

过量表达 NADH 氧化酶加速光滑球拟酵母合成丙酮酸

董志姚, 李秀芬, 刘立明*, 堵国成, 陈坚*

(江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122)

摘要: 【目的】进一步提高光滑球拟酵母(*Torulopsis glabrata*)发酵生产丙酮酸的生产强度。【方法】将来源于乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)中编码形成水的 NADH 氧化酶 *noxE* 基因过量表达于丙酮酸工业生产菌株 *T. glabrata* CCTCC M202019 中, 获得了一株 NADH 氧化酶活性为 34.8 U/mg 蛋白的重组菌 *T. glabrata*-PDnoxE。【结果】与出发菌株 *T. glabrata* CCTCC M202019 相比, 细胞浓度、葡萄糖消耗速率和丙酮酸生产强度分别提高了 168%、44.9%和 12%, 发酵进行到 36 h 葡萄糖消耗完毕。补加 50 g/L 葡萄糖继续发酵 20 h, 则使丙酮酸浓度提高到 67.2 g/L。葡萄糖消耗速度和丙酮酸生产强度增加的原因在于形成水的 NADH 氧化酶过量表达, 导致 NADH 和 ATP 含量分别降低了 18.1% 和 15.8%, 而 NAD⁺增加了 11.1%。【结论】增加细胞内 NAD⁺含量能有效地提高酵母细胞葡萄糖的代谢速度及目标代谢产物的生产强度。

关键词: 光滑球拟酵母; NADH 氧化酶; NADH

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 08-1061-06

NAD⁺作为重要辅因子参与了生物体内 300 多个氧化还原反应, 是糖酵解途径的关键辅因子^[1, 2]。在糖酵解途径中, 葡萄糖利用 NAD⁺作为辅因子被氧化为丙酮酸, 而 NAD⁺则还原成等量的 NADH。光滑球拟酵母(*Torulopsis glabrata*)是发酵法生产丙酮酸的首选菌株^[3], 为了提高丙酮酸的生产强度, 酵解过程中产生的 NADH 必须快速氧化为 NAD⁺, 且维持一定的胞质 NAD⁺浓度。对于酵母细胞, 氧化磷酸化途径是细胞氧化 NADH 为 NAD⁺的关键途径, 这一过程产生大量 ATP^[4], 变构抑制糖酵解关键酶, 降低了葡萄糖消耗速度和丙酮酸生产强度。因此, 如能在酵母细胞中引入不产生 ATP 的 NADH 氧化途径, 则可在保证 NADH 充分氧化为 NAD⁺的同时降低胞内 ATP 水平, 减轻或消除 ATP 对酵解途径关键酶的抑制, 从而加速酵解, 提高丙酮酸的生产强度(图 1)。目前国内主要通过引入外源代谢途径^[5]、缺失竞争途径^[6]、改变氧化还原电势^[7]、添加外源电子受体^[8]、添加不

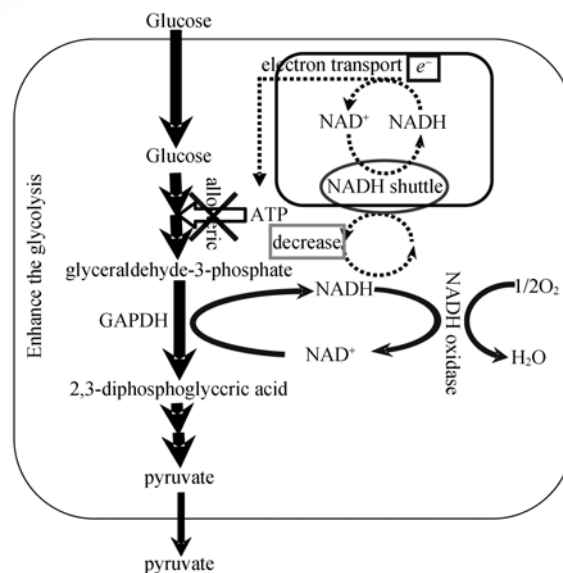


图 1 过量表达形成 H₂O 的 NADH 氧化酶对 *T. glabrata* 代谢的影响

Fig. 1 Effect of H₂O-forming NADH oxidase over-expression on *T. glabrata* on metabolic pathway.

基金项目: 国家杰出青年基金(20625619); 国家“863 计划”(2006AA02Z201); 国家自然科学基金(30670066, 20706025); 国家“973 项目”(2007CB71403)

*通讯作者。Tel: +86-510-85918307; Fax: +86-510-85918309; E-mail: mingll@jiangnan.edu.cn, jchen@jiangnan.edu.cn

作者简介: 董志姚(1983-), 男, 黑龙江鸡西人, 硕士研究生, 主要从事分子及微生物代谢方面的研究。E-mail: duke1983@163.com

收稿日期: 2008-01-14; 修回日期: 2008-04-13

同还原态底物^[9]等策略,调控微生物细胞内 NADH、NAD⁺浓度或 NADH/NAD⁺比率,从而调节碳代谢流的流向及通量,减少副产物分泌,提高目标代谢产物的产量、产率。然而,通过调节 NADH 代谢途径及含量,提高目标代谢产物的生产强度的研究鲜见报道。

本研究将来源于乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)中形成水的 NADH 氧化酶 *noxE* 基因过量表达于 *T. glabrata* 中,调控胞内 NADH 和 ATP 浓度,以期全面理解酵母细胞中 NADH 代谢对 *T. glabrata* 能量代谢和糖酵解途径的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:光滑球拟酵母(*T. glabrata*) CCTCC M202019,烟酸、生物素、硫胺素、盐酸吡哆醇 4 种维生素营养缺陷型菌株,且丙酮酸脱羧酶活性组成型降低,为本实验室保藏,主要用于发酵生产丙酮酸。乳酸乳球菌(*L. lactis*) NZ9000、大肠杆菌(*E. coli*) JM109 由本实验室保藏。酵母表达质粒 pYX212 为大肠杆菌-酵母之间的穿梭载体,在大肠杆菌中选择标记为 *amp^r*,而在酵母中选择标记为尿嘧啶缺陷型互补,由江南大学生物工程学院沈微老师赠送。

1.1.2 主要试剂和仪器:限制性内切酶、T4 DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、Ex-Taq DNA 聚合酶、dATP、dGTP、dCTP、dTTP 等购自 TaKaRa 公司;质粒小量抽提试剂盒、胶回收试剂盒等购自上海生工公司;其它常规试剂采用进口分装或国产分析纯。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);紫外分光光度计(上海科学精密仪器公司);HPLC 高效液相色谱仪(Agilent 公司产品,型号 1100 Series)。

1.1.3 培养基: LB 培养基^[9],使用前加入确良 100 μg/mL 氨苄青霉素,固体培养基添加 20 g 琼脂,用于大肠杆菌培养。斜面 and 种子培养基、基本培养基 MM、发酵培养基、微量元素液、维生素液见参考文献^[10]。在 MM 培养基中加入 60 mg/L 尿嘧啶为补充培养基(CM);在 CM 培养基中加入 0.5 g/L 5-氟乳清酸(5-FOA)即为 5-FOA 培养基。

1.1.4 培养条件:从新鲜斜面上取一环菌接入 50 mL 种子培养基,30、200 r/min 摇瓶培养 24 h,以 10%

接种量(V/V)接入发酵培养基。摇瓶发酵:发酵培养基装液量为 50 mL,温度为 30 °C,转速 200 r/min,发酵时间为 48 h。

1.2 PCR 扩增目的基因

根据乳酸乳球菌(*L. lactis*)*noxE* 基因序列设计 PCR 引物。上游引物 P1 :5'-AGTCGAATTCATGAAAATCGTAGTTATCGGT-3',下游引物 P2 :5'-ACAGG-ATCCTTATTTGGCATTCAAAGCTG-3'。下划线部分序列分别带有限制性内切酶 *EcoR* 和 *BamH* 的识别位点。PCR 反应采用 50 μL 体系,PCR 反应条件 94 5 min;94 50 s;60 50 s;72 90 s,30 个循环;72 10 min。在 1%琼脂糖凝胶电泳并回收 PCR 扩增产物。

1.3 表达质粒 pYX212-*noxE* 的构建

回收后的目的片段 PCR 产物与穿梭载体 pYX212 分别用 *EcoR* 和 *BamH* 双酶切,电泳回收目的片段。酶切后的质粒 pYX212 和酶切后的目的基因片段用 T4 DNA 连接酶连接,连接产物转化宿主菌 JM109,转化菌液涂布在含氨苄霉素的 LB 平板上过夜,挑选阳性克隆子用酶切方法鉴定重组质粒 pYX212-*noxE*。

1.4 酵母电击转化及筛选

转化和筛选操作流程参照 Invitrogen 公司的毕赤表达操作手册并进行部分修改。取 80 μL 感受态细胞,加入 5~10 μL 重组质粒 pYX212-*noxE*,混合后转移至预冷的 0.2 cm 电击杯中,置电击仪中电击转化。电击结束后立即加入 1 mL 预冷的 1 mol/L 的山梨醇,混匀后,后培养 1~2 h,以每板 100 μL 菌液涂布于固体 MM 平板,30 培养。将所生长的转化子点种于 MM 和 5-FOA 平板,30 培养 48 h。挑取 MM 生长正常而 5-FOA 平板不生长的转化子为阳性克隆子。所得阳性克隆子在 MM 平板上划线进一步分离得到阳性转化子,获得一株 NADH 氧化酶活性为 34.8 U/mg 蛋白的重组菌。实验证实该菌仍为 4 种维生素营养缺陷型,且具有良好的遗传稳定性。

1.5 SDS-PAGE 分析

采用 5%浓缩胶及 12%分离胶的不连续垂直平板电泳进行蛋白分离,考马斯亮蓝 R-250 染色^[11]。以 *T. glabrata* CCTCC M202019 作为对照。

1.6 参数测定

NADH 氧化酶活性测定方法参见文献^[12]。葡萄糖、有机酸、细胞浓度(Dry Cell Weight, DCW)测定具体操作参见文献^[10];蛋白质含量采用 Bradford 法测定^[13],以牛血清蛋白为标准蛋白。

1.7 ATP/NADH/NAD⁺的提取和测定

胞内 ATP 含量测定：取 30 mL 处于对数生长期的细胞发酵液，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 备用。测定按照 Sato 和 Stanley 的测定方法测定^[14, 15]。

NADH 和 NAD⁺分别在酸性和碱性条件下不稳定，因此，需采用不同的提取工艺以充分提取 NADH 和 NAD⁺。胞内 ATP、NADH 和 NAD⁺浓度是至少 3 个独立提取工艺的平均值^[14~16]。

2 结果和讨论

2.1 乳酸乳球菌 *noxE* 基因的扩增和表达质粒的构建以 *L. lactis* NZ9000 基因组为模板，PCR 扩增得

到目的基因 *noxE* 片段，经限制性内切酶 *EcoR* 和 *BamH* 双酶切消化后，浓缩纯化，将 *noxE* 基因定向克隆到表达质粒 pYX212 中，得到重组酵母表达质粒 (图 2-A)，重组质粒命名为 pYX212-*noxE*。重组质粒 pYX212-*noxE* 分别进行双酶切验证及 PCR 验证(图 2-B)。结果，重组质粒 pYX212-*noxE* 经 *EcoR* 和 *BamH* 双酶切，得到两条特异性条带，而质粒 pYX212 进行双酶切只有一条特异性条带；以重组质粒质粒 pYX212-*noxE* 为模板，用引物 P1 和 P2 进行 PCR 扩增在 1546 bp 处具有特异性条带，而以质粒 pYX212 为模板扩增，则没有特异性条带，从而证明 *noxE* 基因被正确地插入到质粒 pYX212 中，重组质粒构建成功。

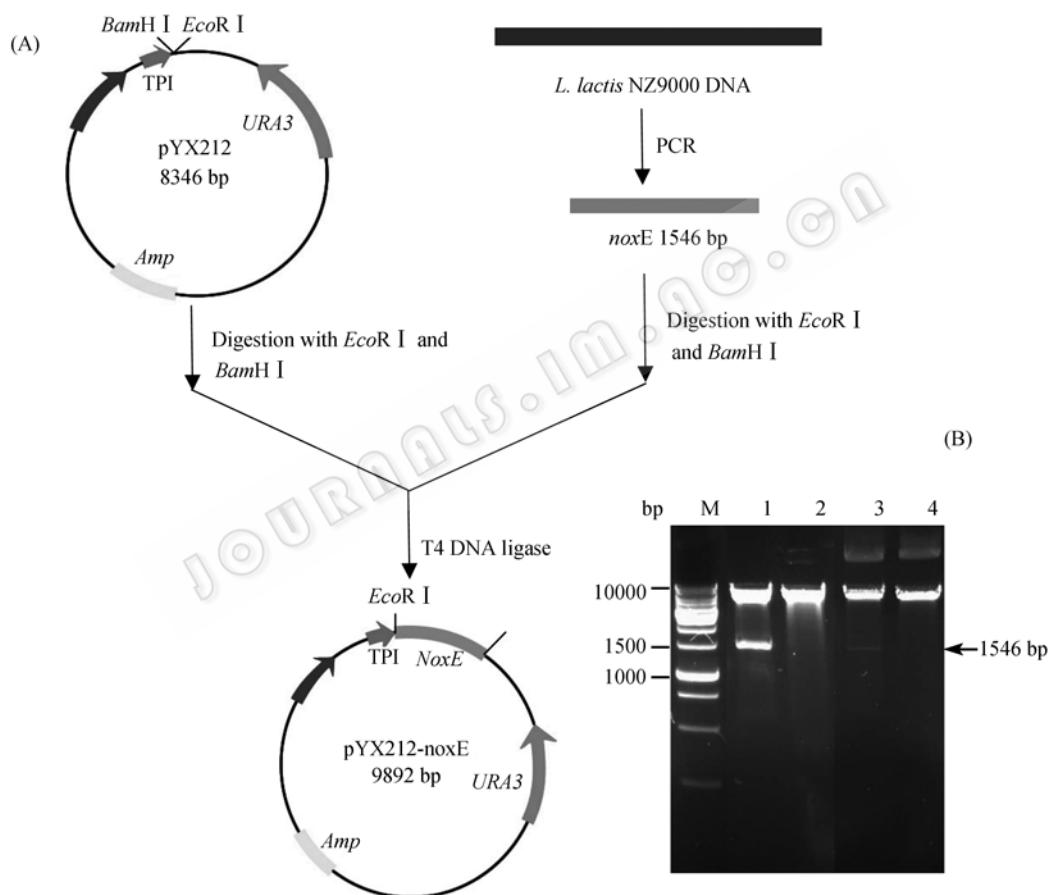


图 2 重组质粒 pYX212-*noxE* 的构建(A)和重组质粒的酶切及 PCR 分析结果(B)

Fig. 2 Construction of the recombinant plasmid pYX212-*noxE* (A) and the results of *EcoR* and *BamH* digestion and PCR (B). M₁: 1 kb ladder; 1. pYX212-*noxE*/*EcoR* /*BamH* ; 2. pYX212/*EcoR* /*BamH* ; 3. PCR analysis of pYX212-*noxE*; 4. PCR analysis of pYX212.

2.2 重组菌的构建

由于重组质粒上带有 *URA3* 基因，电击转化受体菌 *T. glabrata* (*URA*⁻)，得到能在不含尿嘧啶的基本培养基上正常生长的突变株。同时，质粒 pYX212 因其具有 2 μ片段而表现出较好的遗传稳定性。经过 30 代筛

选，得到在 MM 培养基上稳定生长的重组菌 *T. glabrata*-PD*noxE*。将重组菌 *T. glabrata*-PD*noxE* 进行 SDS-PAGE 全细胞蛋白电泳分析(以 *T. glabrata* CCTCC M202019 为对照)发现，重组酵母在 53~54 kDa 处出现明显的蛋白质特征条带(图 3)，与文献报道的目标蛋白大小

相符^[12]。重组菌中 NADH 氧化酶的比活力为 34.8 U/mg 蛋白,但在出发菌株中未检测到 NADH 氧化酶的活性。

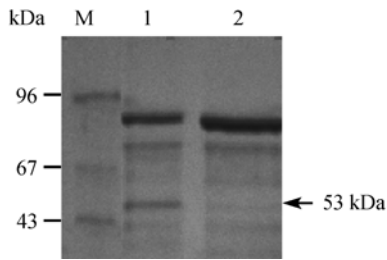


图 3 SDS-PAGE 全细胞蛋白电泳分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of proteins in whole cells. M. Protein markers (kDa); 1. *T. glabrata*-PDnoxE; 2. *T. glabrata* CCTCC M202019 (the control).

2.3 过量表达 NADH 氧化酶改善重组菌好氧生长性能及加速丙酮酸生产

如图 4 中的 A 和 B 所示,在以 100 g/L 葡萄糖为碳源的发酵培养基中,重组菌 *T. glabrata*-PDnoxE 的延滞期仅为 6 h (出发菌株为 10 h),随后进入快速生长期。至发酵结束时菌体浓度为 20.4 g/L (36 h),平均比生长速率为 0.126/h。与对照菌 *T. glabrata* CCTCC M202019 相比,

分别提高了 168% 和 46.5%。这一结果表明, NADH 氧化酶的过量表达明显促进了 *T. glabrata* 好氧生长性能。

表达 NADH 氧化酶对 *T. glabrata* 葡萄糖消耗和丙酮酸生产的影响如图 4 中的 C 和 D,相关参数总结于表 1 (摇瓶数据)。发现: (1) 重组菌 *T. glabrata*-PDnoxE 36 h 葡萄糖消耗完毕,而菌株 *T. glabrata* CCTCC M202019 进行到 48 h 时发酵液中残存 5.34 g/L 葡萄糖; (2) 重组菌 *T. glabrata*-PDnoxE 葡萄糖的消耗速度为 2.52 g/(L·h),比菌株 *T. glabrata* CCTCC M202019 提高了 41.5% [1.78 g/(L·h)]; (3) 发酵 36 h 时重组菌 *T. glabrata*-PDnoxE 丙酮酸产量为 31.4 g/L,此时菌株 *T. glabrata* CCTCC M202019 丙酮酸产量仅为 28.3 g/L,继续发酵至 48 h,菌株 *T. glabrata* CCTCC M202019 丙酮酸产量增加到 37.3 g/L,但重组菌 *T. glabrata*-PDnoxE 的丙酮酸产量并不随发酵时间的延长而增加; (4) 重组菌 *T. glabrata*-PDnoxE 的丙酮酸生产强度为 0.872 g/(L·h),是菌株 *T. glabrata* CCTCC M202019 的 1.12 倍 [0.778 g/(L·h)]; (5) 重组菌 *T. glabrata*-PDnoxE 发酵周期为 36 h,而菌株

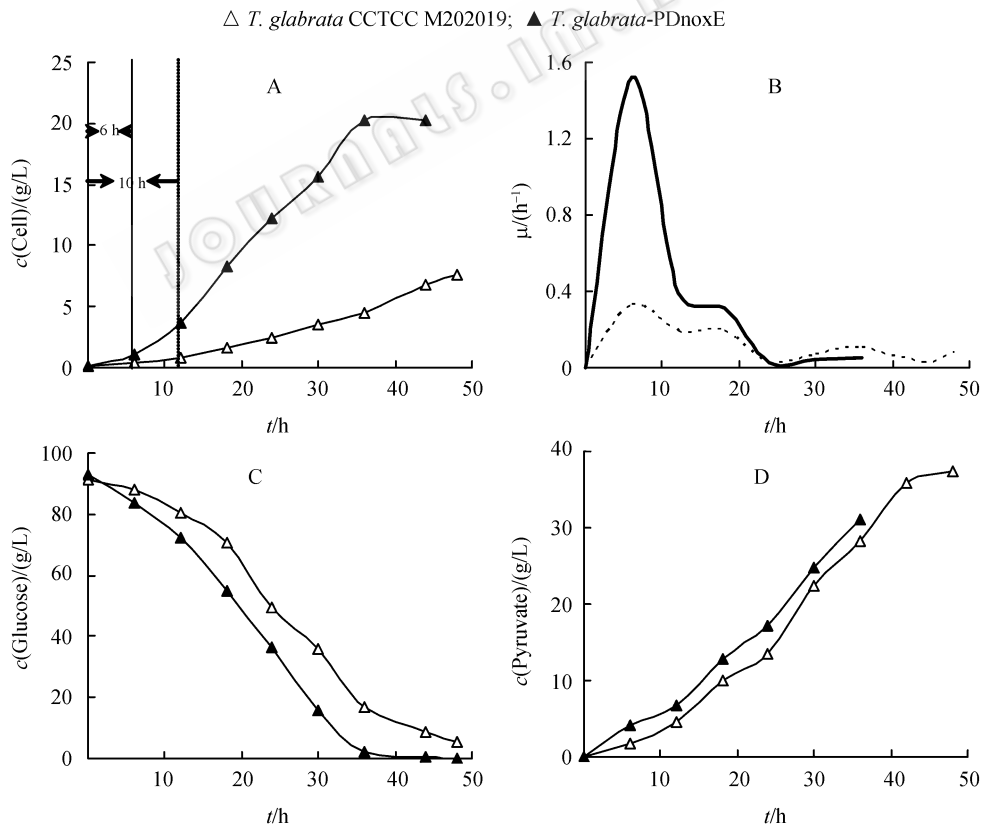


图 4 NADH 氧化酶过量表达对丙酮酸发酵的影响

Fig. 4 Effect of NADH oxidase over-expression on pyruvate fermentation. A: Cell concentration; B: Specific growth rate; C: Glucose consumption; D: Pyruvate production.

T. glabrata CCTCC M202019 发酵周期为 50 h。

上述研究结果表明, 尽管过量表达 NADH 氧化酶能有效地提高葡萄糖消耗速度和丙酮酸生产强度, 但不能有效地提高丙酮酸产量。其原因在于: NADH 氧化酶的过量表达明显改善了 *T. glabrata* 好氧生长的性能, 使得部分碳流转向了菌体的生长, 丙酮酸对葡萄糖的得率下降了 22%。发酵进行到 36 h 时葡萄

糖消耗完毕, 那么, 继续补加葡萄糖能否提高丙酮酸产量呢? 随着发酵液中补加葡萄糖浓度的增加, 丙酮酸的产量逐渐增加。当补加 50 g/L 葡萄糖时(图 5-A, C), 继续发酵 20 h 丙酮酸产量增加了 35.8 g/L, 使丙酮酸总产量达到 67.2 g/L(图 5-B), 而出发菌株 *T. glabrata* CCTCC M202019 丙酮酸产量仅增加了 6.3 g/L(图 5-D)(发酵罐数据)。

表 1 *T. glabrata*-PDnoxE 和 CCTCC M202019 的发酵参数

Table 1 Fermentation patterns of strain *T. glabrata*-PDnoxE and CCTCC M202019

Parameters	Strain		Change(%) (B/A-1)×100%
	CCTCC M202019(A)	PdnoxE(B)	
Fermentation time (h)	50	36	-30.8
Total cell growth (g/L)	7.59	20.4	168%
Total consumed glucose (g/L)	85.04	92.85	9.0%
Total pyruvate production (g/L)	37.3	31.4	-16%
Rate of glucose consumed (g/L/h)	1.773	2.57	44.9%
Rate of pruvate production (g/L/h)	0.778	0.872	12%
Average specific cell growth rate (h ⁻¹)	0.086	0.126	46.5%

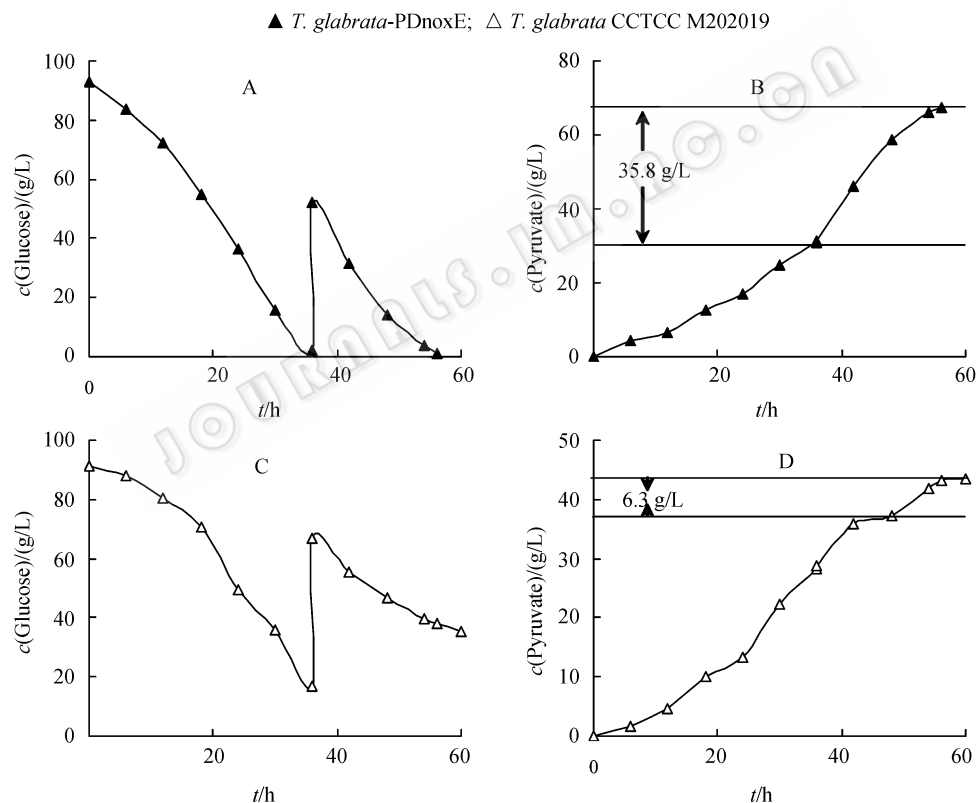


图 5 补加葡萄糖对发酵产丙酮酸的影响

Fig. 5 Effect of glucose feeding on the pyruvate production. A and C: Glucose consumption; B and D: Pyruvate production.

2.4 过量表达 NADH 氧化酶对 NADH 代谢的影响

与出发菌株 *T. glabrata* CCTCC M202019 比较, 为何提高 NADH 氧化酶能有效提高糖酵解速度? 取对数生长中期的细胞, 测定细胞内 NADH、NAD⁺和 ATP 的含量(表 2)。NADH 氧化酶的过量表达, 使 NADH 含

量降低了 18.1% (与出发菌株比较), NAD⁺含量增加了 11.1%, 导致 NADH/NAD⁺比率降低了 26.3%, 胞内 ATP 含量下降 15.8%。NADH 氧化酶的过量表达, 将 NADH 氧化途径从大量形成 ATP 的氧化磷酸化途径转向形成水的 NADH 氧化酶途径, 保证了高酵

解速度所需的高 NAD⁺水平和低 ATP 水平(图 1)。从而解除了 NAD⁺浓度不足对糖酵解途径关键酶活性的限制以及减轻了高含量 ATP 对糖酵解关键酶的变构抑制。

表 2 胞内 NADH, NAD⁺, 和 ATP 浓度

Table 2 The intracellular concentration of NADH, NAD⁺, and ATP

Parameters	Strain		Change(%) (B/A-1)×100%
	CCTCC M202019 (A)	PDnoxE (B)	
NADH/(μmol)	9.86	8.08	-18.1%
NAD ⁺ /(μmol)	1.08	1.20	11.1%
NADH/NAD ⁺	9.13	6.73	-26.3%
ATP/(m mol)	0.677	0.570	-15.8%

参 考 文 献

- [1] Foster JW, Park YK, Penfound T, *et al.* Regulation of NAD metabolism in *Salmonella typhimurium*: molecular sequence analysis of the bifunctional nadR regulator and the nadA-pnuC operon. *J Bacteriol*, 1990, 172: 4187-4196.
- [2] Lopez de Felipe F, Kleerebezem M, de Vos WM, *et al.* Cofactor engineering: a novel approach to metabolic engineering in *Lactococcus lactis* by controlled expression of NADH oxidase. *J Bacteriol*, 1998, 180: 3804-3808.
- [3] Li Y, Chen J, Lun SY. Biotechnological production of pyruvic acid. *Appl Microbiol Biotech*, 2001, 57: 451-459.
- [4] Senior A E. ATP synthesis by oxidative phosphorylation. *Physiol Rev*, 1988, 68: 177-231.
- [5] Heux S, Cachon R, Dequin S. Cofactor engineering in *Saccharomyces cerevisiae*: Expression of a H₂O-forming NADH oxidase and impact on redox metabolism. *Metab Eng*, 2006, 8(4): 303-314.
- [6] Zhang YP, Li Y. Inactivation of aldehyde dehydrogenase: A key factor for engineering 1,3-propanediol production by *Klebsiella pneumoniae*. *Metab Eng*, 2006 (8): 578-586.
- [7] Du CY, Zhang YP. Novel redox potential-based screening strategy for rapid isolation of *Klebsiella pneumoniae* mutants with enhanced 1,3-propanediol-producing capability. *Appl Environ Microb*, 2007 73 (14): 4515-4521.
- [8] Liu L, Li Y. Enhancement of pyruvate productivity in *Torulopsis glabrata*: Increase of NAD⁺ availability. *J Biotechnol*. 2006 126(2): 173-185.
- [9] Lin H, Bennett GN, San KY. Effect of carbon sources differing in oxidation state and transport route on succinate production in metabolically engineered *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2005 32(3): 87-93.
- [10] Liu LM, Li Y, Li HZ, *et al.* Manipulating the pyruvate dehydrogenase bypass of a multi-vitamin auxotrophic yeast *Torulopsis glabrata* enhanced pyruvate production. *Lett Appl Microbiol*, 2004, 39 (2): 199-206.
- [11] Joseph S, David WR. Molecular Cloning. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [12] Lopez de Felipe F, Hugenholtz J. Purification and characterisation of the water forming NADH-oxidase from *Lactococcus lactis*. *Int Dairy J*, 2001, 11: 37-44.
- [13] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.
- [14] Sato K, Yoshida Y, Hirahara T, *et al.* On-line measurement of intracellular ATP of *Saccharomyces cerevisiae* and pyruvate during sake mashing. *J Biosci Bioeng*, 2000, 90: 294-301.
- [15] Stanley PE. Extraction of adenosine triphosphate from microbial and somatic acid. *Methods Enzymol*, 1986, 133: 14-22.
- [16] Miseta A, Tokes-Fuzesi M, Aiello D, *et al.* A *Saccharomyces cerevisiae* mutant unable to convert glucose to glucose-6-phosphate accumulates excessive glucose in the endoplasmic reticulum due to core oligosaccharide trimming. *Eukaryot Cell*, 2003, 2: 534-541.

Heterologous expression of H₂O-forming NADH oxidase in *Torulopsis glabrata* significantly enhance the pyruvate productivity of the host

Zhiyao Dong, Xiufen Li, Liming Liu*, Guocheng Du, Jian Chen*

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

Abstract: [Objective] The aim of this manuscript was to illuminate the effect of NADH oxidation pathway on the glycolytic rate and the pyruvate productivity. [Methods] The *noxE* gene encoding a water-forming NADH oxidase from *Lactococcus lactis*, was expressed in a pyruvate producing *Torulopsis glabrata* CCTCC M202019. A mutant strain *T. glabrata*-PDnoxE, with specific NADH oxidase activity of 34.8 U/mg protein, was obtained. [Results] During batch fermentation with 100 g/L glucose in the medium, the dry cell weight, the glucose consumption rate and pyruvate production rate were 168%, 44.9% and 12% higher than that of the parent strain, respectively. Only 2.5 g/L residual glucose was detected in the fermentation broth after 36 h culture, then 50 g/L glucose was supplemented to the culture broth and the concentration of pyruvate increased to 67.2 g/L. As the result of NADH oxidase overexpression, the intracellular NADH, NAD⁺ and ATP concentrations of the mutant and the parent strain were determined, the NADH and ATP content decreased 18.1% and 15.8% respectively, while the NAD⁺ concentration increased 11.1%. [Conclusion] The increasing of intracellular NAD⁺ concentration can efficiently enhance the rate of glucose consumption and the pyruvate production.

Keywords: *Torulopsis glabrata*; H₂O-forming NADH oxidase; NAD⁺

Supported by the National Science Foundation for Distinguished Young Scholars (20625619), the National Programs for High Technology Research and Development of China (2006AA02Z201), the National Natural Science Foundation of China (30670066, 20706025) and the Key Project of China National Programs for Fundamental Research and Development(2007CB71403)

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

Received: 14 January 2008/ Revised: 13 April 2008