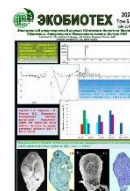




ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

<http://ecobiotech-journal.ru>


Обзор

СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ С ПОМОЩЬЮ ДРОЖЖЕВЫХ ШТАММОВ, СКОНСТРУИРОВАННЫХ СОВРЕМЕННЫМИ МЕТОДАМИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Ертилецкая Н.Л.*, Суханова А.А.

Отдел биоразлагаемых полимерных материалов,
Сибирский государственный университет науки
и технологий им. М.Ф. Решетнева, Красноярск, Россия

*E-mail: natalya.ertiletskaya@gmail.com

В обзоре рассмотрены способы получения молочной кислоты с помощью дрожжевых штаммов, сконструированных современными методами генетической инженерии. Представлены одни из последних работ и патентов, посвященных повышению продуктивности дрожжевых штаммов-продуцентов молочной кислоты и улучшению их характеристик методами геномного редактирования, а также придание способности синтезировать молочную кислоту новым, ранее не использовавшимся для этой цели штаммам дрожжей. Новые дрожжевые штаммы-продуценты молочной кислоты получают трансформацией исходных штаммов плазмидными векторами, несущими чужеродный или усиленный уже имеющийся ген лактатдегидрогеназы. Для внедрения чужеродного гена в плазмиду главным образом используют принцип гомологичной рекомбинации, который лежит в основе современного метода геномного редактирования CRISPR-Cas9. Для усиления существующего гена создают плазмиды, в которых нокаутированы гены, кодирующие ферменты конкурирующих метаболических путей, либо плазмиды с увеличенными копиями гена ЛДГ и усиленным соответствующим промотором. Кроме того, редактируя геном дрожжевых клеток, можно увеличить их кислототолерантность, снизить синтез побочных продуктов и придать способность к использованию новых субстратов для синтеза молочной кислоты.

Ключевые слова: геномодифицированные организмы ♦ молочная кислота генная инженерия ♦ рекомбинантный штамм ♦ редактирование генома ♦ дрожжи ♦ *Saccharomyces cerevisiae*

Поступила в редакцию: 26.10.2023

[Цитировать | Cite as](#)

DOI: [10.31163/2618-964X-2023-6-4-200-210](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2023-6-4-200-210)

EDN: [HBKPMN](https://www.edn.ru/HBKPMN)

ВВЕДЕНИЕ

Молочная кислота (МК) является важным сырьем для пищевой, химической, косметической, полимерной и других отраслей промышленности. В частности, в России

METHODS FOR PRODUCING LACTIC ACID USING YEAST STRAINS CONSTRUCTED BY CUTTING-EDGE METHODS OF GENETIC ENGINEERING

Ertiletskaya N.L.*, Sukhanova A.A.

Department of biodegradable polymer materials,
Reshetnev Siberian state university,
Krasnoyarsk, Russia

*E-mail: natalya.ertiletskaya@gmail.com

Methods for producing lactic acid using yeast strains constructed by cutting-edge methods of genetic engineering are discussed in the review. Some of the latest studies and patents on increasing the productivity of yeast strains producing lactic acid and improving their characteristics using genome editing methods, as well as imparting the ability to synthesize lactic acid to new yeast strains that have not previously been used for this purpose are presented. New yeast strains producing lactic acid are obtained by transforming the original strains with plasmid vectors carrying a foreign lactate dehydrogenase gene or an existing enhanced one. To introduce a foreign gene into a plasmid, homologous recombination is mainly used, which underlies the modern method of genome editing by CRISPR-Cas9. To enhance an existing gene, plasmids in which genes encoding enzymes of competing metabolic pathways are knocked out, or plasmids with increased copies of the LDH gene and an enhanced corresponding promoter are developed. In addition, by editing the genome of yeast cells, it is possible to increase their acid tolerance, reduce the synthesis of by-products, and impart the ability to use new substrates for the synthesis of lactic acid.

Keywords: genetically modified organisms ♦ lactic acid ♦ genetic engineering ♦ recombinant strain ♦ genome editing ♦ yeast ♦ *Saccharomyces cerevisiae*

Принято в печать: 09.11.2023



годовой объем потребления молочной кислоты оценивается в 10 тыс. тонн (Интернет-портал «Интерфакс» <https://www.interfax.ru/russia/856669>). Существует два способа получения молочной кислоты – химический и биотехнологический. Химический способ заключается в гидролизе 2-хлорпропионовой кислоты и ее солей (100 °С) или лактонитрила с последующим образованием эфиров, выделение и гидролиз которых приводит к образованию молочной кислоты. Себестоимость получаемой таким способом молочной кислоты невысока, однако ее применение ограничено ввиду того, что в результате такого способа получают только смесь L- и D-молочной кислоты (рацемат), который малоприменим в пищевой и косметической промышленности. Биотехнологический способ получения молочной кислоты путем ферментации углеродсодержащих субстратов рядом штаммов МКБ и некоторых микроскопических грибов позволяет получать как L-, так и D-молочную кислоту с энантиомерной чистотой до 97 -100%.

Недостатком биотехнологического способа получения является его техническая сложность, которая связана с его многостадийностью и необходимостью контролировать множество параметров культивирования. Существует также ряд тормозящих факторов в процессе ферментации, таких как высокая начальная концентрация сахара, подавляющая рост штамма, токсическое действие образованной МК на микробные клетки на поздней стадии ферментации, образование побочных продуктов и сложности в контроле оптической чистоты образуемой МК [Huang, 2023]. Кроме того, природные штаммы-продуценты обладают ограниченными продуктивностью и устойчивостью к факторам окружающей среды, что значительно сказывается на общей эффективности процесса. Поэтому рекомбинантные штаммы являются более предпочтительным объектом биотехнологии, т.к. они позволяют варьировать их физиологическими характеристиками и направлять их метаболизм в сторону более активной продукции молочной кислоты, а также придавать им устойчивость к некоторым факторам среды, которые существенно снижают или подавляют ее.

В частности, активно разрабатываются штаммы, обладающие кислототолерантностью и таким образом способные к продукции МК даже при пониженных значениях pH (до 2,0) [Ноц, 2019]. Активно предпринимаются попытки повышения продукции МК и придание способности метаболизировать новые субстраты путем рекомбинации генома продуцента. Повышение продуктивности главным образом достигается делецией генов, регулирующих конкурирующие за пируват метаболические пути (*PDC*, *ADH*, *ADY2* и др.) или же увеличением уже имеющихся копий генов, участвующих в регуляции синтеза молочной кислоты (*LDH*, *PFK*, *JEN1* и др.). В результате такого вмешательства снижается или полностью прекращается синтез побочных продуктов.

Среди продуцентов, которые чаще всего подвергаются геномному редактированию с целью улучшения продукции МК, подавляющее большинство составляют штаммы микроскопических грибов, в особенности дрожжей. Бактериальные продуценты МК в этом смысле менее предпочтительны, поскольку не все бактерии способны к эффективной трансформации чужеродной ДНК [Bosma, 2017]. Во многом это связано с низкой способностью бактерий к естественной трансформации, которая является следствием нарушения в работе генов компетенции или присутствия их в неполном количестве в бактериальном геноме [Di Giacomo, 2022]. Кроме того, многие виды *Lactobacillus* и *Pediococcus* хотя и более устойчивы к некоторым стрессам по сравнению с *Lactococcus*,

наименее всех способным к трансформации, но не имеют широко применимых высокопроизводительных генетических инструментов [Boguta, 2014; Vosma, 2017].

Что касается дрожжевых штаммов-продуцентов МК, то представлено большое количество работ и патентов, описывающих создание новых соответствующих штаммов, обладающих улучшенными характеристиками и показателями выхода целевого продукта.

В данном мини-обзоре представлены одни из последних работ и патентов, посвященных повышению продуктивности дрожжевых штаммов-продуцентов молочной кислоты и улучшению их характеристик методами геномного редактирования, а также придание способности синтезировать молочную кислоту новым, ранее не использовавшимся для этой цели штаммам дрожжей. Цель данного обзора — ознакомить читателя с последними работами посвященными генной инженерии дрожжевых штаммов для получения молочной кислоты.

ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ ДРОЖЖЕВЫХ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ

Для геномного редактирования грибных штаммов-продуцентов молочной кислоты используют как штаммы, изначально имеющие активный ген лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и, соответственно, способные к естественной продукции молочной кислоты в приемлемых количествах (такowymi являются *Rhizopus oryzae*, *Kluuyveromyces lactis*, *Pichia stipitis* и др.), так и штаммы, имеющие неактивный ген ЛДГ или не имеющие способности к продукции МК вовсе, но приобретающие ее после трансформации соответствующим геном. Среди последних находятся виды родов *Saccharomyces* и *Schizosaccharomyces*, которые являются одними из основных объектов для генной инженерии. Преимущества дрожжевых штаммов перед другими грибными штаммами делает их предпочтительными для высокоэффективного получения молочной кислоты. В частности, общепринятые, хорошо отработанные методики и алгоритмы трансформации дрожжевых клеток упрощают прогнозирование результатов геномного редактирования. Среди физиологических преимуществ дрожжевых клеток, которые делают их особенно привлекательными в качестве продуцентов МК, отмечают их кислотоустойчивость и возможность их относительно простой ферментации с высокой плотностью клеток [Peetermans, 2021; Liu, 2022].

Ингибирование роста продуцента выделяемым продуктом вследствие существенного снижения pH при получении молочной кислоты является одной из проблем, решаемых методами генетической инженерии. Даже при небольших продуктивностях, pH культуральной среды очень быстро опускается ниже значения pKa (3,86), при том, что оптимальный диапазон pH для существующих грибных продуцентов молочной кислоты находится в пределах 4,0-6,0 в зависимости от температурных условий, концентрации кислорода в среде и выбранного штамма [Narendranath, 2005; Singhvi, 2018]. Устойчивость к слабым кислотам, в том числе к молочной кислоте предположительно обусловлена функционированием клеточной стенки и насосов мембранного оттока. Изменение структуры клеточной стенки и увеличение степени насыщения липидов плазматической мембраны являются одними из эффективных стратегий повышения кислототолерантности клеток [Miga, 2010]. Альтернативным способом может быть экспрессия белков, регулирующих функционирование клеточной мембраны в клетках организмов с высокой кислототолерантностью. Такой подход был предпринят Zhong et al., которые трансформировали клетки *S. cerevisiae* плазмидой, содержащей ген

гликозилфосфатидилинозитол-заякоренного белка *Issatchenkia orientalis* IoGas1 с соответствующими промоторным и терминаторным участками. Данный белок, в отличие от гомологичного нативного белка Gas1, обеспечивает устойчивость к низкому pH и солевому стрессу. Данный ген был помещен в кодирующий пируватдекарбоксилазу сайт PDC1 клонирующего вектора pRS423. Дополнительно с помощью CRISPR-Cas9 была ослаблена экспрессия генов *Adh5*, *Adh3* и *Adh4* алкогольдегидрогеназы и полностью подавлена экспрессия генов *Gpd1* и *Gpd2* глицерол-3-фосфат дегидрогеназы глицеринового пути. В штамме с клонированным геном *IoGas1* была значительно улучшена способность к росту в среде с пониженным pH (до 2,2), а так же в среде, содержащей лактат натрия. Значения выхода и продуктивности за 75 часов составили 15,1 г/л и 0,16 г/(л·ч), соответственно [Zhong, 2021]. Mitsui et al. так же использовали CRISPR-Cas опосредованную эволюция генома для получения штамма *S. cerevisiae* с высокой продукцией D-молочной кислоты. Сначала штамм дрожжей, трансформированный плазмидой, содержащей ген *Cas9*, подвергали адаптивной эволюции в условиях низкого pH (2,5 и 2,3) путем нескольких пересевов, после чего в их геномную ДНК были случайным образом интегрированы фрагменты ДНК, экспрессирующие тринадцать белков из *Leuconostoc mesenteroides* (HXT7, HXK2, PGI1, PFK1, PFK2, FBA1, TPI1, TDH3, PGK1, GPM1, ENO2, PYK2 и D-лактатдегидрогеназа (D-LDH)), регулирующих синтез МК. Полученный рекомбинантный штамм из 100 г/л глюкозы продуцировал около 33,9 и 52,2 г/л D-молочной кислоты без добавления нейтрализующих агентов и при добавлении 20 г/л карбоната кальция, соответственно [Mitsui, 2020].

Примером решения проблемы кислотоустойчивости продуцента из отечественной практики может быть высокоэффективный штамм *Schizosaccharomyces pombe* Sp-МК6 ВКПМ Y-4822, полученный научной группой из ГосНИИгенетики, который способен продуцировать L-молочную кислоту при низких значениях pH (до 2,7) на небогатой среде с кукурузным экстрактом. Штамм имеет делетированный ген пируватдекарбоксилазы PDC1 и несет в составе хромосомной ДНК гены ЛДГ из *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus acidophilus* и *Lactobacillus helveticus*. Штамм продуцирует L-молочную кислоту в количестве 125 г/л за 72 ч культивирования в ферментере в аэробных условиях [Анисимова, 2021].

Другая серьезная проблема, с которой сталкиваются при ферментации дрожжевых клеток с целью получения молочной кислоты, связана с параллельной продукцией большого количества побочных продуктов, в частности этанола, глицерина и ацетата. Стандартным способом решения этой проблемы является нарушение экспрессии генов, кодирующих ферменты, участвующие в соответствующих реакциях синтеза побочных продуктов. Так, например, введением гена *LDH* из *Staphylococcus epidermidis* в положение гена *PDC*, кодирующего пируватдекарбоксилазу, катализирующую образование ацетальдегида из пирувата, получен штамм рекомбинантных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* YBC6 с улучшенной способностью продуцировать молочную кислоту с высоким выходом и сниженной продукцией этанола и глицерина по сравнению со штаммом YBC (KCTC13508BP) или штаммом YBC5 [Park, 2021]. Yamada et al. получили рекомбинантный штамм *Saccharomyces cerevisiae* YPH499/dPdA3-34/DLDH/1-18 трансформировав исходный штамм плазмидой рДН, содержащей ген *D-LDH* из *L. mesenteroides*. Объединив оптимизацию экспрессии генов, связанных с гликолизом (*HXT7*, *HXK2*, *PGI1*, *PFK1*, *PFK2*, *FBA1*, *TPI1*, *TDH3*, *PGK1*, *GPM1*, *ENO2* и *PYK2*), и удаление генов *PDC1* и *ADH1*, связанных с синтезом этанола, авторы получили штамм, отличающийся высокой скоростью потребления глюкозы

и низкой продукцией этанола. Для последующего повышения продукции D-молочной кислоты, дополнительно был проведен второй этап глобальной оптимизации генов, связанных с гликолизом и была усилена экспрессия гена *D-LDH*. Новый сконструированный штамм дрожжей YPH499/dPdA3-34 показал в 1,3 раза более высокую скорость потребления глюкозы, чем исходный штамм [Yamada, 2017]. О похожих результатах сообщают Sornlek et al., которые сконструировали новый штамм *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK2_DLDH, способный к продукции D-молочной кислоты, клонировав в него ген *D-LDH* из *Leuconostoc mesenteroides*. Дополнительно осуществили делецию генов *GPD1*, *GPD2* и *ADH1* с использованием CRISPR/Cas12a для сведения к минимуму выработки глицерина и этанола. Полученные после клонирования гена *D-LDH* и делеции генов *GPD* и *ADH1* штаммы ΔGPD и $\Delta GPD\Delta ADH1$ показали повышенный титр молочной кислоты по сравнению со штаммом, содержащим только ген *D-LDH* без делеции генов (9,6 и 14,4 г/л против 2,3 г/л, соответственно). Однако улучшение титра и выхода D-молочной кислоты в штамме с обоими выключенными генами сопровождалось значительным ухудшением роста. В дальнейшем только штамм ΔGPD скрещивали со слабым кислотоустойчивым штаммом *S. cerevisiae* с итоговым повышением выхода до 23,41 г/л молочной кислоты за 48 часов [Sornlek, 2022]. Pangestu et al. в своем исследовании, направленном на решение аналогичной проблемы, использовали высокоустойчивый штамм *Saccharomyces cerevisiae* BTCC3 в качестве продуцента молочной кислоты. Штамм подвергся модификации путем введения экзогенного гена *LDH* из *Lactobacillus casei* и нарушения экспрессии генов *PDC1* и *PDC5*, участвующих в образовании этанола. В результате сконструированный штамм, при его культивировании с высокой плотностью, показывал значения продуктивности 4,80 и 3,68 г/(л·ч) в условиях нейтрализации карбонатом кальция и без нейтрализации, соответственно. Последующая ферментация без нейтрализации с использованием недетоксифицированного гидролизата жома сахарного тростника в качестве среды показала продуктивность 1,69 г/(л·ч), что по заверениям авторов вполне сопоставимо с результатами при ферментации на аналогичном сырье, прошедшем стадии детоксикации и нейтрализации [Pangestu, 2022].

Довольно интересное направление редактирования генома дрожжевых штаммов связано с внедрением в них чужеродных генов ЛДГ с целью повышения их уровня синтеза молочной кислоты. Вышеупомянутой научной группой из ГосНИИгенетики проведено исследование по внедрению гена ЛДГ различного происхождения (грибная — из *Rhizopus oryzae*, млекопитающих — из *Bos taurus* и *Homo sapiens*, и из молочнокислых бактерий — *L. plantarum* и *L. pentosus*) и оценки ее активности в клетках *Schizosaccharomyces pombe* и уровня синтеза молочной кислоты полученными рекомбинантными штаммами. Компетентные клетки *S. pombe* трансформировали плазмидами, содержащими соответствующие гены ЛДГ *ldh1 Bos taurus*, *ldhA Homo sapiens*, *ldhA Rhizopus oryzae*, *ldh1 Lactobacillus plantarum* и *ldh1 Lactobacillus pentosus*. В результате было установлено, что наибольшей активностью обладали ЛДГ молочнокислых бактерий *L. plantarum* и *L. pentosus*. При этом у соответствующих трансформантов наблюдался самый высокий уровень синтеза молочной кислоты [Борщевская, 2015]. Позже в работе de Lima et al. ген ЛДГ из *Bos taurus*, находящийся под контролем промотора GAP, впервые клонирован в метилотрофные дрожжи *Pichia pastoris* стандартным методом гомологичной рекомбинации. Полученный мутант, устойчивый к зеоцину, показал выход молочной кислоты всего 10% при использовании технического глицерина в качестве источника углерода. В этой же работе дополнительно по отдельности клонировали ген переносчика лактата *Jen1p* из *Saccharomyces*

cerevisiae и предполагаемого переносчика лактата у *P. pastoris*, в ЛДГ-продуцирующий штамм *P. pastoris* GS115. Оба штамма, названные GLJ и GLS, показали более высокое сродство к лактату по сравнению с исходным штаммом. При периодическом культивировании с подпиткой штамм GLS демонстрировал увеличение выхода лактата на 46 % по сравнению с исходным штаммом и на 43 % выше, чем у GLJ [de Lima, 2016].

Довольно обширную работу по внедрению чужеродных генов ЛДГ в грибные штаммы провела группа Kong et al. В своей работе они получили рекомбинантный штамм термотолерантной *Kluyveromyces marxianus*, способный к утилизации глюкозы и ксилозы с образованием молочной кислоты, клонировав в него гены различных гетерологичных L-ЛДГ (из *Homo sapiens* (*HsLDH*), *Bacillus subtilis* (*BsLDH*), *Bacillus megaterium* (*BmLDH*), *Lactococcus lactis* (*LlLDH*), *Rhizopus oryzae* (*RoLDH*) и *Plasmodium falciparum* (*PfLDH*). Экспрессия гена переносчика 6-монокарбоксилатов *S. cerevisiae* 6-монокарбоксилата (*ScJEN1*) и гена 6-фосфофруктокиназы *K. marxianus* (*KmPFK*) была усилена для повышения накопления L-молочной кислоты. Дополнительно была нарушена экспрессия предполагаемого гена D-ЛДГ *K. marxianus* (*KmDLD1*) с помощью кассеты CRISPR-Cas9. Штаммы, содержавшие *BmLDH*, *RoLDH* и *PfLDH* потребляли всю глюкозу и большую часть ксилозы и производили 47,4, 33,5 и 50,0 г/л L-молочной кислоты за 48 ч, соответственно. Штамм YKX019 со сверхэкспрессией *PfLDH* продуцировал наибольшее количество L-молочной кислоты с максимальной продуктивностью 1,04 г/(л·ч) и выходом 0,55 г/г. YKX014, экспрессирующий *BmLDH*, был вторым наиболее эффективным штаммом с продуктивностью 0,99 г/(л·ч) и выходом 0,50 г/г. Наконец, штамм YKX071, полученный с помощью комбинации всех вышеупомянутых генных модификаций, продуцировал 103,0 г/л L-молочной кислоты с оптической чистотой 99,5% из остатков кукурузных початков в процессе одновременного осахаривания и ферментации [Kong, 2019]. Novy et al. так же получили рекомбинантный штамм *S. cerevisiae*, способный к утилизации ксилозы с образованием молочной кислоты, клонировав в него ген L-ЛДГ из *Plasmodium falciparum* (*pfLDH*) в локус гена пируватдекарбоксилазы *PDC1*. Замещающую кассету собирали с использованием ПЦР, амплифицируя ген *pfLDH* и прилегающую область, кодирующую ген устойчивости *kanR* из плазмиды pLA. Дополнительно был получен штамм с делецией гена пируватдекарбоксилазы *PDC5*. Нокаут-кассету амплифицировали из плазмиды pUG74 с использованием олигонуклеотидных праймеров *pdc5_ko_fwd* и *pdc5_ko_rev*. Полученный штамм был способен к образованию молочной кислоты в анаэробных условиях при стабилизации pH добавлением CaCO₃ [Novy, 2017]. Turner et al. в своей работе, посвящённой конструированию нового штамма *S. cerevisiae*, способного к метаболизированию ксилозы с получением молочной кислоты, установили, что нарушение функционирования генов, кодирующих монокарбоксилат транспортеры, в частности, генов *JEN1* и *ADY2*, влияет на эффективность получения молочной кислоты из ксилозы, при том, что усиление их экспрессии не отражается на значениях продуктивности. В штамм, предварительно трансформированный плазмидой, содержащей ген *ldhA* из *R. oryzae*, сначала внесли плазмиды, усиливающие экспрессию генов *JEN1* и *ADY2*. Затем, наоборот, внесли плазмиды с кассетой Cas9, содержащей распознающие последовательности генов *JEN1* и *ADY2*, для того чтобы произвести их последующую делецию. В результате, штаммы с усиленной экспрессией вышеуказанных генов не показали какого-либо значительного увеличения продукции МК из ксилозы по сравнению с исходным. В то же время, у штаммов с делецированными генами *JEN1* и *ADY2* снизилась продукция молочной кислоты

при ферментации ксилозы (с 9,3 до 5,4 г/л молочной кислоты за 48 часов) [Turner, 2019]. Таким образом, в случае ксилозы, можно говорить о том, что усиление экспрессии соответствующих генов не влияет на выход молочной кислоты, при том, что их выключение приводит к значительному снижению ее выхода.

Часть современных работ по геномному редактированию дрожжевых штаммов направлена на придание способности производить МК видам, которые изначально к этому не способны, либо усиливать ее синтез в видах со слабым синтезом молочной кислоты. В исследовании Melo et al. осуществили делецию гена пируватдекарбоксилазы (*PDC*) и усилили экспрессию гена *LDH* с целью направить дополнительный пируват на путь производства молочной кислоты в клетках *Pichia pastoris* GS115. У штаммов с делецией *PDC* наблюдалось снижение биомассы и продукции уксусной кислоты на 32% и 75%, соответственно, по сравнению с исходным штаммом. Эксперименты по ферментации показали, что во время фазы ограничения кислорода штамм достиг выхода молочной кислоты 0,65 г/г. У этого штамма образование ацетата было снижено на 20%, но с одновременным 7-кратным увеличением продукции арабитола по сравнению со штаммом GS115 дикого типа [Melo, 2018]. Yamada et al. получили штамм *Pichia pastoris*, способный продуцировать D-молочную кислоту из метанола, интегрировав в него плазмиду, содержащую ген D-ЛДГ. Соответствующий ген был помещен в предварительно амплифицированный спейсерный участок рДНК и дополнен селективным геном устойчивости к антибиотику зеоцину. В результате четырехкратной селекции на среде, содержащей нарастающие количества зеоцина (0,1, 0,5, 1 и 2 г/л) были получены штаммы с повышенной копийностью гена ЛДГ и соответствующей максимальной продуктивностью молочной кислоты 5,35 и 5,27 г/л, причем оба штамма были получены с третьего пассажа на среде с антибиотиком [Yamada, 2019]. Hou et al. получили рекомбинантный штамм *Candida glycerinogenes* путем введения в него кислотоиндуцируемого промотора *PCggmt1*, контролирующего синтез гена ЛДГ, секвенированного из *Rhizopus oryzae*. В результате, сконструированный штамм способен к синтезу молочной кислоты при значениях pH до 2,5. По сравнению с pH 5,5, удельная активность ЛДГ и титр молочной кислоты при pH 2,5 повышались на 229% и 218%, достигая 13,8 мЕд/мг и 12,3 г/л соответственно. Полученные результаты продемонстрировали возможность экономичного производства органических кислот при низком pH с помощью кислотоустойчивого *C. glycerinogenes* и нового промотора *PCggmt1*, индуцируемого при низком pH [Hou, 2019].

Пожалуй, самой необычной из последних работ подобного плана будет исследование Wefelmeier et al., в котором авторы использовали метилотрофные дрожжи *Ogataea polymorpha* в качестве организма-хозяина для производства МК из метанола. Для придания *Ogataea polymorpha* способности к выработке МК, четыре различных ЛДГ из *Bos taurus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus helveticus* и *Lactiplantibacillus plantarum* были экспрессированы под контролем индуцируемого метанолом промотора MOX. Чтобы сделать возможным генную инженерию этого штамма посредством редактирования CRISPR-Cas9, ген улучшенного Cas9 (iCas9) был интегрирован в ген MET2 *O. polymorpha*, что делает штамм ауксотрофным по метионину. Самый высокий титр лактата 3,8 г/л в этом исследовании был получен при культивировании в периодическом эксперименте с подпиткой метанолом во встряхиваемых колбах с источником азота. Это исследование представляет собой доказательство того, что *Ogataea polymorpha* является подходящим

организмом-хозяином для производства лактата с использованием метанола в качестве источника углерода [Wefelmeier, 2023].

В таблице, представленной ниже, кратко резюмированы все приведенные в статье данные по вариантам решения проблем получения молочной кислоты методами генетической инженерии.

Таблица. Проблемы получения молочной кислоты штаммами дрожжей и варианты их решения методами генетической инженерии

№	Проблема	Варианты решения	Ссылки
1	Ингибирование синтеза МК вследствие снижения pH среды	Экспрессия белков, регулирующих функционирование клеточной мембраны	Zhong, 2021
		Адаптивная эволюция в условиях низкого pH	Mitsui, 2020
		Использование кислотоустойчивого штамма для генной модификации	Анисимова, 2020
		Введение кислотоиндуцируемого промотора <i>PCggmt1</i>	Hou, 2019
2	Низкая продуктивность или отсутствие способности синтеза МК	Трансформирование кислотоустойчивого штамма плазмидами, содержащими гетерологичные гены <i>ldh</i>	Борщевская, 2015
		Инсерция гетерологичного гена переносчика лактата <i>Jen1p</i>	de Lima, 2016
		Инсерция гетерологичного гена <i>L-ЛДГ</i> с усилением генов переносчиков промежуточных продуктов <i>ScJEN1</i> и <i>KmPFK</i> и нарушением гена <i>KmDLD1</i>	Kong, 2019
3	Синтез побочных продуктов	Нарушение гена <i>PDC</i>	Park, 2021
		Делеция генов <i>PDC1</i> и <i>ADH1</i>	Yamada, 2021
		Делеция генов <i>GPD1</i> , <i>GPD2</i> и <i>ADH1</i>	Sornlek, 2022
		Нарушения экспрессии генов <i>PDC1</i> и <i>PDC5</i>	Pangestu, 2022
		Делеция гена <i>PDC</i> и усиление экспрессии гена <i>LDH</i>	Melo, 2019
4	Ограниченность подходящих субстратов для синтеза МК	Редактирование генома ксилоза-метаболизирующего штамма путем инсерции гетерологичного гена <i>L-ЛДГ</i> в локус гена <i>PDC1</i> и делеция гена пируватдекарбоксилазы <i>PDC5</i>	Novy, 2017
		Гетерологичный ген <i>D-ЛДГ</i> помещен в предварительно амплифицированный спейсерный участок рДНК	Yamada, 2019
		Редактирование генома метанол-метаболизирующего штамма путем инсерции гетерологичного гена <i>ЛДГ</i> , находящегося под контролем индуцируемого метанолом промотора <i>MOX</i>	Wefelmeier, 2023

Таким образом, на настоящий момент работы по генной инженерии дрожжевых штаммов-продуцентов МК в основном посвящены увеличению выхода МК, снижению синтеза побочных продуктов, повышению кислотоустойчивости штаммов и приданию способности продуцировать МК штаммам, изначально не имеющим такой способности, но которые обладают преимуществами перед штаммами-продуцентами МК дикого типа. При этом используются как более современные методы, в частности, системы CRISPR/Cas (главным образом для делеции генов, экспрессирующих ферменты, участвующие в синтезе побочных продуктов), так и уже давно устоявшиеся методы геномного редактирования эндонуклеазами рестрикции и системами TALEN (для нокаутирования отдельных генов, и, наоборот, для внесения новых генетических конструкций в геном дрожжевой клетки).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Усиление экспрессии гена ЛДГ на настоящий момент является основным направлением работ по получению высокоэффективного дрожжевого штамма-продуцента молочной кислоты. Это связано с изначально низкой способностью дрожжевых штаммов к продукции молочной кислоты. Эта стратегия позволяет повысить выход молочной кислоты в изначально малоэффективном штамме-продуценте. Тем не менее, механизмы увеличения выходов МК за счет усиления гена/генов ЛДГ остаются неясными. В частности, из рассмотренных выше работ можно сделать вывод, что не всегда увеличение копий гена ЛДГ приводит к закономерному увеличению выхода, как и усиление соответствующего промотора. Лежащие в основе этого причины еще предстоит выяснить, в том числе и с применением молекулярных методов. Имеющиеся на данный момент результаты показывают, что искусственное усиление экспрессии ЛДГ в некоторых случаях позволяет увеличивать выход МК до 125 г/л и продуктивность до 1,74 г/(л·ч).

Получение штаммов с высокой кислотоустойчивостью так же представляется вполне достижимой задачей при использовании методов генной инженерии. С одной стороны, возможной стратегией может быть придание способности к продукции МК штамму, изначально обладающему высокой кислотолерантностью. В таком случае, задача сводится к внедрению вышеупомянутого гена ЛДГ и других сопутствующих генов, чтобы заставить его в достаточном количестве продуцировать МК. С другой стороны, можно взять штамм с природно высокими выходами МК и придать ему свойство кислотолерантности. Как было рассмотрено выше, это достигается, например, внесением генов, экспрессирующих белки, участвующие в регуляции состояния клеточной мембраны.

Снижение количества побочных продуктов, которые, как известно, значительно снижают выход основного продукта, достигается делецией или нарушением соответствующих генов, продукты экспрессии которых направляют метаболизм в сторону синтеза побочного соединения. Зачастую этот способ совмещают с усилением экспрессии ЛДГ путем внедрения дополнительных копий ее гена в сайты генов, регулирующих синтез побочных продуктов.

Наконец, придание способности к синтезу МК дрожжевым штаммам, изначально не приспособленных к этому, особенно таким экзотическим, как метилотрофные дрожжи, дает возможность создавать новых продуцентов МК, способных метаболизировать новые источники углерода. Как было рассмотрено, такие штаммы получают внедрением генетической конструкции содержащей чужеродный ген ЛДГ и соответствующие промотор и терминаторы.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках проекта «Методы клонирования и работы с рекомбинантной ДНК» №2023031309580, поддержанного Красноярским краевым фондом науки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анисимова Е.О., Тарутина М.Г., Шутов А.В. и др. Штамм дрожжей *Schizosaccharomyces pombe*, продуцирующий L-молочную кислоту, содержащий в составе хромосомы гены трех различных гетерологичных лактатдегидрогеназ. Патент RU2752896C1. Бюллетень № 23. Дата публикации: 11.08.2021.
2. Борщевская Л.Н., Гордеева Т.Л., Синеокий С.П. Сравнение L-лактатдегидрогеназ различного происхождения в клетках дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* // Биотехнология. 2015. Т. 31 (6). С. 25-34.
3. Boguta A.M., Bringel F., Martinussen J., Jensen P.R. Screening of lactic acid bacteria for their potential as microbial cell factories for bioconversion of lignocellulosic feedstocks // Microbial Cell Factories. 2014. Т. 13 (1). P. 1-16. DOI: [10.1093/femsre/fuac014](https://doi.org/10.1093/femsre/fuac014)
4. Bosma E. F., Forster J., Nielsen A. T. Lactobacilli and pediococci as versatile cell factories—Evaluation of strain properties and genetic tools // Biotechnology Advances. 2017. Т. 35 (4). P. 419-442. DOI: [10.1016/j.jbiosc.2019.01.005](https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.01.005)
5. de Lima P.B.A., Mulder K.C.L., Melo N.T.M., et al. Novel homologous lactate transporter improves L-lactic acid production from glycerol in recombinant strains of *Pichia pastoris* // Microbial Cell Factories. 2016. Т. 15 (1). P. 1-9. DOI: [10.1186/s12934-016-0557-9](https://doi.org/10.1186/s12934-016-0557-9)
6. Di Giacomo S., Toussaint F., Ledesma-García L., et al. Expanding natural transformation to improve beneficial lactic acid bacteria // FEMS Microbiology Reviews. 2022. Т. 46 (4). Article: fuac014. DOI: [10.1016/j.biotechadv.2017.04.002](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.04.002)
7. Hou Q., He Q., Liu G., et al. Identification and application of novel low pH-inducible promoters for lactic acid production in the tolerant yeast *Candida glycerinogenes* // Journal of Bioscience and Bioengineering. 2019. Т. 128 (1). P. 8-12. DOI: [10.1016/j.jbiosc.2019.01.005](https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.01.005)
8. Huang Y., Wang Y., Shang N., Li P. Microbial Fermentation Processes of Lactic Acid: Challenges, Solutions, and Future Prospects // Foods. 2023. Т. 12 (12). Article: 2311. DOI: [10.3390/foods12122311](https://doi.org/10.3390/foods12122311)
9. Kong X., Zhang B., Hua Y., et al. Efficient L-lactic acid production from corncob residue using metabolically engineered thermo-tolerant yeast // Bioresource Technology. 2019. Т. 273. P. 220-230. DOI: [10.1016/j.biortech.2018.11.018](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.11.018)
10. Liu T., Xu X., Liu Y., et al. Engineered Microbial Cell Factories for Sustainable Production of L-Lactic Acid: A Critical Review // Fermentation. 2022. Т. 8. Article: 279. DOI: [10.3390/fermentation8060279](https://doi.org/10.3390/fermentation8060279)
11. Melo N.T., Mulder K.C., Nicola A.M., et al. Effect of pyruvate decarboxylase knockout on product distribution using *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) engineered for lactic acid production // Bioengineering. 2018. Т. 5 (1). Article: 17. DOI: [10.3390/bioengineering5010017](https://doi.org/10.3390/bioengineering5010017)
12. Mira N.P., Teixeira M.C., Sá-Correia I. Adaptive response and tolerance to weak acids in *Saccharomyces cerevisiae*: a genome-wide view // OMICS: A Journal of Integrative Biology. 2010. Т. 14 (5). P. 525-540.
13. Mitsui R., Yamada R., Matsumoto T., et al. Construction of lactic acid-tolerant *Saccharomyces cerevisiae* by using CRISPR-Cas-mediated genome evolution for efficient d-lactic acid production // Applied Microbiology and Biotechnology. 2020. Т. 104. P. 9147-9158. DOI: [10.1007/s00253-020-10906-3](https://doi.org/10.1007/s00253-020-10906-3)

14. Narendranath N.V., Power R. Relationship between pH and medium dissolved solids in terms of growth and metabolism of lactobacilli and *Saccharomyces cerevisiae* during ethanol production // *Applied Environmental Microbiology*. 2005. Т. 71 (5). P. 2239-2243. DOI: [10.1128/AEM.71.5.2239-2243.2005](https://doi.org/10.1128/AEM.71.5.2239-2243.2005)
15. Novy V., Brunner B., Müller G., Nidetzky B. Toward “homolactic” fermentation of glucose and xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae* harboring a kinetically efficient l-lactate dehydrogenase within *pdcl-pdc5* deletion background // *Biotechnology & Bioengineering*. 2017. Т. 114 (1). P. 163-171. DOI: [10.1002/bit.26048](https://doi.org/10.1002/bit.26048)
16. Pangestu R., Kahar P., Kholida L. N., et al. Harnessing originally robust yeast for rapid lactic acid bioproduction without detoxification and neutralization // *Scientific Reports*. 2022. Т. 12 (1). Article: 13645. DOI: [10.1038/s41598-022-17737-4](https://doi.org/10.1038/s41598-022-17737-4)
17. Park J.Y., Lee T.Y., Lee K.S. Recombinant acid-resistant yeast with inhibited lactate metabolism and alcohol production and method of producing lactic acid using the same. Patent EP3808852A1. Bull. №2021/16. Дата публикации: 21.04.2021.
18. Peetermans A., Foulquié-Moreno M.R., Thevelein J.M. Mechanisms underlying lactic acid tolerance and its influence on lactic acid production in *Saccharomyces cerevisiae* // *Microbial Cell*. 2021. Т. 8 (6). P. 111-130. DOI: [10.15698/mic2021.06.751](https://doi.org/10.15698/mic2021.06.751)
19. Singhvi M., Zendo T., Sonomoto K. Free lactic acid production under acidic conditions by lactic acid bacteria strains: challenges and future prospects // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2018. Т. 102. P. 5911-5924. DOI: [10.1007/s00253-018-9092-4](https://doi.org/10.1007/s00253-018-9092-4)
20. Sornlek W., Sae-Tang K., Watcharawipas A., et al. D-Lactic acid production from sugarcane bagasse by genetically engineered *Saccharomyces cerevisiae* // *Journal of Fungi*. 2022. Т. 8 (8). Article: 816. DOI: [10.3390/jof8080816](https://doi.org/10.3390/jof8080816)
21. Turner T.L., Lane S., Jayakody L.N., et al. Deletion of JEN1 and ADY2 reduces lactic acid yield from an engineered *Saccharomyces cerevisiae*, in xylose medium, expressing a heterologous lactate dehydrogenase // *FEMS Yeast Research*. 2019. Т. 19 (6). Article: foz050. DOI: [10.1093/femsyr/foz050](https://doi.org/10.1093/femsyr/foz050)
22. Wefelmeier K., Schmitz S., Haut A.M., et al. Engineering the methylotrophic yeast *Ogataea polymorpha* for lactate production from methanol // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2023. Т. 11. Article: 1223726. DOI: [10.3389/fbioe.2023.1223726](https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1223726)
23. Yamada R., Ogura K., Kimoto Y., Ogino, H. Toward the construction of a technology platform for chemicals production from methanol: D-lactic acid production from methanol by an engineered yeast *Pichia pastoris* // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2019. Т. 35. P. 1-9. DOI: [10.1007/s11274-019-2610-4](https://doi.org/10.1007/s11274-019-2610-4)
24. Yamada R., Wakita K., Mitsui R., Ogino H. Enhanced d-lactic acid production by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* following optimization of the global metabolic pathway // *Biotechnology & Bioengineering*. 2017. Т. 114 (9). P. 2075-2084. DOI: [10.1002/bit.26330](https://doi.org/10.1002/bit.26330)
25. Zhong W., Yang M., Hao X., et al. Improvement of D-lactic acid production at low pH through expressing acid-resistant gene *IoGAS1* in engineered *Saccharomyces cerevisiae* // *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2021. Т. 96 (3). P. 732-742. DOI: [10.1002/jctb.6587](https://doi.org/10.1002/jctb.6587)

Цитировать как

Ертилецкая Н.Л., Суханова А.А. Способы получения молочной кислоты с помощью дрожжевых штаммов, сконструированных современными методами генетической инженерии // *Экобиотех*, 2023. Т. 6. № 4. С. 200-210. DOI: [10.31163/2618-964X-2023-6-4-200-210](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2023-6-4-200-210). EDN: HBKPMN

Cited as

Ertiletskaya N.L., Sukhanova A.A. Methods for producing lactic acid using yeast strains constructed by cutting-edge methods of genetic engineering. *Ekobiotech*. 2023, V. 6 (4). P. 200-210. DOI: [10.31163/2618-964X-2023-6-4-200-210](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2023-6-4-200-210). EDN: HBKPMN (In Rus.)