

代谢工程改造野生耐酸酵母生产 L-乳酸

张勤^{1,2}, 张梁^{1,2}, 丁重阳^{1,2}, 王正祥^{1,2}, 石贵阳^{1,2}

1 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122

2 江南大学生物工程学院 生物资源与生物能源研究中心, 无锡 214122

摘要: 以选育低 pH 条件下高产 L-乳酸的酵母菌为目的, 从自然样品中筛选分离得到一株能在 pH 2.5 (乳酸调节) 的培养基中生长且不利用乳酸的酵母 (初步鉴定为木兰假丝酵母 *Candida magnolia*); 进一步将来源于米根霉 As3.819 的乳酸脱氢酶编码基因 (*ldhA*) 插入含有 G418 抗性基因的酵母穿梭载体, 构建了重组质粒 pYX212-kanMX-*ldhA*, 电转化入野生型 *C. magnolia* 中, 筛选获得了一株具有产 L-乳酸能力的重组菌株 *C. magnolia*-2; 通过发酵实验表明, 该重组菌产 L-乳酸的最适 pH 为 3.5, 并在 pH 2.5 时正常发酵产乳酸。本研究首次从自然界筛选到一株耐高浓乳酸的耐酸酵母菌, 并以此为宿主菌构建了具有生产 L-乳酸能力的耐酸重组酵母, 为以耐酸酵母菌高产 L-乳酸进行了有益的探索。

关键词: 耐酸酵母, 米根霉, 乳酸脱氢酶, 代谢工程, L-乳酸

Metabolic engineering of wild acid-resistant yeast for L-lactic acid production

Qin Zhang^{1,2}, Liang Zhang^{1,2}, Zhongyang Ding^{1,2}, Zhengxiang Wang^{1,2}, and Guiyang Shi^{1,2}

1 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

2 Center for Bioresource & Bioenergy, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract: In order to obtain a yeast strain able to produce L-lactic acid under the condition of low pH and high lactate content, one wild acid-resistant yeast strain isolated from natural samples, was found to be able to grow well in YEPD medium (20 g/L glucose, 20 g/L tryptone, 10 g/L yeast extract, adjusted pH 2.5 with lactic acid) without consuming lactic acid. Based on further molecular biological tests, the strain was identified as *Candida magnolia*. Then, the gene *ldhA*, encoding a lactate dehydrogenase from *Rhizopus oryzae*, was cloned into a yeast shuttle vector containing G418 resistance gene. The resultant plasmid pYX212-kanMX-*ldhA* was introduced into *C. magnolia* by electroporation method. Subsequently, a recombinant L-lactic acid producing yeast *C. magnolia*-2 was obtained. The optimum pH of the recombinant yeast is 3.5 for lactic acid production. Moreover, the recombinant strain could grow well and produce lactic acid at pH 2.5. This recombinant yeast strain could be useful for producing L-lactic acid.

Received: September 25, 2010; **Accepted:** January 29, 2011

Supported by: Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. JUSRP31004), Innovative Research Team of Jiangsu Province, 2008.

Corresponding author: Guiyang Shi. Tel/Fax: +86-510-85918229; E-mail: gyshi@jiangnan.edu.cn

Liang Zhang. Tel/Fax: +86-510-85918235; E-mail: zhangl@jiangnan.edu.cn

中央高校基本科研业务费专项资金 (No. JUSRP31004), 2008 年度江苏省高校“青蓝工程”科技创新团队。

Keywords: acid-resistant yeast, *Rhizopus oryzae*, lactate dehydrogenase, metabolic engineering, L-lactic acid

乳酸因其安全性、光学特性及其特殊的分子结构被广泛应用于食品、医药和化妆品等工业。由于人体只能利用 L(+)-乳酸, 世界卫生组织提倡在食品及医药行业使用 L(+)-乳酸取代目前普遍使用的 DL(+)-乳酸^[1-2]。另外, L-乳酸的一个重要用途为合成聚乳酸, 聚乳酸因可以由可再生资源生产并能被生物降解而被认为是最有发展前景的聚合物之一^[3]。2009 年世界 L-乳酸需求量为 13~15 万 t, 主要集中在美国、西欧和日本, 且需求量将以年均 5%~8% 的速度持续增长, 加之聚乳酸的逐步推广使用, L(+)-乳酸产业规模将急剧扩大^[4]。

目前, L-乳酸的生产方法主要为微生物发酵法。现国内外研究主要集中在乳杆菌和米根霉^[5-6]。在乳酸发酵过程中, pH 值会随着乳酸的生成而逐渐降低, 而低 pH 值会抑制细菌和根霉菌的生长和发酵能力^[7]。虽然 CaCO₃ 作为中和剂, 可以维持最适 pH 值。但是乳酸钙结晶细小, 且结晶过程不易控制, 另外 30% 乳酸钙残留在结晶母液中, 不能结晶出来, 大量的副产物 (石膏) 会造成环境污染。另外 NaOH 或 NH₄OH 可也作为中和剂, 但用量大、成本高^[8-9]。

相对于细菌和霉菌, 酵母菌具备更好的耐酸性, 可在强度更高的酸性条件下生存和生长。早在 1994 年 Dequin 和 Barr 就报道了代谢工程酵母菌株异源表达 L-乳酸脱氢酶, 其 L-乳酸产量为 12 g/L^[10]。之后也有学者研究将来源于乳酸菌、米根霉和其他来源的乳酸脱氢酶在酿酒酵母中表达, 其 L-乳酸产量也提高至 25.7 g/L 和 38.0 g/L^[11-12]。

然而有文献显示, L-乳酸比其他大多数有机酸和无机酸引起的细胞内酸化速度更快, 对细胞造成的损伤更为严重^[13]。因此, 一般酵母和以 HCl 或 H₂SO₄ 等无机酸为筛选压力得到的耐酸菌在 L-乳酸生产上并不能表现出其在耐酸方面的优越性。本研究则以自然界中筛选得到的一株耐高浓度乳酸的酵

母菌为出发菌株, 在国内首次采用基因工程技术, 通过表达米根霉乳酸脱氢酶基因, 改造野生耐酸酵母菌株, 增加其乳酸代谢途径, 代谢葡萄糖生成乳酸。可以降低传统乳酸发酵过程中因添加钙所产生的污染, 也可降低氨水等中和剂的用量并简化操作过程, 可大幅度降低生产成本, 为以耐酸酵母菌高产 L-乳酸进行了有益的探索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

水果皮、土壤、酒曲等。

1.1.2 菌株与来源

本研究所用菌株及质粒如表 1 所示。

表 1 本研究中所用菌株及质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristic or genotype	Source
<i>Rhizopus oryzae</i> (As3.819)	Carrying <i>ldhA</i> gene	CGMCC
pYX212- <i>kanMX</i>	Yeast shuttle vector (<i>TPI</i> promoter, 2 μ autonomously replicating sequence, G418 resistance gene)	Preserved in our laboratory
pYX212- <i>kanMX-ldhA</i>	pYX212- <i>kanMX</i> carrying <i>ldhA</i> gene	This study

1.1.3 培养基

YEPD 培养基: 葡萄糖 20 g/L; 蛋白胨 20 g/L; 酵母膏 10 g/L。用于固体培养基时添加 20 g/L 琼脂粉; 挑选转化子时添加 800 mg/L 的 G418 抗生素。

筛选培养基 (Selection medium): 葡萄糖 20 g/L; 蛋白胨 20 g/L; 酵母膏 10 g/L; 以乳酸调节 pH 值至 2.5。

单碳源培养基 (Solo carbon medium): 乳酸 17 g/L; (NH₄)₂SO₄ 7.5 g/L; KH₂PO₄ 3.5 g/L; MgSO₄·7H₂O 0.75 g/L; 酵母膏 0.5 g/L。

PDA 培养基: 葡萄糖 20 g/L; 马铃薯 200 g/L, 琼脂粉 20 g/L, 用于米根霉的培养。

LB 培养基: NaCl 10 g/L; 蛋白胨 10 g/L; 酵母膏 5 g/L。用于固体培养基时添加 20 g/L 琼脂粉; 挑选转化子时添加终浓度为 30 mg/L 的卡那霉素。

发酵培养基: 葡萄糖 100 g/L, 蛋白胨 20 g/L; 酵母膏 10 g/L。

1.2 方法

1.2.1 采样与分离

称取 5 g 样品, 加至含 100 mL 无菌生理盐水及玻璃珠的三角瓶中, 30 °C、150 r/min 振荡打散 30 min; 样品悬液用无菌生理盐水稀释, 选择适合的稀释度, 分别涂布 YEPD 平板, 30 °C 培养 5~7 d, 观察菌落生长情况, 并将新长出的形态上有差异的单菌落挑出。

1.2.2 耐酸酵母的筛选

从分离得到的单菌落中挑取典型的酵母菌落分别接种于以乳酸调节 pH 值至 4 的 YEPD 液体培养基中, 30 °C 培养 48 h。选择生长较好的酵母菌株依次接入筛选培养基中, 培养 48 h, 选择长势最好的菌株在 YEPD 试管斜面上划线, 4 °C 保存。

1.2.3 分类鉴定

形态学鉴定: 按照文献[14]的方法进行。

分子生物学鉴定: 酵母 DNA 的提取方法参照《精编分子生物学实验指南》^[15], 所用引物为真菌 ITS 通用引物 (上游 ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAA CCTGCGG-3'; 下游 ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), PCR 扩增产物经电泳检测后测序, 在核酸序列数据 (GenBank) 中进行同源序列搜索, 根据同源序列搜索结果, 确定该菌株所属的最近属种。

生理生化鉴定: 按照文献[14]的方法进行。

1.2.4 分析方法

生长量测定方法: 取不同发酵时间的发酵液, 用 721 型分光光度计于 600 nm 处测其吸光值。

残糖测定方法: 生物传感仪测定发酵液内残糖含量。

HPLC 法测定有机酸: 发酵液经 8 000 r/min 离

心 5 min, 取 300 μ L 上清液加入 700 μ L 无水乙醇沉淀蛋白质 3 h 以上后, 12 000 r/min 离心 15 min, 0.45 μ m 有机微孔滤膜后, 通过 HPLC 进行测定。分析条件: 色谱柱 SH1011; 流动相 0.01 mol/L H₂SO₄; 流速 0.8 mL/min; 进样量 5 μ L; 柱温 50 °C; 检测器为紫外检测器, 检测波长为 210 nm。

1.2.5 常规基因克隆操作方法

大肠杆菌感受态制备, 外源基因片段与载体连接, 简易转化操作, 大肠杆菌质粒快速提取, PCR 扩增, 丝状真菌基因组 DNA 制备等操作参见文献[15]。

1.2.6 目的基因的 PCR 扩增及克隆

根据米根霉 L-乳酸脱氢酶基因 (*ldhA*) 序列 (GenBank Accession No. EF15228.1), 设计引物如下: Roldh1: 5'-CGCGGATCCATGGTATTACTCA-3', Roldh2: 5'-CCGAAGCTTTCAACAGCTACTTTTA-3' (下划线所示分别为 *Bam*H I、*Hind* III 酶切位点)。PCR 反应体系体积为 50 μ L, 扩增条件: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 60 s, 72 °C 延伸 60 s, 共 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。

1.2.7 质粒的构建

将 PCR 获得的 *ldhA* 基因用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切, 经纯化后与经同样酶切的质粒 pYX212-*kanMX* 连接, 构建重组质粒 pYX212-*kanMX-ldhA*。

1.2.8 G418 的敏感测定

收集耐酸酵母菌体, ddH₂O 洗涤 2 次后悬浮, 30 °C 进行饥饿培养 2~3 h。培养后的细胞经适当稀释后涂布于含不同浓度 G418 抗生素的 YEPD 平板, 30 °C 培养 3~4 d, 观察生长情况。

1.2.9 转化方法

酵母转化采用电穿孔转化法, 转化后涂布于含 G418 抗性的 YEPD 平板, 挑选转化子。

电穿孔转化条件: 1 500 V, 5 ms, 电击 2 次; 电脉冲仪的型号为 ECM399。

1.2.10 转化子验证

菌落 PCR 验证和 SDS-PAGE 电泳验证等操作均参见文献[15]。

1.2.11 重组菌发酵实验

种子液制备: 将重组菌从 YEPD 抗性平板上刮取一单菌落至 YEPD 液体培养基 (250 mL 三角瓶, 装液量为 30 mL) 中, 30 °C、150 r/min 培养 24 h, 即为种子液, 转接发酵液时接种量为 10%。

重组菌发酵产乳酸验证实验: 将不同重组菌的种子液分别接种至发酵培养基 (250 mL 三角瓶, 装液量为 50 mL), 30 °C、150 r/min 培养 48 h。

发酵液初始 pH 值对发酵产乳酸的影响: 分别在发酵培养基中滴加乳酸, 使其培养基 pH 值分别为 2.5、3.0、3.5、4.0, 并以未调节 pH 值的培养基 (pH 7.0) 作空白对照。将种子液分别转接至已调节 pH 值的发酵培养基中 (250 mL 三角瓶, 装液量为 50 mL), 30 °C、150 r/min 培养 48 h。

2 结果与分析

2.1 耐酸酵母的分离筛选

从自然界 96 个样品中筛选出 55 株能在乳酸调节 pH 值达 2.5 的 YEPD 培养基中存活或生长的酵母菌株, 其中 17 株酵母能够生长。逐一经 YEPD 培养基、乳酸筛选培养基和乳酸单碳源培养基中摇瓶发酵初筛, 以生长量为指标进一步复筛。对多个批次的酵母反复比较之后, 确定一株编号为 No.4 的菌株能在 pH 值 2.5 YEPD 培养基中生长良好。

2.2 分类鉴定

2.2.1 生理生化与分子生物学鉴定

菌株 No.4 有典型的酵母菌株形态, 细胞呈卵形或球形, 多边芽殖。对此菌进行分子生物学鉴定, 将此菌株的 ITS 序列与 NCBI 中同源性较高的几株菌进行比对和同源性分析, 同源树 (图 1) 清楚地显示出以分子生物学特征为基础, 菌株 No.4 与 NCBI 中其他一些参考酵母菌株的亲缘关系。由实验获得的结果可以推断此耐酸酵母的分类地位应属于假丝酵母属 *Candida* sp.。同时对此菌进行生理生化鉴定, 结果如表 2 所示, 可初步推测该耐酸酵母应属于木兰假丝酵母 *Candida magnolia*。

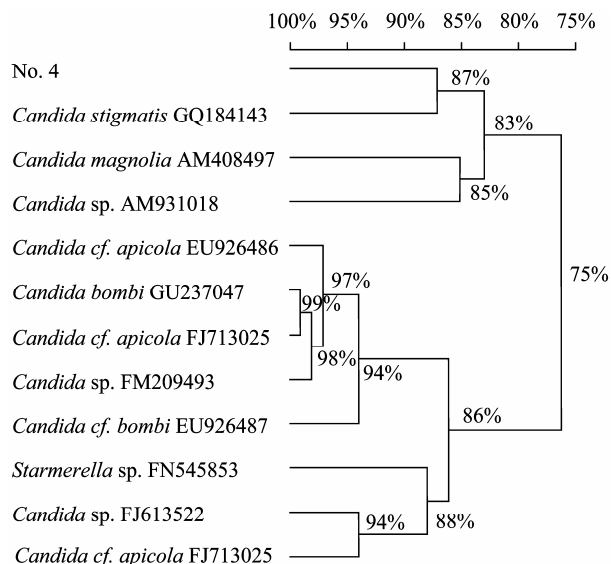


图 1 DNAMAN 软件绘制菌株 No.4 的同源树

Fig. 1 Homology tree of strain No.4 drawn by DNAMAN.

表 2 菌株 No.4 的生理生化特征

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of strain No.4

Nitrogen-carbon sources	Utilization	Nitrogen-carbon sources	Utilization
Glucose	+	D-xylose	+
L-sorbose	-	Cellulobiose	-
Maltose	-	Inulin	-
Trehalose	-	Methanol	-
Melibiose	-	Ethanol	-
Melezitose	-	Inositol	-
Soluble starch	-	Galactitol	-
L-arabinose	-	Adonitol	-
D-arabinose	-	Glycerol	+
Raffinose	-	D-sorbitol	+
D-ribose	-	Erythritol	-
D-mannose	+	DL-lactic acid	-
Galactose	+	Citric acid	D
Lactose	-	Succinic acid	-
Sucrose	-	D-gluconic acid	+
L-rhamnose	-	L-lysine	+
D-mannose	+	Potassium nitrate	+

2.2.2 *C. magnolia* 的乳酸耐受性

对耐酸酵母 *C. magnolia* 进行乳酸耐受性实验, 将其分别接种至添加不同量乳酸的 YEPD 培养基

中, 观察其乳酸含量对此耐酸菌生长的影响, 其结果如图 2 所示, 在乳酸浓度低于 68 g/L (pH 值约为 2.5) 时, 培养基中的乳酸对 *C. magnolia* 的生长影响较小, 高于 68 g/L 时, 菌体生长逐渐受到抑制, 但此耐酸菌在乳酸浓度高达 93.5 g/L 时, 仍能够生长, 其 *OD* 可达到 6.5, 说明此菌对乳酸具有极高的耐受性, 为耐酸微生物。

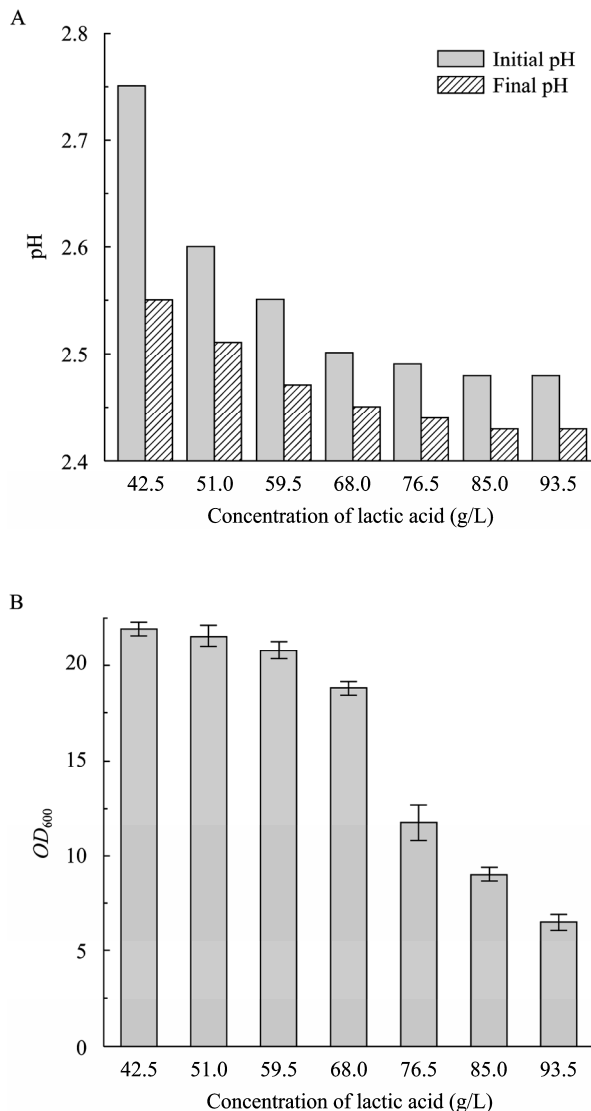


图 2 乳酸含量对培养基 pH 值 (A) 及 *C. magnolia* 生长 (B) 的影响

Fig. 2 Effect of concentration of lactic acid on the pH of medium (A) and the growth of *C. magnolia* (B).

2.2.3 *C. magnolia* 的有机酸利用分析

对耐酸酵母 *C. magnolia* 进行有机酸利用实验, 将其分别接种至筛选培养基和单碳源培养基中, 发现在筛选培养基中生长旺盛, 而在单碳源培养基中基本不能生长, 且 *C. magnolia* 对乳酸的利用率均低于 5%。说明 *C. magnolia* 能在营养丰富的高浓度乳酸条件正常生长, 但不能在以乳酸为唯一碳源的培养基中生长。

2.3 产乳酸重组菌的构建

因为 *C. magnolia* 的耐乳酸而不利用乳酸的特性, 本实验设计以此菌为研究对象, 通过表达米根霉乳酸脱氢酶基因, 试图将代谢流引向乳酸形成方向, 以达到生产乳酸的目的。

2.3.1 质粒构建及酶切

按照 1.2.7 构建质粒, 得到表达载体 pYX212-kanMX-ldhA, 将该质粒进行酶切验证, 结果如图 3 所示, 证明质粒构建成功。

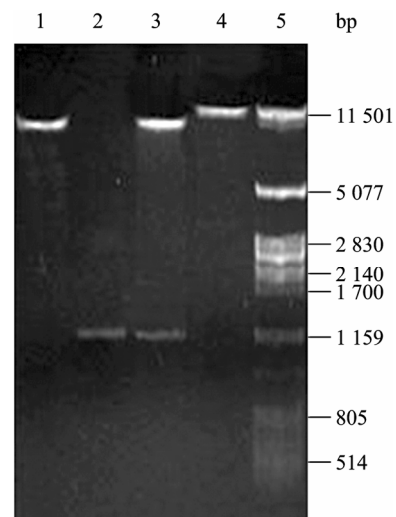


图 3 重组表达载体 pYX212-kanMX-ldhA 的鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant expression vector pYX212-kanMX-ldhA. 1: plasmid pYX212-kanMX digested with *Bam*H I digestion; 2: identification of recombinant plasmid pYX212-kanMX-ldhA by PCR; 3: recombinant plasmid pYX212-kanMX-ldhA digested with *Bam*H I and *Hind* III digestion; 4: recombinant plasmid pYX212-kanMX-ldhA digested with *Bam*H I digestion; 5: λ DNA/*Pst* I marker.

2.3.2 G418 的敏感测定

重组菌的筛选要以 G418 抗生素为筛选压力, 因此需要测定原始耐酸酵母对 G418 抗生素的敏感性, 按照 1.2.8 进行实验, 发现能够完全抑制原始耐酸酵母菌株 *C. magnolia* 生长的最低 G418 浓度为 800 mg/L。因此在后续筛选转化子实验中, 均在培养基中添加 800 mg/L 的 G418 来抑制原始菌的生长。

2.3.3 质粒 pYX212-kanMX-ldhA 的电转化和筛选重组酵母转化子

将质粒 pYX212-kanMX-ldhA 电击转化进入感受态酵母 *C. magnolia* 细胞中, 转化后的酵母涂布在含 800 mg/L G418 抗生素的 YEPD 平板上, 按照 1.2.9 挑选转化子进行菌落 PCR 扩增, 电泳验证 (PCR 扩增 *ldhA* 片段)。结果发现菌株 *C. magnolia-2* 和 *C. magnolia-3* 均有一条大小约为 1.0 kb 的片段, 与 *ldhA* 片段大小基本一致, 而对照原始菌株则没有, 因此推测此条带即为 *ldhA* 片段。即 *C. magnolia-2* 和 *C. magnolia-3* 已成功转入重组质粒 pYX212-kanMX-ldhA。

将经 PCR 验证的转化子 *C. magnolia-2*、*C. magnolia-3*、及原始菌株 *C. magnolia* 进行细胞破碎, 细胞破碎液稀释适当浓度后进行 SDS-PAGE 电泳验证, 结果如图 4 所示, 转化子 *C. magnolia-2* 和 *C. magnolia-3* 均在相对分子量约为 43 kDa 附近出现了明显的蛋白表达条带, 与预期大小相一致, 而原始菌 *C. magnolia* 则未见此蛋白的表达。进一步证明了 *C. magnolia-2* 和 *C. magnolia-3* 为阳性转化子, 外源乳酸脱氢酶基因已得到表达。

2.4 产乳酸酵母发酵性能的研究

2.4.1 重组菌发酵产乳酸验证实验

为测定上述实验所得重组菌的发酵能力, 进行通风发酵产乳酸实验。将重组菌 *C. magnolia-2* 和 *C. magnolia-3* 及原始菌株 *C. magnolia* 接种于发酵培养基中, 其结果如图 5 所示, 原始菌株不能利用葡萄糖进行发酵生产乳酸, 而重组菌在发酵过程中明显

有乳酸生成, 且随着发酵过程的进行, 乳酸逐渐得到积累。对 *C. magnolia-2* 和 *C. magnolia-3* 两株重组菌的最终乳酸含量进行比较, 发现 *C. magnolia-2* 最终乳酸含量略高于 *C. magnolia-3*, 因此在后续发酵试验中选择 *C. magnolia-2* 进一步研究。

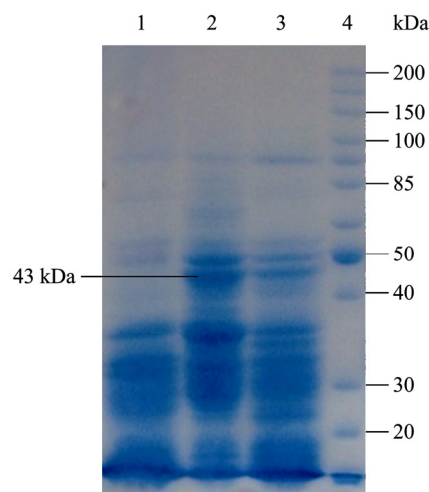


图 4 *C. magnolia* 及其重组菌 SDS-PAGE 电泳验证结果
Fig. 4 SDS-PAGE of *C. magnolia* and its recombinant cells. 1: *C. magnolia*; 2: *C. magnolia-2*; 3: *C. magnolia-3*; 4: protein marker.

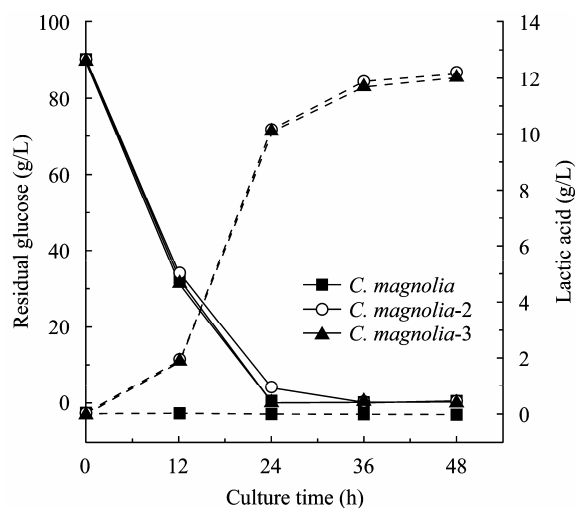


图 5 重组菌产乳酸性能的验证

Fig. 5 Different recombinants fermented in fermentation medium. Solid line represents the concentration of glucose, and dash line represents the concentration of lactic acid.

2.4.2 发酵液初始 pH 值对发酵产乳酸的影响

因宿主菌为耐酸菌，为研究此重组菌是否同样可在酸性条件下具有发酵生成乳酸的能力，设计实验将 *C. magnolia-2* 分别接种于 pH 值不同的发酵培养基。其结果如图 6 所示，重组菌 *C. magnolia-2* 于培养基 pH 值范围在 2.5~7.0 范围内进行发酵，均能转化葡萄糖生成乳酸，且在 pH 为 3.5 时糖酸转化率最高，达到 16% 以上。

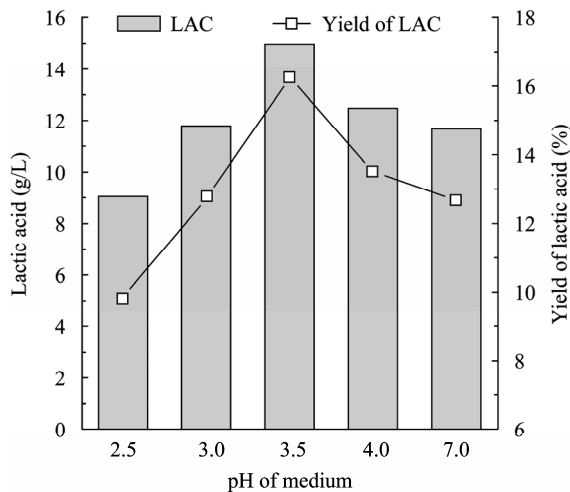


图 6 培养基初始 pH 值对发酵产乳酸的影响

Fig. 6 Effect of initial pH on lactic acid production. LAC: lactic acid.

3 讨论

在酵母产乳酸工程菌研究方面，国外已有报道。Skory 等将米根霉的 L-乳酸脱氢酶基因转入酿酒酵母中，在 pH 5.5 时糖酸转化率最高时，在 pH 3.5 时，糖酸转化率降低了约 10%，产酸明显受到了抑制^[6]；其他关于应用酵母生产 L-乳酸的研究，绝大多数依旧需要以 CaCO_3 、NaOH 或氨水调节，将发酵过程的 pH 值控制在 4~6.6，才能使发酵正常进行^[10-12]，说明这些工程菌株在乳酸耐受性方面并没有很大的优势。

本研究首次从自然界中筛选得到一株耐高浓乳酸（以乳酸调节 pH 值至 2.5）的耐酸酵母菌株，并且此耐酸菌株不能利用乳酸。对该菌进行分子生物

学和生理生化鉴定后推断其分类地位为木兰假丝酵母 *C. magnolia*。并首次以此为出发菌株，采用基因工程育种技术，在耐酸酵母中表达米根霉乳酸脱氢酶基因，构建乳酸代谢途径，代谢葡萄糖生成乳酸，证明了利用基因工程技术使此耐酸酵母生产乳酸的可行性。重组菌在 pH 2.5~7.0 之间均能有效生成乳酸，在 pH 值为 3.5 时，糖酸转化率最高，并且在发酵过程中 pH 值降低至 2.5 时，仍有乳酸继续生成。因此，该重组菌在乳酸发酵过程中大幅减少碳酸钙等中和剂用量方面表现出较好的应用前景；同时，在低 pH 条件下可以一定程度上减少杂菌的污染几率。

将本实验所得的重组菌应用于乳酸发酵时，初步优化其培养条件，即可使乳酸产量达到 40 g/L 以上（数据另发），表明重组菌株通过进一步的发酵工艺优化具有较好的提升空间。下一步工作中，为提高乳酸产量和转化率，可在本文构建的菌株基础上深入研究中间代谢产物积累与乳酸积累之间的关系，并确定其他可能的限速因素，如乙醇、甘油和 NADH 等对酵母乳酸代谢的影响，最终解决由于中间代谢产物的积累而导致乳酸产量较低的问题；对发酵条件如 pH 值和溶氧等进行精确调节控制也可进一步提高发酵水平。同时，基于本文的研究策略，通过更换乳酸脱氢酶基因的启动子等调控序列或通过增加拷贝数以增强其乳酸脱氢酶的酶活，将有可能进一步较大幅度提高乳酸发酵产率。

REFERENCES

- [1] Maas RHW, Bakker RR, Jansen MLA, et al. Lactic acid production from lime-treated wheat straw by *Bacillus coagulans*: neutralization of acid by fed-batch addition of alkaline substrate. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 78(5): 751-758.
- [2] Yun JS, Ryu HW. Lactic acid production and carbon catabolite repression from single and mixed sugars using *Enterococcus faecalis* RKY1. *Proc Biochem*, 2001, 37(3): 235-240.

- [3] Wang LM, Zhao B, Liu B, et al. Efficient production of l-lactic acid from corncob molasses, a waste by-product in xylitol production, by a newly isolated xylose utilizing *Bacillus* sp. strain. *Bioresour Technol*, 2010, 101(20): 7908–7915.
- [4] Wang DR. Development and use of lactic acid. *Grain Proc*, 2009, 34(1): 44–47.
汪多仁. L-乳酸的开发与应用进展. *粮食加工*, 2009, 34(1): 44–47.
- [5] Li J, Tang Y, Liang FL, et al. Cloning and function analysis of L-lactate dehydrogenase gene from *Lactobacillus* sp. MD-1. *Chin J Biotech*, 2004, 20(5): 725–729.
李剑, 唐贇, 梁凤来, 等. L-乳酸脱氢酶基因克隆及功能分析. *生物工程学报*, 2004, 20(5): 725–729.
- [6] Jiang ST, Zheng Z, Zhu Y, et al. Repeated intermittent L-lactic acid fermentation technology by self-immobilized *Rhizopus oryzae*. *Chin J Biotech*, 2008, 24(10): 1729–1733.
姜绍通, 郑志, 朱羽, 等. 无载体固定化米根霉重复间歇发酵生产 L-乳酸. *生物工程学报*, 2008, 24(10): 1729–1733.
- [7] Cohn GC. Lactic acid producing yeast cells having nonfunctional L- or D-lactate: ferricytochrome c oxidoreductase gene: US, WO/2007/117282 A2. 2007-10-18.
- [8] Yu L, Pei XL, Lei T. Study on L-lactic acid production by glucose-tolerant *Lactobacillus rhamnosus* GS2. *Food Res Des*, 2007, 28(11): 84–87.
于雷, 裴晓林, 雷霆. 耐糖鼠李糖乳杆菌发酵生产 L-乳酸的研究. *食品研究与开发*, 2007, 28(11): 84–87.
- [9] Xu GQ, Chu J, Wang YH, et al. Effects of different neutralizers on L(+)-lactic acid fermentation. *Ind Microbiol*, 2007, 37(4): 1–5.
徐国谦, 储炬, 王永红, 等. 不同的中和剂对 L(+)-乳酸发酵的影响. *工业微生物*, 2007, 37(4): 1–5.
- [10] Dequin S, Barre P. Mixed lactic acid-alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* expressing the *Lactobacillus casei* L(+)-LDH. *Biotechnology*, 1994, 12(2): 173–177.
- [11] Skory CD. Lactic acid production by *Saccharomyces cerevisiae* expressing a *Rhizopus oryzae* lactate dehydrogenase gene. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2003, 30(1): 22–27.
- [12] Ishida N, Saitoh S, Tokuhiko K, et al. 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.
- [13] De Hemptinne A, Marrannes R, Vanheel B. Influence of organic acids on intracellular pH. *Am J Physiol*, 1983, 245(3): 178–183.
- [14] Barnett JA, Payne RW. *Characteristics and Identification*. Qingdao: Qingdao Ocean University Press, 1991.
巴尼特 JA, 佩恩 RW. 酵母菌的特征与鉴定手册. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1991.
- [15] Ausubel FM, Brent E, Kingston RE, et al. *Short Protocol in Molecular Biology*. Yan ZY, Wang HL, Translated. Beijing: Science Press, 1998.
奥斯伯 FM, 布伦特 E, 金士顿 RE, 等. 精编分子生物学实验指南. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1998.