能力; 同时要显著增强菌株的工业适应性, 以提高发酵强度, 从而降低光学纯乳酸的生产成本。

3.1 利用廉价碳源

纤维素原料是一种廉价的可再生生物质资源, 目前这些资源不但大部分没有得到合理利用, 反而常常造成环境污染。因此, 如何利用纤维素原料高效发酵乳酸一直是研发的重点。近期, 于波等综述了采用非粮生物质发酵生产聚合级 L-乳酸的研究进展^[32], 本文简单介绍近年来采用基因工程菌利用纤维素等非粮原料发酵生产 L-乳酸的进展。

为进一步降低生产成本, 转化纤维素至乳酸需要菌株具有发酵混合糖的能力, 即需菌株具备可同步利用纤维素水解液中的葡萄糖和木糖为碳源发酵生产 L-乳酸的功能。Shinkawa 等构建了一株可以利用木糖同型发酵生产 L-乳酸的乳酸乳球菌工程菌株。通过导入同样来源于乳酸乳球菌的木糖代谢基因簇 *xy/RAB*, 使其获得同化木糖的能力。随后通过构建磷酸转酮酶基因 (*ptk*) 缺陷型突变株, 对其木糖同化的途径进行了修饰, 使其仅产生乳酸一种终产物。进一步引入转酮醇酶基因, 增强了磷酸戊糖途径。最终

构建的工程菌株可以利用木糖生产 50.1 g/L 的 L-乳酸, 光学纯度达 99.6%, 转化率为 1.58 mol/mol, 接近于理论值 1.67 mol/mol^[33]。Wang 等在 50 °C 条件下分离得到一株地衣芽胞杆菌 BL1, 该菌可以发酵葡萄糖生成光学纯的 L-乳酸。在 LB 培养基中最高生产速率达到 7.8 g/(L·h), 在基本培养基中最高生产速率达到 0.7 g/(L·h)。BL1 能在 20 h 和 48 h 内分别消耗 10% 和 15% 的葡萄糖。BL1 和 BL2 分别经过不同浓度木糖和 MS 培养基连续传代, 适应性进化培养后, 最终的突变株 BL3 能够在严格的无机盐基本培养基中有效发酵葡萄糖和木糖, 单位产率分别为 1.9 g/(L·h) 和 1.2 g/(L·h)^[34]。赵筱等通过插入乳酸片球菌的 L-乳酸脱氢酶基因, 构建了产 L-乳酸的大肠杆菌工程菌 WL306。该菌可将 100 g/L 的蔗糖转化生成 81.92 g/L 的乳酸, 产率为 82%, 在发酵产物中 L-乳酸占 99.5%, L-光学纯度达到 99.9%。该工程菌具有利用廉价碳源材料 (甘蔗渣, 糖蜜) 生产高纯度 L-乳酸的工业开发潜力^[35]。Dien 等开发了重组的大肠杆菌, 具有同时发酵葡萄糖和木糖生产 L-乳酸的能力。最佳突变株 FBR19 在利用 100 g/L 等量混合糖时, 获得了 0.77 g/g 的转化率, 也消耗了 75% 的木糖。随后用 FBR19 发酵不同浓度的葡萄糖 (0~40 g/L) 和木糖 (40 g/L) 的混合物, 乳酸转化率则从 0.74 变化至 1.00 g/g^[36]。

淀粉也是目前工业上利用比较多、相对便宜的发酵原料。由于需要添加淀粉酶高温蒸煮释放葡萄糖, 需要消耗一定的能源, 提高了成本。因此, 开发直接发酵生淀粉生产 L-乳酸的工程菌株也是目标之一。通过基因组重排一株德氏乳杆菌 NCIM2025 突变株 (通过亚硝酸诱

变获得) 和一种产淀粉酶的解淀粉芽胞杆菌 ATCC23842, John 等获得了不需要复杂营养、较快生长速率、较低 pH 耐受性和较高产率的乳酸生产菌株。通过优化, 选出的融合子能直接利用液态的木薯渣淀粉, 用低营养供给生产 L-乳酸。在添加各 0.2% 的酵母粉和蛋白胨 (W/W), 使用 2% 的 CaCO₃ 调酸的情况下, 发酵 83 g/L 的木薯渣 (淀粉含量 50%, W/W), 获得了 40 g/L 的 L-乳酸, 转化率为 96%^[37]。

除了纤维素、糖蜜、淀粉等糖类外, 甘油也是工业上生产高附加值的燃料和化工品的重要碳源。Mazumdar 等以一株具有生产 D-乳酸能力的大肠杆菌工程菌为出发菌株, 该工程菌已经敲除相关基因, 使其琥珀酸、乙酸和乙醇的合成最小化; 并过表达了调节细胞呼吸途径中的甘油异化作用的基因 *GlpK/GlpD*。Mazumdar 等对该工程菌进行了原理设计, 使其能同源发酵生产 L-乳酸。具体方案为: 1) 用牛链球菌的 L-乳酸脱氢酶 (L-LDH) 替换掉天然的 D-LDH。2) 阻断代谢旁路, 避免合成 DL-乳酸外消旋混合物, 并防止中间毒素丙酮醛的积累。3) 阻断天然的 L-LDH, 以防止 L-乳酸被代谢。改造后的工程菌以 56 g/L 的粗甘油为底物, 生成了 50 g/L 的 L-乳酸, 达到最高理论转化率的 93%, 光学纯度和化学纯度分别达到 99.9% 和 97%^[38]。

3.2 提高菌株的抗逆性

大宗化学品和材料的生物法生产的发展, 对工业菌株的适应能力、鲁棒性和环境耐受性等生理功能提出更高要求。目标产品的过量积累会对微生物细胞产生毒害作用, 使其活力降低。对目标代谢途径上的单个或多个基因的操作

作,有时会导致胞内微环境(如氧化还原电势)的改变,从而使胞内酶活性大幅变化,产生不可预知的表型。另外,由于微生物细胞代谢往往受到外部环境,如pH值、温度、渗透压、氧化还原电势的影响,仅改造细胞的代谢途径通常不能获得稳定的生理功能,也有很多实验室菌株因操作条件要求苛刻不能在实际生产中应用。因此,从工业应用的角度出发,开发出生产性能良好、对发酵过程中的主要胁迫因素有高耐受性的菌株至关重要^[39]。

在来源广泛的木质生物原料的半纤维素糖浆中,糠醛是一种主要的发酵抑制剂。研究表明0.11 g/L 糠醛就可对微生物生长造成影响^[40]。在大肠杆菌中,糠醛通过NADPH依赖性的氧化还原酶(如YqhD,对NADPH有较低 K_m 值)代谢,与生物合成NADPH相互竞争,从而抑制了细胞生长和木糖代谢。研究发现,NADH依赖型的丙二醇氧化还原酶(FucO)能够降低糠醛含量,这提供了一种新的提高糠醛耐受性的途径。Wang等构建了利用木糖高效生产乙醇或乳酸等初级产品的菌株,这些菌株包括yqhD表达突变菌,该菌在木糖液体培养基中可以耐受10 mmol/L的糠醛。通过质粒表达fucO基因,提高了50%的糠醛耐受性,15 mmol/L糠醛浓度下的产物产量与不加糠醛的对照组相当^[41]。

全基因组水平的易错扩增重组技术(Error-prone whole genome amplification)也是提高菌株性能的有力工具。通过用随机引物和聚合酶易错扩增*Lb. pentosus* ATCC 8041的基因组,扩增目的产物通过电穿孔转化进野生型的*Lb. pentosus*,然后用低pH的琼脂平板进行筛选,提高了该菌的耐酸能力。仅经过一轮突变,就鉴

定出一株突变株(MT3)。在pH 3.8的MRS培养基中,36 h内消耗20 g/L的葡萄糖转化生成乳酸,转化率为95%,而野生型菌株在此条件下则不能生长或产酸。突变株MT3的酸耐受性传代培养25代仍保持遗传稳定。因此,易错全基因组扩增技术是改良乳酸菌表型的有力工具^[42]。

利用干酪乳杆菌生产L-乳酸已成为研究底物抑制和增加乳酸产量的模型,高浓度底物、低pH值、高渗透压等条件抑制了L-乳酸发酵。为了增强菌株在高温下对渗透压的抗逆性,Ge等筛选获得一株突变株*Lb. casei* G-03,该菌在45 °C、360 g/L葡萄糖的条件下筛选获得。在41 °C的发酵条件下,*Lb. casei* G-03将210 g/L的葡萄糖转化生成198.2 g/L的L-乳酸,产率为5.5 g/(L·h)。其产酸的能力和产率分别比野生型高115.2%和97.8%。这种通过提高菌体在高温下对渗透压的耐受性从而提高L-乳酸产量的策略,可为其他菌种增产有机酸提供一种可选途径^[43]。

乳酸链球菌肽诱导的DnaK蛋白的表达对乳酸乳球菌的乳酸发酵性能也有显著影响,DnaK蛋白表达能显著提高菌株的抗逆性并促进乳酸发酵。Abdullah等利用乳酸链球菌肽诱导表达系统,将来源于*Lactococcus lactis*和*E. coli*的DnaK蛋白导入到*Lb. lactis* NZ9000中。工程菌株在40 °C的培养中表现出更高的耐高温胁迫性。经过6 h的热处理,原始菌的细胞活力降低了4.6倍,而表达大肠杆菌DnaK蛋白工程菌的细胞活力则增加了13.5倍。此外,工程菌表现出对多种压力的抗逆性,包括3%的氯化钠、5%的乙醇和0.5%的乳酸(pH 5.47)。40 °C条件下,工程菌的乳酸脱氢酶活力仍保持

稳定。上述研究表明,异源表达大肠杆菌 DnaK 蛋白能够增强菌株的抗性,进而提高在高温条件下的细胞生长和乳酸发酵能力^[44]。

虽然在微生物菌种改造方面取得了很多成功,但是目前很多微生物菌种在工业环境下的适应能力、胁迫抗性和代谢能力方面还远不能满足实际应用。传统菌种改造策略往往过于关注代谢途径,忽略了对细胞应激能力的改造,因此获得的菌株工业适应性较差。为有效利用微生物发酵生产乳酸等大宗平台化学品,除需具备较强的代谢能力外,工业生产菌株还需增强菌株的工业适应性。

4 展望

基因工程(重组 DNA 技术)的问世极大地推动了微生物发酵产业的发展,它使得微生物代谢途径中特定酶反应的遗传改造成为可能。然而,生物体是一个复杂的网络,单一的途径改造并不能实现真正的系统优化。上个世纪 90 年代发展起来的代谢工程技术,为系统改造工业菌株、拓展生物制造的应用范围提供了技术路径。代谢工程技术已被广泛应用于微生物菌种改造,并取得了巨大成功。通过修饰和优化微生物代谢网络与表达调控网络,改善细胞的生理功能,微生物细胞可以被改造成“细胞工厂”,生产各种有用的物质。虽然报道了很多利用代谢工程技术手段改造生产乳酸的例子,但是目前绝大多数的工作都是围绕食品领域。随着聚乳酸的产业发展,对高光学纯的 L-乳酸的需求量的增大,需要我们开发高效的 L-乳酸发酵菌种,进一步降低 L-乳酸的发酵成本和提高 L-乳酸发酵行业的光学纯度,满足聚乳酸的产业

需求^[45-46]。

另一方面,随着燃料、化学品和材料生物制造技术的不断发展,对工业菌株的适应能力、鲁棒性和环境耐受性等生理功能提出更高要求,这就要求高效的微生物菌株除了需要有优化的合成途径外,还需要具备适合工业发酵的最佳生理性能。工业胁迫所引发的细胞内 mRNA、蛋白质、代谢流的变化不是孤立存在而是相互联系的,单一的“组学”分析不利于理解细胞对于突变的响应。如今,基于整体性研究为特点的系统生物学(Systems biology)的系统代谢工程(Systems metabolic engineering)已成为改造细胞复杂代谢调控网络的有力研究工具,通过对所有相关基因、蛋白质间的相互关系进行比较分析,发现新的遗传操作靶点并进行改造,可以更有效地对微生物的代谢能力进行改造。随着更多的重要工业微生物的基因组序列完成测序及“组学”技术研究的深入发展,以及计算生物学的发展,有望在不远的将来,能够利用多尺度多层次的系统代谢工程技术快速构建出更能适应工业生产条件的高效菌株^[4]。

REFERENCES

- [1] Datta R, Henry M. Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies - a review. *J Chem Technol Biotechnol*, 2006, 81(7): 1119-1129.
- [2] Wee YJ, Kim JN, Ryu HW. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. *Food Technol Biotechnol*, 2006, 44(2): 163-172.
- [3] Qin JY, Zhao B, Wang XW, et al. Non-sterilized fermentative production of polymer-grade L-lactic acid by a newly isolated thermophilic

- strain *Bacillus* sp. 2–6. PLoS ONE, 2009, 4(2): e4359.
- [4] Branco dos Santos F, de Vos WM, Teusink B. Towards metagenome-scale models for industrial applications—the case of lactic acid bacteria. *Curr Opin Biotechnol*, 2013, 24(2): 200–206.
- [5] Mills DA. Mutagenesis in the post genomics era: tools for generating insertional mutations in the lactic acid bacteria. *Curr Opin Biotechnol*, 2001, 12(5): 503–509.
- [6] Papagianni M. Recent advances in engineering the central carbon metabolism of industrially important bacteria. *Microb Cell Fact*, 2012, 11(1): 50.
- [7] Shichang L, Zhaoyang Z, Shaobin G, et al. Mutation-screening in L-(+)-lactic acid producing strains by ion implantation. *Indian J Microbiol*, 2011, 51(2): 138–143.
- [8] Adsul M, Khire J, Bastawde K, et al. Production of lactic acid from cellobiose and celotriose by *Lactobacillus delbrueckii* mutant UC-3. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(15): 5055–5057.
- [9] Bai DM, Zhao XM, Li XG, et al. Strain improvement and metabolic flux analysis in the wild-type and a mutant *Lactobacillus lactis* strain for L-(+)-lactic acid production. *Biotechnol Bioeng*, 2004, 88(6): 681–689.
- [10] Yu L, Pei X, Lei T, et al. Genome shuffling enhanced L-lactic acid production by improving glucose tolerance of *Lactobacillus rhamnosus*. *J Biotechnol*, 2008, 134(1/2): 154–159.
- [11] Wang Y, Li Y, Pei X, et al. Genome-shuffling improved acid tolerance and L-lactic acid volumetric productivity in *Lactobacillus rhamnosus*. *J Biotechnol*, 2007, 129(3): 510–515.
- [12] Wang Q, Zhao X, Chamu J, et al. Isolation, characterization and evolution of a new thermophilic *Bacillus licheniformis* for lactic acid production in mineral salts medium. *Bioresour Technol*, 2011, 102(17): 8152–8158.
- [13] Wang LM, Zhao B, Liu B, et al. Efficient production of L-lactic acid from corn cob molasses, a waste by-product in xylitol production, by a newly isolated xylose utilizing *Bacillus* sp. strain. *Bioresour Technol*, 2010, 101(20): 7908–7915.
- [14] Patel MA, Ou MS, Harbrucker R, et al. Isolation and characterization of acid-tolerant, thermophilic bacteria for effective fermentation of biomass-derived sugars to lactic acid. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(5): 3228–3235.
- [15] Wang Q, Ingram LO, Shanmugam KT. Evolution of D-lactate dehydrogenase activity from glycerol dehydrogenase and its utility for D-lactate production from lignocelluloses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(47): 18920–18925.
- [16] Miura S, Dwiarti L, Arimura T, et al. Enhanced production of L-lactic acid by ammonia-tolerant mutant strain *Rhizopus* sp. MK-96-1196. *J Biosci Bioeng*, 2004, 97(1): 19–23.
- [17] Ge CM, Yang YG, Fan YH, et al. Improvement of L-(+)-lactic acid production of *Rhizopus oryzae* by low-energy ions and analysis of its mechanism. *Plasma Sci Technol*, 2008, 10(1): 131–135.
- [18] Bai DM, Li SZ, Liu ZL, et al. Enhanced L-(+)-lactic acid production by an adapted strain of *Rhizopus oryzae* using corncob hydrolysate. *Appl Biochem Biotechnol*, 2007, 144(1): 79–85.
- [19] Bai DM, Zhao XM, Li XG, et al. Strain improvement of *Rhizopus oryzae* for over-production of L-(+)-lactic acid and metabolic flux analysis of mutants. *Biochem Eng J*, 2004, 18(1): 41–48.
- [20] Tokuhiko K, Ishida N, Nagamori E, et al. Double mutation of the PDC1 and ADH1 genes improves lactate production in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* expressing the bovine lactate dehydrogenase gene. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 82(5): 883–890.
- [21] Pacheco A, Talaia G, Sa-Pessoa J, et al. Lactic acid production in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated by expression of the monocarboxylate transporters Jen1 and Ady2. *FEMS Yeast Res*, 2012, 12(3): 375–381.
- [22] Ookubo A, Hirasawa T, Yoshikawa K, et al.

- Improvement of L-lactate production by CYB2 gene disruption in a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain under low pH condition. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2008, 72(11): 3063–3066.
- [23] Osawa F, Fujii T, Nishida T, et al. Efficient production of L-lactic acid by Crabtree-negative yeast *Candida boidinii*. *Yeast*, 2009, 26(9): 485–496.
- [24] Tamakawa H, Ikushima S, Yoshida S. Efficient production of L-lactic acid from xylose by a recombinant *Candida utilis* strain. *J Biosci Bioeng*, 2012, 113(1): 73–75.
- [25] Ilmen M, Koivuranta K, Ruohonen L, et al. Production of L-lactic acid by the yeast *Candida sonorensis* expressing heterologous bacterial and fungal lactate dehydrogenases. *Microb Cell Fact*, 2013, 12(1): 53.
- [26] Zhang Q, Zhang L, Ding CY, et al. Metabolic engineering of wild acid-resistant yeast for L-lactic acid production. *Chin J Biotech*, 2011, 27(7): 1024–1031 (in Chinese).
张勤, 张梁, 丁重阳, 等. 代谢工程改造野生耐酸酵母生产 L-乳酸. *生物工程学报*, 2011, 27(7): 1024–1031.
- [27] Liu H, Kang J, Qi Q, et al. Production of lactate in *Escherichia coli* by redox regulation genetically and physiologically. *Appl Biochem Biotechnol*, 2011, 164(2): 162–169.
- [28] Zhao JF, Xu LY, Wang YZ, et al. Production of L-lactic acid from pentose by a genetically engineered *Escherichia coli*. *Acta Microbiol Sin*, 2013, 53(4): 328–337 (in Chinese).
赵锦芳, 许丽媛, 王永泽, 等. 利用五碳糖产高纯度 L-乳酸的大肠杆菌基因工程菌的构建. *微生物学报*, 2013, 53(4): 328–337.
- [29] Tian KM, Shi GY, Lu FP, et al. High-efficiency L-lactate production from glycerol by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Chin J Biotech*, 2013, 29(9): 1–10 (in Chinese).
田康明, 石贵阳, 路福平, 等. 代谢工程大肠杆菌利用甘油高效合成 L-乳酸. *生物工程学报*, 2013, 29(9): 1–10.
- [30] Yu C, Cao Y, Zou H, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biotechnological production of high-value organic acids and alcohols. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 89(3): 573–583.
- [31] Joseph A, Aikawa S, Sasaki K, et al. Utilization of lactic acid bacterial genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803 in the production of lactic acid. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2013, 77(5): 966–970.
- [32] Yu B, Zeng Y, Jiang X, et al. Trends in polymer-grade L-lactic acid fermentation by non-food biomass. *Chin J Biotech*, 2013, 24(2): 200–206 (in Chinese).
于波, 曾艳, 姜旭, 等. 聚合级 L-乳酸的非粮生物质发酵研究进展. *生物工程学报*, 2013, 29(4): 411–421.
- [33] Shinkawa S, Okano K, Yoshida S, et al. Improved homo L-lactic acid fermentation from xylose by abolishment of the phosphoketolase pathway and enhancement of the pentose phosphate pathway in genetically modified xylose-assimilating *Lactococcus lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 91(6): 1537–1544.
- [34] Wang Q, Zhao X, Chamu J, et al. Isolation, characterization and evolution of a new thermophilic *Bacillus licheniformis* for lactic acid production in mineral salts medium. *Bioresour Technol*, 2011, 102(17): 8152–8158.
- [35] Zhao X, Li KP, Zhao JF, et al. Homofermentative production of pure L-lactic acid by genetic engineered *Escherichia coli*. *Food Ferment Technol*, 2012, 48(5): 40–45 (in Chinese).
赵筱, 李坤朋, 赵锦芳, 等. 高光学纯度 L-乳酸工程菌的构建及其蔗糖发酵. *食品与发酵科技*, 2012, 48(5): 40–45.
- [36] Dien BS, Nichols NN, Bothast RJ. Fermentation of sugar mixtures using *Escherichia coli* catabolite repression mutants engineered for production of L-lactic acid. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2002, 9(5): 221–227.
- [37] John RP, Gangadharan D, Madhavan Nampoothiri K. Genome shuffling of

- Lactobacillus delbrueckii* mutant and *Bacillus amyloliquefaciens* through protoplasmic fusion for L-lactic acid production from starchy wastes. *Bioresour Technol*, 2008, 99(17): 8008–8815.
- [38] Mazumdar S, Blankschien MD, Clomburg JM, et al. Efficient synthesis of L-lactic acid from glycerol by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*, 2013, 12(1): 7.
- [39] Zhang Y, Li Y. Engineering the antioxidative properties of lactic acid bacteria for improving its robustness. *Curr Opin Biotechnol*, 2013, 24(2): 142–147.
- [40] Alterthum F, Ingram LO. Efficient ethanol production from glucose, lactose, and xylose by recombinant *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 1989, 55 (8): 1943–1948.
- [41] Wang X, Miller EN, Yomano LP, et al. Increased furfural tolerance due to overexpression of NADH-dependent oxidoreductase FucO in *Escherichia coli* strains engineered for the production of ethanol and lactate. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(15): 5132–5140.
- [42] Ye L, Zhao H, Li Z, et al. Improved acid tolerance of *Lactobacillus pentosus* by error-prone whole genome amplification. *Bioresour Technol*, 2013, 135: 459–463.
- [43] Ge XY, Yuan J, Qin H, et al. Improvement of L-lactic acid production by osmotic-tolerant mutant of *Lactobacillus casei* at high temperature. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 89(1): 73–78.
- [44] Abdullah-Al-Mahin, Sugimoto S, Higashi C, et al. Improvement of multiple-stress tolerance and lactic acid production in *Lactococcus lactis* NZ9000 under conditions of thermal stress by heterologous expression of *Escherichia coli* DnaK. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(13): 4277–4285.
- [45] Martinussen J, Solem C, Holm, AK, et al. Engineering strategies aimed at control of acidification rate of lactic acid bacteria. *Curr Opin Biotechnol*, 2013, 24(2): 124–129.
- [46] Kleerebezem M, Hugenholtz J. Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria. *Curr Opin Biotechnol*, 2003, 14(2): 232–237.

(本文责编 郝丽芳)