

**ВЛИЯНИЕ ДЕЛЕЦИИ ГЕНА *NDE1* НА СВОЙСТВА ШТАММА
Schizosaccharomyces pombe – ПРОДУЦЕНТА *L*-МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ**

© 2024 г. Е. О. Анисимова^{1, 2, *}, Д. Д. Бочаров³, С. П. Синеокий¹, М. Г. Тарутина^{1, 2}

¹НИЦ “Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

²НИЦ “Курчатовский институт”, Курчатовский геномный центр, Москва, 123182 Россия

³Студент ФГБОУ ВО “РОСБИОТЕХ”, Москва, 125080 Россия

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

Поступила в редакцию 17.09.2024 г.

После доработки 01.10.2024 г.

Принята к публикации 03.10.2024 г.

На основе кислотоустойчивого штамма, *Schizosaccharomyces pombe* сконструированы штаммы-продуценты *L*-молочной кислоты (МК) с делецией гена *NDE1*, кодирующего NADH-дегидрогеназу, предположительно регулирующую цитозольный NADH/NAD⁺ баланс в дрожжах. При насыщении генома ранее полученных штаммов-продуцентов гетерологичными генами *L-LDH*, кодирующими *L*-лактатдегидрогеназу, ухудшается рост культуры и замедляется потребление глюкозы. Увеличение дозы генов *L-LDH* не всегда приводит к увеличению биосинтеза целевого продукта. Возможно ограничивающим фактором в биопроцессе производства МК является недостаток цитозольного NADH, в окислении которого до NAD⁺ в дрожжах *S. pombe* задействована NADH-дегидрогеназа, кодируемая геном *NDE1*. Штамм *S. pombe*, с делецией гена *NDE1* и дополнительной копией гена *L-LDH*, превосходит родительский штамм по росту, потреблению глюкозы и биосинтезу молочной кислоты (139 г/л, что на 28% больше, финальный pH 3.2). Проведенное исследование позволяет лучше понять основы клеточной биологии дрожжей *S. pombe* и использовать полученные результаты для конструирования высокопродуктивных штаммов-продуцентов МК.

Ключевые слова: (по значимости) *Schizosaccharomyces pombe*, *L*-молочная кислота, NADH дегидрогеназа, инженерия метаболизма

DOI: 10.56304/S0234275824050028

L-молочная кислота (2-гидроксипропионовая кислота, МК) имеет GRAS (Generally Regarded As Safe) статус и нашла применение в пищевой, фармацевтической и косметической промышленности. МК можно конвертировать в некоторые востребованные химические соединения, такие как пировиноградная и акриловая кислоты, 1,2-пропандиол, этиллактат [1]. В виде мономера МК применяется для производства полилактида – биоразлагаемого полимера, занимающего лидирующее положение по объемам выпуска среди биопластиков.

В микробиологической промышленности традиционными продуцентами лактата являются молочнокислые бактерии, преимущественно лактобациллы *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*, *Lactobacillus helveticus* и *Lactiplantibacillus plantarum*, на долю которых в текущий период приходится около 90% МК на рынке [2]. Привлекательным направлением развития технологии микробного синтеза является биосинтез МК при низких значениях pH

(коэффициент диссоциации МК pKa = 3.86), когда основная часть целевого продукта содержится в виде кислоты. Разработку данного направления осуществляют, преимущественно, на кислотоустойчивых штаммах дрожжей, например, *Saccharomyces cerevisiae* [3], *Pichia kudriavzevii* [4], *Schizosaccharomyces pombe* [5].

Дрожжи *S. pombe* обладают высокой устойчивостью к низким значениям pH и к повышенной концентрации МК в среде [6]. Для этого микроорганизма разработаны генно-инженерные подходы, он хорошо изучен генетически, не требует для роста сложных сред и удобен для промышленной ферментации, что делает его перспективным объектом для разработки продуцентов МК.

В геноме дрожжей *S. pombe* содержится ген *L-LDH* (SPAC186.08c), кодирующий *L*-лактатдегидрогеназу, но в норме они не продуцируют значимых количеств МК (около 5 г/л). Экспрессия гетерологичных генов *L-LDH*, кодирующих NAD⁺-зависимые *L*-лактатдегидрогеназы (EC 1.1.1.27) с высокой удельной активностью, позволяет полу-

Список сокращений: (по алфавиту) МК – *L*-молочная кислота; ФС – ферментационная среда.

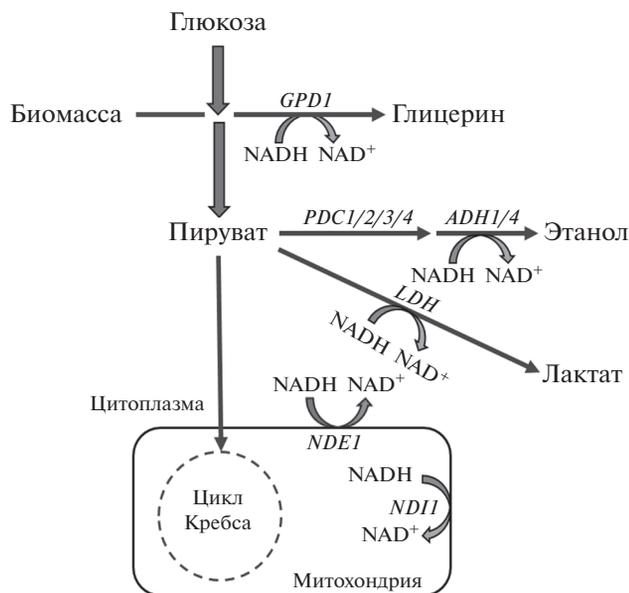


Рис. 1. Обобщенная схема окисления NADH до NAD⁺ в дрожжах *S. pombe*. LDH – лактатдегидрогеназа, PDC – пируватдекарбоксилаза, GPD – глицерол-3-фосфатдегидрогеназа, NDE1 – цитозольная NADH-дегидрогеназа, NDI1 – митохондриальная NADH-дегидрогеназа, ЦТК – цикл трикарбоновых кислот.

Fig. 1. Scheme of reduction of the NADH to NAD⁺ in *S. pombe* yeast. LDH – lactate dehydrogenase, PDC – pyruvate decarboxylase, GPD – glycerol-3-phosphate dehydrogenase, NDE1 – cytosolic NADH-dehydrogenase, NDI1 – mitochondrial NADH-dehydrogenase.

чать штаммы, продуцирующие МК в количествах, сравнимых с промышленным уровнем [7].

Повышение копияности генов *L-LDH* в геноме штамма-продуцента является одним из подходов метаболической инженерии для увеличения биосинтеза МК. *L*-лактатдегидрогеназы в качестве кофактора используют NADH (никотинамидадениндинуклеотид), который необходим также на этапах биосинтеза этанола и глицерина (рис. 1). Возможно, при насыщении генома продуцента МК генами *L-LDH* потребность клеток в NADH возрастает.

NADH появляется во время катаболических реакций, протекающих как в цитоплазме, так и в митохондриях. Во время аэробного роста NADH, образующийся во время гликолиза, окисляется до NAD⁺ преимущественно с образованием этанола. NADH, формирующийся в реакциях отличных от гликолиза, окисляется, в основном, за счет образования глицерина [8]. Этанол и глицерин являются побочными продуктами при биосинтезе МК.

Также NADH/NAD⁺ баланс в дрожжах поддерживается NADH-зависимыми дегидрогеназами. В *S. cerevisiae* окисление цитозольного NADH осуществляют две внешние связанные с мембраной митохондриальные NADH-дегидрогеназы, кодируемые генами *NDE1* и *NDE2* [9], а окисле-

ние митохондриального NADH – внутренняя дегидрогеназа Ndi1p. В дрожжах *S. pombe* в результате сравнительного геномного анализа выявлены последовательности *NDE1* (SPBC947.15c) и *NDI1* (SPAC3A11.07), кодирующие энзимы с высокой гомологией к NADH-дегидрогеназам дрожжей *S. cerevisiae*, кодируемым генами *NDE1*, *NDE2* и *NDI1*.

Нарушение NADH/NAD⁺ баланса может оказывать существенное влияние на изменение метаболизма и уровни метаболитов, что было показано на дрожжах *S. cerevisiae* [10, 11]. В исследовании Lee J.Y и соавторов было продемонстрировано позитивное влияние инактивации генов *NDE1* и *NDE2* на продуктивность продуцента МК при увеличении дозы гетерологичных генов *L-LDH* [12].

Целью данного исследования было изучение влияния инактивации гена *NDE1* на свойства штаммов *S. pombe* – продуцентов МК, а именно на рост, потребление глюкозы, накопление МК и побочных продуктов, и дать оценку перспектив использования данной модификации для разработки более продуктивных штаммов на основе этих дрожжей.

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* и плазмиды, использованные в данной работе, представлены в табл. 1.

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

Триптон, пептон, дрожжевой экстракт, агар бактериологический были приобретены в компании “Диа-М” (Россия). Кукурузный экстракт получен в “РусТарк” (Россия), моногидрат глюкозы закуплен в “Qinhuangdao Lihua Starch Co, Ltd” (Китай). Соли и другие реагенты приобретены в фирме “Химмед” (Россия). Все реактивы отечественного производства имели квалификацию “х. ч.” и “ч. д. а.”.

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). Плазмиды и амплифицированные фрагменты ДНК обрабатывали ферментами рестрикции (Thermo Fisher Scientific, США). Для выделения плазмидной ДНК и фрагментов

Таблица 1. Штаммы *S. pombe* и плазмиды, использованные в работе
Table 1. *S. pombe* strains and plasmids used in this study

| Название | Генотип/Конструирование | Источник |
|------------------------------------|---|---------------|
| Штаммы | | |
| M2 | P_{CMV} - <i>LpentLDH ADH1::P_{ADH1}</i> - <i>LpentLDH P_{Hsp9}</i> - <i>LaciLDH-URA4</i> | БРЦ ВКПМ* |
| M2 <i>LplaLDH-1</i> | M2 <i>PDC1::P_{ADH1}</i> - <i>LplaLDH KanMX^R</i> | Данная работа |
| M2 <i>LplaLDH-2</i> | | |
| M2Δ <i>nde1</i> | M2Δ <i>nde1</i> | Данная работа |
| M2Δ <i>nde1-LplaLDH-1</i> | M2Δ <i>nde1PDC1::P_{ADH1}</i> - <i>LplaLDH KanMX^R</i> | Данная работа |
| M2Δ <i>nde1-LplaLDH-2</i> | | |
| Плазмиды | | |
| pd <i>NDE1-KanMX-lox</i> , 5167 пн | На основе pBluescriptII ks+, <i>KanMX</i> с lox сайтами на флангах, часть гена <i>NDE1</i> (560 пн) с сайтом <i>BpiI</i> | Данная работа |
| p <i>PDC1-LplaLDH</i> , 7515 пн | На основе pBluescriptII ks+, <i>KanMX</i> с lox сайтами на флангах, ген <i>LplaLDH</i> под контролем промотора <i>P_{ADH1}</i> и терминатора TбGH, фрагмент ДНК с промотором гена <i>PDC1</i> (788 пн) с сайтом <i>SmaI</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.

ДНК из агарозы использовали наборы Plasmid Miniprep и Cleanup Mini (“Евроген”). Правильность сборки всех конструкций проверена секвенированием.

При конструировании штаммов *S. pombe* использовали общепринятые генно-инженерные подходы. Приготовление компетентных клеток дрожжей *S. pombe* и электропорацию проводили по стандартной методике [13].

Для селективного отбора трансформантов, устойчивых к генетицину, в среду YES добавляли 50 мкг/мл генетицина (G418; Gibco, США). Удаление гена *KanMX*, фланкированного сайтами lox71/66, проводили за счет индукции рекомбинации по lox-сайтам [14] в присутствии вспомогательной плазмиды p407-nmt-cre (БРЦ ВКПМ, НИЦ “Курчатовский институт”), содержащей ген cre рекомбиназы под контролем промотора Pnmt1 и ген *Hph*, обеспечивающий клеткам дрожжей устойчивость к гигромицину (Calbiochem, США), содержащемуся в среде YES в количестве 50 мкг/мл.

Общую ДНК из дрожжей *S. pombe* выделяли при помощи набора реагентов Проба-Экспресс (“Синтол”, Россия). Наличие вводимых модификаций в штаммах, использованных в работе, подтверждено методом ПЦР.

Культивирование штаммов-производителей МК в колбах в аэробных условиях

Посевную культуру растили в 10 мл жидкой среды YPD при 30°C и 250 об./мин в течение 24 ч. Посевным материалом засевали 50 мл ферментационной среды (ФС) в колбах на 0.75 л до стартового значения оптической плотности при длине волны 600 нм (OD₆₀₀) равной 0.5. Состав среды ФС (мас. %): КН₂РО₄ – 0.57, кукурузный экстракт – 4.0, глюкоза – 20.0. В колбы добавляли мел (СаСО₃) в количестве 12 г/л. Колбы инкубировали при 30°C и 250 об./мин. в течение 75 ч в шейкере-инкубаторе Innova 44 (New Brunswick, Германия). Образцы отбирали в нулевой точке и (в соответствии с ростом культуры) на 22, 29, 46, 53, 70, 75 час культивирования, анализировали OD₆₀₀. Центрифугировали при 11 500 g в течение 3 мин (MiniSpin Plus, Eppendorf, Германия), в супернатанте определяли pH и содержание органических кислот, остаточной глюкозы, глицерина и этанола.

Поскольку штаммы M2Δ*nde1-LplaLDH-1*(2) из среды ФС потребляли всю глюкозу к 46 ч, то ее дополнительно вносили на установленные экспериментальным путем 31, 49 и 55 час культивирования. Перед внесением глюкозы ее концентрацию в образцах определяли с помощью системы измерения уровня глюкозы/лактата BIOSEN C-Line (мо-

дель Clinic/GP+, EKF-diagnostic GmbH, Германия), используя ферментные чип-сенсоры глюкозы.

Культивирование штаммов с ограниченной начальной концентрацией глюкозы проводили в среде ФС, содержащей 3% глюкозы. Колбы инкубировали при 30°C и 250 об./мин. Дополнительно вносили глюкозу на 21, 29 и 46 час культивирования. Образцы отбирали в нулевой точке и на 21, 29, 46, 51, 72 час культивирования. В образцах анализировали OD₆₀₀, а в супернатанте определяли pH и содержание органических кислот, остаточной глюкозы, глицерина и этанола.

Все эксперименты проведены в трех повторностях.

Аналитические методы

OD₆₀₀ измеряли на спектрофотометре UV mini 1240 (Shimadzu, Япония) в образцах, предварительно разбавленных 1M раствором HCl, чтобы избавиться от остатков CaCO₃, и значения OD₆₀₀ рассчитывали с учетом разведения.

Для измерения pH использовали pH-метр F20-Standard (Mettler Toledo, Швейцария).

Концентрацию МК, глюкозы и глицерина определяли методом ВЭЖХ на хроматографе Alliance Separations Module Waters 2695 (Waters, США). Для тестирования МК использовали колонку YMC Pack Pro C18, 250 × 4.6 мл (YMC-Triart, Япония), хроматографию проводили при 30°C и скорости потока 1.5 мл/мин, элюентом служил 0.1%-ный водный раствор H₃PO₄, ультрафиолетовый детектор – диодная матрица, длина волны – 220 нм. Для определения глюкозы и глицерина в образцах использовали колонку YMC-Pack Polyamine II (YMC, Япония) и рефрактометрический детектор Waters 2414 с. Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения Empower Pro Software (Waters).

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение штаммов *S. pombe* – продуцентов молочной кислоты

Для проведения исследования в качестве родительского штамма был взят сконструированный нами на основе кислотоустойчивого штамма *S. pombe* штамм *S. pombe* M2. Данный штамм является продуцентом МК, в геноме которого содержится три копии чужеродных генов *L-LDH*, коди-

рующие *L*-лактатдегидрогеназы с высокой удельной активностью:

- ген *L-LDH* из *Lactiplantibacillus pentosus pentosus* под контролем раннего сильного промотора цитомегаловируса (*P_{CMV}*),
- ген *L-LDH* из *Lactiplantibacillus pentosus pentosus*, встроенный в локус *ADH1* под промотор *P_{ADH1}* с удалением структурной части гена *ADH1*,
- и кассета с геном *URA4* и геном *L-LDH* из *L. acidophilus* под контролем позднего промотора *P_{Hsp9-}*.

В результате интеграции плазмиды *pdNDE1-KanMX-lox* в структурную часть гена *NDE1* в геноме штамма M2 и последующего выщепления гена *KanMX* по *lox* сайтам был получен штамм M2Δ*nde1*. Далее в промоторный регион гена *PDC1* штаммов M2 и M2Δ*nde1* была интегрирована плаزمида *pPDC1-LplaLDH* и отобрано по два независимых изогенных штамма, соответственно: M2*LplaLDH*-1, M2*LplaLDH*-2 (далее M2*LplaLDH*-1(2)) и M2Δ*nde1-LplaLDH*-1, M2Δ*nde1-LplaLDH*-2 (далее M2Δ*nde1-LplaLDH*-1(2)). Вышеперечисленные штаммы содержат четвертую копию гена *L-LDH* из *L. plantarum* под контролем промотора гена *ADH1* из дрожжей *S. pombe* и отличаются между собой только наличием или отсутствием гена *NDE1* на одинаковом генетическом фоне.

При создании продуцентов МК основной подход метаболической инженерии заключается в усилении пути превращения пирувата в лактат путем увеличения копийности гетерологичных генов *L-LDH* и ослабления или удаления (где это возможно) конкурирующих метаболических путей, ведущих к накоплению побочных продуктов. Дрожжи *S. pombe* относятся к Crabtree-позитивным, и у них в экспоненциальной фазе роста в условиях аэрации до 50% глюкозы расходуется на продукцию этанола (ферментативный путь) [15], который образуется по пути пируват → ацетальдегид → этанол.

Конверсию пирувата в ацетальдегид осуществляют пируватдекарбоксилазы (EC 4.1.1.1), кодируемые генами *PDC*, согласно базе PomBase: *PDC1* (SPAC13A11.06), *PDC2* (SPAC1F8.07c), *PDC3* (SPAC186.09) и *PDC4* (SPAC3G9.11c). В превращении ацетальдегида в этанол задействованы алкогольдегидрогеназы (EC 1.1.1.1), кодируемые генами *ADH*, согласно PomBase: *ADH1* (SPCC13B11.01), *ADH4* (SPAC5H10.06c), SPBC1773.06c и SPAC13F5.03c. Фермент Adh1p является основным изоэнзимом ферментативного пути образования этанола. В штаммах *S. pombe* с *Δadh1* алкогольдегидрогеназная активность снижена на 10%, т. к. этанол образуется за счет усиления экспрессии гена *ADH4* [16]. На основе этих сведений в сконструированный нами ранее штамм M2 была интегрирована дополнительная копия генов *L-LDH* в локус *ADH1*.

Роль генов *PDC* дрожжей *S. pombe* малоизучена. Ранее нами было показано, что делеция гена *PDC1* не влияет на ростовые характеристики этих дрожжей, и на ее фоне биосинтез МК усиливается при введении дополнительных копий генов *L-LDH* в противовес влиянию делеции гена *PDC2* на эти характеристики [5]. Исходя из полученных данных, в штаммах *M2LplaLDH-1(2)* и *M2 Δ nde1-LplaLDH-1(2)* дополнительные копии генов *L-LDH* были интегрированы в локус *PDC1*.

Реакции биосинтеза лактата, этанола и глицерина связаны с окислением цитозольного NADH до NAD⁺, регенерация которого происходит в NAD⁺-зависимых реакциях. Сохранение NADH/NAD⁺ баланса имеет важное значение для роста биомассы и метаболической активности дрожжей. В штаммах-продуцентах МК, содержащих высокоактивные *LDH*, потребность в цитоплазматическом NADH может быть выше из-за значительно усиления пути биосинтеза лактата из пирувата. В дрожжах *S. pombe* NADH-дегидрогеназа Nde1p (EC 1.6.5.9) предположительно окисляет цитозольный NADH до NAD⁺. В таком случае, делеция гена *NDE1* должна сместить редокс-баланс в сторону увеличения доли NADH. Чтобы изучить, как эта модификация повлияет на ростовые свойства и метаболические пути биосинтеза лактата, этанола и глицерина, нами были получены штаммы *S. pombe* – продуценты МК с инактивированным геном *NDE1* (табл. 1).

Влияние делеции гена *NDE1* на синтез МК, рост и потребление глюкозы

Штаммы *M2*, *M2 Δ nde1*, *M2LplaLDH-1(2)* и *M2 Δ nde1-LplaLDH-1(2)* культивировали аэробно в ФС среде с 20%-ной глюкозой в колбах в течение 70 ч и определяли содержание МК в супернатанте образцов (рис. 2). Для двух независимо отобранных штаммов *M2LplaLDH-1(2)*, содержащих ген *NDE1*, а также *M2 Δ nde1-LplaLDH-1(2)*, с делецией *Δ nde1*, приведены средние значения продукции МК, полученные при культивировании.

Nde1+ штаммы *M2* и *M2LplaLDH-1(2)* с дополнительной копией гетерологичного гена *L-LDH* из *L. plantarum* продуцировали сравнимые количества МК (в среднем 107 г/л за 70 ч) и увеличение копийности генов *L-LDH* не привело к повышению биосинтеза МК.

Введение делеции гена *NDE1* в штамм *M2* (штамм *M2 Δ nde1*) способствовало снижению биосинтеза МК и после 46 ч культивирования наблюдалось постепенное падение содержания МК в супернатанте. Однако, увеличение копийности генов *L-LDH* в штамме с *Δ nde1* приводит к повышению биосинтеза МК. Так, в супернатанте штаммов *M2 Δ nde1-LplaLDH-1(2)* содержание МК на 34% вы-

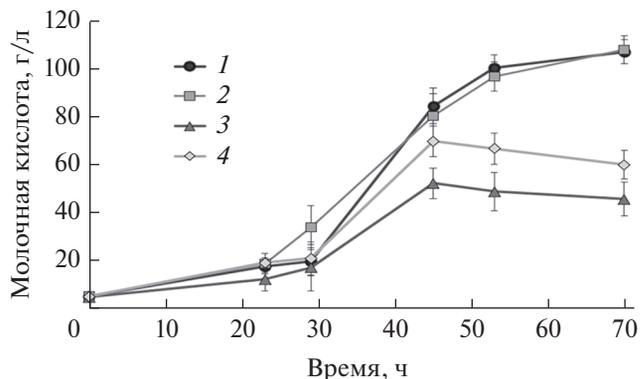


Рис. 2. Биосинтез молочной кислоты (МК) штаммами-продуцентами *S. pombe*: *M2* (1), *M2LplaLDH-1(2)* (2), *M2 Δ nde1* (3) и *M2 Δ nde1-LplaLDH-1(2)* (4) при культивировании в колбах.

Fig. 2. Biosynthesis of lactic acid by strains *S. pombe*: *M2* (1), *M2LplaLDH-1(2)* (2), *M2 Δ nde1* (3) and *M2 Δ nde1-LplaLDH-1(2)* (4) during cultivation in flasks.

ше на 46 час культивирования, чем у штамма *M2 Δ nde1*.

Подобные результаты были получены на штаммах *S. cerevisiae* – продуцентах МК. В статье [12] показано, что если в штамм *S. cerevisiae* SP2, содержащий 3 гетерологичных гена *L-LDH*, ввести дополнительную копию гена *L-LDH*, то биосинтез МК не меняется, а инактивация гена *NDE1* приводит к снижению биосинтеза МК на 24% при культивировании в полной среде в микроаэрофильных условиях. Также авторами было установлено, что биосинтез МК в штаммах с делецией генов *NDE1/NDE2* можно повысить за счет увеличения копийности генов *L-LDH*.

Мы предположили, что снижение биосинтеза МК в штаммах с делецией *NDE1* может быть связано с недостатком источника углерода. Для проверки этой гипотезы штаммы *M2-LplaLDH-1(2)* и *M2 Δ nde1-LplaLDH-1(2)* культивировали в колбах в ФС среде при 30°C и 250 об./мин. в течение 75 ч и анализировали динамику роста и потребления глюкозы (рис. 3).

Согласно полученным результатам, инактивация гена *NDE1*, предположительно связанная с изменением цитоплазматического NADH/NAD⁺ баланса, оказывает значительное влияние на ростовые свойства. Штаммы *M2 Δ nde1-LplaLDH-1(2)* потребовали всю глюкозу в ФС среде через 46 ч, и за это время OD₆₀₀ культуры достигла значения 24.7. Для штаммов *Nde1+* в этой временной точке значение OD₆₀₀ было 14.6, и осталась неutilizированная глюкоза в количестве 75 г/л. К 46 часу штаммы достигали стационарной фазы роста. Таким образом, введение делеции гена *NDE1* в генотип штаммов

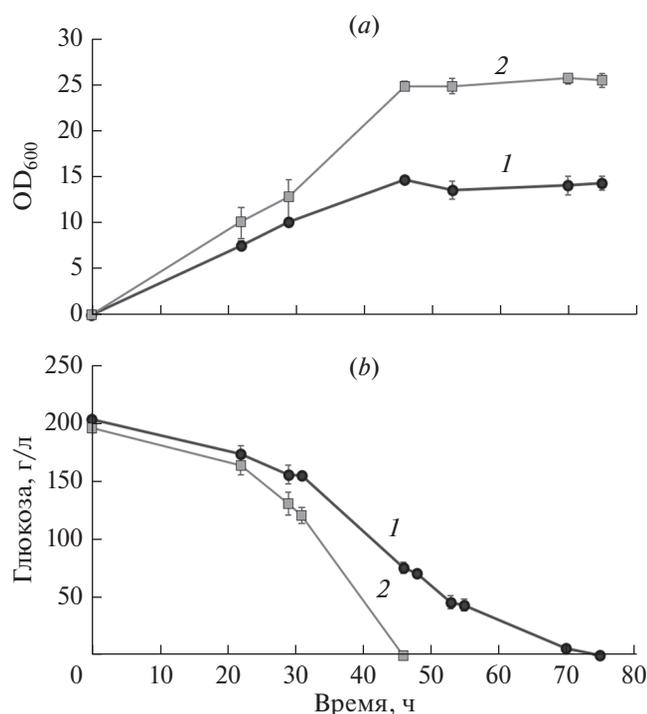


Рис. 3. Влияние гена *NDE1* на оптическую плотность (OD₆₀₀) культуры и потребление глюкозы штаммами *S. pombe*: *a* – динамика роста штаммов M2-*LplaLDH*-1(2) (1), M2Δ*nde1*-*LplaLDH*-1(2) (2), *b* – концентрация глюкозы при культивировании в колбах.

Fig. 3. The effect of *NDE1* gene deletion on optical density (OD₆₀₀) and utilization of glucose by strains *S. pombe*: *a* – growth kinetics of strains M2-*LplaLDH*-1(2) (1), M2Δ*nde1*-*LplaLDH*-1(2) (2), *b* – glucose concentration during cultivation in flasks.

S. pombe, продуцирующих МК, значительно улучшает рост штаммов и потребление ими глюкозы.

Известно, что масштабные генетические модификации генома хозяина могут приводить к ухудшению роста рекомбинантного продуцента [17]. Так, штаммы с высокой продукцией МК обычно имеют пониженный уровень биомассы, поскольку МК токсична для клеток, а кроме того часть энергии расходуется на экспорт лактата, который предположительно является АТФ-зависимым процессом [18, 19]. На дрожжах *S. cerevisiae* данная проблема была решена путем изменения редокс-баланса. Так, сконструированный в работе [12] штамм *S. cerevisiae* SP7 – продуцент МК, содержащий *Δnde1 Δnde2* и 5 копий генов *L-LDH*, интегрированных в локус *PDC1, CYB2, GPD1, TRP1, NDE2*, при культивировании в ферментере в анаэробных условиях в полной среде продуцировал 117 г/л L-МК и около 33 г/л этанола и при таких характеристиках демонстрировал хороший рост. Также показано, что избыток цитозольного NADH при-

водит к увеличению скорости роста культуры и связан с образованием биомассы [19].

Характеристика штаммов *S. pombe* – продуцентов МК в условиях ферментации с добавочной глюкозой

В штаммах с *Δnde1* биосинтез МК прекращается из-за недостатка глюкозы, поэтому при культивировании штаммов M2Δ*nde1*-*LplaLDH*-1(2) в ФС среде с начальной концентрацией глюкозы 20% по мере ее потребления глюкозу вносили дополнительно. Сравнительная характеристика штаммов M2-*LplaLDH*-1(2) и M2Δ*nde1*-*LplaLDH*-1(2) в этих условиях культивирования в колбах представлена на рис. 4.

При культивировании с внесением дополнительной глюкозы, как и без ее добавления, штаммы M2Δ*nde1*-*LplaLDH*-1(2) переходят в стационарную фазу роста при значении OD₆₀₀ равном 24.5 (рис. 3а). Среднее содержание МК в штаммах с *Δnde1* и *Nde1+* на 75 час культивирования составляет 139 и 108 г/л, соответственно. В штаммах с *Δnde1* активный биосинтез МК запускается только после 29 ч культивирования и продолжается в стационарной фазе роста. К окончанию культивирования штаммов с *Δnde1* накапливается значительное количество этанола (55 г/л) и глицерина (7.4 г/л), в то время как в штаммах *Nde1+* содержание этих спиртов составляет 10 и 3.8 г/л, соответственно. Во всех штаммах этанол синтезируется преимущественно во время логарифмической фазы роста (до 46 часа), а глицерин начинает синтезироваться одновременно с активным биосинтезом МК (после 29 часа).

Таким образом, инактивация гена *NDE1* в штаммах *S. pombe* – продуцентах МК привела не только к улучшению их роста, но и увеличению биосинтеза МК (на 28%), также значительно выросло содержание побочных продуктов – этанола (в 5.5 раз) и глицерина (в 2 раза).

При высокой концентрации глюкозы цитозольный редокс-баланс в значительной степени поддерживается за счет образования этанола и глицерина [20, 21]. Их накопление вызывает выработку NAD⁺, который играет важную роль в противодействии негативному воздействию различных стрессовых факторов на клетки [22, 23]. На дрожжах *S. cerevisiae* – продуценте МК показано, что при наличии гетерологичных генов *L-LDH* запускается новый, альтернативный путь образования NAD⁺ в реакции превращения пирувата в лактат, что приводит к одновременному образованию этанола и МК [24]. Путь биосинтеза МК становится конкурентным пути биосинтеза этанола, и в этом случае полное отключение последнего привело

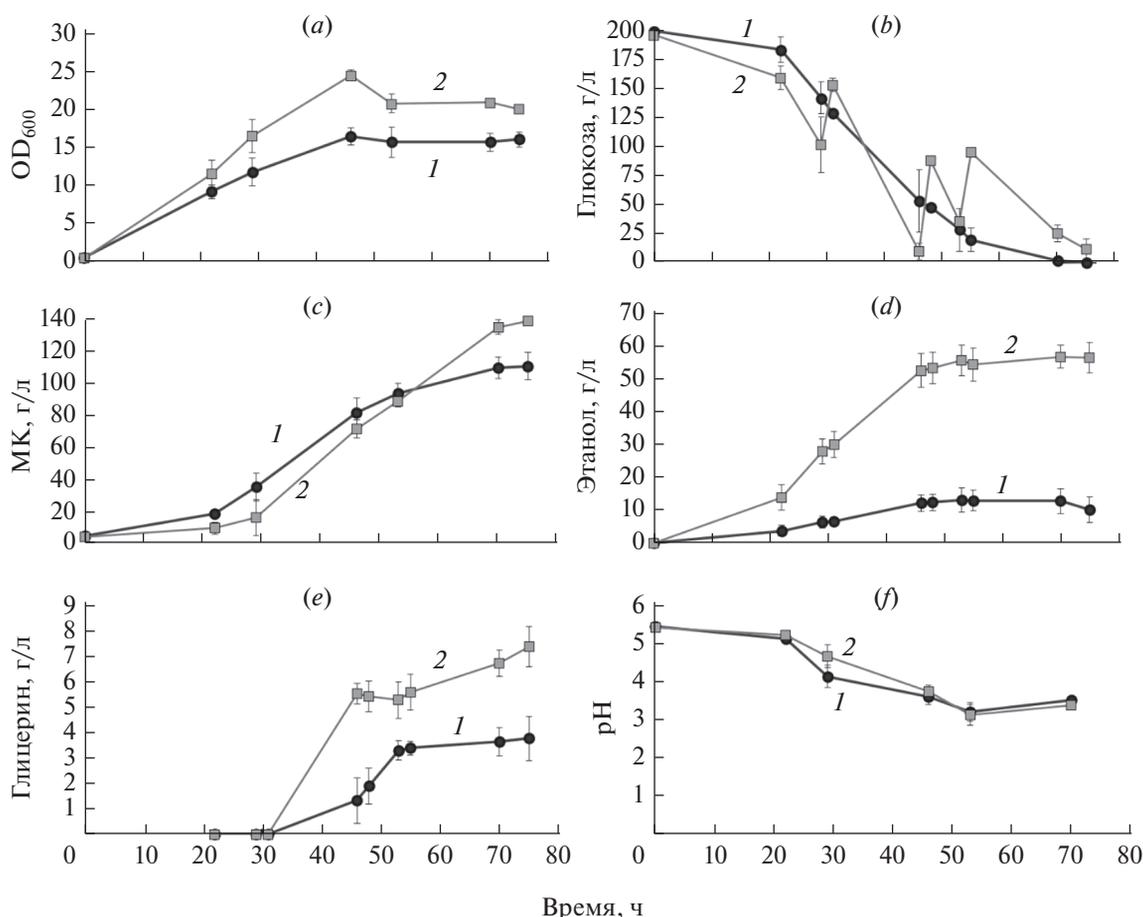


Рис. 4. Влияние делеции гена *NDE1* на свойства штаммов *S. pombe* в динамике: *a* – рост штаммов *M2-LplaLDH*-1(2) (1); *M2Δnde1-LplaLDH*-1(2) (2); *b* – концентрация глюкозы; *c* – биосинтез молочной кислоты; *d* – биосинтез этанола; *e* – биосинтез глицерина; *f* – pH супернатанта при культивировании в колбах.

Fig. 4. The effect of *NDE1* gene deletion on characteristics of strains *S. pombe* in dynamics: *a* – growth kinetics of strains *M2-LplaLDH*-1(2) (1), *M2Δnde1-LplaLDH*-1(2) (2); *b* – glucose concentration; *c* – biosynthesis of lactic acid; *d* – biosynthesis of ethanol; *e* – biosynthesis of glycerin; *f* – pH of the supernatant during cultivation in flasks.

бы к значительному увеличению конверсии глюкозы в конечный продукт.

В дрожжах *S. pombe* алкогольдегидрогеназы, кодируемые генами *ADH1* и *ADH4*, продуцируют практически весь этанол из ферментируемых источников углерода, но штамм *Δadh1Δadh4* обладает плохими ростовыми характеристиками – скорость роста и количество биомассы снижены примерно в 5 раз [16], что неприемлемо при создании промышленных штаммов-продуцентов МК.

Генно-инженерный штамм *S. cerevisiae* S177, в котором отсутствуют 6 NADH-зависимых алкогольдегидрогеназ, не продуцирует этанол, а окисление NADH осуществляется за счет усиленного биосинтеза глицерина в условиях хемостата с низким кислородом [25]. Полученный на основе *S. cerevisiae* S177 штамм *S. cerevisiae* S252 с инак-

тивированными генами *PDC1* и генами *GPD1* и *GPD2*, ответственными за биосинтез глицерина, и содержащий ген *L-LDH* человека, способен продуцировать незначительное количество МК (1.75 г/л), в анаэробных условиях с максимальной, теоретически возможной конверсией, т.к. из-за неспособности образования биомассы, этанола и глицерина вся глюкоза (только при низких концентрациях) может конвертироваться в МК [26]. Таким образом, чтобы использовать штамм *S. cerevisiae* S252 в качестве продуцента МК, необходимо улучшить его рост, потребление субстрата, устойчивость к стрессу (например, к высокому содержанию сахара).

Безэтанольные штаммы-продуценты МК с высоким выходом лактата (заявленный выход 0.85 г/г) получены на Crabtree негативных дрожжах *Kluyveromyces lactis*, не обладающих активностью Pdc и/или Pdh [27].

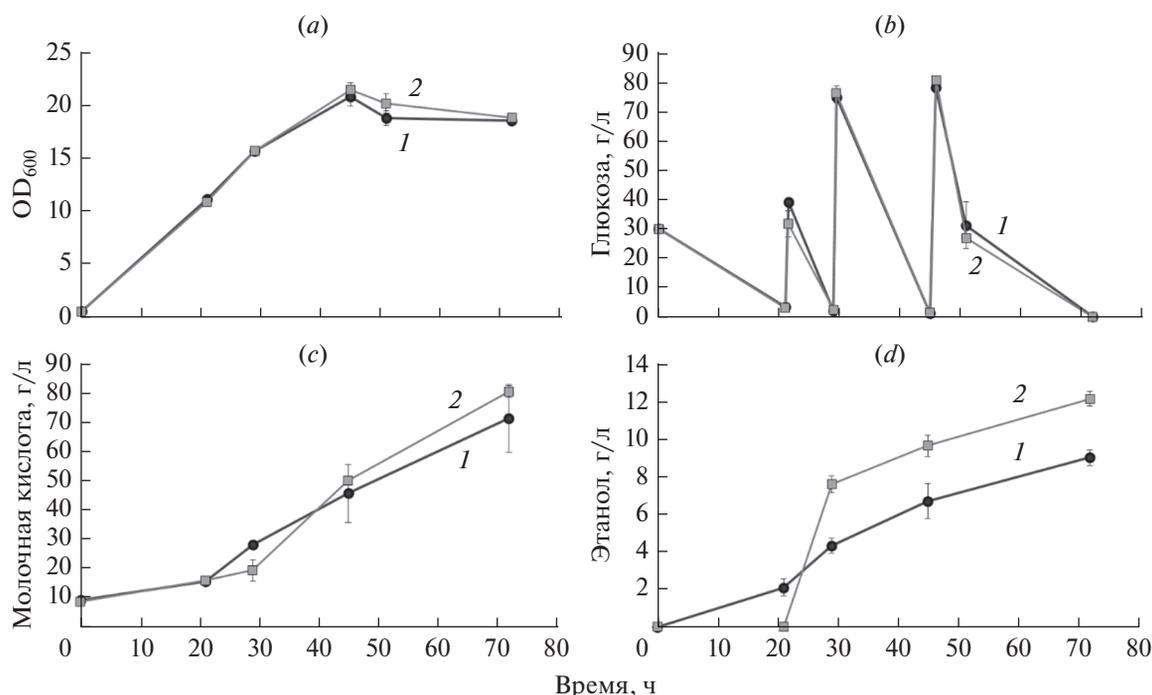


Рис. 5. Сравнение *Nde1+* и *Nde1-* штаммов *S. pombe* – продуцентов МК: а – динамика роста штаммов M2-*LplaLDH*-1(2) (1); M2Δ*nde1*-*LplaLDH*-1(2) (2); б – концентрация глюкозы; в – биосинтез молочной кислоты; д – биосинтез этанола при культивировании в колбах.

Fig. 5. Comparing of *Nde1+* and *Nde1-* strains *S. pombe*: а – growth kinetics of strains M2-*LplaLDH*-1(2) (1), M2Δ*nde1*-*LplaLDH*-1(2) (2); б – glucose concentration; в – biosynthesis of lactic acid; д – biosynthesis of ethanol during cultivation in flasks.

Характеристика штаммов *S. pombe* – продуцентов МК в условиях ферментации с низкой начальной концентрацией глюкозы

Одним из способов снижения биосинтеза побочных продуктов может быть ограничение ферментируемого источника углерода (глюкозы) в среде культивирования.

Штаммы *S. pombe* M2-*LplaLDH*-1(2) и M2Δ*nde1*-*LplaLDH*-1(2) культивировали в ФС среде с низкой начальной концентрацией глюкозы (3%) в колбах (рис. 5).

В данных условиях культивирования *Nde+* и *Nde-* штаммы сравнимы по росту и потреблению глюкозы, глицерин в культуральной среде не тестируется. Штаммы M2Δ*nde1*-*LplaLDH*-1(2) в среднем продуцируют 80 г/л МК и 12 г/л этанола, причем биосинтез этанола начинается только после внесения дополнительной глюкозы после 21 часа. Штаммы M2-*LplaLDH*-1(2) продуцируют 71 г/л МК и 9 г/л этанола.

В ФС среде при низком содержании глюкозы она расходуется преимущественно на рост биомассы. Активный биосинтез МК и этанола начинается после внесения дополнительной глюкозы. В этих условиях различия между *Nde1+* и *Nde1-* штаммами *S. pombe* менее существенны, чем на-

блюдались при культивировании с высокой начальной концентрацией глюкозы.

Редокс-баланс клетки строго регулируется. Как было показано на дрожжах *S. cerevisiae*, в сохранении цитозольного редокс-баланса во время аэробного роста задействованы две системы: NADH-дегидрогеназы (*Nde1p*/*Nde2p*) и глицерол-3-фосфатный челнок [9, 28], которые работают по-разному в различных условиях. Так, при высокой концентрации глюкозы в среде глицерол-3-фосфатный челнок не работает из-за глюкозной репрессии одного из составляющих системы, *Gut2p*, и в таких условиях восстановление баланса NADH/NAD⁺ достигается работой NADH-дегидрогеназ и метаболических путей образования этанола и глицерина [29]. Напротив, во время аэробного роста при низких концентрациях глюкозы внешняя НАД-дегидрогеназа и глицерол-3-фосфатный челнок действуют одновременно [30, 31].

По аналогии с дрожжами *S. cerevisiae* можно предположить, что в *Nde-* штаммах *S. pombe* M2Δ*nde1*-*LplaLDH*-1(2) в условиях культивирования с высоким содержанием глюкозы обе системы сохранения редокс-баланса не работают и излишки NADH распределяются между путями биосинтеза лактата, этанола и глицерина, конечные продукты которых образуются в соотношении

18.8 : 7.4 : 1. В *Nde1+* штаммах лактат, этанол и глицерин синтезируются в соотношении 28.4 : 2.6 : 1.

При низком содержании глюкозы в среде глицерол-3-фосфатный челнок функционирует, поэтому различия между *Nde1-* и *Nde1+* штаммами *S. pombe* менее выражены: так лактат, этанол и глицерин синтезируется в соотношении 6.7 : 1 : 0 в штаммах с $\Delta nde1$ и 7.9 : 1 : 0 в *Nde1+* штаммах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, штаммы *S. pombe* M2 $\Delta nde1$ -*LplaLDH-1(2)* при аэробном культивировании в колбах в среде с кукурузным экстрактом и высокой концентрацией глюкозы (20%) продуцируют 139 г/л МК (конечный pH 3.2), 60 г/л этанола и 7.8 г/л глицерина, а при низкой начальной концентрации глюкозы – 80 г/л МК (конечный pH 3.4), 12 г/л этанола и глицерин отсутствует. Штаммы *S. pombe* с $\Delta nde1$ имеют преимущество в росте, потреблении глюкозы и накапливают больше биомассы по сравнению со штаммами *Nde1-*. Недостатком $\Delta nde1$ штаммов – продуцентов МК является высокий титр этанола. В *Scabtree* позитивных штаммах полное выключение генов пути биосинтеза этанола не эффективно при создании штаммов-продуцентов, т.к. это приводит к значительному ухудшению ростовых свойств. Возможно, введение пятой копии гена *L-LDH* может незначительно повысить выход МК и снизить титр этанола. Однако, как показано на дрожжах *S. cerevisiae* – продуцентах МК увеличение от трех до пяти копий гена *L-LDH* обеспечивает только незначительный прирост МК. Это указывает на то, что количество фермента не является сдерживающим фактором в биопроцессе производства МК [2]. Одним из ограничивающих факторов может быть недостаток NADH, который необходим в реакциях биосинтеза лактата, этанола и глицерина. Доля этого кофермента должна увеличиться в штаммах *S. pombe* с делецией гена *NDE1* по аналогии с дрожжами *S. cerevisiae* с делецией генов *NDE1/NDE2* [12].

Штаммы *S. pombe* M2 $\Delta nde1$ -*LplaLDH-1(2)* продуцируют на 28 и на 12% больше МК, чем штаммы M2-*LplaLDH-1(2)*, соответственно, в условиях культивирования с высокой и низкой начальной концентрацией глюкозы. Из полученных нами данных следует, что при оптимизации условий культивирования штаммов *S. pombe* с делецией гена *NDE1* путем строгого контроля подачи глюкозы можно увеличить выход МК и снизить содержание этанола.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gao C., Ma C., Xu P. Biotechnological Routes Based on Lactic Acid Production from Biomass. *Biotechnol. Adv.*, 2011, 29, 930–939. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.07.022>
2. Melo N.T.M., de Oliveira Junqueira A.C., Lima L.F., de Oliveira K.B.S., dos Reis M.C.G., Franco O.L., Paes H.C. Just around the Corner: Advances in the Optimization of Yeasts and Filamentous Fungi for Lactic Acid Production. *J. Fungi.*, 2024, 10, 207. <https://doi.org/10.3390/jof10030207>
3. 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(11), 928. <https://doi.org/10.3390/jof7110928>
4. Park H.J., Bae J., Ko H., Lee S., Sung B.H., Han J., Sohn J. Low-pH Production of D-Lactic Acid Using Newly Isolated Acid Tolerant Yeast *Pichia kudriavzevii* NG7. *Biotech. Bioeng.*, 2018, 115, 2232–2242. <https://doi.org/10.1002/bit.26745>
5. Анисимова Е.О., Тарутина М.Г., Синеокий С.П. Метаболическая инженерия кислотоустойчивого штамма *Schizosaccharomyces pombe* для разработки рекомбинантного промышленного продуцента L-молочной кислоты. *Биотехнология*, 2023, 39(4), 1–10. <https://doi.org/10.56304/S0234275823040026>
6. Синеокий С.П., Вустин М.М., Юзбашев Т.В., Рыбаков Ю.А., Райнина Е.И., Токарева Н.Г., Великая М.А., Агранович А.М., Дебабов В.Г. Способ микробиологического синтеза молочной кислоты и рекомбинантный штамм дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* для его осуществления. Патент RU 2268304 С1, опубл. 20.01.2006, бюлл. № 9.
7. Анисимова Е.О., Шутков 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 RU 2752896 С1, опубл. 11.08.2021, бюлл. № 23.
8. Flores C.-L., Rodriguez C., Petit T., Gancedo C. Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microb. Rev.*, 2000, 24(4), 507–529. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00553.x>
9. Luttik M.A.H., Overkamp K.M., Kotter P., de Vries S., van Dijken J.P., Pronk J.T. The *Saccharomyces cerevisiae* *NDE1* and *NDE2* genes encode separate mitochondrial NADH dehydrogenases catalyzing the oxidation of cytosolic NADH. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, 24529–24534. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.38.24529>
10. Vemuri G.N., Eiteman M.A., McEwen J.E., Olsson L., Nielsen J. Increasing NADH oxidation reduces overflow metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS*,

- 2007, 104(7), 2402–2407.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0607469104>
11. Medina V.G., Almering M.J.H., van Maris A.J.A., Pronk J.T. Elimination of Glycerol Production in Anaerobic Cultures of a *Saccharomyces cerevisiae* Strain Engineered To Use Acetic Acid as an Electron Acceptor. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2010, 76(1), 190–195.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01772-09>
 12. 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>
 13. Sabatinos 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)
 14. 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>
 15. 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>
 16. Sakurai M., Tohda H., Kumagai H., Giga-Hama Y. A distinct type of alcohol dehydrogenase, adh4_b, complements ethanol fermentation in an adh1-deficient strain of *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Yeast Res.*, 2004, 4, 649–654.
<https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2003.12.009>
 17. Pangestu R., Kahar P., Kholida L.N., Perwitasari U., Thontowi A., Fahrurrozi, Lisdiyanti P., Yopi, Ogino C., Prasetya B., Kondo A. Harnessing originally robust yeast for rapid lactic acid bioproduction without detoxification and neutralization. *Sci. Rep.*, 2022, 12, 13645.
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-17737-4>
 18. van Maris A.J., Winkler A.A., Porro D., van Dijken J.P., Pronk J.T. Homofermentative lactate production cannot sustain anaerobic growth of engineered *Saccharomyces cerevisiae*: possible consequence of energy-dependent lactate export. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, 70(5), 2898–2905.
<https://doi.org/10.1128/AEM.70.5.2898-2905.2004>
 19. Branduardi P., Sauer M., De Gioia L., Zampella G., Valli M., Mattanovich D., Porro D. Lactate production yield from engineered yeasts is dependent from the host background, the lactate dehydrogenase source and the lactate export. *Microb. Cell Fact.*, 2006, 5(4).
<https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-4>
 20. Van Dijken J.P., Scheffers W.A. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1986, 32, 199–224.
[https://doi.org/10.1016/0378-1097\(86\)90291-0](https://doi.org/10.1016/0378-1097(86)90291-0)
 21. Fiechter A., Fuhrmann G.F., Kappeli O. Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. *Adv. Microb. Physi-ol.*, 1981, 22, 123–183.
[https://doi.org/10.1016/s0065-2911\(08\)60327-6](https://doi.org/10.1016/s0065-2911(08)60327-6)
 22. Kato M., Lin S.-J. Regulation of NAD⁺ metabolism, signaling and compartmentalization in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst.)*, 2014, 23, 49–58.
<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.07.009>
 23. Massudi H., Grant R., Guillemain G.J., Braidy N. NAD⁺ metabolism and oxidative stress: The golden nucleotide on a crown of thorns. *Redox Rep.*, 2012. doi: 00212Y.0000000001
<https://doi.org/10.1179/13510>
 24. Porro D., Brambilla L., Ranzi B.M., Martegani E., Alberghina L. Development of metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* cells for the production of lactic acid. *Biotechnol. Prog.*, 1995, 11(3), 294–298.
<https://doi.org/10.1021/bp00033a009>
 25. Ida Y., Furusawa C., Hirasawa T., Shimizu H. Stable disruption of ethanol production by deletion of the genes encoding alcohol dehydrogenase isozymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.*, 2012, 113, 192–195.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.09.019>
 26. Ida Y., Hirasawa T., Furusawa C., Shimizu H. Utilization of *Saccharomyces cerevisiae* recombinant strain incapable of both ethanol and glycerol biosynthesis for anaerobic bioproduction. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2013, 97, 4811–4819.
<https://doi.org/10.1007/s00253-013-4760-x>
 27. Bianchi M.M., Brambilla L., Protani F., Liu C.L., Lievense J., Porro D. Efficient homolactic fermentation by *Kluyveromyces lactis* strains defective in pyruvate utilization and transformed with the heterologous LDH gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, 67(12), 5621–5625.
<https://doi.org/10.1128/AEM.67.12.5621-5625.2001>
 28. Larsson C., Pahlman I.L., Ansell R., Rigoulet M., Adler L., Gustafsson L. The importance of the glycerol-3-phosphate shuttle during aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 1998, 14, 347–357.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19980315\)14:4<347::AID-YEA226>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19980315)14:4<347::AID-YEA226>3.0.CO;2-9)
 29. Rigoulet M., Aguilaniu H., Averet N., Bunoust O., Camougrand N., Grandier-Vazeille X., Larsson C., Pahlman I.-L., Manon S., Gustafsson L. Organization and regulation of the cytosolic NADH metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biochem.*, 2004, 256/257, 73–81.
<https://doi.org/10.1023/b:mcbi.0000009888.79484.fd>
 30. Pahlman I.L., Gustafsson L., Rigoulet M., Larsson C. Cytosolic redox metabolism in aerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 2001, 18, 611–620.
<https://doi.org/10.1002/yea.709>
 31. Overkamp K.M., Bakker B.M., Kötter P., van Tuijl A., de Vries S., van Dijken J.P., Pronk J.T. In vivo analysis of the mechanisms for oxidation of cytosolic NADH by *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *J. Bacteriol.*, 2000, 182, 2823–2830.
<https://doi.org/10.1128/JB.182.10.2823-2830.2000>

The Effect of Deletion of *NDE1* Gene on Properties of *Schizosaccharomyces pombe* Yeast Producing *L*-Lactic Acid

E. O. Anisimova^{a, b, #}, D. D. Bocharov^c, S. P. Sineoky^a, and M. G. Tarutina^{a, b}

^a*NRC “Kurchatov Institute”, Moscow, 123182 Russia*

^b*NRC “Kurchatov Institute”, Kurchatov Genomic Center, Moscow, 123182 Russia*

^c*Student, FGBOU VO “ROSBIOTECH”, Moscow, 125080 Russia*

[#]*e-mail: ekaterina.genetika@gmail.com*

Abstract—Based on acidophilic strain *Schizosaccharomyces pombe* *L*-lactic acid producing strains with deletion of the *NDE1* gene encoding NADH dehydrogenase, presumably regulating the cytosolic NADH/NAD⁺ balance in yeast, were constructed. When the genome of previously obtained producer strains is saturated with heterologous *L-LDH* genes encoding *L*-lactate dehydrogenase, culture growth worsens and glucose consumption slows down. An increase in the dose of *L-LDH* genes does not always lead to an increase in biosynthesis of the target product. Perhaps the limiting factor in the biosynthesis of lactic acid is the lack of cytosolic NADH oxidized to NAD⁺ by NADH dehydrogenase encoded by the *NDE1* gene. The *S. pombe* strain with deletion of the *NDE1* gene and an additional copy of the *L-LDH* gene surpasses the parent strain in growth, glucose consumption and lactic acid biosynthesis (139 g/L, which is 28% more, final pH 3.2). The study will provide a better understanding of the underlying cellular processes in yeast *S. pombe* and use the results obtained for the design of highly productive strains producing lactic acid.

Keywords: *Schizosaccharomyces pombe*, *L*-lactic acid, NADH dehydrogenase, metabolic engineering