代谢工程改造酿酒酵母生产 L-苹果酸

陈修来[1,2]，王元彩[1,2]，董晓翔[1,2]，罗秋玲[1,2]，刘 佳[1,2]，刘立明[*1,2]
（1. 食品科学与技术国家重点实验室，江南大学，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122）

摘要：为了研究胞质还原路径对酿酒酵母积累 L-苹果酸的影响，通过在酿酒酵母中过量表达源于黄曲霉的丙酮酸羧化酶（Afpyc）、苹果酸脱氢酶（Afmdh）及 C4-二羧酸转运蛋白（Afmae），成功构建了 L-苹果酸合成的胞质还原路径。结果表明：（1）当低水平表达 Afpyc 时，其丙酮酸浓度降低了 42%，但不能积累 L-苹果酸；（2）当共表达 Afpyc 和 Afmdh 时，菌株 W005 积累了 1.93 g/L 的 L-苹果酸，与对照菌株 W004 相比细胞干重提高了 350%，丙酮酸降低了 65.9%；（3）当共表达 Afpyc、Afmdh 和 Afmae 时，菌株 W006 的 L-苹果酸产量提高了 21.2%，达到 2.34 g/L；4）通过提高接种量至初始 OD_{600}=2，L-苹果酸的产量提高到 3.28 g/L。通过在酿酒酵母中过量表达黄曲霉胞质还原路径的关键基因，使得工程菌能够积累 L-苹果酸，为目标产物的高效积累提供了一种可借鉴的思路。

关键词：酿酒酵母；胞质还原路径；L-苹果酸；代谢工程
中图分类号：TQ 922.9　**文章编号**：1673-1689(2019)02-0072-09　**DOI**：10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.02.011

Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for L-Malic Acid Production

CHEN Xiulai[1,2], *WANG Yuancai*[1,2], *DONG Xiaoxiang*[1,2], *LUO Qiuling*[1,2], *LIU Jia*[1,2], *LIU Liming*[*1,2]
(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: With the purpose of elucidating the introduction of cytoplasmic reductive pathway in *Saccharomyces cerevisiae* on the production of L-malic acid, the reductive pathway for L-malic acid biosynthesis is constructed in *S. cerevisiae* by overexpressing genes *Afpyc*, *Afmdh* and *Afmae* from *Aspergillus flavus*. When gene *Afpyc* is kept in low level, the pyruvate titers of W003 are decreased 42% compared with control strain W001, respectively. To further introduced gene *Afmdh* in strain W003, the concentration of L-malic acid in W005 is up to 1.93 g/L, the DCW is increased by 350% and the pyruvate titers is decreased by 65.9% than that of the strain W004. Moreover, the malate

收稿日期：2016-05-20
基金项目：国家 863 计划项目（2012AA022108；2014AA021501；2014AA021701）；江苏省科技支撑计划社会发展项目（BE2013612）；江南大学食品科学与技术国家重点实验室自由探索资助课题（SKLF-ZZA-201602）。
作者简介：陈修来（1985—），男，博士，副教授，硕士研究生导师，主要从事微生物系统代谢工程与合成生物学的研究。E-mail：cxl2006202420@126.com
*** 通信作者**：刘立明（1976—），男，博士，教授，博士生导师，主要从事微生物生理功能解析与调控的研究。E-mail：mingll@jiangnan.edu.cn
引用本文：陈修来，王元彩，董晓翔，等. 代谢工程改造酿酒酵母生产 L-苹果酸[J]. 食品与生物技术学报，2019，38(02)：72-80.

efflux system is enhanced by introducting the tansporter gene *Afmae* and the L-malic acid titers of strain W006 is increased by 21.2%(2.34 g/L). The concentrations of L-malic acid is increased from 2.34 g/L to 3.28 g/L with the initial OD_{600}=2. It could be summarized that introducting the reductive pathway of overproducing L-malic acid strain *A. flavus* in *S. cerevisiae* is indeed producted L-malic acid, and this successful method provides a strategy to the metabolic engineering.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, reductive pathway, L-malic acid, metabolic engineering

L-苹果酸作为生物体 TCA 循环的重要中间体，在食品、化工、医药等领域具有广泛的应用[1]。早期关于 L-苹果酸的研究主要集中于高产菌株的筛选和培养条件的优化[1-2]。通过优化发酵条件，如：转速、溶氧、氮源浓度、金属离子及 $CaCO_3$ 添加量等，使得黄曲霉(*Aspergillus flavus*)在 190 h 时能够积累 113 g/L 的 L-苹果酸，生产强度达到 0.59 g/L/h[1]。由于高产 L-苹果酸的野生型菌株为霉菌[3]，具有发酵周期长、条件难以控制、产生黄曲霉毒素等缺点，使其不能被广泛的应用[4]。因此，近年来的研究主要集中于代谢工程策略改造常见工业微生物生产 L-苹果酸，如：酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)[5]、光滑球拟酵母 (*Torulopsis glabrata*)[6] 和大肠杆菌(*Escherichia coli*)[7-8]等。由于 *S. cerevisiae* 较其他微生物，具有以下优点：(1) 良好的食品安全性，*S. cerevisiae* 已广泛应用于食品、医药等领域；(2) 低 pH 耐受性，有利于高效积累有机酸、降低下游提取纯化成本；(3) 高葡萄糖耐受性，为实现高密度发酵奠定基础。因此，*S. cerevisiae* 被认为是二羧酸生产的潜在高效细胞工厂[9]。

目前，*S. cerevisiae* 生产 L-苹果酸的代谢策略主要有：1) L-苹果酸积累路径的构建：以丙酮酸为起点在丙酮酸羧化酶 (PYC) 及苹果酸脱氢酶(MDH)的作用下积累 L-苹果酸，即胞质还原路径，因该路径简单且理论得率高，而被广泛应用于二羧酸的生产[7-10]。通过在丙酮酸高产菌株 *S. cerevisiae* TAM 中过量表达基因 PYC2 和 MDH△SKL 构建 L-苹果酸积累的胞质还原路径，使得 L-苹果酸产量提高了 3 倍[11]；2) 转运系统的强化：研究表明 L-苹果酸的外转运是限制 L-苹果酸积累的关键性因素[6,12]。在构建完成 L-苹果酸路径的基础上，过量表达源于栗酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)的 C4-二羧酸转运蛋白，使得 L-苹果酸产量提升到了 31.5 g/L[5]；3) 启动子表达水平的改造：Pines 等[13]利用不同表达强度的启动子，对基因 MDH2 进行过量表达，有效的提高了 MDH 的酶活，最终使得 L-苹果酸产量达到 11.8 g/L。

本研究以高产丙酮酸的 *S. cerevisiae* tTAM 为出发菌株，利用分子生物学手段将高产 L-苹果酸 *A. flavus* 代谢路径表达于 *S. cerevisiae* 中，构建 *Afpyc* 单表达，*Afpyc*、*Afmdh* 双基因共表达和 *Afpyc*、*Afmdh*、*Afmae* 三基因共表达的工程菌株，通过分析基因表达对碳流分布的影响，探讨 *A. flavus* 胞质还原路径对 *S. cerevisiae* 积累 L-苹果酸的影响，为利用代谢工程策略生产 L-苹果酸提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及质粒 *S. cerevisiae* TAM 由荷兰代尔夫特理工大学 Jack T. Pronk 教授赠送。pY26 和 pY14 购自 Turbo 生物工程有限公司。pMD19-T-simple 购自 TaKaRa(大连)生物工程有限公司。表 1 为本研究所用的菌株和质粒。

1.1.2 主要仪器和试剂 紫外可见分光光度计(日本岛津公司，型号 UV2450)；SBA 生物传感仪(山东科学院生物研究所)；高效液相色谱仪(美国赛默尔飞，型号 Ultimate 3000)。丙酮酸和 L-苹果酸标准品购自 sigma 公司，其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.1.3 引物 本研究所用引物如表 2 所示，引物 GMC-*Sac* I-S、GMC-*Not* I-A 为扩增 GPD 启动子、多克隆位点、CYC1 引物；18SrDNA-*Bgl* II-S、18SrDNA-*Sph* I-A 为扩增 18S rDNA 引物；rDNAtrp-*Sac* I *Not* I-S、rDNAtrp-*Nco* I-A 为扩增 Trp 引物。*Afpyc*-*Bam*H I-S 和 *Afpyc*-*Pst* I-A 用于扩增基因 *Afpyc*；*Afmdh*-*Not* I-S 和 *Afmdh*-*Bgl*II-A 用于扩增基因 *Afmdh*；*Afmae*-*Eco*R I-S 和 *Afmae*-*Xho* I-A 用于扩增基因 *Afmae*。

1.1.4 培养基 LB 培养基(g/L)：氯化钠 10，酵母膏 5，蛋白胨 10。YNB 培养基 (g/L)：葡萄糖 20，YNB 6.7，根据需要添加 20 mg/L 的氨基酸。种子培

表 1 本研究所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株与质粒		特征	来源
菌株	*S. cerevisiae* TAM	MTAa pdc1(−6,−2) ::loxp pdc5(−6,−2) ::loxp pdc6(−6,−2) ::loxp ura3−52	文献[5]
	tTAM	TAM trp1::loxp	本研究
	W001	tTAM+pY14	本研究
	W002	tTAM, 整合表达 *Afpyc*	本研究
	W003	tTAM+pY14/*Afpyc*	本研究
	W004	tTAM+pY14+pY26	本研究
	W005	tTAM+pY14/*Afpyc*+pY26/TEF−*Afmdh*	本研究
	W006	tTAM+pY14/*Afpyc*+pY26/TEF−*Afmdh*−GPD−*Afmae*	本研究
质粒	pY26	URA3, 2μ ori	Turbo
	pY14	TRP1, CEN/ARS	Turbo
	pMD19−GMC−*Afpyc*	T−Vector, Amp^R, GPD−MCS−CYC1, *Afpyc*	本研究
	pY14/*Afpyc*	TRP1, CEN/ARS, 游离表达 *Afpyc*	本研究
	pY26/TEF−*Afmdh*	URA3, 2μ ori, 游离表达 *Afmdh*	本研究
	pY26/TEF−*Afmdh*−GPD−*Afmae*	URA3, 2μ ori, 游离表达 *Afmdh*, *Afmae*	本研究

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

引物	序列(5'−3')
GMC−*Sac* I−S	CGAGCTCGTTTATCATTATCAATACTCG
GMC−*Not* I−A	AAATATGCGGCCGCGTAATACGACTCACTATAGG
18SrDNA−*Bgl* II−S	GAAGATCTTAATGATCCTTCCGCAGGTTCAC
18SrDNA−*Sph* I−A	ACATGCATGCTATCTGGTTGATCCTGCCAGT
rDNAtrp−*Sac* I *Not* I−S	CGAGCTCAAATATGCGGCCGCATGTCTGTTATTAATTTCACAGG
rDNAtrp−*Nco* I−A	CATGCCATGGCTATTTCTTAGCATTTTTGACG
Afpyc−*Bam*H I−S	CGGGATCCATGGCGGCTCCGTTTCGT
Afpyc−*Pst* I−A	AACTGCAGTTGCTTACGCTTTGACGAT
Afmdh−*Not* I−S	ATAAGAATGCGGCCGCATGGTCAAAGCTGCGGTACT
Afmdh−*Bgl* II−A	GAAGATCTTCAAAGCTTTGGTGGTGGGTT
Afmae−*Eco*R I−S	CGGAATTCATGTTCAATAACGAACACC
Afmae−*Xho* I−A	CCGCTCGAGCTAATCAGATACATCCTCAT

养基(g/L):葡萄糖 20,YNB 6.7,碳酸钙 5。发酵培养基(g/L):葡萄糖 80,K_2SO_4 6.6,KH_2PO_4 3,$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5,尿素终浓度 1,生物素终浓度为 10^{-3},$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 终浓度为 0.735,碳酸钙 25(接种时添加 5 g/L,发酵 48 h 时添加 20 g/L),微量金属离子液、维生素液均为 1 mL/L。微量金属离子液(mg/L):EDTA 15,$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 4.5,$CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.3,$MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 1,$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.3,$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 4.5,$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 3,$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.4,H_3BO_3 1,KI 0.1。维生素液(mg/L):生物素 0.05,泛酸钙 1,烟酸 1,肌醇 25,盐酸硫胺素 1,盐酸吡哆醇 1,对氨基苯甲酸 0.2。

1.2 分子生物学操作

1.2.1 RNA 的提取及 18S rDNA 整合表达框的构建

利用 UNIQ−10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒(上海生工生物),提取总 *A. flavus* 的 RNA。按照 PrimerScript RT reagent Kit Perfect Real Time 试剂盒(TaKaRa),将 RNA 反转录获得 cDNA。以 cDNA 为模板,利用引物 *Afpyc*−*Bam*H I−S 和 *Afpyc*−*Pst* I−A 进行 PCR 扩增获得 *Afpyc* 基因。基于此,设计 *Afpyc* 基因 18S rDNA 整合表达框的构建流程(图 1):(1) 利用引物 GMC−*Sac* I−S、GMC−*Not* I−A 为扩增 GPD 启动子的表达元件,并将其连接于 pMD19−

T-simple 载体，获得 pMD19-GMC；(2) 利用引物 18SrDNA-*Bgl* II-S 与 18SrDNA-*Sph* I -A、rDNAtrp-*Sac* I *Not* I-S 与 rDNAtrp-*Nco* I-A 进行 PCR 扩增，分别获得 18SrDNA 基因片段、Trp 标记基因，并将其连接至 pMD19-T-simple 载体，获得 pMD19-18S-TRP；(3) 将 *Afpyc* 基因插入到 pMD19-GMC 的 GPD 启动子的表达元件中，获得 pMD19-GMC-*Afpyc*；(4) 将 pMD19-18S-TRP 的 18S-TRP 片段，通过酶切与连接的方法，连接到 pMD19-GMC-*Afpyc*，获得 *Afpyc* 基因的融合表达载体 pMD19-GMC-*Afpyc*-18S-TRP。

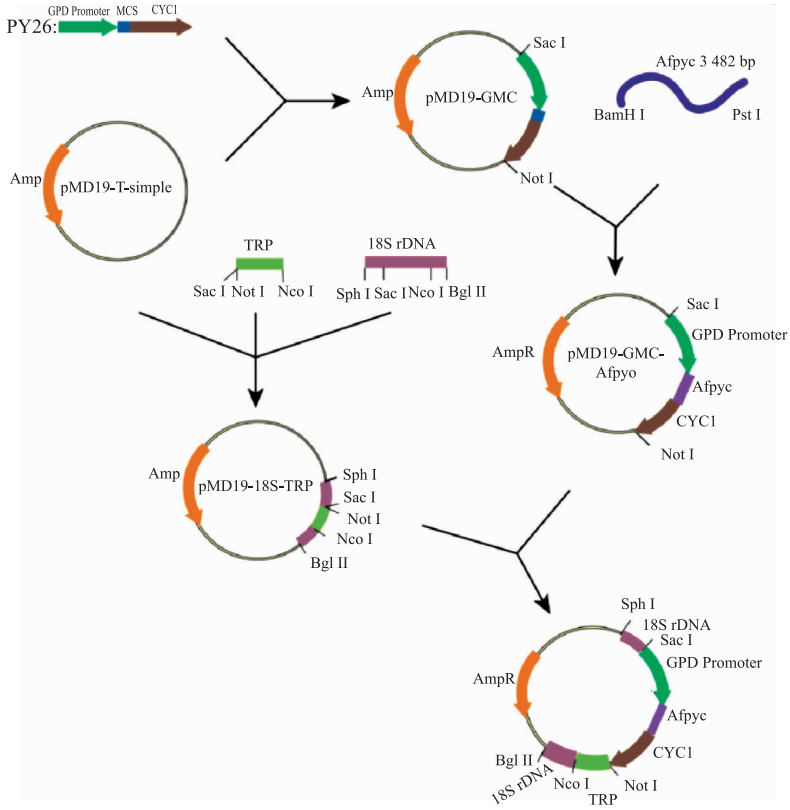


图 1　基因 *Afpyc* 的 18S rDNA 整合表达框构建

Fig. 1　Construction procedure of gene *Afpyc* intergration plasmid pMD19-GMC-*Afpyc*-18S-TRP

1.2.2　重组质粒的构建　以 *A. flavus* ATCC13697 的 cDNA 为模板，扩增关键基因 *Afpyc*、*Afmdh*、*Afmae*。利用限制性酶 *Bam*H I & *Pst* I、*Not* I & *Bgl* II 双酶切后，借助 T4 连接酶分别连接至 pY14、pY26，获得重组质粒 pY14/*Afpyc*、pY26/TEF-*Afmdh*。在此基础上，利用限制性酶 *Eco*R I & *Xho* I 双酶切后，借助 T4 连接酶连接至 pY26/TEF-*Afmdh*，获得重组质粒 pY26/TEF-*Afmdh*-GPD-*Afmae*。

1.3　苹果酸发酵条件及参数测定

1.3.1　培养条件　将平板菌落接种于种子培养基，30 ℃，200 r/min 培养 48 h，4 000 r/min 离心 5 min 收集菌体。将菌体以发酵培养基悬浮，调整发酵起始 OD_{600} 为 1.0，30 ℃，200 r/min 培养 96 h。发酵起始时，添加 5 g/L 的 $CaCO_3$；当发酵 48 h 时，补充 20 g/L 的 $CaCO_3$。

1.3.2　发酵参数测定　葡萄糖的测定：利用 SBA-40E 生物传感分析仪测定，发酵液经适当的稀释后，取 25 μL 直接进样到生物传感器中，根据葡萄糖标准样品浓度、仪器读书及发酵液稀释倍数计算发酵液中的葡萄糖含量。

菌体干重测定：将发酵液稀释一定倍数后，以相应的培养基作为对照，在波长 600 nm 处测定吸光值，并将该吸光值按照细胞干重（Dry Cell Weight，DCW）与菌体吸光值的线性曲线（1 OD_{600}=0.23 g/L DCW），计算菌体干重。

有机酸测定:采用高效液相色谱(HPLC)测定,色谱柱为 Atlantis® C_{18}(5 μm 4.6×250 mm),流动相为 0.1 mol/L KH_2PO_4,pH 2.8;流速为 0.6 mL/min;柱温为 20 ℃;进样量为 20 μL;检测器为紫外检测器;检测波长为 210 nm。胞内苹果酸的提取及样品预处理方法参照文献[14-15]。

甘油测定:采用 HPLC 测定,色谱柱为 BioRad Aminex HPX-87H,流动相为 5 mmol/L 稀硫酸;柱温为 35 ℃;流速为 0.6 mL/min;进样量为 20 μL;检测器为示差检测器。

1.3.3 酶活测定 取不同时期的发酵液离心弃上清,用 0.1 mol/L、pH 8.0 的磷酸钾缓冲液洗涤菌体 3 次,并悬浮于缓冲液中,超声破碎 10 min(工作 5 s,间隔 5 s)后,4 ℃,8 000 r/min 离心 3 min,所得上清液用于酶活测定。苹果酸脱氢酶的酶活测方法定参考文献[5]。丙酮酸羧化酶的酶活测定参考文献[16]。蛋白质浓度的测定,采用改良型 Bradford 法蛋白质浓度测定试剂盒(上海生工生物)。

2 结果与分析

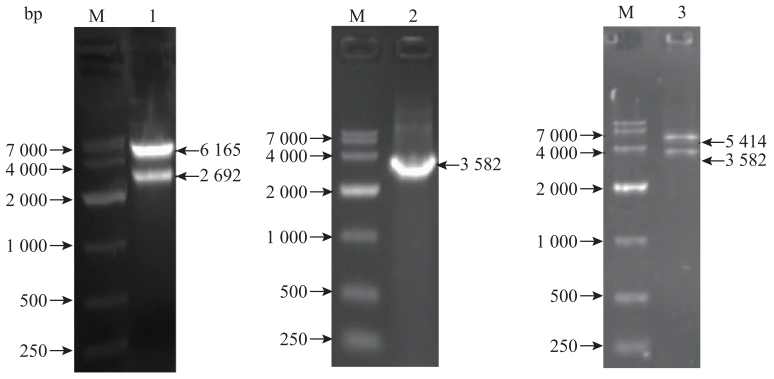
2.1 *Afpyc* 的表达对碳流分布的影响

丙酮酸羧化酶是影响苹果酸、富马酸等二羧酸大量积累的关键因素[5,10],且其低水平表达有利于提高目标产物[10-17]。前期研究表明,*Afpyc* 基因的中、高水平表达对菌体生长有一定的抑制作用。因此,考察了 *Afpyc* 低水平表达对碳流分布的影响。将整合表达质粒 pMD19-GMC-*Afpyc*-18S-TRP,利用限制性内切酶 *Sph* I 和 *Bgl* II 进行双酶切,得到条带大小分别为 6 165 bp 和 2 692 bp 的片段(图 2),表明该整合表达质粒已经构建成功。将测序正确的 *Afpyc* 基因(3 582 bp)经 *Bam*H I、*Pst* I 双酶切后,连接用相同限制酶酶切的表达载体 pY14,经双酶切获得条带大小分别为 5 414 bp 和 3 582 bp 的片段,表明质粒 pY14/*Afpyc* 已经构建成功。利用 LiAc 转化法,将线性化的质粒 pMD19-GMC-*Afpyc*-18S-TRP 和重组质粒 pY14/*Afpyc* 分别转入菌株 tTAM 中,筛选获得阳性转化子,并分别命名为 W002 和 W003(表 1)。

基因 *Afpyc* 的单独表达能够调节碳流分布,降低丙酮酸的积累量,具体表现在(表 3):1)菌株 W002 和 W003 的丙酮酸羧化酶比酶活分别为 0.63 U/mg 和 0.78 U/mg,相对于对照组 W001 分别提高了 30 倍和 38 倍,且单独表达 *Afpyc* 基因,对菌体生长没有影响;2)菌株 W002、W003 的丙酮酸积累量相对于 W001 分别降低了 29.6%和 42.3%;3)分析其他副产物情况可知,菌株 W002、W003 的 α-酮戊二酸(α-KG)积累量较对照组 W001 分别提高了 48.1%和 79.7%,这可能是由于 *Afpyc* 基因的表达使得丙酮酸的碳流流向草酰乙酸,从而进入 TCA 循环,导致部分 α-酮戊二酸(α-KG)积累[18]。上述结果表明 *Afpyc* 的低水平表达能够有效的调节丙酮酸节点的碳流分布,且 *Afpyc* 基因的低水平游离表达效果较好。因此,选择菌株 W003 进行下一步研究。

2.2 *Afmdh* 的表达对碳流分布的影响

为了进一步将碳流导向 L-苹果酸,将测序正确的 *Afmdh* 基因经 *Not* I、*Bgl* II 双酶切后,连接至相同限制酶酶切的表达载体 pY26,经双酶切获得条带大小分别为 7 430 bp 和 996 bp 的片段(图 3(a)),



M:DL-10000 DNA 标记;泳道 1:经 *Sph* I 和 *Bgl* II 双酶切的质粒 pMD19-GMC-*Afpyc*;泳道 2:*Afpyc* 基因的 PCR 结果;泳道 3:经 *Bam*H I 和 *Pst* I 双酶切的质粒 pY14/*Afpyc*。

图 2 质粒 pMD19-GMC-*Afpyc*-18S-TRP、pY14/*Afpyc* 酶切验证

Fig. 2 Confirmation of recombinant plasmid pMD19-GMC-*Afpyc*、pY14/*Afpyc*

表 3　*Afpyc* 的表达对碳流分布的影响

Table 3　Fermentation profiles by overexpressing *Afpyc*

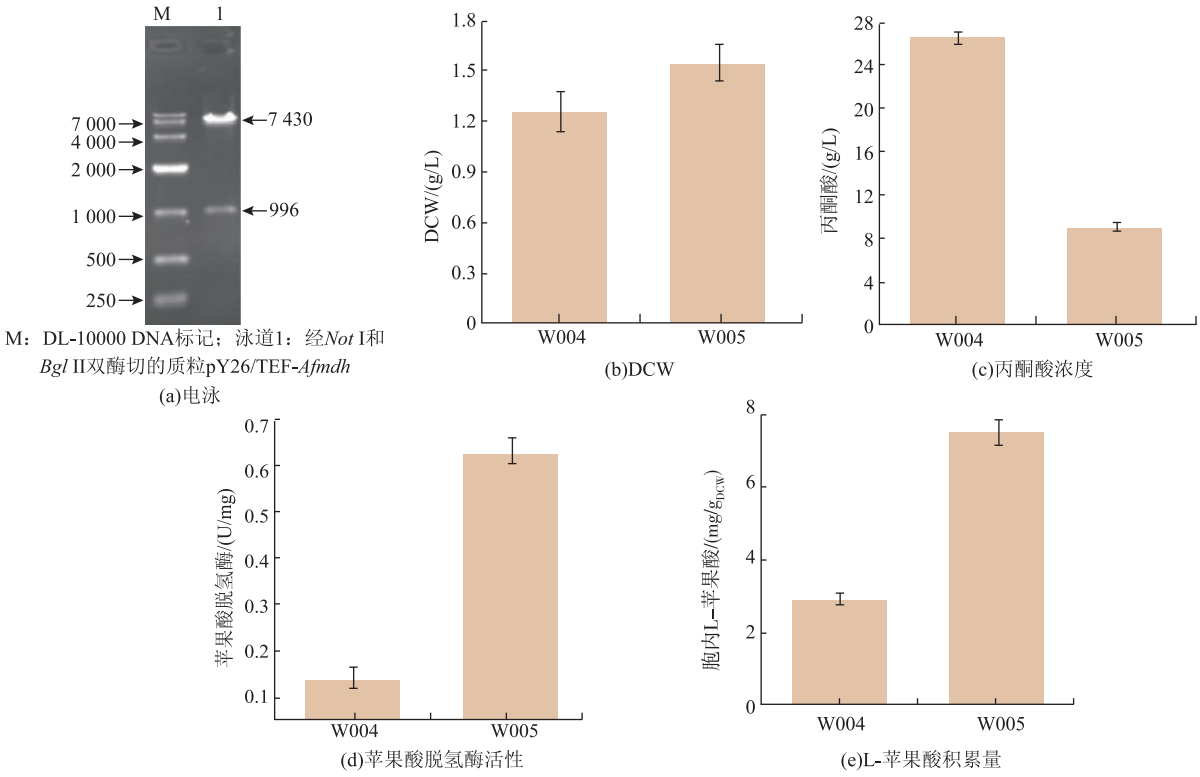
发酵参数	W001(*A*)	W002 (*B*)	W003 (*C*)	(*B*/*A*–1) ×100%	(*C*/*A*–1) ×100%	(*C*/*B*–1) ×100%
细胞干重/(g/L)	1.25±0.17	1.25±0.24	1.27±0.21	0	1.6	1.6
葡萄糖消耗量/(g/L)	40±2.0	36±2.0	32±1.0	–10.0	–20.0	–11.1
丙酮酸羧化酶/(U/mg)	0.02±0.01	0.63±0.03	0.78±0.03	—	—	—
丙酮酸/(g/L)	27.4±1.64	19.3±1.7	15.8±1.58	–29.6	–42.3	–18.1
α–酮戊二酸/(g/L)	1.58±0.23	2.34±0.13	2.84±0.16	48.1	79.7	21.4
甘油/(g/L)	0.98±0.02	1.08±0.01	1.11±0.03	10.2	13.2	2.8

表明重组质粒 pY26/TEF–*Afmdh* 构建成功。利用 LiAc 转化法，将上述质粒转入菌株 W003，获得菌株 W005。

将菌株 W005 经摇瓶发酵后，研究基因 *Afmdh* 的表达对碳流分布的影响，结果如图 3 所示：1）菌株 W005 的苹果酸脱氢酶比酶活为 0.63 U/mg，细胞干重 DCW 为 1.54 g/L，比对照组 W004 分别提高了 350.2%和 23.3%；2）发酵 96 h 时，菌株 W005 积累了 1.93 g/L 的 L–苹果酸，但是，其胞内 L–苹果酸浓度达到了 7.52 mg/g DCW，比对照组菌株 W004 提高了 1.59 倍；3）菌株 W005 的丙酮酸产量为 9.03 g/L，相对于菌株 W004 降低了 62.5%。上述结果表明，基因 *Afmdh* 的表达有利于菌体生长，且共表达基因 *Afpyc* 和 *Afmdh* 能够进一步将丙酮酸的碳流导向 L–苹果酸。但是由于菌株 W005 的胞内 L–苹果酸浓度较高，限制了 L–苹果酸的进一步积累。目前，已有研究表明，苹果酸的外转运是限制 L–苹果酸大量积累的一个关键性因素[5–6,12]，因此，需要强化 L–苹果酸的外运系统，降低胞内 L–苹果酸的积累量，进一步提高 L–苹果酸产量。

2.3　*Afmae* 的表达对 L–苹果酸积累的影响

通过在菌株 W005 中过表达基因 *Afmae*，强化 L–苹果酸的外转运系统，促进胞内 L–苹果酸向胞外转运。将测序正确的 *Afmae* 基因经 *Eco*R Ⅰ、*Xho* Ⅰ



M：DL-10000 DNA标记；泳道1：经*Not* I和*Bgl* II双酶切的质粒pY26/TEF-*Afmdh*

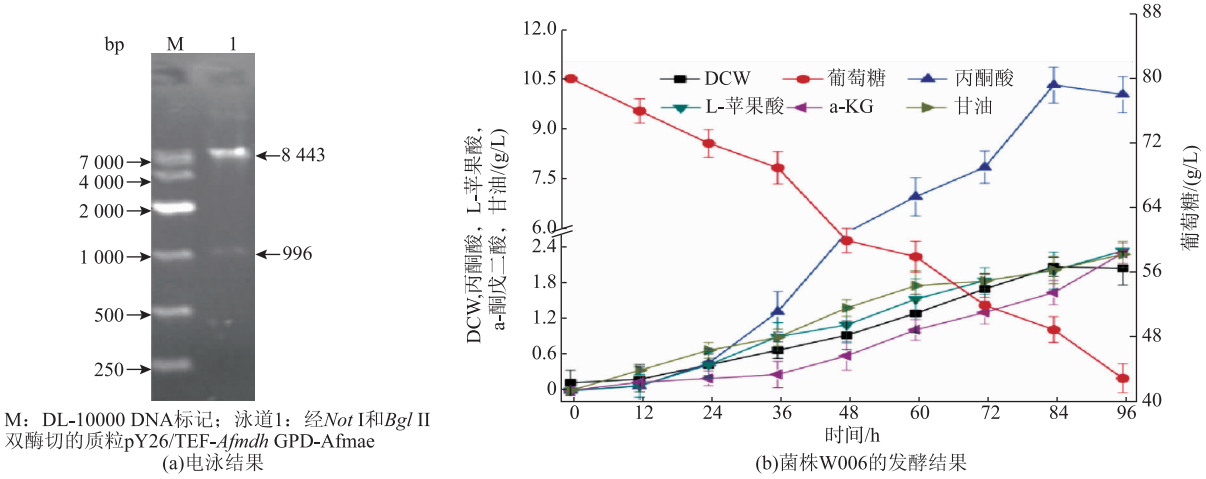
(a)电泳　(b)DCW　(c)丙酮酸浓度　(d)苹果酸脱氢酶活性　(e)L-苹果酸积累量

图 3　胞质还原路径对 L–苹果酸积累的影响

Fig. 3　Effect of construct rTCA pathway on the production of L–malate

双酶切后,连接至相同限制酶酶切的表达载体 pY26/TEF-*Afmdh*，经双酶切获得条带大小分别为 8 443 bp 和 996 bp 的片段(图 4(a)),表明重组质粒 pY26/TEF-*Afmdh*-GPD-*Afmae* 构建成功。利用 LiAc 转化法,将上述质粒转入菌株 W003,获得菌株 W006。

在此基础上，分析基因 *Afmae* 的表达对菌株 W006 积累 L-苹果酸的影响，结果表明:(1) 发酵 96 h 时,菌株 W006 的 L-苹果酸积累量为 2.34 g/L,相对于 W005 提高了 21.2%;(2) 菌株 W006 的 DCW 由 1.54 g/L 提高到 1.88 g/L，提高了 22.1%;(3) 分析其他副产物情况可知，丙酮酸积累量为 10.4 g/L,没有进一步下降(图 4(b)),且仍然存在少量的 α-酮戊二酸(α-KG)和甘油。上述结果表明,外转运系统的强化有利于菌体生长及 L-苹果酸的积累。



M：DL-10000 DNA标记；泳道1：经*Not* I和*Bgl* II双酶切的质粒pY26/TEF-*Afmdh* GPD-Afmae
(a)电泳结果

(b)菌株W006的发酵结果

图 4　质粒 pY26/TEF-*Afmdh* GPD-*Afmae* 的验证及菌株 W006 发酵生产 L-苹果酸

Fig. 4　Vertification of plasmid pY26/TEF-*Afmdh* GPD-*Afmae* and fermentation performance of strain W006

2.4　接种量对 L-苹果酸积累的影响

为了进一步提高 L-苹果酸产量,研究了不同接种量对 L-苹果酸积累的影响，结果如表 4 所示:1) 初始接种量 OD_{600} = 2 时,L-苹果酸的产量最高达到 3.28 g/L，最终菌体 DCW 为 2.34 g/L，单位细胞产 L-苹果酸能力(L-malate/DCW)为 1.40 g/L/gDCW,较对照组 (OD_{600} = 1) 分别提高了 40.2%、13.0%和 22.8%;2) 当初始接种量 OD_{600} < 2 时，随着接种量的增加,菌体 DCW、L-苹果酸产量和 L-malate/DCW 也随之提高;3) 当初始接种量 OD_{600} > 2 时，菌体 DCW 和 L-苹果酸产量开始下降。上述结果表明,L-苹果酸产量提高的原因，一方面是由于菌体 DCW 的增加，另一方面是由于单位菌体生产能力 (L-malate/DCW)的提高。因此,后续研究可以通过浓缩菌体量的方式,进一步提高 L-苹果酸的产量。

3　讨　论

丙酮酸生产菌 *S. cerevisiae* TAM 能够积累高浓度的丙酮酸,这为构建理性的 L-苹果酸生物合成路径，有效地将丙酮酸碳流导向 L-苹果酸奠定了基础[5]。本研究构建的 L-苹果酸生物合成路径涉及 2 个关键酶:丙酮酸羧化酶和苹果酸脱氢酶,该路径

表 4　接种量对 L-苹果酸发酵的影响

Table 4　Effect of initial inoculum on the production of L-malic acid

接种量 (OD_{600})	发酵参数						
	细胞干质量/(g/L)	葡萄糖消耗量/(g/L)	丙酮酸/(g/L)	L-苹果酸/(g/L)	单位细胞产丙酮酸能力/(g/g)	单位细胞产L-苹果酸能力/(g/g)	生产强度/(g/L/h)
0.5	1.89±0.07	35±1.5	8.96±0.68	2.03±0.18	0.22	0.93	0.02
0.75	1.94±0.13	35±1.3	10.20±1.50	2.06±0.08	0.19	0.94	0.023
1	2.07±0.08	37±1.2	10.32±1.45	2.34±0.26	0.20	1.14	0.024
2	2.34±0.11	45±1.5	13.94±1.0	3.28±0.12	0.18	1.40	0.034
3	2.42±0.22	45±1.0	12.65±1.08	3.21±0.17	0.19	1.02	0.033

在理论上能够实现 L-苹果酸的最大化生产。已有研究表明，丙酮酸羧化酶是高效生产氨基酸和四碳二羧酸的主要代谢瓶颈，因此，该酶也是进行基因改造获取高产菌株的重要靶标酶[19-21]。过量表达丙酮酸羧化酶能够有效增强自丙酮酸到草酰乙酸的碳流，从而，一方面增加 L-苹果酸合成的直接前体，另一方面提高进入 TCA 循环的碳流[22]。然而，提高的碳流最终并没有转变成更多的 L-苹果酸，其原因可能是苹果酸合成路径的下游草酰乙酸代谢路径存在着限速步骤[5]。单独过量表达苹果酸脱氢酶，使得由草酰乙酸到 L-苹果酸的产物代谢流得到了很大的提升[23]。但是，苹果酸脱氢酶的过量表达大量消耗了胞质的 NADH，有效地增强了糖酵解的速率[24-25]。综上所述，结合丙酮酸羧化酶和苹果酸脱氢酶的特点，本研究通过过量表达丙酮酸羧化酶和苹果酸脱氢酶将碳流由丙酮酸导向 L-苹果酸，成功构建了 L-苹果酸积累的胞质还原路径。

然而，上述路径并不能有效的将丙酮酸碳流导向 L-苹果酸，原因在于 L-苹果酸生物合成路径中存在着动力学代谢瓶颈。本研究中，通过测定胞内 L-苹果酸的含量，发现菌株 W005 胞内 L-苹果酸浓度达到了 7.52 mg/g DCW，比对照组菌株 W004 提高了 1.59 倍。上述结果初步证明了 L-苹果酸的外转运能力弱为关键代谢瓶颈。因此，应当增强工程菌 W005 对二羧酸的转运能力以便于竞争性转运胞质中的 L-苹果酸，提高发酵液中 L-苹果酸的积累量。已有研究表明，通过过量表达 SpMAE1 能够有效地将胞质中的 L-苹果酸转运到胞外，使得在发酵液中积累更多的 L-苹果酸[26]。基于此，为了进一步提高 L-苹果酸的产量，将 SpMAE1 过量表达于 W005 中（即 W006），最终使得 L-苹果酸的产量比 W005 提高了 21.2%。

然而，工程菌 W006 除了产生 L-苹果酸外，仍然能够产生 13.94 g/L 丙酮酸，及少量的 α-酮戊二酸等杂酸，从而大大提高了 L-苹果酸的下游提取成本，该结果表明，L-苹果酸的生产菌株仍有再次提高的空间。伴随着组学技术的发展，系统代谢工程作为一种概念性技术框架，有效地加速了对存在路径的修饰，有效地优化了对目标代谢物的生产，为高效改造微生物生产工业产品提供了新的方法[27]。例如，利用转录组、蛋白组和代谢组能够有效深入的分析利用还原路径生产 L-苹果酸所存在的代谢瓶颈。在上述基础上，利用模块路径工程系统性的装配与优化代谢模块，进而精细化控制已经存在的代谢路径，实现生产宿主的代谢平衡，进而有效地消除代谢瓶颈，改善微生物的细胞表型[28]。最终，实现杂酸大幅度降低、L-苹果酸大幅度提高，从而有效的降低 L-苹果酸的下游提取成本。

4 结 语

通过在 *S. cerevisiae* 中过量表达源于 *A. flavus* 的丙酮酸羧化酶（*Afpyc*）、苹果酸脱氢酶（*Afmdh*）及 C4-二羧酸转运蛋白（*Afmae*），成功构建了 L-苹果酸合成的胞质还原路径。在此基础上，通过优化工程菌株 W006 的发酵条件，使得 L-苹果酸的积累量达到 3.28 g/L。本研究为利用异源路径生产 L-苹果酸提供了一种新的借鉴。

参考文献：

[1] BATTAT E，PELEG Y，BERCOVITZ A，et al. Optimization of L-malic acid production by *Aspergillus flavus* in a stirred fermentor[J]. **Biotechnology and Bioengineering**，1991，37：1108-1116.

[2] TAING O，TAING K. Production of malic and succinic acids by sugar-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* [J]. **European Food Research and Technology**，2006，224(3)：343-347.

[3] BERCOVITZ A，PELEG Y，BATTAT E，et al. Localization of pyruvate carboxylase in organic acid-producing [J]. **Applied and Environment Microbiology**，1990，56(6)：1594.

[4] KNUF C，NOOKAEW I，REMMERS I，et al. Physiological characterization of the high malic acid-producing *Aspergillus oryzae* strain 2103a-68[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**，2014，98(8)：3517-3527.

[5] ZELLE R M，DE HULSTER E，VAN W W A，et al. Malic acid production by *Saccharomyces cerevisiae*：engineering of pyruvate carboxylation，oxaloacetate reduction，and malate export [J]. **Applied and Environment Microbiology**，2008，74 (9)：2766-2777.

[6] CHEN X，XU G，XU N，et al. Metabolic engineering of *Torulopsis glabrata* for malate production [J]. **Metabolic Engineering**，

2013,19:10-16.

[7] MOON S Y,HONG S H,KIM T Y,et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of malic acid [J]. **Biochemical Engineering Journal**,2008,40(2):312-320.

[8] ZHANG X,WANG X,SHANMUGAM K T,et al. L-malate production by metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. **Applied and Environment Microbiology**,2011,77(2):427-434.

[9] ABBOTT D A,ZELLE R M,PRONK J T,et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of carboxylic acids:current status and challenges[J]. **FEMS Yeast Research**,2009,9(8):1123-1136.

[10] XU G,LIU L,CHEN J. Reconstruction of cytosolic fumaric acid biosynthetic pathways in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. **Microbial Cell Factories**,2012,11:24-34.

[11] CHEN X,XU G,XU N,et al. Metabolic engineering of *Torulopsis glabrata* for malate production [J]. **Metabolic Engineering**,2013,19:10-16.

[12] BROWN S H,BASHKIROVA L,BERKA R,et al. Metabolic engineering of *Aspergillus oryzae* NRRL 3488 for increased production of L-malic acid[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2013,97(20):8903-8912.

[13] PINES O,SHEMESH S,BATTAT E,et al. Overexpression of cytosolic malate dehydrogenase(MDH2) causes overproduction of specific organic acids in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,1997,48(2):248-255.

[14] CANELAS A B,PIERICK A,RAS C,et al. Quantitative evaluation of intracellular metabolite extraction techniques for yeast metabolomics[J]. **Analytical Chemistry**,2009,81(17):7379-7389.

[15] CANELAS A B,RAS C,TEN PIERICK A,et al. Leakage-free rapid quenching technique for yeast metabolomics [J]. **Metabolomics**,2008,4(3):226-239.

[16] JONG-GUBBELS P,VANROLLEGHEMI P,HEIJNENI S,et al. Regulation of carbon metabolism in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae* grown on mixtures of glucose and ethanol[J]. **Yeast**,1995,11(5):407-418.

[17] YAN D,WANG C,ZHOU J,et al. Construction of reductive pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for effective succinic acid fermentation at low pH value[J]. **Bioresource Technology**,2014,156:232-239.

[18] LIU L,LI Y,ZHU Y,et al. Redistribution of carbon flux in *Torulopsis glabrata* by altering vitamin and calcium level [J]. **Metabolic Engineering**,2007,9(1):21-29.

[19] PETERS-WENDISCH P G,SCHIEL B,WENDISCH V F,et al. Pyruvate carboxylase is a major bottleneck for glutamate and lysine production by *Corynebacterium glutamicum* [J]. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**,2001,3(2):295-300.

[20] BLANKSCHIEN M D,CLOMBURG J M,GONZALEZ R. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of succinate from glycerol[J]. **Metabolic Engineering**,2010,12(5):409-419.

[21] QIN Jingru,XU Meijuan,ZHANG Xian,et al. Co-production of L-arginine and polyhydroxybutyrate in recombinant *Corynebacterium crenatum*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2016,35(3):240-246.(in Chinese)

[22] KOFFAS M A,JUNG G Y,STEPHANOPOULOS G. Engineering metabolism and product formation in *Corynebacterium glutamicum* by coordinated gene overexpression[J]. **Metabolic Engineering**,2003,5(1):32-41.

[23] PINES O,EVEN-RAM S,ELNATHAN N,et al. The cytosolic pathway of L-malic acid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of fumarase[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,1996,46(4):393-399.

[24] HOU J,LAGES N F,OLDIGES M,et al. Metabolic impact of redox cofactor perturbations in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. **Metabolic Engineering**,2009,11(4/5):253-261.

[25] MOLENAAR D,VAN DER REST M E,DRYSCH A,et al. Functions of the membrane-associated and cytoplasmic malate dehydrogenases in the citric acid cycle of *Corynebacterium glutamicum*[J]. **Journal of Bacteriology**,2000,182(24):6884-6891.

[26] GROBLER J,BAUER F,SUBDEN R E,et al. The mae1 gene of *Schizosaccharomyces pombe* encodes a permease for malate and other C4 dicarboxylic acids[J]. **Yeast**,1995,11(15):1485-1491.

[27] LEE J W,NA D,PARK J M,et al. Systems metabolic engineering of microorganisms for natural and non-natural chemicals[J]. **Nature Chemical Biology**,2012,8(6):536-546.

[28] JUMINAGA D,BAIDOO E E,REDDING-JOHANSON A M,et al. Modular engineering of L-tyrosine production in *Escherichia coli*[J]. **Applied and Environment Microbiology**,2012,78(1):89-98.