

研究报告

酿酒酵母产苹果酸的还原 TCA 路径构建及发酵调控

闫道江^{1,2}, 王彩霞^{1,2}, 周杰民^{1,2}, 刘谊兰^{1,2}, 杨茂华¹, 邢建民¹

1 中国科学院过程工程研究所 生化工程国家重点实验室, 北京 100190

2 中国科学院大学研究生院, 北京 100049

闫道江, 王彩霞, 周杰民, 等. 酿酒酵母产苹果酸的还原 TCA 路径构建及发酵调控. 生物工程学报, 2013, 29(10): 1484-1493.

Yan DJ, Wang CX, Zhou JM, et al. Construction and fermentation control of reductive TCA pathway for malic acid production in *Saccharomyces cerevisiae*. Chin J Biotech, 2013, 29(9): 1484-1493.

摘要: 苹果酸广泛应用于食品、化工行业。文中通过在酿酒酵母内敲除丙酮酸脱羧酶 *PDC1*, 并通过构建胞质内还原 TCA 的路径, 即超表达丙酮酸羧化酶和苹果酸脱氢酶, 成功地实现了苹果酸的生产。在野生型菌株中基本检测不到苹果酸的生成, 而在工程菌株, 苹果酸发酵浓度达到了 45 mmol/L, 同时副产物乙醇的产量也降低了 18%。进一步通过发酵调控提高第二信使 Ca^{2+} 的浓度使苹果酸的产量提高了 7%, 在此基础上提高丙酮酸羧化酶的辅酶生物素浓度, 使苹果酸的产量达到 52.5 mmol/L, 较原始菌株提高了 16%。

关键词: 酿酒酵母, *PDC1*, 丙酮酸羧化酶, 苹果酸脱氢酶, 还原 TCA 途径, 发酵调控

Received: June 25, 2013; **Accepted:** September 11, 2013

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (Nos. 2011AA02A203, 2012AA022301), Knowledge Innovation Program of the Chinese Academy of Sciences (No. KSCX2-EW-G-2).

Corresponding author: Jianmin Xing. Tel/Fax: +86-10-62550913; E-mail: jmxing@home.ipe.ac.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (Nos. 2011AA02A203, 2012AA022301), 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (No. KSCX2-EW-G-2)资助。

Construction and fermentation control of reductive TCA pathway for malic acid production in *Saccharomyces cerevisiae*

Daojiang Yan^{1,2}, Caixia Wang^{1,2}, Jiemin Zhou^{1,2}, Yilan Liu^{1,2}, Maohua Yang¹, and Jianmin Xing¹

1 National Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

2 Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: Malic acid is widely used in food, and chemical industries. Through overexpressing pyruvate carboxylase and malate dehydrogenase in *pdcl*-deficient *Saccharomyces cerevisiae*, malic acid was successfully produced through the reductive TCA pathway. No malic acid was detected in wild type *Saccharomyces cerevisiae*, however, 45 mmol/L malic acid was produced in engineered strain, and the concentration of byproduct ethanol also reduced by 18%. The production of malic acid enhanced 6% by increasing the concentration of Ca^{2+} . In addition, the final concentration reached 52.5 mmol/L malic acid by addition of biotin. The increasing is almost 16% higher than that of the original strain.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, *PDC1*, pyruvate carboxylase, malate dehydrogenase, malic acid, reductive TCA, fermentation control

苹果酸广泛用于食品、化妆品、医疗和化学工业中，目前苹果酸主要通过石油来源的化学合成的方法^[1]。利用生物发酵法生产苹果酸具有手性纯、可直接用于食品医药行业等优点^[2]。发酵法生产苹果酸目前主要采用催化法，如利用延胡索酸为底物直接转化生产苹果酸^[3-4]。可直接发酵大量产生苹果酸的菌株是黑曲霉 *Aspergillus flavus*^[5]、基因工程的大肠杆菌^[6]等。酿酒酵母被认为是 GRAS (Generally Regarded As Safe) 微生物，具有营养需求简单、底物和产物的耐受力强、耐受低 pH 条件、产物易于分离纯化等优点^[7]。并且酿酒酵母作为真核模式微生物，遗传背景清晰，分子操作技术成熟的特点，使其成为代谢工程改造的良好出发菌株^[8]。

野生型酿酒酵母为偏好产生乙醇^[9]，而有机

酸的积累很少，如二元羧酸基本上发酵浓度在 0.1 g/L 以下^[10]。因此有必要以代谢工程的手段改变酿酒酵母的代谢流，以达到发酵有机酸的目的^[11]。糖酵解产生丙酮酸后，丙酮酸作为节点，通过脱羧最终产生乙酸和乙醇；通过脱氢生成乙酰辅酶 A 进入线粒体并进入 TCA 循环；通过羧化生成草酰乙酸在胞质内进入还原 TCA 循环路径^[12]。其中，脱羧路径的代谢流最为强烈，而羧化反应的代谢流则极低，PDC 的活性通常在 3 U/mg 总蛋白以上^[13]，丙酮酸羧化酶的总活性都在 0.02 U/mg 总蛋白以下。文献报道，PDC 由 3 个基因编码 *PDC1/PDC5/PDC6*，其中 *PDC1* 和 *PDC5* 在葡萄糖为碳源的培养基中表现活性，而 *PDC6* 在非葡萄糖碳源如乳糖、乙醇等中表现活性^[14]。同时敲除 *PDC1* 和

PDC5, 酵母菌株则不能在以葡萄糖为碳源的培养基上生长, 但通过长期进化可以获得可利用葡萄糖并高产丙酮酸的菌株, 但该步骤耗时较长, 通常需要进化筛选半年以上才有可能获得^[15]。丙酮酸羧化酶由 2 个基因 *PYCI* 和 *PYC2* 编码的同工酶, 具有相同的作用, 并定位于胞质内^[16]。苹果酸脱氢酶 *MDH1* 定位于线粒体内参与 TCA 循环^[17], 胞质定位的 *MDH2* 被葡萄糖效应所抑制不表现活性^[18], 而 *MDH3* 定位于过氧化物酶体内, 但研究发现, 通过敲除 *MDH3* 的后 3 个氨基酸可以使其定位于胞质内并表现较高的活性^[19]。

考虑到 3 个丙酮酸脱羧酶敲除后不能在葡萄糖中生长, 而长期进化筛选耗时耗力^[20]。本研究的策略是通过敲除主要的丙酮酸脱羧酶 *PDC1*, 以减少乙醇代谢通量, 进一步通过超表达丙酮酸羧化酶和胞质定位的苹果酸脱氢酶, 以探讨构建酿酒酵母还原 TCA 路径产生苹果酸的可能。

表 1 本研究所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Plasmid or strain	Description
Plasmids	
pRS316	Cen expression vector with <i>URA3</i> marker
pRS316PYC2	Cen expression vector with <i>URA3</i> marker, <i>GPD1</i> promoter, <i>PYC2</i> gene, <i>CYC1</i> terminator
pRS316MDH3ΔSKL	Cen expression vector with <i>URA3</i> marker, <i>TEF2</i> promoter, <i>MDH3</i> gene, <i>ADH1</i> terminator
pRS316PYC2MDH3ΔSKL	Cen expression vector with <i>URA3</i> marker, <i>GPD1</i> promoter, <i>PYC2</i> gene, <i>CYC1</i> terminator; <i>TEF2</i> promoter, <i>MDH3</i> gene, <i>ADH1</i> terminator
Strains	
CEN.PK 2-1D	<i>MATa ura3-52; trp1-289; leu2-3,112; his3Δ 1</i>
CP100	<i>MATa pdc1Δ 1; ura3-52; trp1-289; leu2-3,112; his3Δ 1</i>
CP101	<i>MATa pdc1Δ 1; ura3-52; trp1-289; leu2-3,112; his3Δ 1; {pRS316}</i>
CP102	<i>MATa pdc1Δ 1; ura3-52; trp1-289; leu2-3,112; his3Δ 1; {pRS316PYC2}</i>
CP103	<i>MATa pdc1Δ 1; ura3-52; trp1-289; leu2-3,112; his3Δ 1; {pRS316MDH3ΔSKL}</i>
CP104	<i>MATa pdc1Δ 1; ura3-52; trp1-289; leu2-3,112; his3Δ 1; {pRS316PYC2MDH3ΔSKL}</i>

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

所用菌株和质粒如表 1 所示; 酿酒酵母菌株 *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK 2-1D 购自德国 Euroscarf 菌种库; 质粒 pRS316 由中国科学院天津工业生物技术研究所王钦宏研究员惠赠; 感受态细胞菌株 DH 5 α 由本实验室自存。

1.1.2 培养基及抗生素

酿酒酵母合成培养基 SD 包含 20 g/L 葡萄糖, YNB 6.7 g/L, 用 10 mol/L KOH 调节 pH 值到 6.0, 对于氨基酸缺陷型菌株, 再依次加入对应的氨基酸 0.1 g/L。发酵培养在 500 mL 圆底三角瓶中进行, 装液量为 100 mL, 培养温度 30 °C, 转速 200 r/min, 接种至初始 OD 为 0.2。发酵培养基包含 YNB 6.7 g/L, 150 g/L 葡萄糖, 及对应的氨基酸 (0.1 g/L), 用 10 mol/L KOH 调节 pH 值到 4.8, 并于 110 °C、20 min 高压灭菌后加入

5 g/L 碳酸钙。大肠杆菌的培养使用 LB 培养基：胰蛋白胨 10 g/L，酵母提取物 5 g/L，氯化钠 5 g/L。氨苄青霉素母液浓度 50 mg/mL，使用浓度 100 mg/L。5-FOA 使用 DMSO 溶解至 100 mg/mL，使用浓度为 1 mg/mL。

1.1.3 主要试剂

BSA、NADH 购自天根公司；苹果酸脱氢酶、乙醇脱氢酶、5-FOA 购自百灵威公司；快速连接酶、DNA 标准分子量 marker、限制性内切酶、微生物快速裂解缓冲液为 TaKaRa 公司产品；凝胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒为 Axygen 公司产品。高保真酶 KOD-Plus-Neo 为 TOYOBO 公司产品。其余产品为进口分装或国产分析纯。引物由 primer premier 5 软件设计后交于北京赛百盛公司合成，PCR 产物和质粒测序由上海美集生物公司完成，本文用到的引物列于表 2。

1.2 方法

1.2.1 基因克隆与质粒构建

酿酒酵母基因组模板制备：挑取少量菌落至 50 μ L 微生物快速裂解缓冲液中，80 $^{\circ}$ C 裂解 10 min 后，4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min 置于-20 $^{\circ}$ C 备用。PYC2 表达簇包含 *GPD1* 启动子、*PYC2* 基因和 *CYC1* 终止子 3 部分，*GPD1* 启动子和 *CYC1* 终止子 (包含 *PYC2* 序列) 的扩增以 CEN.PK 2-1D 为模板，高保真酶扩增程序：94 $^{\circ}$ C 5 min；94 $^{\circ}$ C 30 s，55 $^{\circ}$ C 30 s，68 $^{\circ}$ C 30 s，35 个循环；68 $^{\circ}$ C 5 min。琼脂糖凝胶电泳回收 *GPD1* 和 *CYC1* 的 PCR 产物后作为引物扩增 *PYC2* 基因获得 *PYC2* 表达簇。*MDH3 Δ SKL* 表达簇以类似方法构建，启动子为 *TEF2*，终止子为 *ADH1*，其中 *MDH3* 基因缺失最后 9 个碱基。

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
PDC1Knock1	AGTTTTTGGTGGTTCGGCTT	21
PDC1Knock2	TCCTTATATGTAGCTTTCGACATGCAGTTTTGAATTGAGTAACCATTATTTGTATCGA GGTGTCTAGTCTTCTATTACACTAATGCAGTTTCAGGGTTTTGGGGCGCAATTGGC CTTTGATTGATTTGACTGTGTT	136
PDC1Knock3	GAAGATGCGGCCAGCAAAACTAAGCGATTTAATCTCTAATTAT	43
PDC1Knock4	AAACCACACTGTTTAAACAGT	21
PYC2GPDs	ATAT <u>TCTAGAG</u> GCAAGGTGACAGCGGTCCCC	29
PYC2GPDa	CCAATTTCTTGCTACTGCTCATCTTTATATTATCAATATT	40
PYC2CYCs	TACCCCCATCCCCAAAAAAGTAAACAGGCCCTTTTCCTTTGT	43
PYC2CYCa	TAAG <u>TCTGACA</u> AAAATATGCACATGAGGCGAA	30
MDH3TEFs	ATAT <u>TCTAGA</u> CCAATCAGCAAACCTACCTCCG	30
MDH3TEFa	AAGAATTGCGACTTTGACCATGTTTAGTTAATTATAGTTCGT	42
MDH3ADHs	AGTTTCATCCTAGACTCTTCCGCGAATTTCTTATGATTTATG	42
MDH3ADHa	ATAC <u>CGCGGCT</u> CAGGTAAGGGGCTAGTAGA	30

The underlined nucleotides represent the used restriction enzyme sites for vector construction

PYC2 表达簇和 pRS316 以 *Xba* I 和 *Sal* I 酶切后用 Solution I 连接 3 h 并转化感受态细胞, 阳性克隆经酶切验证正确后即为重组合 pRS316PYC2。pRS316 PYC2 和 *MDH3* 表达簇以 *Xba* I 和 *Sac* II 双酶切后, 用 Solution I 连接 3 h, 热激转化 DH5 α 细胞, 阳性克隆经质粒酶切验证正确即为 pRS316PYC2MDH3 Δ SKL。

1.2.2 *PDC1* 基因的敲除

根据无痕基因敲除方法^[21], 以 PDC1Knock1 和 PDC1Knock2 为引物扩增 5' 同源区 500 bp, PDC1Knock3 和 PDC1Knock4 为引物扩增 3' 同源区 300 bp, 以 5' 同源区和 3' 同源区为引物, pRS316 为模板扩增 *URA3* 基因获得敲除组件。敲除组件经电转化酿酒酵母后在缺失尿嘧啶的 SD 培养基上筛选 *pdc1* 敲除菌株。因 PDC1Knock2 包含 3' 同源区后的 80 bp 序列, 可在细胞分裂中发生自发染色体重组删除筛选标记, 在 5-FOA 上可筛选到回收 *URA3* 标记的 *pdc1* 敲除菌株。

1.2.3 酿酒酵母电转化条件

酿酒酵母电转感受态细胞依据文献方法制备^[22], 电转化条件为: 转化体系包含 40 μ L 感受态细胞, 1 μ g 质粒或 DNA, 1 μ L 10 mg/mL 单链鲑鱼精 DNA。体系混合均匀并置于冰上 30 min 后转移至 0.2 cm 电极杯中, 电转化条件为: BIO-RAD MicroPulse 165-2100 电转仪, 电压 1.5 kV, 电击时间 6 ms。

1.2.4 酶活检测

酿酒酵母细胞在 SD 培养基中预培养 24 h 至对数生长期, 12 000 r/min 离心 30 s 收集细胞, 用 10 mmol/L 磷酸钾 (pH 7.0) 清洗 2 次后, 悬浮并置于 -20 $^{\circ}$ C 备用。检测前将离心收集的细

胞用 0.2 mL 100 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.4) 重新悬浮, 并加入 1 mmol/L DTT, 0.75 g 玻璃珠, 在超声波仪中超声 6 s, 置于冰上 1 min, 重复过程 10 次, 4 $^{\circ}$ C、5 800 r/min 离心 20 min, 所得上清液即为细胞提取物, 立即用于酶活的检测, 总蛋白量以考马斯亮蓝法定量^[23]。1 min 转化 1 μ mol 底物所需的酶量, 称为 1 个酶活单位 (U)。比酶活 (U/mg 总蛋白) 则定义为细胞提取物中, 每 mg 总蛋白所含有的酶活。

丙酮酸脱羧酶 (EC4.1.1.1) 反应混合液每 1 mL 包含 100 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.4), 0.2 mmol/L 硫胺素焦磷酸, 0.15 mmol/L NADH, 乙醇脱氢酶 8 U, 5 mmol/L MgCl₂, 细胞提取物 30 μ L, 反应起始 50 mmol/L 丙酮酸钾的加入。通过紫外分光光度计 *OD*₃₄₀ 测定 NADH 的消耗量。

丙酮酸羧化酶 (EC6.4.1.1) 反应混合液每 mL 包含 100 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.4), 7.5 mmol/L MgSO₄, 0.1 mmol/L acetyl-CoA, 20 mmol/L KHCO₃, 0.15 mmol/L NADH, 12 U 苹果酸脱氢酶, 10 mmol/L 丙酮酸钾, 细胞提取物 30 μ L, 反应起始于 1 mmol/L ATP 的加入。通过紫外分光光度计 *OD*₃₄₀ 测定 NADH 的消耗量。

苹果酸脱氢酶 (EC1.1.1.82) 反应混合液每 mL 包含 100 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.4), 7.5 mmol/L MgSO₄, 1 mmol/L 草酰乙酸, 细胞提取物 30 μ L, 反应起始于 0.15 mmol/L NADH 的加入。通过紫外分光光度计 *OD*₃₄₀ 测定 NADH 的消耗量。

1.3 菌体生长及 HPLC 分析条件

将发酵液稀释合适的倍数使其 *OD*₆₀₀ 值处于 0.2~0.7 之间, 并记录以监控细胞生长。葡萄

糖、丙酮酸、苹果酸、丁二酸、乙醇的分析采用 Agilent 公司 HP1200 工作站, 色谱分离柱为 BioRad Aminex HPX-87H 有机酸柱(300 mm × 7.8 mm, 9 μm), 流动相: 2.5 mmol/L H₂SO₄, 流速 0.6 mL/min, 柱温 50 °C。

2 结果

2.1 *PDC1* 基因的敲除

以 CEN.PK 2-1D 基因组为模板, 利用设计的引物扩增 5' 同源区和 3' 同源区, 并以此为引物, pRS316 为模板进行第 2 轮扩增获得含有 *URA3* 标记的敲除组件, 大小约 1.6 kb (图 1)。PCR 大量扩增敲除组件后电转化 CEN.PK 2-1D 中, 并不添加尿嘧啶的 SD 培养基上筛选。接种阳性克隆至 YPD 培养基中, 连续传代 3 次后, 在含有 5-FOA 和尿嘧啶的 SD 培养基上筛选 *URA3* 标记被删除的 *pdcl* 敲除突变体, 并测定酶活以最终确定 *PDC1* 被敲除。酶活检测表明, *PDC1* 被敲除后, PDC 的活性由原始菌株的 3.2 U/mg 总蛋白, 降低到 2.1 U/mg 总蛋白, 证明 *PDC1* 确实被敲除。

2.2 *PYC2*、*MDH3* 超表达载体的构建

真核生物为单顺反子转录, 因此每个超表达的基因都分别携带一个启动子和终止子。*PYC2* 表达簇包括 *GPD1* 启动子(824 bp)、*PYC2* 基因 (3 544 bp) 和 *CYC1* 终止子 (437 bp) 共 4.8 kb, 通过 *Xba* I 和 *Sal* I 连接到 pRS316 上。*MDH3* 表达簇包括 *TEF2* 启动子(471 bp)、*MDH3* 基因 (1 024 bp) 和 *ADH1* 终止子 (402 bp) 共 1.95 kb, 通过 *Xba* I 和 *Sac* II 连接到 pRS316 和 pRS316PYC2 上。重组质粒经酶切验证 (图 2) 并测序确保读码框的正确性。

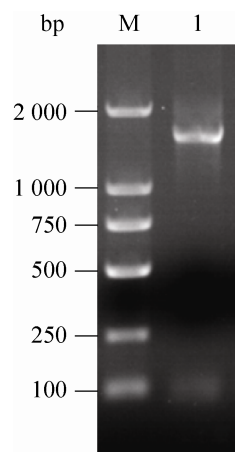


图 1 *PDC1* 敲除组件的 PCR 扩增

Fig. 1 Amplification of *PDC1* knockout cassette by PCR. M: DNA marker; 1: PCR product of *PDC1* knockout cassette.

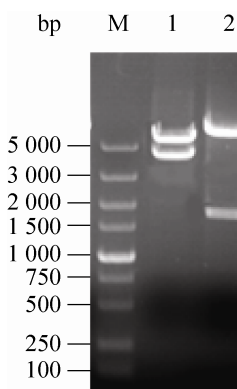


图 2 重组质粒 pRS316PYC2MDH3ΔSKL 的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of the recombinant plasmid pRS316PYC2MDH3ΔSKL. M: DNA marker; 1: digest products with *Sal* I and *Xba* I; 2: digest products with *Sac* II and *Xba* I.

2.3 超表达菌株的酶活测定

重组质粒转化至对应的酿酒酵母菌株后, 对转基因菌株进行酶活检测以确定超表达的效果。如表 3 所示, 原始菌株内 *PYC* 的活性只有 0.02 U/mg 总蛋白, 而超表达 *PYC2* 的菌株酶活

表 3 转基因菌株中的 PYC 和 MDH 酶活

Table 3 Enzyme activities of PYC and MDH in transgenic strains

Strains	PYC activity (U/mg protein)	MDH activity (U/mg protein)
CP101	0.02 ± 0.01	1.2 ± 0.7
CP102	0.24 ± 0.011	1.2 ± 0.5
CP103	0.02 ± 0.01	32.6 ± 2.3
CP104	0.22 ± 0.015	32.4 ± 1.2

最高提高至 0.24 U/mg 总蛋白。原始菌株内的 MDH 活性为 1.2 U/mg, 而超表达 MDH3 突变型可使 MDH 的活性提高到 32.6 U/mg 总蛋白。酶活检测表明超表达这两个基因可获得较高的酶活, 因此推测其可以与 PDC 有效竞争底物丙酮酸从而通过还原 TCA 途径达到积累苹果酸的目的。

2.4 超表达 PYC2 和 MDH3 对酿酒酵母发酵的影响

当 *PDC1* 被敲除的时候, PDC 的活性减小, 并在发酵过程中有丙酮酸的积累 (图 3A)。当单独超表达丙酮酸羧化酶时, 丙酮酸的积累减少 (表 4), 但并没有明显的苹果酸积累, 主要是因为胞质内缺少有活性的苹果酸脱氢酶。单独超表达苹果酸脱氢酶时, 有 18.2 mmol/L 的苹果酸积累, 同时乙醇的产量也降低。当共表达苹果酸脱氢酶和丙酮酸羧化酶时, 苹果酸的产量提高到 45 mmol/L (图 3B), 且丙酮酸基本被还原, 乙醇产量也进一步降低, 表明碳代谢流明显从丙酮酸脱羧方向进入丙酮酸羧化即还原 TCA 路径上。同时, 丁二酸的产量也提高了约 3.4 倍, 可能是通过 TCA 循环氧化或乙醛酸循环所积累的, 具体机制有待于进一步研究。

2.5 Ca²⁺对苹果酸发酵的影响

文献报道, Ca²⁺对苹果酸的发酵具有明显的

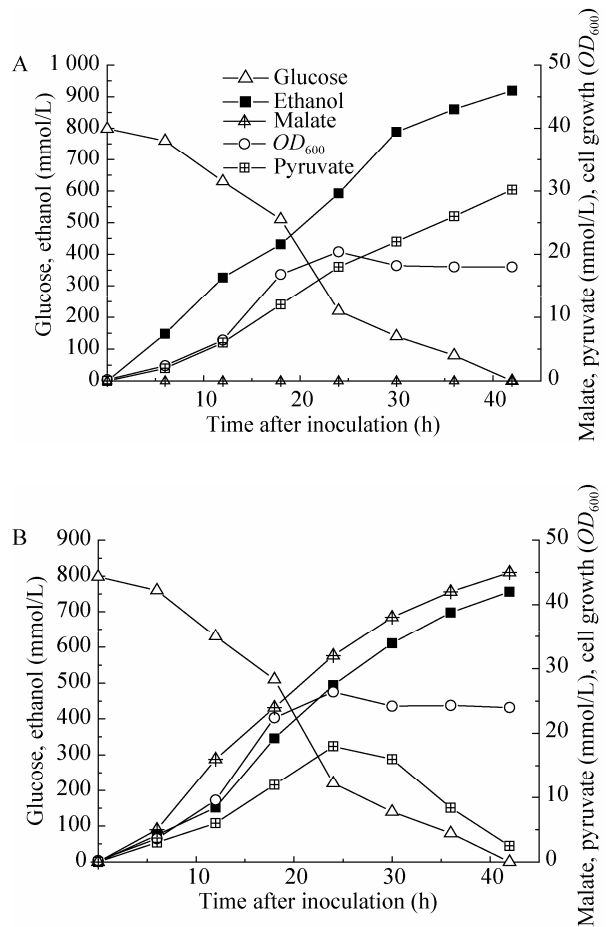


图 3 *pdc1* 菌株与 PYC2、MDH3 共表达菌株的发酵特征

Fig. 3 Batch fermentation performance of *pdc1* and PYC2/MDH3 co-expression strain. (A) Fermentation feature of *pdc1*. (B) Fermentation profile of CP104.

促进作用^[24], 但发酵过程中产酸较慢且 CaCO₃ 的溶解度较低因而发酵过程中 Ca²⁺ 浓度较低。因此, Ca²⁺也作为调控因素进行了研究。由图 4 中可以看到在培养基中外源添加 5 和 10 mmol/L CaCl₂ 的时候, 苹果酸的产量由 45 mmol/L 提高到了 47.9 和 48.1 mmol/L, 而进一步的发酵调控中统一采用外源添加 10 mmol/L CaCl₂ 的培养基。

表 4 工程菌中发酵产物的鉴定

Table 4 Fermentation products in engineered strains

Strains	Glucose consumed (mmol/L)	Malate (mmol/L)	Succinate (mmol/L)	Pyruvate (mmol/L)	Ethanol (mmol/L)	Glycerol (mmol/L)	OD_{600}
CP101	798	–	2.4±0.02	30.2±0.13	919±1.2	82.8±1.2	18.2±1.3
CP102	798	–	2.8±0.07	7.3±0.08	916±0.72	86.3±2.8	22.8±0.6
CP103	798	18.2±0.12	5.6±0.03	6.8±0.02	805±0.87	78.5±3.6	23.2±0.8
CP104	798	45±0.08	7.8±0.11	2.5±0.07	756±0.74	84.9±1.7	24.2±1.2

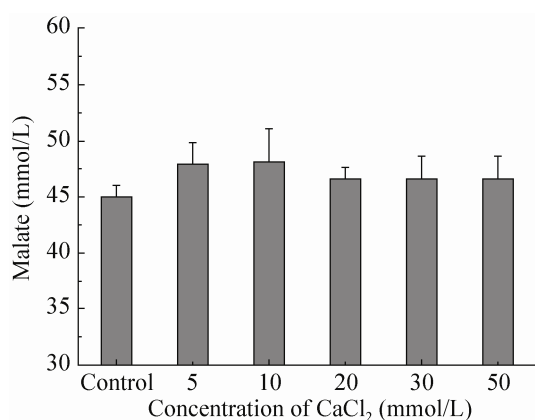
图 4 CaCl₂ 浓度对苹果酸产量的影响

Fig.4 Effect of CaCl₂ concentrations on the production of malate

2.6 生物素对苹果酸发酵的影响

在工程菌中, PYC 的活性为 0.24 U/mg, 而 MDH 为 32.4 U/mg, 相对而言, PYC 的活性较低, 可能是苹果酸进一步产生的限制性步骤。丙酮酸羧化酶 (PYC) 以丙酮酸、ATP 和 CO₂ 为底物, 以乙酰辅酶 A 和生物素为辅酶, 催化丙酮酸到草酰乙酸的转化。因此考察了生物素对工程菌苹果酸发酵的影响。由图 5 中可以看到, 在添加 1~10 mmol/L 生物素的发酵过程中, 苹果酸的产量均有不同程度的提高, 在生物素浓度为 5 mmol/L 时, 苹果酸的产量提高到了 52.5 mmol/L, 较对照提高了 9%。但当生物素的浓度高于 5 mmol/L 时, 苹果酸的产量并没有进一步的提高, 表明

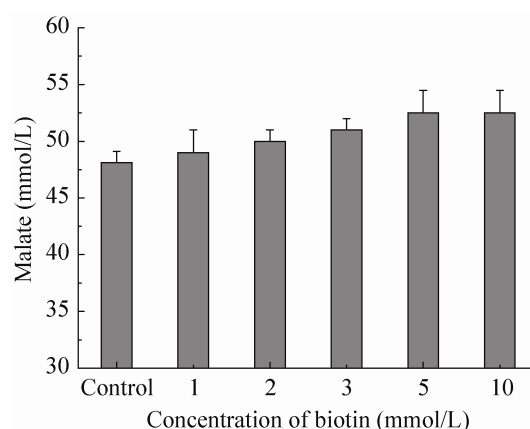


图 5 生物素对苹果酸产量的影响

Fig. 5 Effect of biotin concentrations on the production of malate.

作为 PYC 的辅酶供给基本达到饱和。

3 讨论

本研究首先通过敲除 *PDC1* 基因, 使酿酒酵母的乙醇代谢通量降低, 进一步通过超表达丙酮酸羧化酶和苹果酸脱氢酶, 在胞质内重构了产生苹果酸的还原 TCA 路径。最终获得了 45 mmol/L 的苹果酸, 进一步通过发酵调控, 提高 Ca²⁺ 浓度, 使苹果酸的产量增加到 48.1 mmol/L, 提高了 7%。在此基础上进一步提高丙酮酸羧化酶的辅酶生物素的浓度, 使苹果酸的产量增加到了 52.5 mmol/L。文献报道, 酿酒酵母中并不

含有二元羧酸(苹果酸、富马酸等)的转运蛋白^[25],通过外源表达粟酒裂殖酵母的苹果酸透性酶 *SpMAE1* 苹果酸的产量提高了3倍^[19,26]。因此下一步的工作目标是通过寻找新的苹果酸转运蛋白以进一步提高苹果酸的产量^[27-28]。

还原 TCA 途径被认为是产生二元羧酸产率最高的途径^[29],本文通过构建胞质 TCA 还原途径获得了苹果酸,因此以该菌株为基础,未来通过还原 TCA 途径的进一步构建理论上可以获得用途更为广泛的丁二酸^[30]。

REFERENCES

- [1] Werpy T, Petersen G, Aden A, et al. Top value added chemicals from biomass. Volume 1-Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas[EB/OL]. [2013-06-25]. http://www.pnl.gov/main/publications/external/technical_reports/PNNL-14808.pdf.
- [2] Zhang JM, Wu QP, Zhou XY, et al. Physiological function and application prospect of L-malic acid. *China Microbiol*, 1997, 24(2): 116-117 (in Chinese).
张菊梅, 吴清平, 周晓燕, 等. L-苹果酸的生理功能和应用前景. *微生物学通报*, 1997, 24(2): 116-117.
- [3] Hu YH, Ouyang PK, Shen SB, et al. Study on the optimal conditions in simultaneous reaction and separation for L-malic acid production. *Chin J Biotech*, 2001, 17(5): 503-505 (in Chinese).
胡永红, 欧阳平凯, 沈树宝, 等. 反应分离耦合技术生产 L-苹果酸工艺过程的优化研究. *生物工程学报*, 2001, 17(5): 503-505.
- [4] Stojkovič G, Žnidaršič-Plazl P. Continuous synthesis of L-malic acid using whole-cell microreactor. *Process Biochem*, 2012, 47(7): 1102-1107.
- [5] Battat E, Peleg Y, Bercovitz A, et al. Optimization of L-malic acid production by *Aspergillus flavus* in a stirred fermentor. *Biotechnol Bioeng*, 1991, 37(11): 1108-1116.
- [6] Zhang X, Wang X, Shanmugam KT, et al. L-Malate production by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(2): 427-434.
- [7] Xu GQ, Liu LM, Chen J. Metabolic engineering strategies for carboxylic acids production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Microbiol Sin*, 2011, 51(112): 1571-1577 (in Chinese).
徐国强, 刘立明, 陈坚. 酿酒酵母生产羧酸的代谢工程策略. *微生物学报*, 2011, 51(112): 1571-1577.
- [8] Österlund T, Nookaew I, Nielsen J. Fifteen years of large scale metabolic modeling of yeast: developments and impacts. *Biotechnol Adv*, 2012, 30(5): 979-988.
- [9] Nevoigt E. Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2008, 72(3): 379-412.
- [10] Raab AM, Gebhardt G, Bolotina N, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the biotechnological production of succinic acid. *Metab Eng*, 2010, 12(6): 518-525.
- [11] Liu L, Redden H, Alper HS. Frontiers of yeast metabolic engineering: diversifying beyond ethanol and *Saccharomyces*. *Curr Opin Biotechnol*, 2013, doi: 10.1016/j.copbio.2013.03.005.
- [12] Pronk J, Steensma Y, Johannes P. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 1996, 12(16): 1607-1633.
- [13] Flikweert MT, Van Der Zanden L, Janssen WM, et al. Pyruvate decarboxylase: an indispensable enzyme for growth of *Saccharomyces cerevisiae* on glucose. *Yeast*, 1996, 12(3): 247-257.
- [14] Hohmann S. Characterization of *PDC6*, a third structural gene for pyruvate decarboxylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 1991, 173(24): 7963-7969.
- [15] Maris AJA, Geertman JMA, Vermeulen A, et al. Directed evolution of pyruvate decarboxylase-negative *Saccharomyces cerevisiae*, yielding a

- C₂-independent, glucose-tolerant, and pyruvate-hyperproducing yeast. *Appl Environ Microb*, 2004, 70(1): 159–166.
- [16] Stucka R, Dequin S, Salmon JM, et al. DNA sequences in chromosomes II and VII code for pyruvate carboxylase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of pyruvate carboxylase-deficient strains. *Mol Gen Genet MGG*, 1991, 229(2): 307–315.
- [17] McAlister-Henn L, Thompson LM. Isolation and expression of the gene encoding yeast mitochondrial malate dehydrogenase. *J Bacteriol*, 1987, 169(11): 5157–5166.
- [18] Minard KI, McAlister HL. Isolation, nucleotide sequence analysis, and disruption of the MDH2 gene from *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for three isozymes of yeast malate dehydrogenase. *Mol Cell Biol*, 1991, 11(1): 370–380.
- [19] Zelle RM, de Hulster E, van Winden WA, et al. Malic acid production by *Saccharomyces cerevisiae*: engineering of pyruvate carboxylation, oxaloacetate reduction, and malate export. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74(9): 2766–2777.
- [20] Wang Z, Gao C, Wang Q, et al. Production of pyruvate in *Saccharomyces cerevisiae* through adaptive evolution and rational cofactor metabolic engineering. *Biochem Eng J*, 2012, 67(0): 126–131.
- [21] Akada R, Kitagawa T, Kaneko S, et al. PCR-mediated seamless gene deletion and marker recycling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 2006, 23(5): 399–405.
- [22] Manivasakam P, Schiestl RH. High efficiency transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by electroporation. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21(18): 4414–4415.
- [23] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, 193(1): 265–275.
- [24] Zelle RM, de Hulster E, Kloezen W, et al. Key process conditions for production of C4 dicarboxylic acids in bioreactor batch cultures of an engineered *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Appl Environ Microb*, 2009, 76(3): 744–750.
- [25] Casal M, Paiva S, Queiros O, et al. Transport of carboxylic acids in yeasts. *FEMS Micro Rev*, 2008, 32(6): 974–994.
- [26] Chen X, Xu G, Xu N, et al. Metabolic engineering of *Torulopsis glabrata* for malate production. *Metab Eng*, 2013, 19: 10–16.
- [27] Casal M, Paiva S, Queirós O, et al. Transport of carboxylic acids in yeasts. *FEMS Microbiol Rev*, 2008, 32(6): 974–994.
- [28] André B. An overview of membrane transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 1995, 11(16): 1575–1611.
- [29] Raab AM, Lang C. Oxidative versus reductive succinic acid production in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioeng Bugs*, 2011, 2(2): 120–123.
- [30] Cheng KK, Zhao XB, Zeng JA, et al. Biotechnological production of succinic acid: current state and perspectives. *Biofuels Bioprod Bioref*, 2012, 6(3): 302–318.

(本文责编 郝丽芳)