

## МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ КИСЛОТОУСТОЙЧИВОГО ШТАММА *Schizosaccharomyces pombe* ДЛЯ РАЗРАБОТКИ РЕКОМБИНАНТНОГО ПРОМЫШЛЕННОГО ПРОДУЦЕНТА L-МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ

© 2023 г. Е. О. Анисимова<sup>1, 2, \*</sup>, М. Г. Тарутина<sup>1, 2</sup>, С. П. Синеокий<sup>1</sup>

<sup>1</sup>НИЦ “Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

<sup>2</sup>НИЦ “Курчатовский институт”, Курчатовский геномный центр, Москва, 123182 Россия

\*e-mail: ekaterina.genetika@gmail.com

Поступила в редакцию 18.09.2023 г.

После доработки 28.09.2023 г.

Принята к публикации 14.10.2023 г.

В целях оптимизации биосинтеза L-молочной кислоты рекомбинантными дрожжевыми продуцентами на основе ацидофильных дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* с клонированным геном гетерологичной L-лактатдегидрогеназы (*LDH*) изучено влияние инактивации генов пируваткарбоксилаз (*PDC*) на синтез ацетата, пирувата и этанола (основного побочного продукта при синтезе молочной кислоты). На природном штамме *S. pombe* показано, что делеции  $\Delta pdc3$  и  $\Delta pdc4$  не влияют на данные показатели, в то время как у мутанта  $\Delta pdc1$  снижен биосинтез этанола и усилен биосинтез ацетата, а мутант  $\Delta pdc2$  аккумулирует пируват. Влияние делеций генов *PDC1* и *PDC2* на биосинтез молочной кислоты было проверено на модельном штамме-продуценте *S. pombe*, содержащем ген гетерологичной лактатдегидрогеназы — из *Lactobacillus pentosus*. Показано, что в штаммах с инактивированным геном *PDC2* накопленный пируват слабо расходуется на биосинтез молочной кислоты даже в присутствии двух различных рекомбинантных лактатдегидрогеназ, введение третьего гетерологичного гена *LDH* приводит к потере жизнеспособности штамма. При этом на фоне делеции *PDC1* биосинтез молочной кислоты усиливается при введении дополнительных генов *LDH*. Полученные результаты могут быть использованы при конструировании промышленных штаммов-продуцентов молочной кислоты.

**Ключевые слова:** *Schizosaccharomyces pombe*, инженерия метаболизма, лактатдегидрогеназа, молочная кислота, пируватдекарбоксилаза

**DOI:** 10.56304/S0234275823040026

L-молочная кислота (МК) широко используется в пищевой и химической промышленности, косметологии и фармакологии. В последние годы спрос на МК значительно вырос, так как это основной компонент в производстве полилактида — биоразлагаемого полимера МК, занимающего лидирующее положение по объемам выпуска среди биопластиков. Мировое производство МК составляет 400 тыс. т в год [1]; причем почти 90% этого соединения получают путем микробной ферментации из возобновляемых источников растительного сырья и только 10% химическим синтезом из продуктов переработки нефти. [2]. В России растущие потребности в МК обеспечиваются практически полностью за счет импорта, при наличии уникальной сырьевой базы для развития крупнотоннажной биотехнологии.

*Список сокращений:* МК — L-молочная кислота; ФС — ферментационная среда.

Традиционные биотехнологии получения МК основаны на использовании природных бактериальных продуцентов [3], недостатком которых является чувствительность к низким значениям pH. По этой причине в промышленных технологиях ферментацию проводят при нейтральных значениях pH: обычно с добавками карбоната или гидроксида кальция и, как следствие, с образованием лактата. Перевод лактата в МК увеличивает себестоимость конечного продукта, а также в процессе ацидификации образуется значительное количество гипса ( $\text{CaSO}_4$ ) как сопродукта (1 т на 1 т МК [2]), утилизация которого снижает срок службы промышленного оборудования и наносит экологический вред [4].

В целях получения свободной формы МК непосредственно в ходе ферментации в последние годы ведутся активные работы по созданию рекомбинантных продуцентов на основе кислотоустойчивых штаммов дрожжей, способных синтезировать и аккумулировать МК без использования pH-нейтрализующих агентов. Основные подходы вклю-

**Таблица 1.** Штаммы *Schizosaccharomyces pombe*, использованные в работе  
**Table 1.** *Schizosaccharomyces pombe* strains used

Штамм	Генотип	Источник
3-2	<i>Dura4</i>	БРЦ ВКПМ*
3-21	<i>Dura4 Δpdc1</i>	Данная работа
3-22	<i>Dura4 Δpdc2</i>	Данная работа
3-23	<i>Dura4 Δpdc3</i>	Данная работа
3-24	<i>Dura4 Δpdc4</i>	Данная работа
Sp- <i>LDH<sub>pent</sub></i>	<i>P<sub>CMV</sub>-LDH<sub>pent</sub> Dura4</i>	БРЦ ВКПМ
Sp- <i>Δpdc1LDH<sub>pent</sub></i>	<i>P<sub>CMV</sub>-LDH<sub>pent</sub> Dura4 Δpdc1</i>	Данная работа
Sp- <i>Δpdc1LDH<sub>pent</sub> LDH<sub>aci</sub></i>	<i>P<sub>CMV</sub>-LDH<sub>pent</sub> Δpdc1 P<sub>Hsp9</sub>-LDH<sub>aci</sub> URA4</i>	Данная работа
Sp- <i>Δpdc1LDH<sub>pent</sub> LDH<sub>aci</sub> LDH<sub>helv</sub></i>	<i>P<sub>CMV</sub>-LDH<sub>pent</sub> Δpdc1 P<sub>Hsp9</sub>-LDH<sub>aci</sub> URA4 pHsp9-LDH<sub>helv</sub> KanMX</i>	Данная работа
Sp- <i>Δpdc2LDH<sub>pent</sub></i>	<i>P<sub>CMV</sub>-LDH<sub>pent</sub> Dura4 Δpdc2</i>	Данная работа
Sp- <i>Δpdc2LDH<sub>pent</sub> LDH<sub>aci</sub></i>	<i>P<sub>CMV</sub>-LDH<sub>pent</sub> Δpdc2 P<sub>Hsp9</sub>-LDH<sub>aci</sub> URA4</i>	Данная работа

*Примечание:* \* Национальный биоресурсный центр Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов НИЦ “Курчатовский институт”, Москва, Россия.

*Note:* \* National Bioresource Center Russian National Collection of Industrial Microorganisms NRC “Kurchatov Institute”, Moscow, Russia.

чают ослабление метаболизма синтеза этанола из пирувата и интеграцию в геном гетерологичных генов *L*-лактатдегидрогеназ (*LDH*), в основном из молочнокислых бактерий, которые конвертируют накапливаемый пируват в МК.

Пируват является конечным продуктом гликолиза и в Crabtree-позитивных дрожжах *S. pombe* и *Saccharomyces cerevisiae* преимущественно используется на биосинтез этанола, который синтезируется из пирувата в две стадии: (I) пируват → ацетальдегид и (II) ацетальдегид → этанол. В дрожжах *S. pombe* за конверсию пирувата в ацетальдегид ответственны 4 гена *PDC*, кодирующие пируватдекарбоксилазы (EC 4.1.1.1), согласно базе PomBase: *PDC1* (SPAC13A11.06), *PDC2* (SPAC1F8.07c), *PDC3* (SPAC186.09) и *PDC4* (SPAC3G9.11c). Ослабление этого этапа – один из возможных способов повышения пула пирувата, который можно использовать для синтеза МК.

Роль генов *PDC* дрожжей *S. pombe* малоизучена. Известно, что ген *SPAC1F8.07c* (*PDC2*) преимущественно экспрессируется в экспоненциальной фазе роста, а транскрипция генов *SPAC3G9.11c* (*PDC4*) и *SPAC13A11.06* (*PDC1*) значительно усиливается в стационарной фазе роста, особенно в присутствии тиаминпирофосфата – кофактора пируватдекарбоксилаз *Pdc4* и *Pdc1* [5].

Известно, что в дрожжах *S. cerevisiae* имеется три изоформы фермента пируватдекарбоксилаз: *Pdc1p*, *Pdc5p* и *Pdc6p*, – основной из которых является *Pdc1p* [6]. Получены и охарактеризованы как штаммы с делецией одного из генов *PDC1*, *PDC5* и *PDC6* [7], так и *PDC*<sup>-</sup> штамм, который не

растет на среде с глюкозой (20 г/л), что ограничивает его применение в промышленности [8].

Задача данной работы заключалась в том, чтобы охарактеризовать одиночные мутанты по генам *PDC* в дрожжах *S. pombe* и использовать полученные результаты для оптимизации синтеза МК модельным кислотоустойчивым штаммом *S. pombe* Sp-*LDH<sub>pent</sub>* – продуцентом МК.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Штаммы, среды, плазмиды

Для конструирования плазмид использовали штамм *Escherichia coli* XL1-blue (Stratagene, США), который растили на среде LB (дрожжевой экстракт – 0.5%, триптон – 1%, NaCl – 0.5%) при 37°C. Для отбора трансформантов в среду добавляли ампициллин в концентрации 100 мкг/мл.

Штаммы дрожжей *S. pombe* представлены в табл. 1.

Конструирование штаммов подробно описано в Дополнительных материалах. Размер делеции в гене *PDC1* составляет 1.76 т.п.н., в *PDC2* – 1.55 т.п.н., в *PDC3* – 1.74 т.п.н., в *PDC4* – 2.19 т.п.н.

Для работы с дрожжами *S. pombe* использовали полные среды YES (дрожжевой экстракт – 0.5%, глюкоза – 3.0%), YPD (дрожжевой экстракт – 1.0%, пептон – 2.0%, глюкоза – 2.0%) и минеральную среду PMG [9]. В плотные среды добавляли агар в концентрации 20 г/л.

Приготовление компетентных клеток дрожжей *S. pombe*, электропорацию и контрелекцию (удаление селективного маркера *URA4* по прямому

повторам по механизму гомологичной рекомбинации) проводили по стандартной методике [9].

Трансформанты с маркером *URA4* отбирали на среде PMG с глюкозой (2%). Для селективного отбора трансформантов, устойчивых к генетицину или гигромицину, в среду YES добавляли 50 мкг/мл генетицина (G418; Gibco, США) или 50 мкг/мл гигромицина В (Calbiochem, США).

Удаление гена *KanMX*, фланкированного сайтами lox71/66, проводили за счет индукции рекомбинации по lox-сайтам [10] в присутствии вспомогательной плазмиды p407-nmt-cre (БРЦ ВКПМ), содержащей ген *cre* рекомбиназы под контролем промотора nmt1+ и ген *Hph*, обеспечивающий клеткам дрожжей устойчивость к гигромицину.

Из отдельных колоний выделяли общую ДНК при помощи набора реагентов Проба-Экспресс (“Синтол”, Россия).

Синтетические олигонуклеотиды, необходимые для конструирования плазмид, были синтезированы в компании “Евроген” (Россия). Амплификацию ДНК проводили с использованием олигонуклеотидов в присутствии полимеразы КАРА HiFi (КараBiosystems, США). Для обработки плазмид и амплифицированных фрагментов ДНК использовали ферменты рестрикции (Thermo Fisher Scientific, США). Для выделения плазмидной ДНК и фрагментов ДНК из агарозы использовали наборы GeneJET Plasmid DNA Purification Kit и GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific). Правильность сборки всех конструкций проверена секвенированием.

#### *Культивирование штаммов с одиночными делециями генов PDC*

Динамику роста мутантов по генам *PDC* определяли спектрофотометрически на качалочном инкубаторе-спектрофотометре TVS062CA: Compact Rocking Incubator (Advantec MFS, Inc., США). Пробирки с 5 мл среды YPD засеивали культурой с начальной оптической плотностью 0.2 при длине волны 600 нм ( $OD_{600}$ ) и инкубировали при 30°C с перемешиванием (70 об/мин) в течение 54 ч.

Для анализа метаболитов, накапливаемых мутантами по генам *PDC*, посевную культуру растили в 3 мл жидкой среды YPD в течение 24 ч при постоянном перемешивании (250 об/мин). Затем культуру переносили в пробирки с 3 мл среды YPD до стартового значения  $OD_{600}$  0.3 и культивировали в шейкере-инкубаторе Innova 44 (New Brunswick, Германия) при 30°C с перемешиванием (250 об/мин). Образцы отбирали через 48 ч и анализировали оптическую плотность, а в супернатанте определяли содержание органических кислот, остаточной глюкозы и этанола.

#### *Тест на митотическую стабильность*

Штаммы-продуценты МК растили в среде YES в глубоколоночных планшетах Eppendorf® Deepwell Plate (Eppendorf, Германия) в шейкере-инкубаторе Innova 44 при 30°C в течение 24 ч, после чего проводили 5 последовательных пересевов культуры путем переноса 1/10 части культуры в свежую среду. Культуру рассеивали до отдельных колоний на плотную среду YES, отбирали 20 независимых колоний и анализировали размер зон гидролиза на среде YES с мелом ( $CaCO_3$ , 10 г/л). Считали, что кассета интегрирована в геном, если зоны гидролиза вокруг колоний имели одинаковый диаметр.

#### *Культивирование в пробирках штаммов-продуцентов МК*

Посевную культуру растили в 3 мл жидкой среды YPD в течение 24 ч на качалке (250 об/мин). Посевной материал (0.5 мл) вносили в 50-миллилитровые пробирки с 5 мл ферментационной среды (ФС) следующего состава (масс.%):  $K_2HPO_4$  – 0.57,  $KH_2PO_4$  – 0.34, кукурузный экстракт – 2.0, глюкоза – 19.0 – и инкубировали в течение 48 ч при 30°C и скорости перемешивания 250 об/мин.

#### *Аналитические методы*

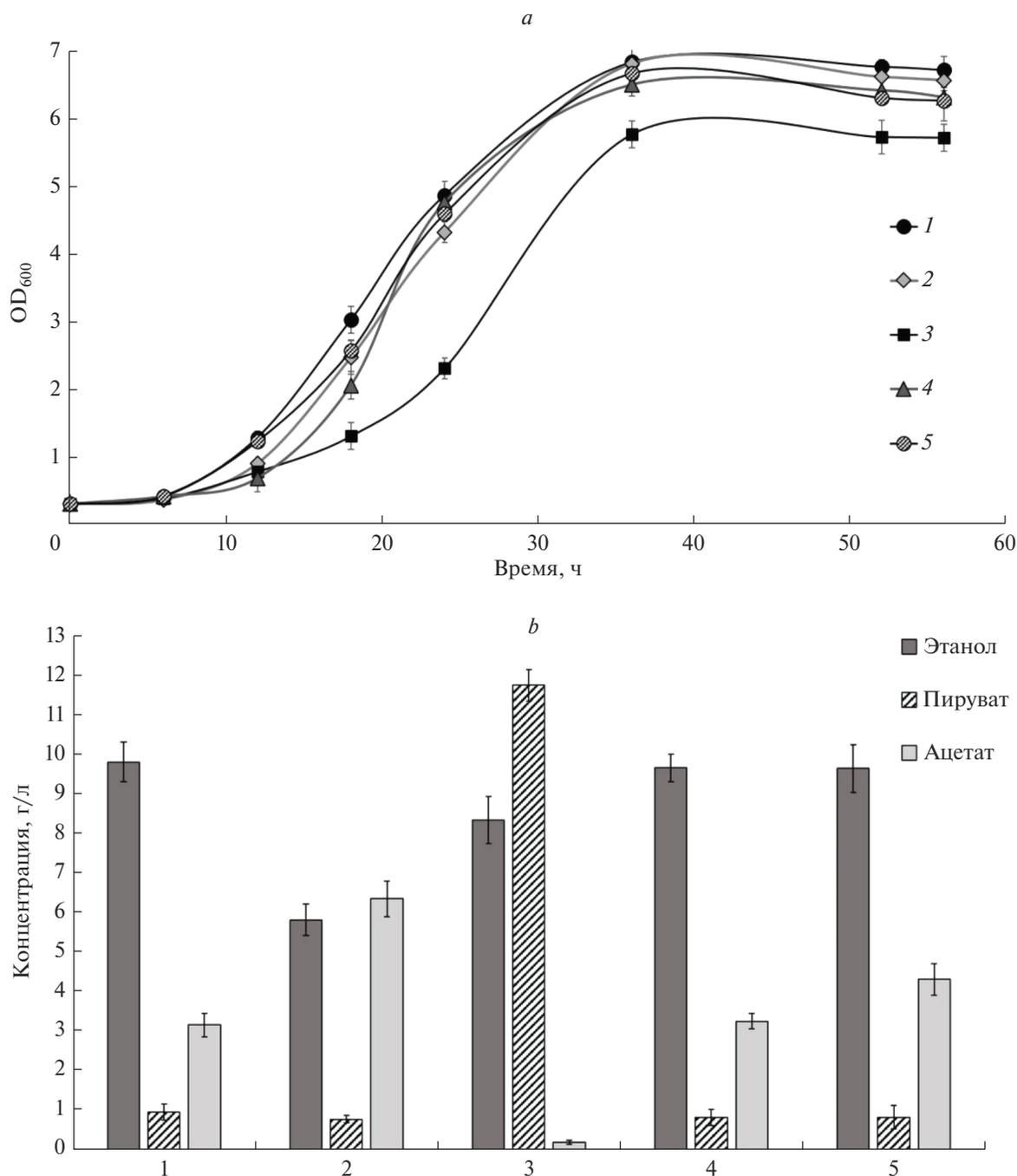
Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре UV mini 1240 (Shimadzu, Япония) в предварительно разбавленных образцах и значения  $OD_{600}$  рассчитывали с учетом разведения. Концентрацию МК, пирувата и ацетата определяли методом ВЭЖХ на хроматографе Alliance Separations Module Waters 2695 (Waters, США) с использованием колонки YMC Pack Pro C18 250 × 4.6 мм × 5 мкм (YMC-Triart, Япония) при 30°C и скорости потока 1.5 мл/мин. В качестве элюента использовали 0.1%-ный водный раствор  $H_3PO_4$ . Ультрафиолетовый детектор – диодная матрица, длина волны – 220 нм. Для обработки данных использовали программное обеспечение Empower Pro Software (Waters).

Концентрацию этилового спирта определяли методом газовой хроматографии на газовом хроматографе Shimadzu GC-2010 (Shimadzu) с использованием капиллярной колонки SGE BPX-Vol 30 м × 0.32 мм × 1.8 мкм (SGE Analytical Science, Великобритания).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Характеристика одиночных мутантов $\Delta pdc1$ , $\Delta pdc2$ , $\Delta pdc3$ , $\Delta pdc4$ дрожжей *S. pombe**

Штаммы *S. pombe* 3-21, 3-22, 3-23 и 3-24, содержащие одиночные делеции:  $\Delta pdc1$ ,  $\Delta pdc2$ ,  $\Delta pdc3$  и



**Рис. 1.** Характеристика штаммов *S. pombe*. *a* – Кинетика роста штаммов: 3-2 ( $\Delta\text{ura4 PDC}^+$ ) (1), 3-21 ( $\Delta\text{ura4 } \Delta\text{pdc1}$ ) (2), 3-22 ( $\Delta\text{ura4 } \Delta\text{pdc2}$ ) (3), 3-23 ( $\Delta\text{ura4 } \Delta\text{pdc3}$ ) (4), 3-24 ( $\Delta\text{ura4 } \Delta\text{pdc4}$ ) (5); *b* – накопление в супернатанте этанола, пирувата и ацетата за 48 ч.

**Fig. 1.** Characterization of strains *S. pombe*. *a* – Growth kinetics of strains: 3-2 ( $\Delta\text{ura4 PDC}^+$ ) (1), 3-21 ( $\Delta\text{ura4 } \Delta\text{pdc1}$ ) (2), 3-22 ( $\Delta\text{ura4 } \Delta\text{pdc2}$ ) (3), 3-23 ( $\Delta\text{ura4 } \Delta\text{pdc3}$ ) (4), 3-24 ( $\Delta\text{ura4 } \Delta\text{pdc4}$ ) (5); *b* – accumulation of ethanol, pyruvate and acetate in the supernatant in 48 h.

$\Delta\text{pdc4}$  соответственно – на фоне делеции  $\Delta\text{ura4}$ , были получены на основе штамма *S. pombe* 3-2 ( $\Delta\text{ura4}$ ).

Мутантные штаммы по генам *PDC* и родительский штамм *S. pombe* 3-2 культивировали в пробирках в среде YPD и анализировали динамику

роста, а также накопление пирувата, ацетата и этанола в супернатанте за 48 ч (рис. 1).

Штаммы *S. pombe* с одиночной делецией  $\Delta\text{pdc1}$ ,  $\Delta\text{pdc3}$  или  $\Delta\text{pdc4}$  практически сравнимы по росту со штаммом *S. pombe* 3-2 ( $\text{PDC}^+$ ), в то время как у

штамма с делецией  $\Delta pdc2$  увеличена протяженность лаг-фазы роста культуры и снижено накопление биомассы.

При культивировании в среде YPD в супернатанте штамма *S. pombe* 3-2 содержится около 1 г/л пирувата, 3 г/л ацетата и около 10 г/л этанола через 48 ч роста. Делетирование генов *PDC2*, *PDC3* или *PDC4* приводит к незначительному (в пределах 15%) снижению биосинтеза этанола, в то время как в штамме с делецией гена *PDC1* содержание этанола снижено на 40% (около 6 г/л). В штамме с  $\Delta pdc2$  содержание в супернатанте пирувата повышено в 67 раз, а ацетата снижено в 15 раз, в то время как в штамме с  $\Delta pdc1$ , наоборот, содержание пирувата снизилось в 1.2 раза, а ацетата увеличилось в 2 раза. Также содержание ацетата увеличилось примерно в 1.4 раза в штамме с  $\Delta pdc4$ . Известно, что ацетат является субстратом для ацетил-КоА – метаболита, необходимого для роста клеток. По накоплению пирувата штамм *S. pombe* 3-2 и штаммы с  $\Delta pdc3$  и  $\Delta pdc4$  сравнимы.

Таким образом, логично предположить, что введение делеции  $\Delta pdc2$  или  $\Delta pdc1$  можно использовать для конструирования продуцента МК – за счет перенаправления потока пирувата на биосинтез МК в присутствии генов гетерологичных лактатдегидрогеназ.

Влияние делеций генов *PDC2* и *PDC1* на синтез МК изучили на кислотоустойчивом модельном штамме Sp- $LDH_{pent}$ , который содержит ген *LDH*, кодирующий L-лактатдегидрогеназу из *Lactobacillus pentosus*, и продуцирует около 60 г/л МК при культивировании в ФС в пробирках.

#### Получение и характеристика продуцентов МК, содержащих $\Delta pdc2$

При культивировании штамма *S. pombe* 3-22, содержащего  $\Delta pdc2$ , значительное количество пирувата оказывается неиспользованным и выделяется клетками в культуральную среду (рис. 1b). Известно, что пируват – это субстрат лактатдегидрогеназ. Исходя из этого, мы предположили, что делеция  $\Delta pdc2$  в присутствии генов гетерологичных *LDH* приведет к повышению биосинтеза МК.

В штамме Sp- $LDH_{pent}$  делетировали ген *PDC2* и получили штамм Sp- $\Delta pdc2LDH_{pent}$ . При его культивировании в ФС (рис. 2) обнаружено, что по сравнению с родительским штаммом Sp- $LDH_{pent}$  ( $PDC^+$ ) оптическая плотность культуры снизилась в 2 раза и количество МК в супернатанте упало с 58 до 22 г/л, в то время как количество пирувата увеличилось с 3 до 20 г/л. При этом штамм Sp- $\Delta pdc2LDH_{pent}$  аккумулирует в культуральной жидкости количество этанола и ацетата, сравнимое со штаммом Sp- $LDH_{pent}$  (с учетом разницы в биомассе). Мы предположили, что для перенаправления накопленного пирувата на синтез МК необходимо введе-

ние дополнительных генов гетерологичных лактатдегидрогеназ.

Для этого штамм Sp- $\Delta pdc2LDH_{pent}$  трансформировали кассетой, содержащей ген *LDH* из *Lactobacillus acidophilus*. В результате отобрали стабильный штамм Sp- $\Delta pdc2LDH_{pent}LDH_{aci}$ , содержащий два гетерологичных гена *LDH*. Введение дополнительной копии гена *LDH* привело к повышению биосинтеза МК с 22 до 25 г/л и снижению количества пирувата в супернатанте с 20 до 17 г/л, однако по росту штамм  $\Delta pdc2LDH_{pent}LDH_{aci}$  ( $OD_{600} = 12$ ) уступает модельному штамму Sp- $LDH_{pent}$  ( $OD_{600} = 18$ ) (рис. 2).

Дальнейшее повышение копийности генов *LDH* в геноме штамма Sp- $\Delta pdc2LDH_{pent}LDH_{aci}$  оказалось невозможно вследствие потери жизнеспособности клеток.

Таким образом, несмотря на то, что в штаммах *S. pombe* с  $\Delta pdc2$  накапливается пируват – субстрат L-лактатдегидрогеназ, – перенаправить его на биосинтез МК не удастся даже при повышении копийности гетерологичных генов *LDH*.

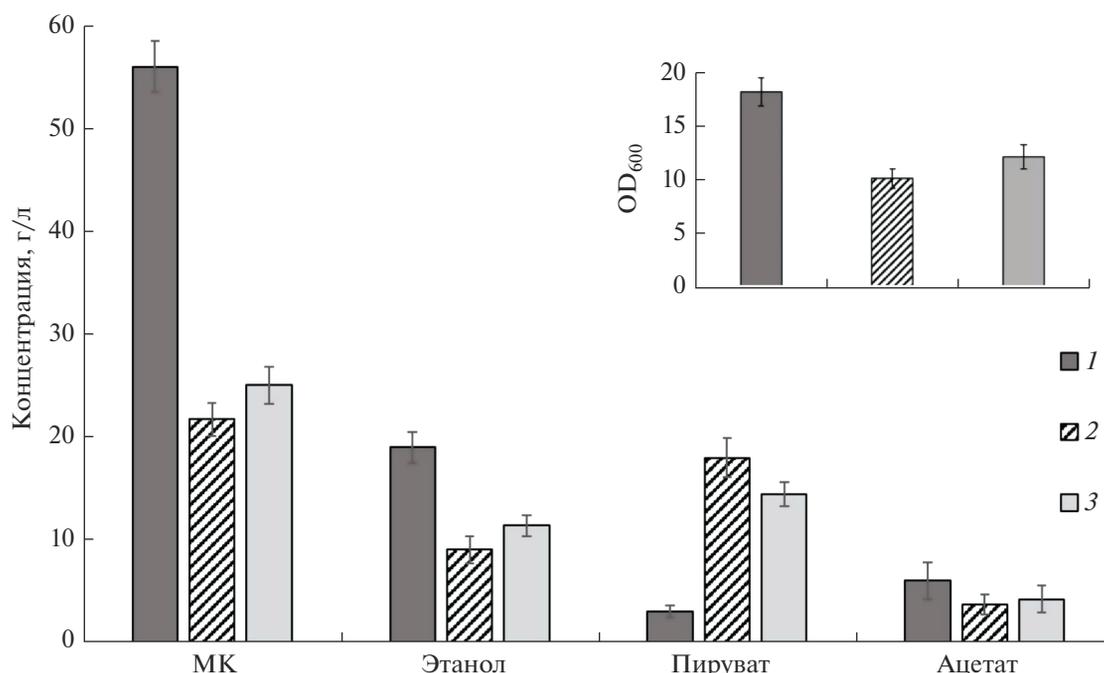
#### Получение и характеристика продуцентов МК, содержащих $\Delta pdc1$

Делеция гена *PDC1* в штамме *S. pombe* 3-21 приводит к перераспределению пирувата, расходуемого на побочные продукты: снижению накопления этанола и повышению ацетата (рис. 1b). Мы предположили, что на фоне  $\Delta pdc1$  наличие гетерологичных лактатдегидрогеназ может привести к повышению биосинтеза МК за счет использования пирувата, прежде расходуемого на синтез этанола.

В геноме штамма Sp- $LDH_{pent}$  делетировали ген *PDC1* и получили штамм Sp- $\Delta pdc1LDH_{pent}$ , который по росту был сравним с родительским – при незначительном повышении продукции МК и снижении этанола (рис. 3).

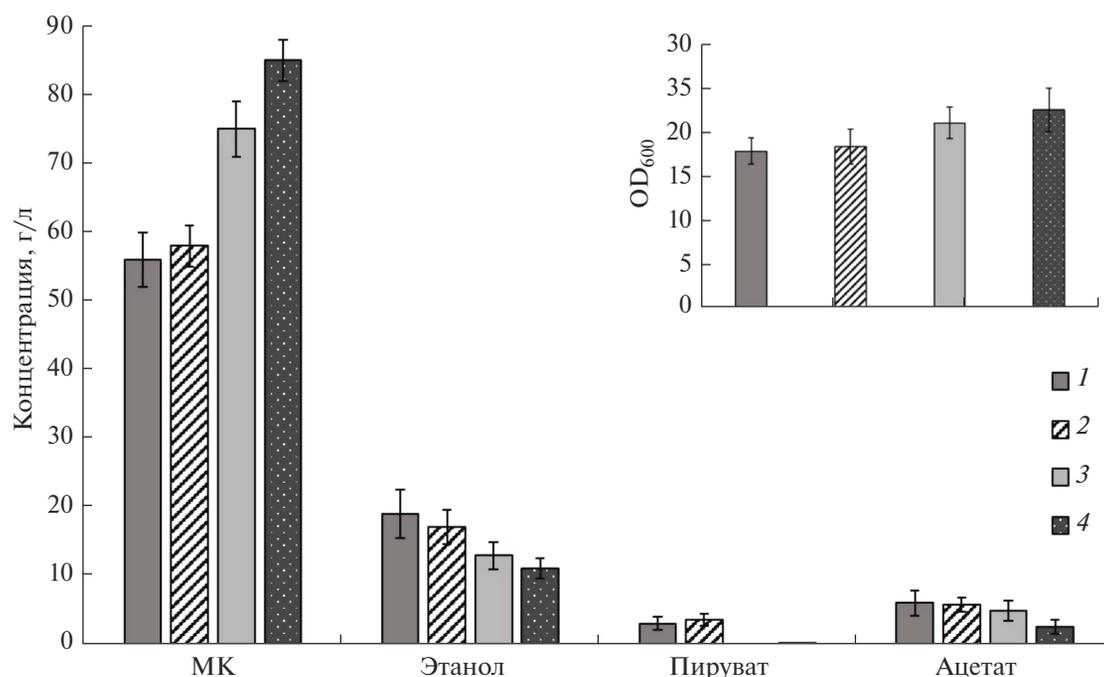
Штамм Sp- $\Delta pdc1LDH_{pent}$  трансформировали кассетой, содержащей ген *LDH* *L. acidophilus*, и отобрали стабильный штамм Sp- $\Delta pdc1LDH_{pent}LDH_{aci}$ . Штамм, содержащий два гетерологичных гена *LDH*, продуцировал на 30% больше МК при отсутствии пирувата в супернатанте (рис. 3).

В геном штамма Sp- $\Delta pdc1LDH_{pent}LDH_{aci}$  интегрировали кассету, содержащую ген *LDH* *Lactobacillus helveticus*, и отобрали штамм Sp- $\Delta pdc1LDH_{pent}LDH_{aci}LDH_{helv}$ . Штамм, содержащий три гетерологичных гена *LDH*, продуцирует 85 г/л МК (рис. 3), что на 47% больше, чем для штамма с одним геном *LDH*, и на 13% больше, чем для штамма с двумя генами *LDH*. В супернатанте штамма Sp- $\Delta pdc1LDH_{pent}LDH_{aci}LDH_{helv}$  отсутствует пируват, при этом содержание этанола и ацетата снижено на 35 и 64% соответственно относительно штамма Sp- $\Delta pdc1LDH_{pent}$  и на 15 и 48%



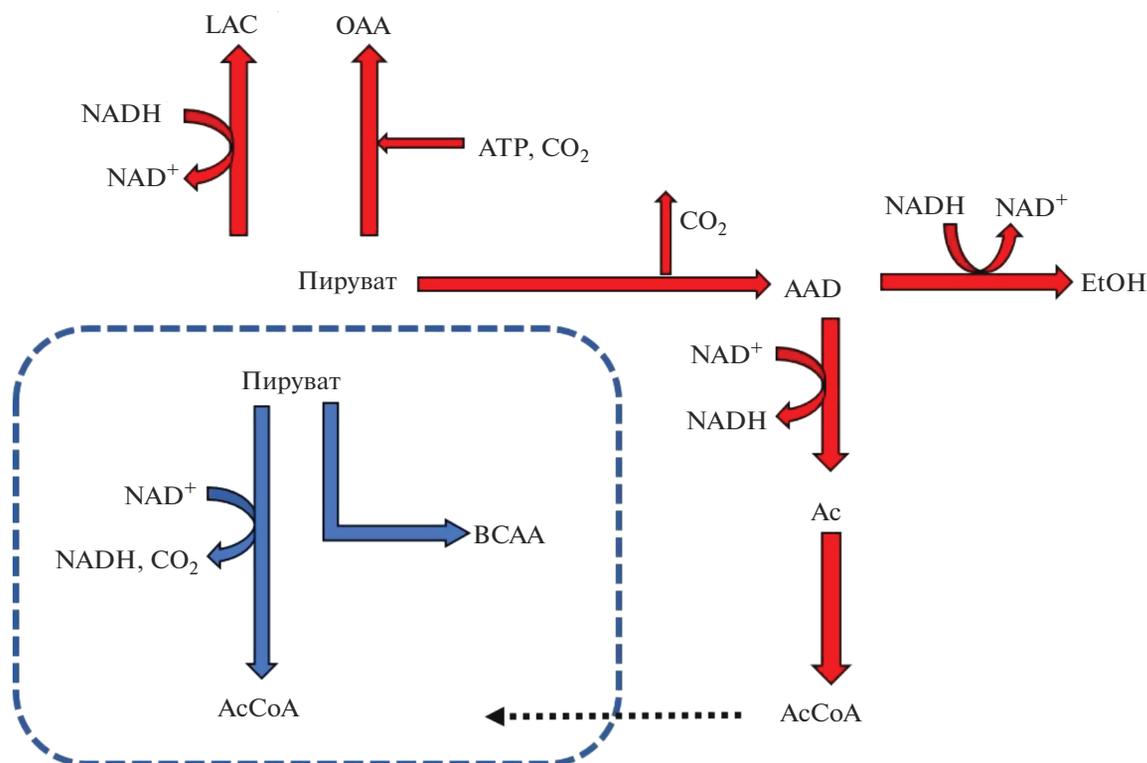
**Рис. 2.** Влияние делеции гена *PDC2* на оптическую плотность ( $OD_{600}$ ) и биосинтез молочной кислоты (МК), этанола, пирувата и ацетата. Сравнение штаммов Sp-*LDH*<sub>pent</sub> (1), Sp- $\Delta$ *pdc2LDH*<sub>pent</sub> (2), Sp- $\Delta$ *pdc2LDH*<sub>pent</sub> *LDH*<sub>aci</sub> (3) при культивировании в пробирках в течение 48 ч.

**Fig. 2.** The effect of *PDC2* gene deletion on optical density ( $OD_{600}$ ) and biosynthesis of lactic acid, ethanol, pyruvate and acetate. Comparison of Sp-*LDH*<sub>pent</sub> (1), Sp- $\Delta$ *pdc2LDH*<sub>pent</sub> (2) and Sp- $\Delta$ *pdc2LDH*<sub>pent</sub> *LDH*<sub>aci</sub> (3) strains during cultivation in test tubes for 48 h.



**Рис. 3.** Влияние делеции гена *PDC1* на оптическую плотность ( $OD_{600}$ ) и биосинтез молочной кислоты (МК), этанола, пирувата и ацетата. Сравнение штаммов Sp-*LDH*<sub>pent</sub> (1), Sp- $\Delta$ *pdc1LDH*<sub>pent</sub> (2), Sp- $\Delta$ *pdc1LDH*<sub>pent</sub> *LDH*<sub>aci</sub> (3) и Sp- $\Delta$ *pdc1LDH*<sub>pent</sub> *LDH*<sub>aci</sub> *LDH*<sub>helv</sub> (4) при культивировании в пробирках в течение 48 ч.

**Fig. 3.** The effect of *PDC1* gene deletion on optical density ( $OD_{600}$ ) and biosynthesis of lactic acid, ethanol, pyruvate and acetate. Comparison of Sp-*LDH*<sub>pent</sub> (1), Sp- $\Delta$ *pdc1LDH*<sub>pent</sub> (2), Sp- $\Delta$ *pdc1LDH*<sub>pent</sub> *LDH*<sub>aci</sub> (3) and Sp- $\Delta$ *pdc1LDH*<sub>pent</sub> *LDH*<sub>aci</sub> *LDH*<sub>helv</sub> (4) strains during cultivation in test tubes for 48 h.



**Рис. 4.** Обобщенная схема распределения пирувата в цитозоле (реакции, окрашенные в красный цвет) и митохондриях (реакции, окрашенные в синий цвет). LAC – *L*-лактат, OAA – оксалоацетат, AAD – ацетальдегид, Ac – ацетил, AcCoA – ацетил-КоА, BCAA (branched chain amino acids) – аминокислоты с разветвленной цепью (лейцин, валин, изолейцин), EtOH – этанол.

**Fig. 4.** Scheme of pyruvate distribution in the cytosol (reactions colored red) and mitochondria (reactions colored blue). LAC, *L*-lactate; OAA, oxaloacetate; AAD, acetaldehyde; Ac, acetyl; AcCoA, acetyl-CoA; BCAA, branched chain amino acids (leucine, valine, isoleucine); EtOH, ethanol.

относительно штамма *Sp-Δpdc1LDH<sub>pent</sub>LDH<sub>aci</sub>*. Все штаммы полностью утилизируют глюкозу.

Создание более продуктивного штамма-производителя МК на фоне *Δpdc1* представляется перспективным направлением. Увеличение копияности генов *LDH* привело к повышению биосинтеза МК и снижению содержания побочных продуктов: этанола, пирувата и ацетата, – при этом сохранились ростовые характеристики родительского штамма.

Обобщенная схема распределения пирувата – конечного метаболита гликолиза – по путям метаболизма в цитозоле и митохондриях показана на рис. 4.

Пируватный узел играет регулируемую роль в клетке, влияя на респираторно-ферментативный метаболизм глюкозы, связанный с Crabtree-эффектом. В Crabtree-позитивных дрожжах, к которым относится *S. pombe*, в экспоненциальной фазе роста в условиях аэрации и при достаточной концентрации глюкозы увеличенный поток углерода (почти 50% поглощенной глюкозы) направлен на продукцию этанола (ферментативный путь), а цикл трикарбоновых кислот частично репрессирован [11].

Исходя из полученных нами данных, следует предположить, что пируватдекарбоксилаза-2 (Pdc2), кодируемая геном *PDC2*, имеет наибольшее сродство к пирувату по сравнению с Pdc1, Pdc3 и Pdc4 и необходима для превращения пирувата в ацетальдегид. В мутанте *Δpdc2* пируват накапливается и транспортируется в среду культивирования, несмотря на то, что это субстрат пируватдекарбоксилазы, *L*-лактатдегидрогеназы, пируваткарбоксилазы и обычно транспортируется в митохондрии, где служит субстратом для образования ацетил-КоА и предшественником для биосинтеза аминокислот лейцина, валина, изолейцина (BCAA). Таким образом, в дрожжах *S. pombe* Pdc2, по-видимому, важнейший фермент, контролирующий распределение пирувата в клетке.

Нами показано, что в штаммах 3-22, *Sp-Δpdc2LDH<sub>pent</sub>* и *Sp-Δpdc2LDH<sub>pent</sub>LDH<sub>aci</sub>*, содержащих *Δpdc2*, существенно снижен рост, возможно, из-за недостатка цитозольного ацетил-КоА, для биосинтеза которого необходим ацетат. В штаммах с *Δpdc2* содержание ацетата в супернатанте

**Таблица 2.** Сравнение генно-инженерных дрожжевых штаммов-продуцентов *L*-молочной кислоты<sup>a</sup>  
**Table 2.** Comparison of genetically engineered yeast strains producing *L*-lactic acid<sup>a</sup>

Штамм	Условия культивирования	Выход МК, г/л	Этанол, г/л	Время, ч	Ссылка
<i>S. cerevisiae</i> SR8LDH	Колба, YP-среда с 20% глюкозы, начальная концентрация клеток 0.05 г сухой биомассы/л, микроаэробные условия (80 об/мин)	102.4	38.9	96	[20]
<i>S. cerevisiae</i> BK01	Колба, YP-среда с 20% глюкозы, начальная концентрация клеток 0.05 г сухой биомассы/л, микроаэробные условия (80 об/мин)	119.1	36.2	96	[20]
<i>S. cerevisiae</i> SH6779	Колба, YP-среда с 10% глюкозы	48.0	nd <sup>b</sup>	72	[21]
<i>S. cerevisiae</i> Y1BO-7A	Колба, YP-среда с 10% глюкозы, микроаэробные условия (100 об/мин)	50.2	16.7	72	[17]
Sp- $\Delta$ <i>pdc1</i> LDH <sub>pent</sub> LDH <sub>aci</sub> LDH <sub>helv</sub>	Пробирки, ФС с кукурузным экстрактом и 19% глюкозы	85.0	12.0	48	Данная работа

Примечание: <sup>a</sup> Культивирование при кислых значениях pH; <sup>b</sup> nd – нет данных.  
 Note: <sup>a</sup> Cultivation at acidic pH values; <sup>b</sup> nd – no data.

значительно снижено: на 90% в штамме 3-22 и на 30% в штаммах-продуцентах МК.

Таким образом, стратегия конструирования продуцента МК на штаммах с делецией гена *PDC2* только за счет увеличения копияности генов лактатдегидрогеназ малоэффективна, в то время как на штаммах с делецией гена *PDC1* при добавлении гетерологичных *LDH* удалось повысить продуктивность, снизить содержание побочных продуктов и сохранить ростовые характеристики.

Известно, что полное или частичное выключение генов *PDC* особенно эффективно для Crabtree-негативных дрожжей, в которых делетирование генов пируватдекарбоксилаз слабо влияет на рост, но может привести к полному ингибированию биосинтеза этанола. В геноме дрожжей *Kluyveromyces marxianus* содержится один ген *PDC* и его делеция в продуценте МК приводит к полной блокировке биосинтеза этанола и повышению продукции лактата [12]. В дрожжах *Candida sonorensis* выявлено два гена *PDC* (*PDC1* и *PDC2*), делеция которых по-разному влияет на биосинтез этанола: в штамме с делецией  $\Delta$ *pdc2* снижена продукция этанола, в то время как в штаммах *PDC1 PDC2* и  $\Delta$ *pdc1 PDC2* продукция этанола сравнима, а в штамме с делецией  $\Delta$ *pdc1 \Delta*pdc2* этанол отсутствует [13]. В Crabtree-негативных дрожжах эффективно работает цикл трикарбоновых кислот [11] и необходимый для жизнедеятельности ацетил-КоА образуется преимущественно в митохондриях, а не в цитоплазме из ацетата.*

В Crabtree-позитивных дрожжах *S. cerevisiae* негативный по пируватдекарбоксилазе мутант *PDC*<sup>-</sup>не продуцирует этанол, аккумулирует пируват, чувствителен к глюкозе и растет только на синтетической среде с лимитирующим содержанием глюкозы с добавлением C2-соединений (этанол или ацетат), что отражает важную роль пируватдекарбоксила-

зы в синтезе цитоплазматического ацетил-КоА [8, 14]. В штаммах *S. cerevisiae* – продуцентах МК – обычно делетируют ген *PDC1* [15–18] или одновременно *PDC1* и *PDC5* [19].

На данный момент в литературе не описаны функции и возможные взаимодействия каждой из четырех пируватдекарбоксилаз, контролирующих превращение пирувата в ацетальдегид в дрожжах *S. pombe*. Нами показано, что в мутанте  $\Delta$ *pdc2* накопление пирувата оказывает негативное влияние на рост культуры (недостаток ацетил-КоА, сильное закисление среды) и фермент Pdc2 необходим для нормальной жизнедеятельности дрожжевой клетки. В штамме генотипа *PDC2 \Delta*pdc1* нам удалось повысить продуктивность штамма-продуцента МК за счет увеличения копияности гетерологичных генов *LDH*.*

Полученный штамм Sp- $\Delta$ *pdc1*LDH<sub>pent</sub>LDH<sub>aci</sub>LDH<sub>helv</sub> при культивировании в минеральной среде, ФС, с кукурузным экстрактом (отходом крахмалопаточного и глюкозного производства) продуцирует 85 г/л МК без поддержания pH. Сравнение генно-инженерных дрожжевых штаммов-продуцентов, способных продуцировать МК в условиях без титрования, приведено в табл. 2.

Все продуценты, кроме штамма-продуцента *S. pombe*, культивировали на богатой комплексной среде, в некоторых случаях с добавлением в среду ферментации аминокислот, витаминов и микроэлементов, что неэффективно и значительно увеличивает себестоимость целевого продукта. Кроме того, культивирование штамма Sp- $\Delta$ *pdc1*LDH<sub>pent</sub>LDH<sub>aci</sub>LDH<sub>helv</sub> проводят в течение 48 ч, в то время как остальные продуценты культивируют 72 или 96 ч.

Результаты проведенного нами исследования стали основой для создания нового высокопродуктивного штамма-производителя молочной кислоты [22]. Работа в данном направлении позволит расширить арсенал рекомбинантных микроорганизмов, продуцирующих *L*-молочную кислоту при кислых значениях pH, для развития отечественной биотехнологии.

#### ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ МАТЕРИАЛ

Электронная версия статьи содержит дополнительный материал, доступный безвозмездно на сайте журнала: <https://sciencejournals.ru/journal/biotekh/>.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа проведена в рамках выполнения государственного задания НИЦ “Курчатовский институт”.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Becker J., Lange A., Fabarius J., Wittmann C. Top value platform chemicals: bio-based production of organic acids. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2015, 36, 168–175. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.08.022>
2. Dusselier M., Van Wouwe P., Dewaele A., Makshina E., Sels B.F. Lactic acid as a platform chemical in the biobased economy: the role of chemocatalysis. *Energy Environ. Sci.*, 2013, 6, 1415. <https://doi.org/10.1039/C3EE00069A>
3. Ghaffar T., Irshad M., Anwar Z., Aqil T., Zulifqar Z., Tariq A., Kamran M., Ehsan N., Mehmood S. Recent trends in lactic acid biotechnology: a brief review on production to purification. *J. Radiat. Res. Appl. Sci.*, 2014, 7, 222–229. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2014.03.002>
4. Qin J., Wang X., Zheng Z., Ma C., Tang H., Xu P. Production of *L*-lactic acid by a thermophilic *Bacillus* mutant using sodium hydroxide as neutralizing agent. *Bioresour. Technol.*, 2010, 101, 7570–7576. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.037>
5. Kim J.-Y., Kim E.-J., Lopez-Maury L., Bahler J., Roe J.-H. A metabolic strategy to enhance long-term survival by Phx1 through stationary phase-specific pyruvate decarboxylases in fission yeast. *Aging*, 2014, 6(7), 587–601. <https://doi.org/10.18632/aging.100682>
6. Pronk J.T., Steensmays H.Y., Van Dijken J.P. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 1996, 12, 1607–1633. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0061\(199612\)12:16<1607::aid-yea70>3.0.co;2-4](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0061(199612)12:16<1607::aid-yea70>3.0.co;2-4)
7. Hohmann S. Characterization of *PDC6*, a third structural gene for pyruvate decarboxylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 1991, 173, 7963–7969. <https://doi.org/10.1128/jb.173.24.7963-7969.1991>
8. van Maris A.J.A., Geertman J.-M.A., Vermeulen A., Groothuizen M.K., Winkler A.A., Piper M.D.W., van Dijken J.P., Pronk J.T. Directed evolution of pyruvate decarboxylase-negative *Saccharomyces cerevisiae*, yielding a C2-independent, glucose-tolerant, and pyruvate-hyperproducing yeast. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, 70(1), 159–166. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.1.159-166.2004>
9. Sabatino S.A., Forsburg S.L. Molecular genetics of *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.*, 2010, 470, 759–795. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(10\)70032-X](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(10)70032-X)
10. Erler A., Maresca M., Fu J., Stewart A.F. Recombineering reagents for improved inducible expression and selection marker re-use in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*, 2006, 23, 813–823. <https://doi.org/10.1002/yea.1396>
11. Christen S., Sauer U. Intracellular characterization of aerobic glucose metabolism in seven yeast species by 13C flux analysis and metabolomics. *FEMS Yeast Res.*, 2011, 11(3), 263–272. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00713.x>
12. Bae J.-H., Kim H.-J., Kim M.-J., Sung B.H., Jeon J.-H., Kim H.-S., Jin Y.-S., Kweon D.-H., Sohn J.-H. Direct fermentation of Jerusalem artichoke tuber powder for production of *L*-lactic acid and *D*-lactic acid by metabolically engineered *Kluyveromyces marxianus*. *J. Biotechnol.*, 2018, 266, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.12.001>
13. Ilmen M., Koivuranta K., Ruohonen L., Rajgarhia V., Suominen P., Penttila M. Production of *L*-lactic acid by the yeast *Candida sonorensis* expressing heterologous bacterial and fungal lactate dehydrogenases. *Microb. Cell Fact.*, 2013, 12, 53.
14. Flikweert M.T., de Swaaf M., van Dijken J.P., Pronk J.T. Growth requirements of pyruvate-decarboxylase-negative *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1999, 174, 73–79. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13551.x>
15. Tokuhiko K., Ishida N., Nagamori E., Saitoh S., Onishi T., Kondo A., Takahashi H. 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, 883–890. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1831-5>
16. Saitoh S., Ishida N., Tokuhiko K., Nagamori E., Kitamoto K., Takahashi H. Genetically engineered wine yeast produces a high concentration of *L*-lactic acid of extremely high optical purity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, 71(5), 2789–2792. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.12.00110.1128/AEM.71.5.2789-792.2005>
17. Ishida N., Saitoh S., Tokuhiko K., Matsuyama T., Kitamoto K., Takahashi H. Efficient production of *L*-lactic acid by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* with a genome-integrated *L*-lactate dehydrogenase gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, 71(4), 1964–1970. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.1964-1970.2005>
18. Lee J.Y., Kang C.D., Lee S.H., Park Y.K., Cho K.M. Engineering cellular redox balance in *Saccharomyces cerevisiae* for improved production of *L*-lactic acid. *Bio-*

- technol. Bioeng.*, 2015, 112(4), 751–758.  
<https://doi.org/10.1002/bit.25488>
19. Ishida N., Saitoh S., Onishi T., Tokuhiko K., Nagamori E., Kitamoto K., Takahashi H. The effect of pyruvate decarboxylase gene knockout in *Saccharomyces cerevisiae* on L-lactic acid production. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2006, 70(5), 1148–1153.  
<https://doi.org/10.1271/bbb.70.1148>
20. Jang B.-K., Ju Y., Jeong D., Jung S.-K., Kim C.-K., Chung Y.-S., Kim S.-R. L-lactic acid production using engineered *Saccharomyces cerevisiae* with improved organic acid tolerance. *J. Fungi*, 2021, 7, 928.  
<https://doi.org/10.3390/jof7110928>
21. Suzuki T., Sakamoto T., Sugiyama M., Ishida N., Kambe H., Obata S., Kaneko Y., Takahashi H., Harashima S. Disruption of multiple genes whose deletion causes lactic acid resistance improves lactic-acid resistance and productivity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.*, 2013, 115, 467–474.  
<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.11.014>
22. Анисимова Е.О., Шутлов А.В., Тарутина М.Г., Федоров А.С., Синеокий С.П. Штамм дрожжей *Schizosaccharomyces pombe*, продуцирующий L-молочную кислоту, содержащий в составе хромосомы гены трех различных гетерологичных лактатдегидрогеназ. Патент RU2752896C1, Оpubл. 11.08.2021.  
[https://searchplatform.rospatent.gov.ru/doc/RU2752896C1\\_20210811](https://searchplatform.rospatent.gov.ru/doc/RU2752896C1_20210811)

## Metabolic Engineering of Low-pH Tolerant Yeast *Schizosaccharomyces pombe* for L-Lactic Acid Production

E. O. Anisimova<sup>a, b, #</sup>, M. G. Tarutina<sup>a, b</sup>, and S. P. Sineoky<sup>a</sup>

<sup>a</sup>NRC “Kurchatov Institute”, Moscow, 123182 Russia

<sup>b</sup>NRC “Kurchatov Institute”, Kurchatov Genomic Center, Moscow, 123182 Russia

<sup>#</sup>e-mail: ekaterina.genetika@gmail.com

**Abstract**—The recombinant strain based on acidophilic yeast *Schizosaccharomyces pombe* with a cloned gene of heterologous lactate dehydrogenase (*LDH*) was used to optimize the biosynthesis of L-lactic acid. For this purpose, the effect of inactivation of pyruvate decarboxylase genes (*PDC*) on the synthesis of acetate, pyruvate and ethanol (the main by-product in the synthesis of lactic acid) was studied. Using the wild *S. pombe* strain, we showed that the  $\Delta pdc3$  and  $\Delta pdc4$  deletions did not affect these indicators, while in the  $\Delta pdc1$  mutant ethanol biosynthesis was reduced and acetate biosynthesis was increased, and the  $\Delta pdc2$  mutant, accumulated pyruvate. The effect of deletions of *PDC1* and *PDC2* genes on lactic acid biosynthesis was tested on a model *S. pombe* strain containing a heterologous *LDH* gene from *Lactobacillus pentosus*. It has been shown that in strains with the inactivated *PDC2* gene the accumulated pyruvate was poorly consumed for the biosynthesis of lactic acid even in the presence of two different recombinant lactate dehydrogenases, the introduction of the third gene of heterologous lactate dehydrogenase led to loss of viability of the strain. At the same time, in strains with the deleted *PDC1* gene the biosynthesis of lactic acid was enhanced with the introduction of additional *LDH* genes. The results obtained can be used in the design of industrial lactic acid producing strains.

**Keywords:** *Schizosaccharomyces pombe*, metabolic engineering, lactate dehydrogenase, lactic acid, pyruvate decarboxylase