

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
49(11): 1483 – 1488; 4 November 2009
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

异源表达 NADH 选择性氧化酶提高光滑球拟酵母酵解速率及丙酮酸生产强度

秦义, 董志姚, 周景文, 刘立明*, 陈坚*

(江南大学, 食品科学与技术国家重点实验室, 无锡 214122)

摘要:【目的】进一步提高光滑球拟酵母(*Torulopsis glabrata*)葡萄糖代谢速率及丙酮酸生产强度。【方法】将源于荚膜胞浆菌(*Histoplasma capsulatum*)的编码选择性氧化酶的 *AOX1* 基因过量表达于 *T. glabrata* 中, 获得了一株线粒体内 NADH 氧化途径发生改变且胞内总 NADH 氧化酶活性提高 1.8 倍的重组菌株 AOX。【结果】与出发菌株 CON 比较, 细胞浓度以及发酵周期降低了 20.3% 和 10.7%, 而平均比葡萄糖消耗速率和丙酮酸合成速率分别提高了 34.7% 和 54.1%。其原因在于 NADH 选择性氧化酶过量表达, 导致胞内 NADH/NAD⁺ 比率和 ATP 含量分别降低了 74.7% 和 52.9%, 而磷酸果糖激酶和丙酮酸激酶活性分别提高了 185.0% 和 28.1%。【结论】构建线粒体内非产能的 NADH 氧化途径, 加速 NADH 氧化的同时降低 ATP 合成, 能有效地提高酵母细胞糖酵解代谢速度及目标代谢产品的生产强度。

关键词: 光滑球拟酵母; NADH 选择性氧化酶; NADH; 糖酵解速率

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2009) 11-1483-06

提高糖酵解速度是所有以糖质原料为底物的工业发酵过程共同关心的问题, 但糖酵解速率受其关键酶活性、细胞内 NADH 氧化途径及效率和 ATP 浓度等条件所控制, 其中最为重要的影响因素是 NADH 氧化途径及其效率。因为 NADH 氧化途径及效率不仅影响糖酵解途径关键酶的反馈抑制物质 ATP 水平, 同时影响糖酵解的底物 NAD⁺ 水平, 这两者的丰度最终影响糖酵解的关键酶活性。微生物细胞内 NADH 主要来源于糖酵解途径、三羧酸循环以及脂类代谢。由于 NADH/NAD⁺ 不能穿过线粒体膜^[1], 导致细胞质与线粒体中具有不同的途径将 NADH 氧化为 NAD⁺。在胞质中, NADH 主要通过 NADH 脱氢酶、乙醇脱氢酶、3-磷酸甘油脱氢酶等

脱氢酶氧化成 NAD⁺[2-3]; 而线粒体内的 NADH 主要通过电子传递链氧化成 NAD⁺, 相应地生成大量 ATP。前期研究表明, 光滑球拟酵母中高浓度的 ATP 抑制糖酵解关键酶磷酸果糖激酶和丙酮酸激酶活性, 在一定范围内降低胞内 ATP 含量能有效地提高糖酵解速度。而改变胞内 NADH 氧化途径是降低胞内 ATP 水平的同时提供足量 NAD⁺ 的一种有效策略。

本研究将荚膜胞浆菌(*Histoplasma capsulatum*)中编码 NADH 选择性氧化酶的 *AOX1* 基因^[4]表达于 *T. glabrata* 中, 构建一条异源 NADH 氧化途径。该异源 NADH 氧化途径能有效地将源于 NADH 的电子流从细胞色素途径中的泛醌处分流, 绕过复合物 III

基金项目: 国家杰出青年基金(20625619); 国家自然科学基金(20706025); 国家“973 项目”(2007CB714303); 全国优秀博士学位论文作者专项资金(200962)

* 通信作者。Tel: +86-510-85918307; E-mail: mingli@jiangnan.edu.cn; jchen@jiangnan.edu.cn

作者简介: 秦义(1982-), 男, 安徽亳州人, 博士研究生, 主要从事分子及微生物代谢方面的研究。E-mail: s19820911@sian.com

收稿日期: 2009-06-05; **修回日期:** 2009-08-07

和IV, 直接由 NADH 选择性氧化酶作用生成水, 避免电子通过电子传递链及 F_0F_1 -ATPase 而大量合成 ATP^[5]。实现了充分氧化 NADH 提供糖酵解途径前体 NAD^+ 而降低胞内 ATP 水平的目的(图 1), 最终有效地提高糖酵解速率。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 见表 1。

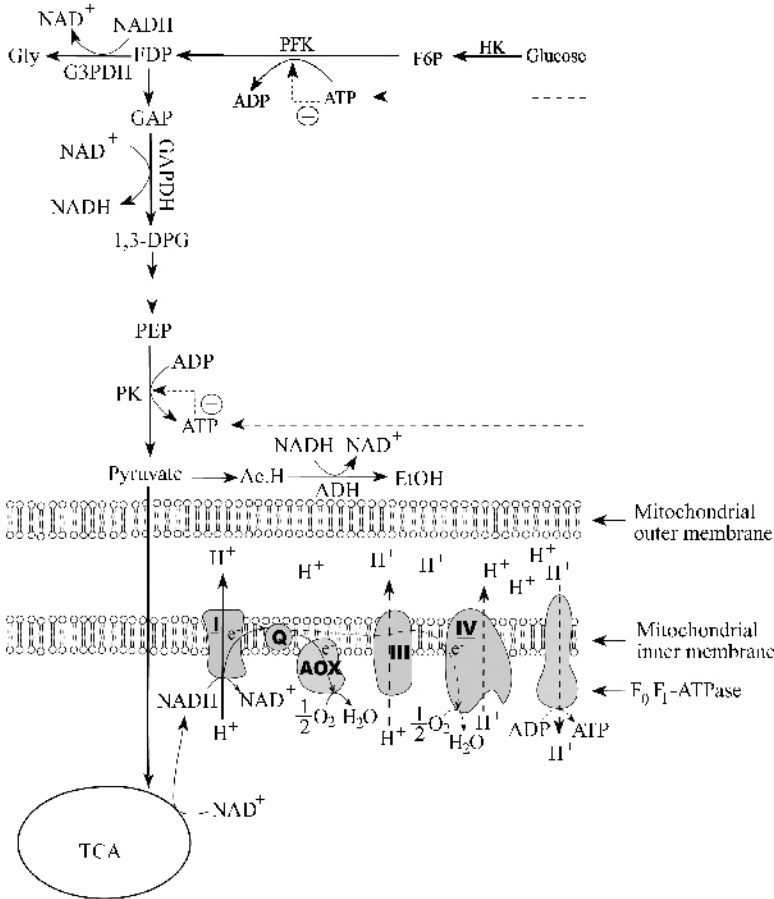


图 1 过量表达 NADH 选择性氧化酶对 *T. glabrata* 代谢的影响

Fig.1 Effect of heterologous expression NADH alternative oxidase on *T. glabrata* metabolic flux.

表 1 本文所使用的菌株及质粒

Table 1 Strains and vectors used in this manuscript

Strain/Vector	Genotype/Description	Source
Strain		
<i>T. glabrata</i> Δ ura3	A Δ ura3 strain derived from <i>T. glabrata</i> CCTCC M202019	[6]
CON	<i>T. glabrata</i> Δ ura3/pYX212	This study
AOX	<i>T. glabrata</i> Δ ura3/pYX212 - AOX1	This study
Vector		
pYX212	2 μ , TPI promoter, AMP ^R	
pYX212-AOX1	pYX212 with AOX1 from pTEF-AOX1	This study
pTEF-AOX1	p416-TEF with alternative oxidase gene AOX1 from <i>H. capsulatum</i>	[4]

1.1.2 主要试剂与仪器: Ex-Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Nco*I 和 *Sac*I 等分子常规试剂购自 TaKaRa 公司; 质粒提取试剂盒, DNA 片

段快速胶回收试剂盒等试剂盒购自上海生工生物工程服务有限公司。PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司产品, 型号 PTC-200 DNA Engine Cycler); UVP 凝胶成像仪

(美国 Bio-Rad 公司产品, 型号 Gel.Doc 2000); 电泳仪(北京六一仪器厂产品, 型号 DYY-6C); 紫外可见光分光光度计(日本岛津公司, 型号 UV2450); HPLC 高效液相色谱仪(Agilent 公司产品, 型号 1100 Series); 液相氧电极(英国 Hansatech 公司, 型号 Chlorol 2)。

1.1.3 培养基: ① LB 培养基组成成分见参考文献[6], 使用前加入 100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素, 固体培养基中添加 20 g/L 琼脂。② 斜面和种子培养基、基本培养基 MM、发酵培养基、微量元素及维生素液组分参见文献[7]。

1.1.4 发酵培养方法: 从新鲜种子斜面上接一环菌进入种子培养基(50 mL/500 mL 锥形瓶), 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 下摇瓶培养 24 h 后, 以 10% 接种量(V/V) 接入发酵培养基。摇瓶发酵: 500 mL 锥形瓶中发酵培养基为 50 mL, 温度为 30 $^{\circ}\text{C}$, 摇床转速 200 r/min。

1.2 表达载体 pYX212-AOX1 的构建及鉴定

根据 *H. capsulatum* 的 AOX1 基因(GenBank 序列号: AF133236) 序列设计 PCR 引物。引物序列如下: AOX1-S: 5'-ATCGCCCCATGCTCAGCACTGCCATTACTAATACACCTCACTTCC-3'

AOX1-A: 5'-TACTCGGAGCTCGTTTTGTTTAAGCTGATGCAATTTTTTGCCG-3'

下划线部分分别为内切酶 *Nco* I 和 *Sac* I 识别位点。pTEF-AOX 的 PCR 产物和载体 pYX212 分别用 *Nco* I 和 *Sac* I 双酶切, 酶切产物电泳纯化后, 16 $^{\circ}\text{C}$, T4 DNA 连接酶连接, 连接产物转化 *E. coli* JM109 感受态细胞, 氨苄青霉素筛选阳性克隆子, 并用 *Nco* I 和 *Sac* I 双酶切方法鉴定重组质粒 pYX212-AOX1。

1.3 重组菌株 AOX 的构建及验证

将表达质粒 pYX212-AOX1 电转化 *T. glabrata* Δura3 感受态细胞, 1 mol/L 山梨醇 30 $^{\circ}\text{C}$ 后培养 1 h, 取 100 μL 培养液涂于 MM 平板上 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h, 挑单菌落(转化子) 转接到新的 MM 平板上 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h, 并进行菌落 PCR 验证。

1.4 参数测定

葡萄糖、有机酸、细胞浓度(Dry Cell Weight, DCW)测定具体操作参见文献[7], 细胞呼吸速率的测定参见文献[4, 8], 粗酶液蛋白质含量采用 Bradford 法测定, 以 BSA 为标准蛋白。

1.5 ATP/NADH/NAD⁺ 的提取和测定

取对数生长中期的细胞发酵液, 迅速移于液氮中以阻断微生物细胞的进一步代谢, 并保存于液氮中 3 min 后, 取出置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。NADH 和 NAD⁺

提取与测定具体操作见文献[9]。ATP 测定按照 Sato 和 Stanley 的测定方法, 参见文献[10, 11]。

1.6 酶活测定

细胞内总 NADH 氧化酶(TDH)活性测定方法参见文献[12]; 甘油三磷酸脱氢酶(G3PDH)活性测定方法参见文献[13]; 乙醇脱氢酶活性测定方法参见文献[14]; 甘油醛脱氢酶(GAPDH), 己糖激酶(HXK), 磷酸果糖激酶(PFK)和丙酮酸激酶(PYK)测定方法参见文献[15]。

2 结果和讨论

2.1 重组质粒及重组菌的构建及验证

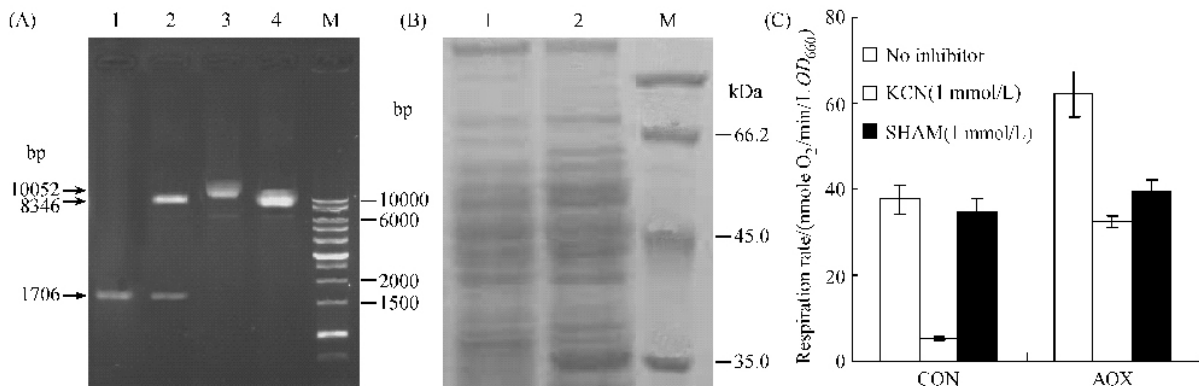
以质粒 p416-AOX1 为模板, PCR 扩增得到与文献报道大小相符的 AOX1 基因片段(约 1700 bp), 将其插入质粒 pYX212, 获得含有 AOX1 基因的酵母表达质粒 pYX212-AOX1(图 2-A, 泳道 3)。重组质粒 pYX212-AOX1 经双酶切分析(图 2-A, 泳道 2), 并进行 DNA 测序, 结果证明 AOX1 基因正确插入了质粒 pYX212 中, 并且在此过程中 AOX1 基因没有产生突变。将质粒 pYX212-AOX1 电击转化受体菌 *T. glabrata* Δura3 , 得到一株能在 MM 平板正常生长的重组子, 菌落 PCR 验证结果表明该重组子含有目的 AOX1 基因(图 2-A, 泳道 1)。将重组菌 AOX 进行 SDS-PAGE 全细胞蛋白电泳分析(以 *T. glabrata* (*ura3*/pYX212 为对照) 发现, 重组酵母在 36 kDa 处出现明显的蛋白质特征条带(图 2-B, 泳道 2), 与文献报道的目标蛋白大小相符[4]。KCN 通过阻断 Cyt. b 和 Cyt. c 之间电子传递而抑制细胞色素 c 途径的有氧呼吸, 但并不抑制选择性氧化酶途径的有氧呼吸, 而水杨羟脲(SHAM)专一抑制选择性氧化酶途径的有氧呼吸作用[4, 8]。图 2-C 显示, KCN 导致出发菌株 CON 的呼吸速率下降了 86.2%, 而工程菌 AOX 的呼吸速率下降了 47.8%; SHAM 对 CON 的呼吸速率没有明显影响, 但却导致 AOX 的呼吸速率下降 36.3%, 结果表明 AOX1 基因在重组菌实现了异源表达。

2.2 过量表达 NADH 选择性氧化酶对 *T. glabrata* 生长及丙酮酸发酵的影响

如图 3 及表 2 所示, 与出发菌株 CON 相比, 表达 AOX1 基因显著改变了 *T. glabrata* 生长及发酵特性: (1) 最大比生长速率(μ_{max}) 下降了 28.5%; (2) 菌体干重减少 20.3%; (3) 平均比葡萄糖消耗速率提高了 34.7%, 为 0.233 h^{-1} ; (4) 平均比丙酮酸合成速率提高了 54.1% (0.094 h^{-1}); (5) 摇瓶发酵中丙酮

酸产量为 35.4 g/L,增加了 11.7%;(6)随着平均葡萄糖消耗速率和丙酮酸比合成速率的增加,使得重组菌株 AOX 的发酵周期缩短了6 h(图 3-B)。但是,

出发菌株 CON 在菌体生长、葡萄糖代谢以及丙酮酸合成等方面与 *T. glabrata* Δ *ura3* 没有明显区别。



2 重组菌 AOX 的构建和验证。(A) 重组质粒 pYX212-AOX1 的酶切及 PCR 分析结果;(B) SDS-PAGE 全细胞蛋白电泳分析;(C) 选择性氧化酶活性分析

Fig.2 Construction and confirmation of the recombinant strain AOX. A: The results of *Nco* I and *Sac* I digestion of pYX212-AOX1 and PCR. Lane1: Colony PCR result of AOX; Lane 2: pYX212-AOX1/ *Nco* I / *Sac* I; Lane 3: pYX212-AOX1; Lane 4: pYX212; M: DNA Marker 1 kb Ladder; B: SDS-PAGE analysis of total cellular proteins. Lane1: CON; Lane2: AOX; M: Protein molecular weight marker(kDa); C: The activity of alternative oxidase.

表 2 重组菌株与出发菌株代谢特性的比较

Table 2 Comparison of metabolic rates and Products formed by *T. glabrata* in batch culture

Strain	μ_{max} (h ⁻¹)	q_{glu} (h ⁻¹)	q_{pyr} (h ⁻¹)	Product concentration· g/L		
				Pyruvate	Ethanol	Glycerol
<i>T. glabrata</i> Δ <i>ura3</i>	0.274 ± 0.01	0.162 ± 0.02	0.061 ± 0.02	30.8 ± 1.7	N	5.5 ± 0.16
CON	0.256 ± 0.01	0.172 ± 0.02	0.061 ± 0.01	31.7 ± 1.7	N	5.1 ± 0.10
AOX	0.183 ± 0.03	0.233 ± 0.01	0.094 ± 0.01	35.4 ± 1.3	N	N

Abbreviations: (N) no detected;

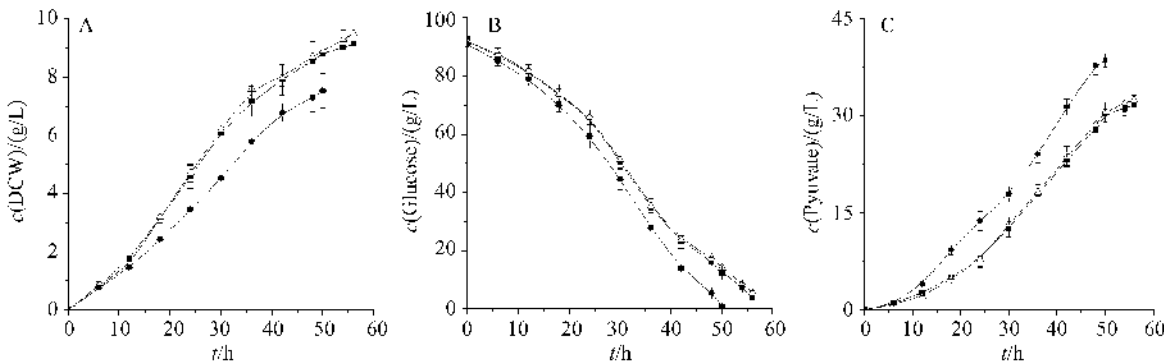


图 3 过量表达 NADH 选择性氧化酶对丙酮酸发酵的影响

Fig.3 Effect of over-expression of alternative NADH oxidase on pyruvate fermentation by

T. glabrata. Δ *T. glabrata* Δ *ura3*, ■ CON, ● AOX; A: Cell concentration; B: Glucose consumption; C: Pyruvate production.

2.3 过量 NADH 选择性氧化酶对 *T. glabrata* 核苷酸代谢的影响

NADH 选择性氧化酶过量表达对 *T. glabrata* 胞内核苷酸代谢的影响如表 3 所示。与出发菌株 CON 比较,重组菌株 AOX 胞内 NADH 含量下降了 61.2%,而 NAD⁺ 水平则提高了 53.2%。NADH/NAD⁺ 比率(这一数据反映微生物细胞内氧化还原

状态)降低了 74.7%,表明 AOX1 基因的表达促进了胞内 NADH 快速氧化为 NAD⁺。而 NADH/NAD⁺ 比率的降低,表明 *T. glabrata* 细胞内处于相对较高的氧化状态,有利于生产 NADH 的代谢反应进行(表现为糖酵解速率的提高,图 3-B)以及氧化性产物(表现为丙酮酸产量的提高,图 3-C)的合成,而抑制了还原性代谢物的合成,在本研究中表现为在重组菌

表 3 *T. glabrata* 细胞内核苷酸浓度的变化

Table 3 The variances of intracellular nucleotides concentration

Nucleotides	Strain		Change(%) (B/A-1) × 100%
	CON (A)	AOX (B)	
NADH (μmol/g DCW)	7.83 ± 0.5	3.04 ± 0.1	-61.2
NAD ⁺ (μmol/g DCW)	9.91 ± 0.9	15.18 ± 0.4	53.2
NADH + NAD ⁺	17.74 ± 1.0	18.22 ± 0.4	2.7
NADH/NAD ⁺	0.79 ± 0.03	0.20 ± 0.02	-74.7
ATP(mg/g DCW)	31.20 ± 1.5	14.70 ± 1.1	-52.9

AOX 发酵产物中难以检测到副产物甘油的生成(表 2)。与出发菌株 CON 比较,重组菌 AOX 细胞中 NADH 和 NAD⁺ 总量并不发生变化(表 3),这一结果表明, *AOX1* 基因的表达只改变 NADH 氧化为 NAD⁺ 的速度,并不能促进 NAD⁺ 的合成。NADH 作为重要的电子供体,其氧化途径和氧化效率对微生物细胞内 ATP 水平发生重要的影响^[16],随着 *AOX1* 基因在 *T. glabrata* 中的异源表达,胞质内 NADH 所提供的电子在选择性氧化酶的作用下生成水,无法传递

至合成 ATP 的 F₀F₁-ATPase^[5](图 1),导致胞内 ATP 水平下降 52.9%(表 3)。

2.4 过量 NADH 选择性氧化酶对 *T. glabrata* 对糖酵解关键酶及相关脱氢酶活性的影响

为了进一步阐明在 *T. glabrata* 线粒体中过量表达 NADH 选择性氧化酶加速其糖酵解速率的生理原因,作者分析了对数生长中期 *T. glabrata* 内 NADH 或 NAD⁺ 依赖的脱氢酶及糖酵解关键酶活性(表 4)。重组菌 AOX 中总 NADH 脱氢酶活性(包括线粒体内、外膜 NADH 脱氢酶在内的细胞内所有 NADH 脱氢酶)是出发菌株 CON 的 1.8 倍。随着胞内 NADH 水平(61.2%)的下降,削弱了依赖 NADH 的甘油三磷酸脱氢酶(61.3%)和乙醇脱氢酶(25.0%)的活性(表 4)。与此同时,较低的胞内 ATP 水平解除了对磷酸果糖激酶和丙酮酸激酶的别构抑制,使两者的活性分别提高了 185.0% 和 28.1%,但对依赖于 ATP 的己糖激酶活性没有明显的影响(表 4)。

表 4 过量表达 NADH 选择性氧化酶对糖酵解关键酶及脱氢酶活性的影响

Table 4 Effect of heterologous expression NADH alternative oxidase on the key enzyme activities in *T. glabrata*

Strain	Specific activities (U/mg protein)						
	TDH	GADPH	G3PDH	ADH	HXK	PFK	PYK
CON	1.06 ± 0.08	2.42 ± 0.07	0.31 ± 0.01	0.04 ± 0.01	1.82 ± 0.02	1.13 ± 0.30	0.32 ± 0.03
AOX	1.91 ± 0.15	2.71 ± 0.03	0.12 ± 0.05	0.03 ± 0.01	2.03 ± 0.01	3.22 ± 0.11	0.41 ± 0.01

3 讨论

NADH 作为一种重要的辅因子参与微生物细胞至少 300 个氧化还原反应^[17,18],其氧化或再生的途径及其效率对 NADH 相关的代谢途径的速率产生重要的影响。本研究以光滑球拟酵母细胞糖酵解途径为研究模型,通过外源重组源于荚膜胞浆菌(*H. capsulatum*)的 NADH 选择性氧化酶的 *AOX1* 基因于 *T. glabrata* 中,将 NADH 的氧化途径从电子传递链途径转向形成水的选择性氧化酶途径,显著降低了 NADH、NADH/NAD⁺ 比率和 ATP 水平,从而有效地提高了葡萄糖的消耗速率和丙酮酸的生产强度。这一研究的不同之处在于:(1)提供了一种在线粒体内通过改变电子传递方向而充分氧化 NADH 的策略;(2)实验证明了改变电子流的方向能显著降低 ATP 的合成效率;(3)这一改变 NADH 氧化途径提高糖酵解速率的策略对于工业生物技术的意义在于,采用代谢工程的策略,通过修饰或调控微生物细胞的生理功能,能够有效地提高工业生物技术过程的效能。

参考文献

- [1] Vemuri GN, Eiteman MA, McEwen JE, et al. Increasing NADH oxidation reduces overflow metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104(7): 2402 - 2407.
- [2] Luttik MA, Overkamp KM, Kotter P, et al. The *Saccharomyces cerevisiae* *NDE1* and *NDE2* genes encode separate mitochondrial NADH dehydrogenases catalyzing the oxidation of cytosolic NADH. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(38): 24529 - 34.
- [3] Larsson C, Pahlman IL, Ansell R, et al. The importance of the glycerol 3-phosphate shuttle during aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 1998, 14(4): 347 - 57.
- [4] Johnson CH, Prigge JT, Warren AD, et al. Characterization of an alternative oxidase activity of *Histoplasma capsulatum*. *Yeast*, 2003, 20(5): 381 - 388.
- [5] Guerrero-Castillo S, Vazquez-Acevedo M, Gonzalez-Halphen D, et al. In *Yarrowia lipolytica* mitochondria, the alternative NADH dehydrogenase interacts specifically with the cytochrome complexes of the classic respiratory pathway. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 2009, 1787(2): 75 - 85.
- [6] Zhou J, Dong Z, Liu L, et al. A reusable method for construction of non-marker large fragment deletion yeast auxotroph strains: A practice in *Torulopsis glabrata*. *Journal of Microbiological Methods*, 2009, 76(1): 70 - 74.

- [7] Liu LM, Li Y, Li HZ, et al. Manipulating the pyruvate dehydrogenase bypass of a multi-vitamin auxotrophic yeast *Torulopsis glabrata* enhanced pyruvate production. *Letters in Applied Microbiology*, 2004, 39(2): 199 – 206.
- [8] Juárez O, Guerra G, Velazquez I, et al. The physiologic role of alternative oxidase in *Ustilago maydis*. *FEBS Journal*, 2006, 273(20): 4603 – 4615.
- [9] Zhang Y, Huang Z, Du C, et al. Introduction of an NADH regeneration system into *Klebsiella oxytoca* leads to an enhanced oxidative and reductive metabolism of glycerol. *Metabolic Engineering*, 2009, 11(2): 101 – 6.
- [10] Stanley PE. Extraction of adenosine triphosphate from microbial and somatic cells. *Methods in enzymology*, 1986, 133: 14 – 22.
- [11] Sato K, Yoshida Y, Hirahara T, et al. On-line measurement of intracellular ATP of *Saccharomyces cerevisiae* and pyruvate during sake mashing. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2000, 90(3): 294 – 301.
- [12] de Felipe FL, Kleerebezem M, de Vos WM, et al. Cofactor engineering: a novel approach to metabolic engineering in *Lactococcus lactis* by controlled expression of NADH oxidase. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(15): 3804 – 3808.
- [13] Valadi A, Granath K, Gustafsson L, et al. Distinct intracellular localization of Gpd1p and Gpd2p, the two yeast isoforms of NAD⁺-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase, explains their different contributions to redox-driven glycerol production. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(38): 39677 – 85.
- [14] Postma E, Verduyn C, Scheffers WA, et al. Enzymic analysis of the crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, 55(2): 468 – 77.
- [15] Liu L, Li Y, Shi Z, et al. Enhancement of pyruvate productivity in *Torulopsis glabrata*: Increase of NAD⁺ availability. *Journal of Bacteriology*, 2006, 126(2): 173 – 185.
- [16] Singh R, Mailloux RJ, Puiseux-Dao S, et al. Oxidative stress evokes a metabolic adaptation that favors increased NADPH synthesis and decreased NADH production in *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(18): 6665 – 6675.
- [17] Bakker BM, Overkamp KM, van Maris AJA, et al. Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 2001, 25(1): 15 – 37.
- [18] San KY, Bennett GN, Berrios-Rivera SJ, et al. Metabolic engineering through cofactor manipulation and its effects on metabolic flux redistribution in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, 2002, 4(2): 182 – 192.

Significantly increase of glycolytic flux and pyruvate productivity in *Torulopsis glabrata* by heterologous expression of NADH alternative oxidase

Yi Qin, Zhiyao Dong, Jingwen Zhou, Liming Liu^{*}, Jian Chen^{*}

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: [**Objective**] This study aimed at increasing the glycolytic flux and pyruvate productivity in *Torulopsis glabrata* with glucose as carbon source. [**Methods**] For this target, we introduced a mitochondrial located alternative oxidase encoded by *Histoplasma capsulatum* AOX1 gene into *T. glabrata*, and a mutant strain named as AOX with total NADH oxidase activity was 1.8-fold higher than that of the parent stain, was achieved. [**Results**] The heterologous expression of NADH alternative oxidase resulted in decrease of the dry cell weight and fermentation time by 20.3% and 10.7%, but the specific rate of glucose consumption and pyruvate production increased 34.7% and 54.1% higher, respectively. The reasons for high glycolytic flux were the intracellular NADH/NAD⁺ ratio and ATP concentration decreased 74.7% and 52.9% respectively, the specific activity of phosphofructokinase, pyruvate kinase increased 185.0% and 28.1%. [**Conclusion**] Introduction of a novel NADH oxidation pathway by alternative oxidase can efficiently increase the rate of glucose consumption and the target metabolite productivity.

Keywords: *Torulopsis glabrata*; alternative oxidase; NADH; glycolytic flux

(本文责编 张晓丽)

Supported by the National Science Foundation for Distinguished Young Scholars (20625619), the National Natural Science Foundation of China (20706025), the Key Project of China National Programs for Fundamental Research and Development(2007CB71403) and A Foundation for the Author of National Excellent Doctoral Dissertation of China (200962)

^{*} Corresponding authors. Tel: +86-510-85918307; Fax: +86-510-85918309; E-mail: mingll@jiangnan.edu.cn, jchen@jiangnan.edu.cn

Received: 5 June 2009 / Revised: 7 August 2009