



热带假丝酵母脂肪醛脱氢酶基因 *CtAld1* 和 *CtAld2* 的功能评价

王泽政¹, 张利华¹, 张满琪¹, 胡世元², 李莉², 沈微¹, 樊游¹, 陈献忠^{1*}

¹江南大学生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

²赢创(上海)投资管理有限公司, 上海 201108

摘要:【目的】热带假丝酵母是发酵法生产二元酸的重要工业菌株, 具有较高的 ω -氧化活性。脂肪醛脱氢酶在 ω -氧化途径中起重要作用, 催化脂肪醛生成脂肪酸, 但其具体催化功能及对细胞生理影响还未被系统研究。本文通过删除脂肪醛脱氢酶基因 *CtAld1* 和 *CtAld2* 鉴定了其在 ω -氧化途径中的功能。【方法】通过基因组信息挖掘获得热带假丝酵母脂肪醛脱氢酶基因 *CtAld1* 和 *CtAld2* 序列, 在此基础上, 通过同源重组敲除 *CtAld1* 和 *CtAld2* 基因。考察突变株的生长和胞内脂肪醛脱氢酶活性变化, 并评价 *CtAld1* 和 *CtAld2* 基因敲除对细胞二元酸合成能力的影响。【结果】分别获得了热带假丝酵母突变株 XZX-1 ($\Delta CtAld1/\Delta CtAld1$)、XZX-2 ($\Delta CtAld2/\Delta CtAld2$)和 XZX-12 ($\Delta CtAld1/\Delta CtAld1$, $\Delta CtAld2/\Delta CtAld2$)。在以十二烷为唯一碳源的培养基中, 敲除 *CtAld2* 基因显著抑制细胞的生长, 胞内脂肪醛脱氢酶活性降低为出发菌株的 30%; 敲除 *CtAld1* 基因尽管会使细胞损失一部分醛脱氢酶活性, 但能够一定程度地提升细胞在十二烷中的生长性能。敲除 *CtAld1* 或 *CtAld2* 会降低菌株二元酸产量, 组合敲除 *CtAld1* 和 *CtAld2* 严重削弱菌株十二碳二元酸的合成能力。【结论】*CtAld2* 对热带假丝酵母细胞的生长和十二碳二元酸的合成具有重要作用, 缺失 *CtAld1* 或 *CtAld2* 基因降低细胞的二元酸合成能力。*CtAld1* 和 *CtAld2* 可作为热带假丝酵母 ω -氧化途径代谢工程改造的潜在靶点。

关键词: 热带假丝酵母, 脂肪醛脱氢酶, 基因敲除, 十二碳二元酸

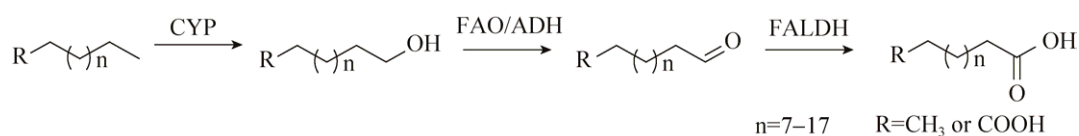
热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)是一种具有重要工业应用价值的非常规酵母, 可以吸收长链烷烃并将其转化为脂肪酸用以生长和繁殖^[1]。热带假丝酵母转化烷烃为二元酸的过程主要通过 ω -氧

化完成, 细胞色素 P450 单加氧酶(CYP)、脂肪醇氧化酶(FAO)、脂肪醇脱氢酶(ADH)和脂肪醛脱氢酶(FALDH)参与了相关反应(图 1)。烷烃(或脂肪酸)被细胞吸收后, 末端甲基在细胞色素 P450 单加氧

基金项目: 江苏省自然科学基金(BK20171138); 国家“863 计划”(2013AA102101-5)

*通信作者。Tel/Fax: +86-510-85918122; E-mail: xzchen@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2017-11-18; 修回日期: 2018-01-10; 网络出版日期: 2018-01-24

图 1. 热带假丝酵母的 ω -氧化途径Figure 1. ω -oxidation pathway of *Candida tropicalis*.

酶催化下被氧化而生成脂肪醇, 随后在脂肪醇氧化酶(或脂肪醇脱氢酶)和脂肪醛脱氢酶的相继作用下生成单羧酸(或二元酸), 最终或分泌到胞外, 或以脂质的形式储藏在细胞中^[2], 或通过 β -氧化途径分解为细胞生长与繁殖提供物质和能量。 β -氧化途径阻断的热带假丝酵母能够高效地积累重要化工原料长链二元酸^[3]。

增强 ω -氧化是提升热带假丝酵母菌株产酸能力的一种策略, 目前已有许多针对细胞色素 P450 单加氧酶和脂肪醇氧化酶基因的研究。CYP 被认为是 ω -氧化途径中的限速酶, Craft 等用不同链长度的烷烃或脂肪酸对热带假丝酵母 CYP 基因转录进行诱导, 通过比较 mRNA 丰度, 发现 CYP52A13 在 10 个前期克隆的 CYP 基因中转录水平最高^[4], 可作为菌株 ω -氧化途径改造的候选基因。Eirich 等克隆了热带假丝酵母中的 FAO1 和 FAO2 (FAO2a 和 FAO2b) 基因, 在大肠杆菌中实现了异源表达, 并研究了相应酶的酶学性质^[5]。已有研究证实热带假丝酵母中脂肪醛脱氢酶活性的存在^[6], 但针对具体蛋白以及相关基因都未有进一步的深入研究。

哺乳动物脂肪醛脱氢酶 ALDH3A2 和其直系同源的 HFD1 (来自酿酒酵母) 可以氧化十六烯醛为十六烯酸^[7]。参考上述两种蛋白的氨基酸序列信息, Iwama 等在解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 基因组中挖掘出 4 个可能编码脂肪醛脱氢酶的基因 (HFD1、HFD2、HFD3 和 HFD4), 敲除这 4 个

基因的解脂耶氏酵母菌株不能利用 12–18 碳的烷烃生长, 而异源表达 HFD1、HFD2 和 HFD4 基因可以明显提高大肠杆菌对十二醛和十四醛的氧化能力^[7]。本文通过对热带假丝酵母的基因组信息进行挖掘, 克隆出 2 对可能与长链脂肪醛代谢相关的基因 CtAld1 和 CtAld2, 初步研究它们在热带假丝酵母烷烃代谢和二元酸生产中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 大肠杆菌 JM109, 用于质粒构建, 由江南大学高校工业微生物资源与信息中心保藏; 热带假丝酵母 XZX, 本研究室通过诱变热带假丝酵母 ATCC 20336 所得^[8]; 热带假丝酵母 03 菌株(肉毒碱酰基转移酶基因 CAT 双敲菌株)和质粒 Tm-gda324-URA3 由本实验室保藏^[9]; pMD19-T (Simple) 载体, 用于基因克隆, 购自 TaKaRa 公司;
1.1.2 主要酶和试剂: 限制性内切酶、DNA Ligation Kit 和 DNA 聚合酶等购自 TaKaRa 公司; PCR 引物由苏州泓迅生物科技股份有限公司合成(表 1); 酵母氨基(YNB)、氨基青霉素钠和 5-氟乳清酸(5-FOA) 购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 十二烷、月桂酸甲酯、4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)和 β -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺) 钠盐购自 Sigma 公司; 十二醛购自阿拉丁试剂公司; 其他试剂均为国产分析纯。

表 1. 本研究中使用的引物
Table 1. Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')	Restriction sites
Ald1-1F	ATGAGTAAGTCATACAAGTTGCCA	
Ald1-1R	CTACAAAGAGGCACCAATAAAATC	
ReAld1-1F	TGCA <u>CTGCAGT</u> CTGGACATGGTGCCTACCACGGA	<i>Xba</i> I
ReAld1-1R	CTAGT <u>CTAGAC</u> CAGCAGCATTGGCAGCAGCGGC	<i>Pst</i> I
Ald1-2F	AAGCAAAGCCAACTCCTA	
Ald1-2R	AGATGTATTCAGCCAACG	
ReAld1-2F	CTAGT <u>CTAGAG</u> GAGGGACGTTATCGAGAA	<i>Xba</i> I
ReAld1-2R	TGCA <u>CTGCAGAC</u> ACACGGTGGAAATCTT	<i>Pst</i> I
YZAld1R	CGATCTTATGAACTAGCTCTACA	
Ald2-1F	CTATTGCTTATTAGTGATGAACT	
Ald2-1R	ATGTCCCCACCATCTAAATT	
ReAld2-1F	CTAGT <u>CTAGACA</u> ACTCATTCAAGCCACCC	<i>Xba</i> I
ReAld2-1R	TGCA <u>CTGCAGG</u> CCAGCTCGACCAGATCTT	<i>Pst</i> I
Ald2-2F	GAACCGCTGGTGAAGATGT	
Ald2-2R	ATGTCGAGCTTGCATGAGT	
ReAld2-2F	CTAGT <u>CTAGAGG</u> TCTCTCAGGAATACCACCATCG	<i>Xba</i> I
ReAld2-2R	TGCA <u>CTGCAGGA</u> ATTCTACCCTAAGTACCAAAGACACCA	<i>Pst</i> I
YZAld2R	CACAAGCAAGAAGATCACCAA	

The underlined are restriction enzyme cutting sites.

1.1.3 主要培养基 (1) LB 培养基(g/L) 酵母粉 5, 蛋白胨 10, 氯化钠 10。(2) MM 培养基(g/L): YNB 6.7, 硫酸铵 10, 葡萄糖 20。(3) SM 培养基: MM 培养基中加入 0.006% (W/V) 尿嘧啶。(4) 5-FOA 培养基: 于 SM 培养基中添加 0.2% (W/V) 5-FOA。(5) C+培养基(g/L): YNB 6.7, 硫酸铵 10, 尿嘧啶 0.06, 另根据不同需求, 灭菌后添加 20 mL 十二烷或月桂酸甲酯。(6) 发酵培养基(g/L): YNB 6.7, 酵母粉 3, 硫酸铵 3, 磷酸氢二钾 1, 磷酸二氢钾 1, 葡萄糖 75。固体培养基另加入 20 g/L 琼脂。

1.2 醛脱氢酶氨基酸序列分析

参照文献[7]从 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 数据库查找解脂耶氏酵母脂肪醛脱氢酶 HFD1、HFD2、HFD3 和 HFD4 以及酿

酒酵母 ScHFD1 的氨基酸序列。根据基因组注释从热带假丝酵母 ATCC20336 基因组序列(前期测序并注释, 尚未公开)中获得潜在的脂肪醛脱氢酶氨基酸序列。用 NCBI 中的 Constraint-based Multiple Alignment Tool 对热带假丝酵母潜在脂肪醛脱氢酶序列和上述已知脂肪醛脱氢酶的序列进行比对, 在此基础上选择 Fast Minimum Evolution 方法绘制进化树, Max Seq Difference 选定为 0.75, Distance 选定为 Grishin (protein); 氨基酸序列相似性分析用 DNAMAN 软件中的两序列比对功能完成。

1.3 敲除质粒的构建

基因敲除策略参照文献[10]。以 *CtAld1* 基因的敲除质粒的构建为例, 如图 2 所示, 根据预测的醛脱氢酶基因的序列设计引物 Ald11F 和 Ald11R,

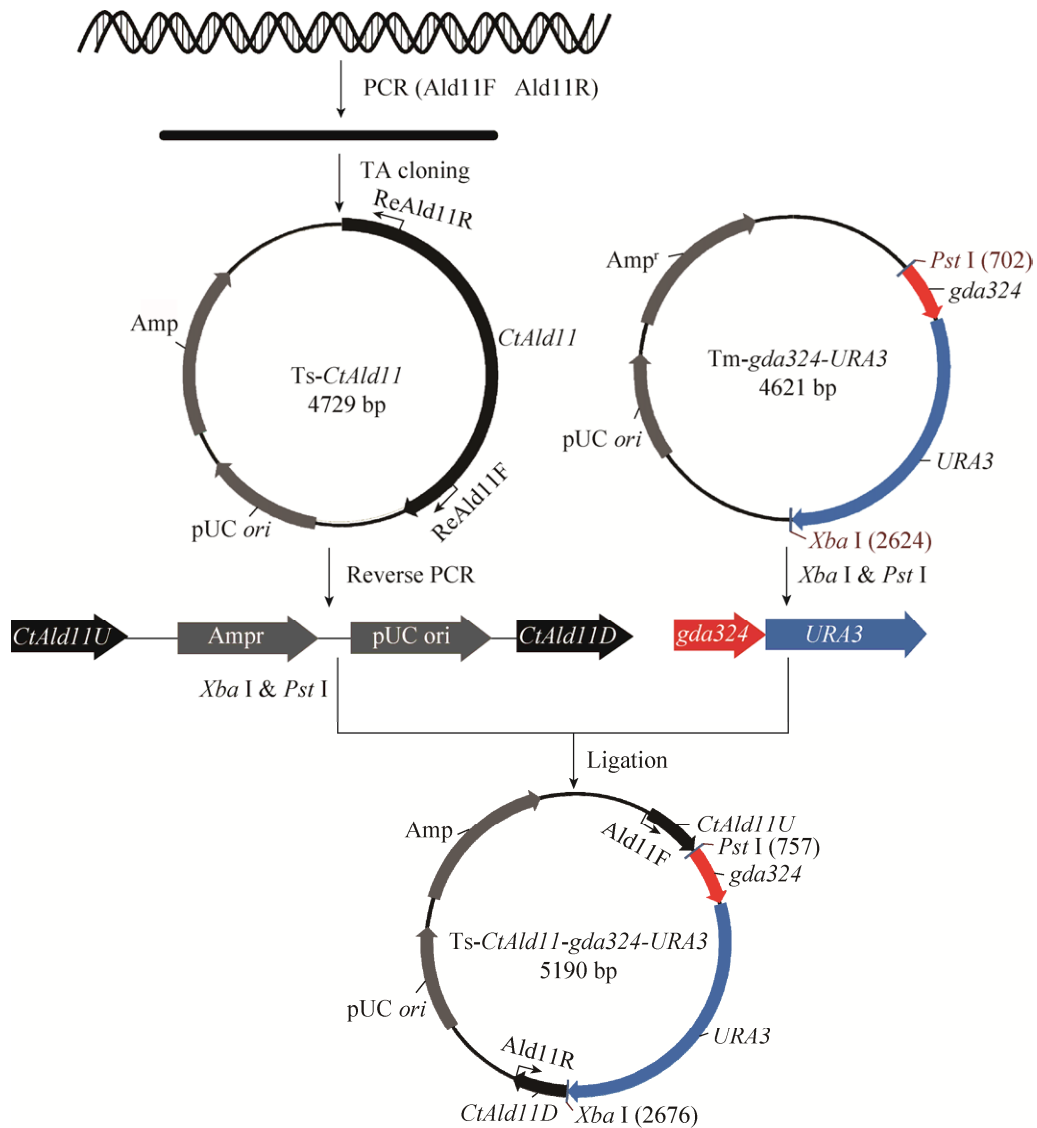


图 2. 敲除质粒 *Ts-CtAld11-gda324-URA3* 的构建

Figure 2. Construction of *CtAld1* disruption plasmid *Ts-CtAld11-gda324-URA3*.

以热带假丝酵母 ATCC 20336 基因组 DNA 为模板, PCR 扩增得到醛脱氢酶基因, 通过 TA 克隆连接到 pMD19-T (Simple) 上, 所得质粒命名为 *Ts-CtAld11*; 以 *Ts-CtAld11* 质粒为模板, 设计引物 *ReAld11F* 和 *ReAld11R*, 反向 PCR 获得携带同源臂的载体片段 *CtAld11U-Ts-CtAld11D*, 同时分别在两端引入酶切位点 *Pst I* 和 *Xba I* 将得到的片段和质粒 *Tm-gda324-URA3* 用上述两种酶消化, 纯

化 *CtAld11U-Ts-CtAld11D* 片段和 *gda324-URA3* 片段, 最后将这 2 个片段连接, 获得 *CtAld1* 敲除质粒 *Ts-CtAld11-gda324-URA3*。以该质粒为模板, *Ald11F* 和 *Ald11R* 为引物进行 PCR 可获得 *CtAld1* 的敲除盒片段。第 2 个 *CtAld1* 基因敲除质粒选用 *CtAld1* 内侧基因序列构成同源臂, 构建基因敲除质粒 *Ts-CtAld12-gda324-URA3*。 *CtAld2* 基因敲除质粒 *Ts-CtAld21-gda324-URA3* 和 *Ts-CtAld22-gda324-*

URA3 的构建流程与上述过程类似。

1.4 热带假丝酵母脂肪醛脱氢酶基因的敲除

热带假丝酵母转化方法参照文献[9]。本研究以尿嘧啶缺陷型菌株 XZX 为出发菌株, 转化敲除盒片段, 实现目的基因的敲除; 以 *URA3* 基因为标记基因, 用不含尿嘧啶的 MM 培养基筛选转化子, 提取转化子基因组并通过 PCR 鉴定转化子基因型。得到阳性转化子后, 在 5-FOA 培养基平板上筛选消去标记基因 *URA3* 的菌株, 以便循环利用 *URA3* 基因作为筛选标记进行基因的不断敲除。

1.5 脂肪醛脱氢酶活力测定

脂肪醛脱氢酶活力测定方法在参考文献[7]基础上有所改动。菌株单菌落用 SM 培养基在 30 °C 和 200 r/min 条件下培养 36 h 后, 转接到新鲜的 SM 培养基, 以 2% (V/V) 终浓度的量添加十二烷, 培养 20 h。取 4 mL 菌液离心收集细胞, 用 PBS 缓冲液洗 2 次后, 悬浮在缓冲液(25 mmol/L HEPES, 100 mmol/L KCl, 10% 甘油, 1 mmol/L 二硫苏糖醇, 用 5 mol/L NaOH 溶液调节 pH 至 7.3)中, 加入 0.45–0.50 mm 直径的玻璃珠后超声波破碎, 每分钟不间断超声 30 s, 共 30 min。破碎液在 4 °C 下 1000×g 离心 10 min, 离心 2 次。取上清液, 加入终浓度为 1% (V/V) 吐温 80, 冰上放置 20 min 后, 在 4 °C 下 13000×g 离心 10 min。上清液作为粗酶液用于酶活测定, 粗酶液中总蛋白量用 Bradford 法测定。

十二醛以终浓度 1 mmol/L 的量与 M 缓冲液 [25 mmol/L HEPES, 100 mmol/L 甘氨酸, 0.25% (V/V) 吐温 80, 用 5 mol/L NaOH 调节 pH 至 7.3] 混合, 室温下超声处理 1 min。取 140 μL 该混合液、10 μL 粗酶液和 50 μL 4 mmol/L NAD^+ (用 M-buffer 配制) 溶液混合, 30 °C 保温反应 45 min。于 340 nm 处测吸光值。NADH 的消光系数为 6.22 L/mmol,

1 个酶活单位(U)定义为每分钟催化生成 1 μmol 的 NADH 的酶量。

1.6 基因敲除菌株生长评价

菌株单菌落用 SM 培养基培养 36 h 后, 取适量种子液转接到 SM 培养基中, 控制初始 OD_{600} 在 0.10–0.15 间, 之后每 8 h 取样测 OD_{600} 。

菌株单菌落用 SM 培养基培养 36 h 后, 取适量菌液接种到 SM 培养基中, 加入终浓度为 2% (V/V) 的月桂酸甲酯或十二烷, 培养 36 h 后, 取适量菌液离心收集菌体, 水洗 1 次后用无菌水重悬, 将重悬后的菌液接种到 C+培养基中, 控制初始 OD_{600} 在 0.10–0.15 间, 之后每 24 h 取样测 OD_{600} 。

1.7 菌株二元酸发酵

发酵实验流程参考文献[11]。从甘油管中接种 200 μL 菌液至 SM 培养基, 并添加 2% (V/V) 十二烷, 30 °C、200 r/min 培养 48 h 后, 按 10% 接种量转接至发酵培养基中, 发酵开始。60 h 将发酵液 pH 调至 6.0 左右, 72 h 将 pH 调至 7.2 左右, 之后每隔 12 h 调 pH 至 7.2 左右, 每 24 h 补糖 1 次。72 h 和 120 h 补加十二烷 2% (V/V)。发酵周期 165 h。发酵液中二元酸浓度用 0.05 mol/L 氢氧化钠溶液滴定测定^[12]。

2 结果和分析

2.1 热带假丝酵母长链脂肪醛脱氢酶基因序列分析

对热带假丝酵母 ATCC 20336 菌株全基因组序列进行分析, 发现其中 5 对等位基因可能编码醛脱氢酶, 将其命名为 *CtAld1*、*CtAld2*、*CtAld3*、*CtAld4* 和 *CtAld5*, 它们分别编码 668、545、501、167 和 478 个氨基酸。热带假丝酵母代谢烷烃途径

与解脂耶氏酵母相似,为挖掘与长链烷烃氧化相关的脂肪醛脱氢酶基因,参考解脂耶氏酵母醛脱氢酶 HFD1 (519 个氨基酸残基组成,简称为 519 aa)、HFD2 (521 aa)、HFD3 (533 aa)和 HFD4 (529 aa)的氨基酸序列,以及酿酒酵母 ScHFD1 (532 aa)的氨基酸序列,构建进化树如图 3 所示,CtAld1 和 CtAld2 与已知的脂肪醛脱氢酶亲缘关系较近。经比对发现 CtAld1 与 HFD1 相似度达到 45% (225 aa/500 aa,表示序列比对覆盖了 500 个氨基酸残基,其中 225 个相同),CtAld2 与 HFD4 相似度达到 44.60% (227 aa/509 aa)。

选择 CtAld1、CtAld2、HFD1 和 HFD4 这 4 个蛋白进行结构域分析(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>),发现它们均含有 ALDH_F14-YMR110C 保守结构域(NCBI 登录号 cd07135)。综上,CtAld1 和 CtAld2 基因在热带假丝酵母 ATCC 20336 中可能编码脂肪醛脱氢酶,影响热带假丝酵母产二元酸的能力。

2.2 脂肪醛脱氢酶基因的敲除

构建了 CtAld1 和 CtAld2 两对基因的敲除盒质粒,分别命名为 Ts-CtAld11-gda324-URA3、Ts-CtAld12-gda324-URA3、Ts-CtAld21-gda324-URA3 和 Ts-CtAld22-gda324-URA3。用 Pst I 和 Xba I 双酶切验证显示质粒构建正确(图 4-C)。

基因敲除流程如图 4-A 和 4-B。以上述敲除盒质粒为模板,用相应的同源臂引物 PCR 扩增出敲除盒转化热带假丝酵母菌株,长出转化子后,用上游同源臂引物和下游同源臂外侧引物对转化子进行验证(图 4-D, 4-E)。最终在热带假丝酵母 XZX 中实现了 CtAld1 和 CtAld2 的敲除,构建了 XZX-1 (*ura3/ura3 ctald1::gda324/ctald1::gda324 CtAld2/CtAld2*)、XZX-2 (*ura3/ura3 CtAld1/CtAld1 ctald2::gda324/ctald2::gda324*)、XZX-12 (*ura3/ura3 ctald1::gda324/ctald1::gda324 ctald2::gda324/ctald2::gda324*) 等菌株。

2.3 脂肪醛脱氢酶基因缺失对菌株生长的影响

通过对比出发菌株和基因敲除菌株在不同碳源中的生长状态,初步分析 CtAld1 和 CtAld2 基因的特点,结果如图 5 所示。在葡萄糖为唯一碳源的培养基中基因敲除菌株(XZX-1、XZX-2 和 XZX-12 菌株)生物量均能够在 86 h 左右达到较大值,生长状态与出发菌株 XZX 一致(图 5-A);以十二烷为唯一碳源时,基因敲除菌株和出发菌株延滞期均较长,但 96 h 后菌株间生长差异逐渐显现并扩大:XZX-1 逐渐超过出发菌株 XZX,而 XZX-2 菌株和 XZX-12 菌株的生长都受到严重抑制,生长 144 h 时 OD_{600} 未能达到 1,其中 XZX-12 生长更为缓慢(图 5-B);以月桂酸甲酯为唯一碳源

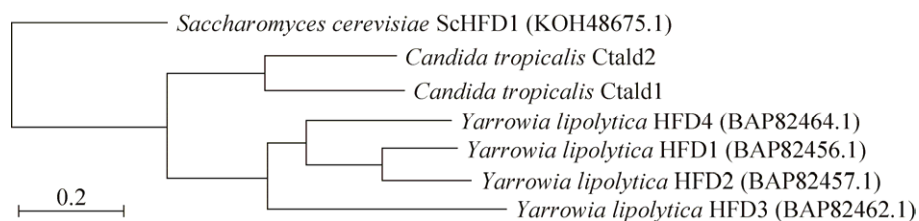


图 3. 来自酿酒酵母、解脂耶氏酵母和热带假丝酵母的醛脱氢酶蛋白的进化树

Figure 3. Phylogenetic tree among the putative fatty aldehyde dehydrogenase proteins in *Candida tropicalis* and the fatty aldehyde dehydrogenase proteins in other strains including *Saccharomyces cerevisiae* and *Yarrowia lipolytica*. The accession numbers of each protein sequences from NCBI are given in brackets.

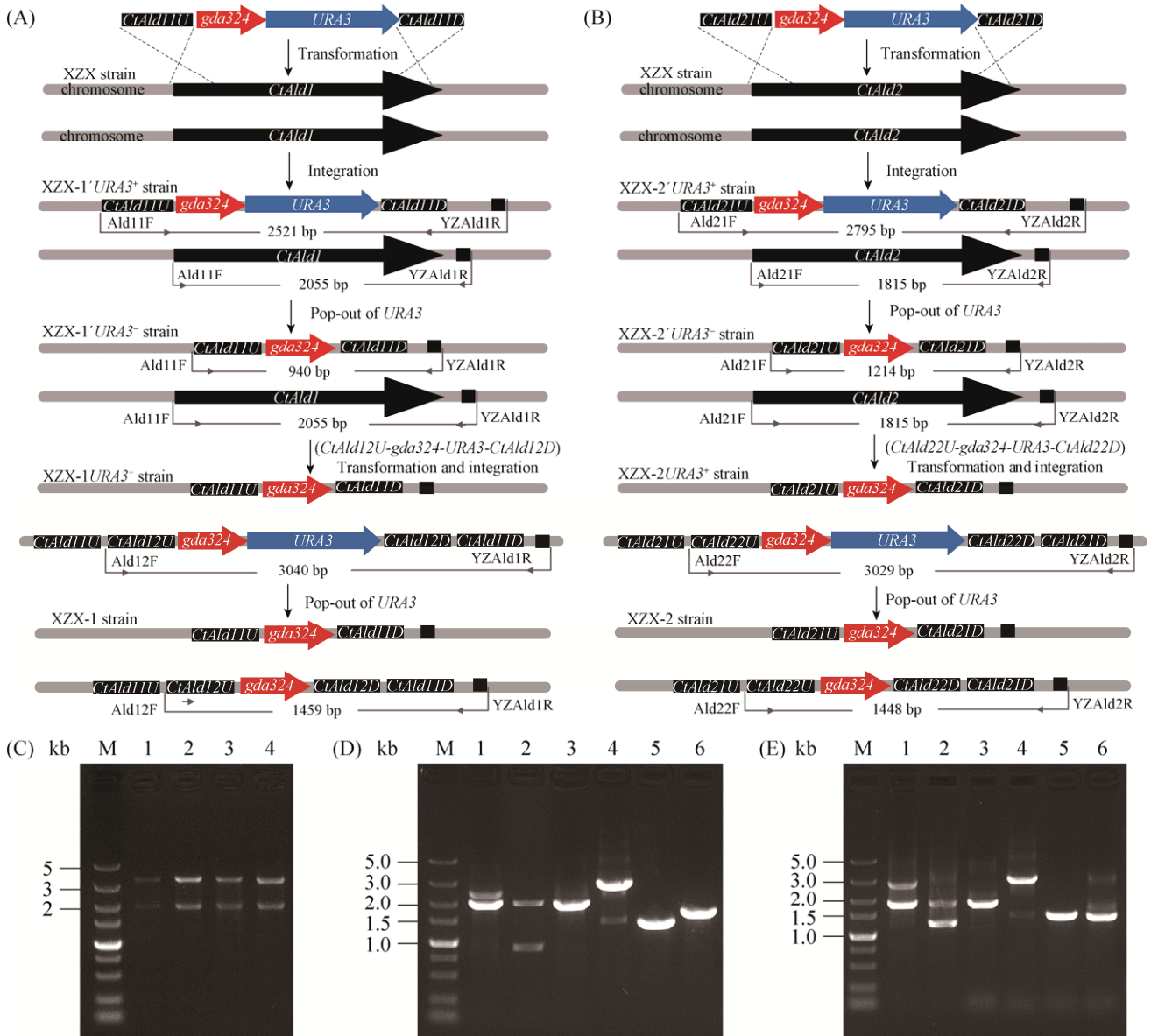


图 4. 脂肪醛脱氢酶基因敲除菌株的构建

Figure 4. Disruption of the *CtAld1* or *CtAld2* genes in *C. tropicalis*. A: Scheme of *CtAld1* disruption in *C. tropicalis* and confirmation using PCR. B: Scheme of *CtAld2* disruption in *C. tropicalis* and confirmation using PCR. C: Identification of gene disruption plasmids by restriction endonuclease *Pst* I and *Xba* I. Lane M: 5 kb ladder DNA marker; lane 1–4: Ts-*CtAld11-gda324-URA3*, Ts-*CtAld12-gda324-URA3*, Ts-*CtAld21-gda324-URA3* and Ts-*CtAld22-gda324-URA3*, respectively. D: Confirmation of *CtAld1* disruption in *C. tropicalis*. The specific size of individual PCR products was shown in Figure 4-A. M: 5 kb ladder DNA marker; lane 1–3: the PCR product using primers Ald11F and YZAld1R, XZX-1'*URA3*⁺, XZX-1'*URA3*⁻ and *C. tropicalis* XZX as template, respectively; lane 4–6: the PCR product using primers Ald12F and YZAld1R, XZX-1*URA3*⁺, XZX-1 and *C. tropicalis* XZX as template, respectively. E: Confirmation of *CtAld2* disruption in *C. tropicalis*. The specific size of individual PCR products was shown in Figure 4-B. M: 5 kb ladder DNA marker; lane 1–3: the PCR product using primers Ald21F and YZAld2R, XZX-2'*URA3*⁺, XZX-2'*URA3*⁻ and *C. tropicalis* XZX as template, respectively; lane 4–6: the PCR product using primers Ald22F and YZAld2R, XZX-2*URA3*⁺, XZX-2 and *C. tropicalis* XZX as template, respectively.

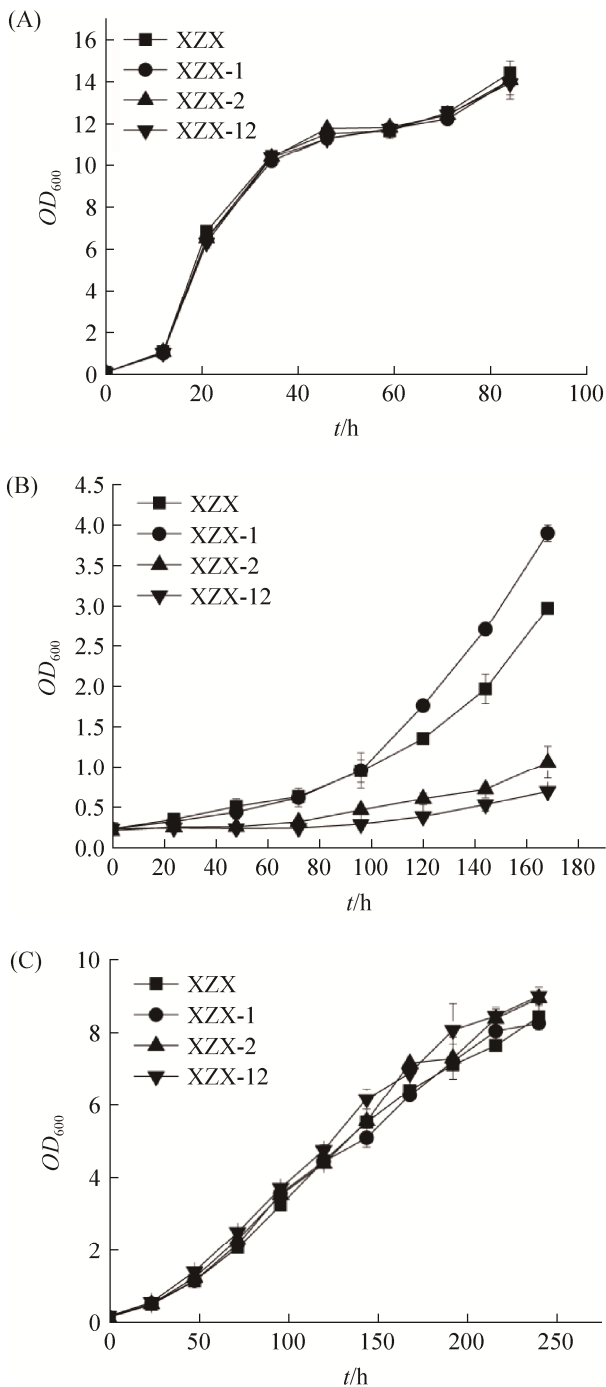


图 5. *CtAld1* 和 *CtAld2* 基因敲除对热带假丝酵母生长的影响

Figure 5. Effect of *CtAld1* and *CtAld2* disruption on cell growth in different carbon source. A: Glucose as sole carbon source; B: Dodecane as sole carbon source; C: Methyl laurate as sole carbon source.

时,所有菌株都能够正常生长, OD_{600} 在 172 h 可达到 7 左右(图 5-C)。总之,以葡萄糖和月桂酸甲酯为碳源时,基因敲除菌株和出发菌株均能够正常生长,而以十二烷为碳源时,脂肪醛脱氢酶基因的敲除对菌株生长的影响显著。

2.4 脂肪醛脱氢酶基因缺失对菌株十二醛脱氢酶酶活的影响

用十二醛为底物测试 XZX、XZX-1、XZX-2 和 XZX-12 菌株的醛脱氢酶活力,比较不同基因敲除菌株的酶活力。发现 *CtAld2* 敲除后的菌株 XZX-2 的醛脱氢酶活性损失严重,比酶活仅为 XZX 的 28.4%; *CtAld1* 的缺失对菌株十二醛脱氢酶的活力影响较小,比酶活较 XZX 菌株仅降低了 14.1%;联合敲除 *CtAld1* 和 *CtAld2* 基因后,菌株 XZX-12 中的脂肪醛脱氢酶的活力较 XZX-2 进一步下降,比酶活仅为出发菌株的 20.0%,表明 *CtAld2* 基因在热带假丝酵母的十二碳烷烃代谢过程中至关重要, *CtAld1* 基因次之。由此看来, *CtAld1* 和 *CtAld2* 可能催化十二醛的氧化(图 6)。

2.5 脂肪醛脱氢酶基因缺失对菌株长链二元酸生产能力的的影响

本研究出发菌株 XZX 的二元酸积累的能力较弱^[13],为进一步分析 *CtAld1* 和 *CtAld2* 对热带假丝酵母合成长链二元酸的影响,在肉毒碱酰基转移酶(CAT)基因缺失的热带假丝酵母 03 菌株中敲除 *CtAld1* 和 *CtAld2*,并利用得到的菌株进行二元酸发酵。研究发现敲除 *CtAld1* 或 *CtAld2* 基因均不利于二元酸的积累,其中 *CtAld2* 敲除后对菌株积累二元酸的负影响较 *CtAld1* 大;两对基因同时缺失时,菌株产酸能力急剧下降,发酵 165 h 后二元酸的积累量仅为 03 菌株的 30%左右(图 7)。

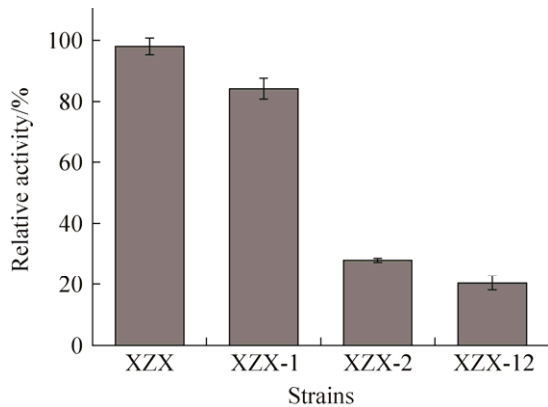


图 6. *CtAld1* 和 *CtAld2* 基因敲除对热带假丝酵母十二醛脱氢酶比酶活的影响

Figure 6. Effect of *CtAld1* and *CtAld2* disruption on FALDH activity in *C. tropicalis*. Specific FALDH activity of *C. tropicalis* XZX as 100%.

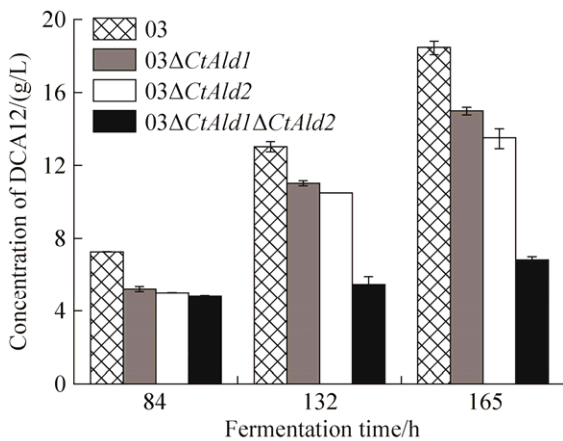


图 7. *CtAld1* 和 *CtAld2* 基因敲除对热带假丝酵母二元酸生产的影响

Figure 7. Effect of *CtAld1* and *CtAld2* disruption on dodecanedioic acid (DCA12) production in *C. tropicalis*.

3 讨论

脂肪醛脱氢酶在热带假丝酵母的二元酸生产过程中催化中间产物脂肪醛转化为脂肪酸,生成目的产物的同时避免了醛类对细胞造成伤害。目前以二元酸生产为中心对热带假丝酵母改造的研究热点主要集中在 ω -氧化中羟基化反应的增强以

及 β -氧化通路的阻断^[3,14],关于脂肪醛脱氢酶的研究并不多。为更加深入地了解热带假丝酵母烷烃代谢机制,本文对热带假丝酵母 ATCC 20336 中脂肪醛脱氢酶基因进行了初步的功能评价。

热带假丝酵母利用烷烃作为唯一碳源进行生长时,先将其氧化为脂肪酸,再通过 β -氧化途径分解为乙酰-CoA 或丙酰-CoA 加以利用,若途径中缺失脂肪醛脱氢酶,势必会影响菌体的生长繁殖。但当月桂酸甲酯为碳源时,热带假丝酵母只需将其水解为脂肪酸,不依赖于特异的醛脱氢酶氧化。本文中,*CtAld1* 和 *CtAld2* 的缺失均不影响菌株利用葡萄糖和月桂酸甲酯生长,而 *CtAld2* 敲除后菌株利用十二烷生长的能力受到大幅度抑制。相反,*CtAld1* 的敲除促进了细胞在十二烷的生长,这与预期结果有所不同。分析 *CtAld1* 氨基酸序列(<https://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>),发现 *CtAld1* N 端 44 个氨基酸残基组成的肽段可能引导 *CtAld1* 在细胞的线粒体中聚集^[15],部分预测参数见表 2。

有研究表明,位于线粒体中的脂肪醛脱氢酶参与合成的脂肪酸主要用于脂质的合成,位于过氧化物酶体的脂肪醛脱氢酶参与合成的脂肪酸主要通过 β -氧化途径为细胞生长提供能源和碳源^[2,16]。*CtAld1* 可能位于线粒体中,其参与合成的脂肪酸用于合成脂质,将 *CtAld1* 基因敲除后,减少了脂质积累,增加了 β -氧化途径中脂肪酸的流量,使

表 2. *CtAld1* 亚细胞定位预测参数

Table 2. Prediction for *CtAld1* subcellular localization

Computed parameters	Values
Analyzed regions	47
Cleavage site	45
Cleaved sequence	MSKSYKLPKSSISPIVKGKTS KSSKSSKTPSPPPSGSPPTSRI
Probability of export to mitochondria	0.8048

得菌株生长代谢得更快。单独敲除 *CtAld1* 和 *CtAld2* 基因特别是 *CtAld2* 基因后会降低菌株十二醛脱氢酶的酶活力和十二碳二元酸产量；联合敲除 *CtAld1* 和 *CtAld2* 后二元酸产量进一步降低, 仅为对照菌株的 30% 左右。综上所述, *CtAld1* 和 *CtAld2* 尤其是后者在热带假丝酵母十二碳二元酸的生产途径中具有重要作用, 这两对基因可作为热带假丝酵母生产二元酸或脂肪酸衍生物代谢工程改造的潜在靶点。

参 考 文 献

- [1] Liu SC, Jiao P, Cao ZA. Metabolism and β -oxidation of alkane-utilizing *Candida tropicalis*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2002, 42(1): 125–128. (in Chinese)
刘树臣, 焦鹏, 曹竹安. 热带假丝酵母代谢烷烃过程中的 β -氧化和代谢调控. *微生物学报*, 2002, 42(1): 125–128.
- [2] Yamada T, Nawa H, Kawamoto S, Tanaka A, Fukui S. Subcellular localization of long-chain alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase in *n*-alkane-grown *Candida tropicalis*. *Archives of Microbiology*, 1980, 128(2): 145–151.
- [3] Picataggio S, Rohrer T, Deanda K, Lanning D, Reynolds R, Mielenz J, Eirich LD. Metabolic engineering of *Candida tropicalis* for the production of long-chain dicarboxylic acids. *Nature Biotechnology*, 1992, 10(8): 894–898.
- [4] Craft DL, Madduri KM, Eshoo M, Wilson CR. Identification and characterization of the *CYP52* family of *Candida tropicalis* ATCC 20336, important for the conversion of fatty acids and alkanes to α , ω -dicarboxylic acids. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(10): 5983–5991.
- [5] Eirich LD, Craft DL, Steinberg L, Asif A, Eschenfeldt WH, Stols L, Donnelly MI, Wilson CR. Cloning and characterization of three fatty alcohol oxidase genes from *Candida tropicalis* strain ATCC 20336. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(8): 4872–4879.
- [6] Ueda M, Tanaka A. Long-chain alcohol dehydrogenase of *Candida* yeast. *Methods in Enzymology*, 1990, 188: 171–175.
- [7] Iwama R, Kobayashi S, Ohta A, Horiuchi H, Fukuda R. Fatty aldehyde dehydrogenase multigene family involved in the assimilation of *n*-alkanes in *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(48): 33275–33286.
- [8] Xiang Z, Chen XZ, Zhang LH, Shen W, Fan Y, Lu ML. Development of a genetic transformation system for *Candida tropicalis* based on a reusable selection marker of *URA3* gene. *Hereditas*, 2014, 36(10): 1053–1061. (in Chinese)
项峥, 陈献忠, 张利华, 沈微, 樊游, 陆茂林. 利用可重复使用的 *URA3* 标记基因建立热带假丝酵母基因敲除系统. *遗传*, 2014, 36(10): 1053–1061.
- [9] Zhang LH, Chen XZ, Chen Z, Wang ZZ, Jiang S, Li L, Pötter M, Shen W, Fan Y. Development of an efficient genetic manipulation strategy for sequential gene disruption and expression of different heterologous *GFP* genes in *Candida tropicalis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(22): 9567–9580.
- [10] Wilson RB, Davis D, Enloe BM, Mitchell AP. A recyclable *Candida albicans* *URA3* cassette for PCR product-directed gene disruptions. *Yeast*, 2000, 16(1): 65–70.
- [11] Zhang LH. Development of the genetic manipulation system for *Candida tropicalis* and its application in dicarboxylic acid production. Master Dissertation of Jiangnan University, 2016. (in Chinese)
张利华. 热带假丝酵母遗传操作系统的建立及在二元酸合成中的应用. 江南大学硕士学位论文, 2016.
- [12] Liu SC, Li C, Fang XC, Cao ZA. Optimal pH control strategy for high-level production of long-chain α , ω -dicarboxylic acid by *Candida tropicalis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2004, 34(1): 73–77.
- [13] Cao ZA, Gao H, Liu M, Jiao P. Engineering the acetyl-CoA transportation system of *Candida tropicalis* enhances the production of dicarboxylic acid. *Biotechnology Journal*, 2006, 1(1): 68–74.
- [14] Laplaza J, Beardslee T, Eirich D, Picataggio S. Biological methods for preparing a fatty dicarboxylic acid. The United States: WO2014100461A2. 26 June 2014.
- [15] Claros MG, Vincens P. Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *European Journal of Biochemistry*, 1996, 241(3): 779–786.
- [16] Tanaka A, Osumi M, Fukui S. Peroxisomes of alkane-grown yeast fundamental and practical aspects. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1982, 386: 183–199.

Functional identification of fatty aldehyde dehydrogenase genes *CtAld1* and *CtAld2* from *Candida tropicalis*

Ze Zheng Wang¹, Lihua Zhang¹, Manqi Zhang¹, Shiyuan Hu², Li Li², Wei Shen¹, You Fan¹, Xianzhong Chen^{1*}

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

² Evonik (Shanghai) Investment Management Co. Ltd., Shanghai 201108, China

Abstract: [Objective] *Candida tropicalis* has become an important industrial strain to produce dicarboxylic acids due to its high ω -oxidation activity. Fatty aldehyde dehydrogenases (FALDHs) play important roles in the ω -oxidation pathway, converting fatty aldehydes to fatty acids. However, FALDHs characterization and their roles in the synthesis of dibasic acids have not been studied in depth. Therefore, we cloned two genes *CtAld1* and *CtAld2* encoding FALDHs and evaluated their function in cell phenotype, enzyme activity and dicarboxylic acids accumulation. [Methods] We screened two genes of *CtAld1* and *CtAld2* through genome mining and sequence alignment. Based on sequence analysis, we deleted *CtAld1* and *CtAld2* either separately or accumulatively by homologous recombination method, and generated various mutants. The effect of deletion of *CtAld1* and *CtAld2* on cell growth, FALDH activity and dodecanedioic acid (DCA12) production were evaluated and compared. [Results] XZX-1 ($\Delta CtAld1/\Delta CtAld1$), XZX-2 ($\Delta CtAld2/\Delta CtAld2$) and XZX-12 ($\Delta CtAld1/\Delta CtAld1$, $\Delta CtAld2/\Delta CtAld2$) were obtained. When using dodecane as sole carbon source, deletion of *CtAld2* gene significantly inhibited cell growth, and the intracellular FALDH activity was only 30% of the parental strain. Deleting *CtAld1* had a slight promotion of cell growth, however intracellular FALDH activity was decreased to some extent. Furthermore, simultaneous deletion of *CtAld1* and *CtAld2* significantly impaired the cell growth performance and decreased FALDH activity, thus causing a distinct lower DCA12 yield compared to the wild type strain. [Conclusion] The deletion of *CtAld1* in *C. tropicalis* could reduce the yield of DCA12. And *CtAld2* plays an important role in the growth on dodecane and production of DCA12. To our knowledge, they could be recruited as target genes for metabolic engineering of ω -oxidation pathway in *C. tropicalis*.

Keywords: *Candida tropicalis*, fatty aldehyde dehydrogenase, gene disruption, dodecanedioic acid

(本文责编: 李磊)

Supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20171138) and by the National High Technology Research and Development Program of China (863 program)(2013AA102101-5)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-510-85918122; E-mail: xzchen@jiangnan.edu.cn

Received: 18 November 2017; Revised: 10 January 2018; Published online: 24 January 2018