

过表达 NADH 激酶基因对酿酒酵母乙醇发酵的影响

王寒, 张梁, 石贵阳

江南大学 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

王寒, 张梁, 石贵阳. 过表达 NADH 激酶基因对酿酒酵母乙醇发酵的影响. 生物工程学报, 2014, 30(9): 1381-1389.

Wang H, Zhang L, Shi GY. Effects of overexpression of NADH kinase gene on ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. Chin J Biotech, 2014, 30(9): 1381-1389.

摘要: 甘油是酿酒酵母乙醇代谢途径中的主要副产物, 降低甘油生成, 可以提高乙醇的产率和原料的利用率。以工业酒精酵母单倍体 S1 (*MATa*) 为研究对象, 构建了一个 4.5 kb 左右的基因敲除突变盒 *gpd2Δ::PGK1_{PT}-POS5-HyBR*, 利用醋酸锂转化法转入 S1, 得到重组菌 S3 (*gpd2Δ::PGK1_{PT}-POS5-HyBR*), 使得工业酒精酵母在敲除 *GPD2* 的同时整合过表达了 NADH 激酶基因 *POS5*。结果表明, 在 150 g/L 的葡萄糖摇瓶发酵实验中, 重组菌 S3 在不影响菌株生理特性的条件下, 乙醇得率 (g ethanol/g glucose) 比原始菌株 S1 提高了 8%, 甘油得率 (g glycerol/g glucose) 降低了 33.64%。本研究证明过表达 NADH 激酶基因可降低乙醇发酵中副产物甘油的生成并提高乙醇得率。

关键词: 酒精酵母, *POS5*, 乙醇, 甘油, NADH

Effects of overexpression of NADH kinase gene on ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*

Han Wang, Liang Zhang, and Guiyang Shi

National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Glycerol is the main byproduct in ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. In order to improve ethanol yield and the substrate conversion, a cassette about 4.5 kb for gene homologous recombination, *gpd2Δ::PGK1_{PT}-POS5-HyBR*, was constructed and transformed into the haploid strain *S. cerevisiae* S1 (*MATa*) to replace

Received: October 28, 2013; **Accepted:** February 21, 2014

Supported by: Program for New Century Excellent Talents in University (No. NCET-11-0665), the Fok Ying-Tong Education Foundation (No. 131020), China and A Project Funded by the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions.

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

教育部新世纪优秀人才支持计划 (No. NCET-11-0665), 霍英东教育基金 (No. 131020), 江苏高校优势学科建设工程资助。

the *GPD2* gene by *POS5* gene. The NADH kinase gene *POS5* was successfully over expressed in the recombinant strain *S. cerevisiae* S3. Comparing with the parent strain, the recombinant strain *S. cerevisiae* S3 exhibited an 8% increase in ethanol production and a 33.64% decrease in glycerol production in the conical flask fermentation with an initiatory glucose concentration of 150 g/L. Overexpression of NADH kinase gene seems effective in reducing glycerol production and increasing ethanol yield.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, *POS5*, ethanol, glycerol, NADH

20 世纪 80 年代, 由于石油的禁运和缺乏, 全球燃料危机在很多国家引起了极大的关注。而人们更为关心的是寻找一种可替代的燃料资源, 乙醇首当其冲被列入其中^[1]。乙醇作为可再生资源有诸多优势, 能减少温室气体的排放, 减少有毒废气的释放, 提高全球能源效率, 减少燃料成本等^[2]。因此, 清洁燃料乙醇的生产成为各国研究的热点。

甘油是乙醇生产过程中的主要副产物, 在厌氧条件下大约 4% 的碳源会流向生成甘油的代谢支路。而这些碳源在不增加成本的情况下每年将会多产生 1.25 亿 L 的乙醇^[3]。因此, 为了提高乙醇的产量, 阻断或者削弱甘油的代谢通路是非常必要的。甘油在酿酒酵母细胞中起着调节胞内氧化还原平衡的作用, 厌氧条件下有机酸和生物量生成过程产生的 NADH 只能通过甘油形成途径来氧化, 甘油的合成是胞内 NAD⁺再生的主要途径^[4]。甘油的生成经过两步反应, 第一步反应是甘油合成的限速步骤^[5], 磷酸二羟基丙酮在由 *GPD1* 和 *GPD2* 编码的 3-磷酸甘油脱氢酶的作用下还原为 3-磷酸甘油, 随后在 *GPP1* 和 *GPP2* 基因编码的 3-磷酸酯酶的作用下, 脱去磷酸生成甘油^[6]。

为维持细胞内的氧化还原平衡, 生物合成反应中产生的过量的 NADH 必须被氧化成 NAD⁺, 以维持一定的比例。酿酒酵母含有 3 种 NADH 激酶基因, 分别是 *UTR1*、*YEF1* 和 *POS5*。

Pos5p 定位于线粒体基质, 将 NADH 转化为 NADPH, 是线粒体 NADPH 的主要来源^[7]。Strand 等^[8]通过对 *Pos5p* 氨基末端分析, 其前 17 个氨基酸为线粒体定位信号肽。NADH 激酶在维持线粒体 DNA 的稳定性和氧化胁迫反应方面有很重要的作用^[9]。Bro 等^[10]根据酿酒酵母代谢网络模型, 预测了 NADH 激酶的表达可以使酿酒酵母乙醇产量提高, 甘油产量降低。Hou 等^[11]在细胞质中超表达 NADH 激酶基因, 明显改变了代谢流向, 使代谢流从 CO₂ 转向乙醇, 提高了乙醇的产量, 但同时却积累了木糖醇。故而, 如何降低甘油的产量, 同时又能将胞内过量的 NADH 氧化成 NAD⁺, 是对甘油途径改造的有效方案之一。

本文旨在对酿酒酵母敲除 *GPD2* 的同时加强 *POS5* 基因的表达, 以期达到降低甘油产量从而提高乙醇产量的目的。本实验通过去除 *POS5* 基因前 17 个氨基酸, 使其在细胞质中过表达, 从而改善由于 *GPD2* 敲除引起的胞内氧化还原的失衡问题。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

工业酒精酵母单倍体菌株 S1 (*MATa*, 野生型, 由工业酒精酵母 CICIMY0086 分离得到), S2 (*MATa*, *gpd2Δ::HyBR*) 由本实验室前期构

建^[10], *E. coli* JM109 (*recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi (Lac-proAB) F'[traD36 proAB⁺ lacI^q lacZM15]*), pMD18T-Simple (TaKaRa), 质粒 pMGKR 和 pSH47-*HyBR* 为实验室前期构建^[12], 其他菌株和质粒均为本实验构建。

1.1.2 培养基

LB 培养基: 蛋白胨 10 g, 酵母膏 5 g, NaCl 10 g, 蒸馏水定容至 1 L。固体培养基添加 2% 琼脂粉, 用于大肠杆菌的培养, 培养温度为 37 °C。

氨苄青霉素的工作浓度为 100 µg/mL。

YEPD 培养基: 蛋白胨 20 g, 酵母膏 10 g, 葡萄糖 20 g, 蒸馏水定容至 1 L。固体培养基添加 2% 琼脂粉, 用于工业酒精酵母的培养, 培养温度 30 °C。潮霉素 B 的工作浓度为 200 µg/mL, 300 µg/mL。

基础发酵培养基: 葡萄糖 150 g, (NH₄)₂SO₄ 7.5 g, KH₂PO₄ 3.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.75 g, 酵母膏 0.5 g, 蒸馏水定容到 1 L。开始发酵时加入过滤除菌后的消泡剂 300 µL, 吐温-80 420 mg, 麦角甾醇 10 mg。

1.2 引物

实验用引物合成订自上海生工生物工程有限公司。引物序列见表 1。

1.3 方法

1.3.1 常规分子生物学操作

大肠杆菌感受态制备, 质粒的提取、酶切、纯化, 载体与 DNA 片段的连接, 酵母基因组提取等方法参见分子克隆实验指南。

1.3.2 敲除 *GPD2* 的同时整合表达 *POS5* 质粒的构建

根据 GenBank 已知的序列, 以工业酒精酵母染色体为模板, 以 G1F、G1R、G2F、G2R、POS5F、POS5R 为引物, PCR 分别扩增出 *GPD2* 基因两端的同源臂 450 bp、383 bp 以及 *POS5* 基因片段; 以质粒 pMGKR 为模板, 以 PGK1F 和 PGK1R 为引物, 扩增得到 *PGK1_P-PGK1_T* 启动子和终止子; 以质粒 pSH47-*HyBR* 为模板, 以 HyrF 和 HyrR 为引物, 扩增得到 *HyBR* 抗性片段。利用重叠延伸 PCR 技术将 *GPD2* 两段同

表 1 引物序列表

Table 1 Primers sequence table

Primers	Sequence (5'-3')	Restriction sites
G1F	ATT <u>GCGGCCG</u> CATGCTTGCTGTCAGAAGATT	<i>Not</i> I
G1R	CTTTGAATGGCTGCGG <u>GAGCTC</u> AAGCTTCAGGTCAATATTGGGTAGATATTT	<i>Nhe</i> I
G2F	AAATATCTACCCAATATTGACCTGA <u>AAGCTT</u> <u>GAGCTC</u> CCCGCAGCCATTCAAAG	<i>Sac</i> I, <i>Hind</i> III
G2R	CCGA <u>AAGCTT</u> ATTTTAGATTCTGACTTCAACTC	<i>Hind</i> III, <i>Sac</i> I
PGK1F	CGG <u>GAGCTC</u> <u>GGTACCGAACGCAGAA</u> TTTTTCGAGT	<i>Hind</i> III
PGK1R	CGG <u>GAGCTC</u> <u>GGTACCGAACGCAGAA</u> TTTTTCGAGT	<i>Kpn</i> I, <i>Sac</i> I
HyrF	GGGGTACCACATTTTGATGGCCGCACGG	<i>Kpn</i> I
HyrR	CGGG <u>GAGCTC</u> AACTCCTTCTTTTCGGTTAGAGCG	<i>Sac</i> I
POS5F	CGCGGATCCATGAGTACGTTGGATTACATTC	<i>Bam</i> H I
POS5R	CGCGT <u>CGACTT</u> TAATCATTATCAGTCTGTCTCTTGG	<i>Sal</i> I

Underlined are restriction enzyme sites.

源臂拼接,并与 pMD18T-Simple 连接,转化 *E. coli* JM109,验证得到阳性转化子并提取质粒 pMD- Δ gpd2,经 *Hind* III/*Sac* I 双酶切线性化,与经同样酶切的 *PGK1_P*-*PGK1_T* 片段连接得到质粒 pMD- Δ gpd2-*PGK1* 用 *Kpn* I/*Sac* I 酶切,继而与经相同酶切的 *HyBR* 抗性片段连接得到质粒 pDGPH。pDGPH 质粒经 *Bam*H I/*Sal* I 酶切与经同样酶切的 *POS5* 片段连接,最终得到重组质粒 pDGPH-*POS5*。

1.3.3 重组质粒 pDGPH-*POS5* 的转化

重组质粒 pDGPH-*POS5* 经 *Not* I 和 *Nhe* I 双酶切,得到 4.5 kb 左右含有 *GPD2* 上下游基因同源臂的敲除突变盒 *gpd2 Δ ::PGK1_{PT}*-*POS5*-*HyBR*。利用醋酸锂转化法^[13-14]将突变盒转入工业酒精酵母单倍体菌株 S1 (*MATa*),涂布 pH 8.5,潮霉素 B 浓度为 200 μ g/mL 的 YEPD 抗性平板培养 2-3 d,挑选转化子。将转化子点种到潮霉素 B 浓度 300 μ g/mL 的 YEPD 平板上,排除假阳性转化子后,PCR 验证。

1.3.4 NADH 激酶酶活的测定方法

NADH 激酶酶活测定方法按参考文献[15]进行。酶活定义 1 IU 为 30 $^{\circ}$ C 1.0 mL 反应液 1 min 内产生 1.0 μ mol NADPH 的量^[15]。

粗酶液中的蛋白含量用 Bradford 方法^[16]测定,以 BSA 作为标准。

1.3.5 胞内 NADH 含量的测定方法

样品处理:取发酵液 30 mL 放置于液氮中 60 s 以达到快速冷却并阻断细胞的进一步代谢。为了提取 NADH 和 NAD^+ ,菌体真空冷冻干燥 24 h,在 50 mmol/L KOH、30%乙醇和 22 mmol/L 硼砂中解冻。提取的样品用 3 mol/L HCl 调 pH 至 9.0-9.4,放置在冰上 30 min。

10 000 r/min 离心 10 min,去除上清液,置于 -70 $^{\circ}$ C 保存备用^[17]。

分析时取出菌体,加入 4 $^{\circ}$ C 预冷的细胞破碎液 (50 mmol/L PBS),超声波处理 10 min,4 $^{\circ}$ C 离心,上清液经 0.45 μ m 膜过滤。

HPLC 条件:色谱柱 column stable-C18 反相柱 (250 mm \times 4.6 mm),流动相 A:100% 100 mmol/L PBS (pH 7.0);流动相 B:50% 100 mmol/L PBS (pH 7.0),50%甲醇。流速 1 mL/min,柱温 35 $^{\circ}$ C,紫外检测器,检测波长 254 nm,340 nm^[18]。

其中, NAD^+ 和 NADP^+ 在 254 nm 处有吸收峰,而 NADH 和 NADPH 在 254 nm 和 340 nm 处均有吸收峰,其中还原态辅酶 NADH 和 NADPH 以 340 nm 处吸收峰积分。

1.3.6 乙醇发酵工艺

分别挑取原始菌株和重组菌株的单菌落接种到 20 mL YEPD 培养基中,培养 24 h;以 10% 接种量转接到 50 mL YEPD 培养基中,培养 12 h 后 *OD* 达到 10.0 左右。以 5%接种量将种子液接种到基础发酵培养基中,控制初始 *OD* 值在 0.5 左右。30 $^{\circ}$ C 恒温静置发酵。发酵过程中每隔 4 h 取样一次,测定相关的发酵性能参数。

1.3.7 发酵产物的检测

发酵液中葡萄糖、乙醇、甘油、乙酸和丙酮酸含量用 HPLC 检测。

HPLC 条件:色谱柱 Shodex SH1011,流动相 0.01 mol/L H_2SO_4 ,流速 0.8 mL/min,柱温 50 $^{\circ}$ C,示差折光检测器 Shodex RI10。

菌体得率:取 30 mL 样品,6 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,用无菌的生理盐水洗涤菌体 2-3 次,再次收集菌体,弃上清后将菌体置于 105 $^{\circ}$ C 下烘至恒重后称重,计算菌体得率。

2 结果与分析

2.1 敲除 *GPD2* 的同时整合表达 *POS5* 质粒的构建

重组质粒 pMD- Δ *gpd2*、pMD- Δ *gpd2*-*PGK1*、pDGPH、pDGPH-*POS5* 的酶切验证如图 1 所示。

2.2 重组菌 S3 (*gpd2* Δ ::*PGK1*_{PT}-*POS5*-*HyBR*) 的验证

将含有 *GPD2* 上下游基因同源臂的敲除突变盒 *gpd2* Δ ::*PGK1*_{PT}-*POS5*-*HyBR* (约 4.5 kb, 如图 2 所示) 转入原始菌 S1 中, 在 pH 8.5、潮霉素 B 浓度为 200 μ g/mL 的 YEPD 抗性平板上筛选阳性转化子。

阳性转化子经 PCR 扩增验证, 提取相应酵母染色体作为模板, 以 G1F 和 G2R 为引物, 如果 PCR 扩增得不到 *GPD2* 基因, 证明重组菌的 *GPD2* 基因已经敲除, 以原始菌作为阴性对照, 原始菌可扩增得到 1 323 bp 大小的 *GPD2* 基因; 以 HyrF 和 HyrR 为引物, 重组菌可扩增得到 1 335 bp 大小的 *HyBR* 抗性片段, 原始菌扩增得

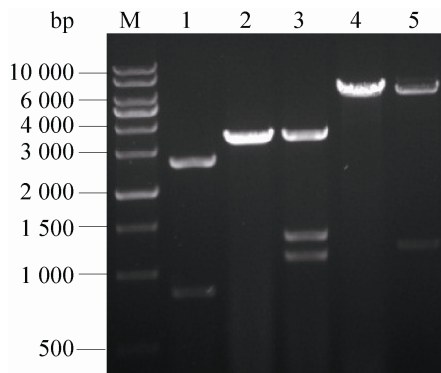


图 1 不同质粒酶切的验证

Fig. 1 Verification of the different plasmids digested by corresponding enzymes. M: 1 kb marker; 2: pMD- Δ *gpd2* digested with *Not* I and *Nhe* I; 3: pMD- Δ *gpd2* digested with *Hind* III; 4: pDGPH digested with *Hind* III, *Kpn* I and *Sac* I; 5: pDGPH-*POS5* digested with *Bam*H I and *Sal* I.

不到 *HyBR* 片段; 以 *PGK1*F 和 *POS5*R、*POS5*F 和 *PGK1*R 分别作为两对引物, 可扩增得到片段 *PGK1*_P-*POS5* 和 *POS5*-*PGK1*_T, 证明 *POS5* 基因已经整合到重组菌的染色体上。PCR 验证结果如图 3 所示。

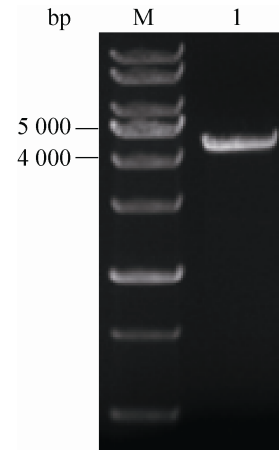


图 2 敲除突变盒的验证

Fig. 2 Verification of the cassette of gene deletion. M: 1 kb marker; 1: a cassette *gpd2* Δ ::*PGK1*_{PT}-*POS5*-*HyBR*.

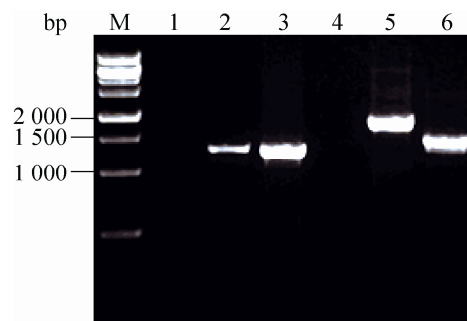


图 3 重组菌 S3 PCR 验证

Fig. 3 Verification of recombinant strain S3 PCR amplification. M: 1 kb marker; 1: the PCR product of *GPD2* amplified from S3 with primers G1F and G2R; 2: negative control of *GPD2* from S1; 3: the PCR product of *HyBR* amplified from S3 with primers HyrF and HyrR; 4: negative control of *HyBR* from S1; 5: the PCR product of *PGK1*_P-*POS5* amplified from S3 with primers *PGK1*F and *POS5*R; 6: the PCR product of *POS5*-*PGK1*_T amplified from S3 with primers *POS5*F and *PGK1*R.

2.3 NADH 激酶酶活的测定

按方法 1.3.4 所述对重组菌和原始菌株进行 NADH 激酶酶活的测定。

由表 2 可知,重组菌 S3 胞内的 NADH 激酶的酶活明显高于原始菌 S1 和突变菌 S2,证明了 NADH 激酶基因 *POS5* 在重组菌中得到了过量表达。

2.4 重组菌胞内 NADH 含量的测定

发酵 12 h 后取样,测定重组菌 S3、S2 和原始菌 S1 胞内的 NADH 浓度。

由表 3 可知,NADH 激酶基因 *POS5* 的超表达调节了重组菌 S3 胞内的 NADH 浓度,略高于原始菌 S1 的胞内 NADH 浓度,但却大大低于重组菌 S2 的 NADH 浓度。重组菌 S2 由于敲除了甘油合成途径的关键酶基因 *GPD2*,使得甘油合成减少,导致胞内 NADH 浓度大量提高,而重组菌在敲除 *GPD2* 的同时过表达了 *POS5* 基因,不仅降低甘油产量,同时缓解了胞内 NADH 的高浓度。

表 2 NADH 激酶酶活比较

Table 2 Enzyme assay of NADH kinase

Strains	S1	S2	S3
NADH ^a kinase activity (IU/mg)	0.030±0.002	0.041±0.03	2.282±0.002

a: triplicate experiments; ±: standard deviation.

表 3 胞内 NADH 浓度比较

Table 3 Intracellular NADH concentration

Strains	S1	S2	S3
NADH ^a concentration (mmol/L)	0.049±0.001	0.081±0.0001	0.051±0.002

a: triplicate experiments; ±: standard deviation.

2.5 重组菌发酵性能研究

在 15%葡萄糖浓度的基础发酵培养基中,比较重组菌 S3 和 S2 与原始菌株 S1 的发酵性能的差异。

发酵过程中菌体生长曲线如图 4A 所示,重组菌 S3 (*MATa, gpd2Δ::PGK1_{PT}-POS5-HyBR*)、S2 (*MATa, gpd2Δ::HyBR*) 的生长速率均低于原始菌 S1 (*MATa*),但 S3 的生长速率要快于 S2,说明在 *GPD2* 基因缺失的情况下,NADH 激酶的表达加快了菌体的生长速率。甘油途径的阻断不仅影响了菌体的生长速率,而且也影响了酵母的发酵性能。从图 4B、4C 看出,S3 和 S2 的耗糖能力和初始产乙醇能力明显低于 S1。重组菌 S3 和 S2 的乙醇产量分别为 68.04 g/L 和 65.43 g/L,均高于原始菌 S1 的 63.01 g/L,S3 和 S2 的乙醇得率 (g ethanol/g glucose) 分别提高了 8%和 3.86%。从图 4D 看出,重组菌 S3 和 S2 的甘油产量分别为 4.29 g/L 和 5.10 g/L,分别低于原始菌的 6.47 g/L,S3 和 S2 的甘油得率 (g glycerol/g glucose) 分别降低了 33.64%和 21.11%。

由表 4 可以证明在酿酒酵母中敲除 *GPD2* 同时表达过量 *POS5* 基因提高乙醇产量的策略是可行的。NADH 激酶基因 *POS5* 的表达,以 ATP 为磷酸供体,催化 NADH 生成 NADPH,通过降低甘油的产量使得乙醇的产量提高,证明了辅酶基因的表达会在一定程度上影响酵母的代谢过程,与前期的报道相符^[19]。重组菌 S2 的乙酸和丙酮酸含量明显低于 S1,可能是由于酿酒酵母调整代谢途径来应对甘油产量降低的一种机制^[4]。而重组菌 S3 的最大比生长速率、菌体得率以及副产物含量与原始菌株差异不大,证明整合表达 *POS5* 达到了预期的效果。

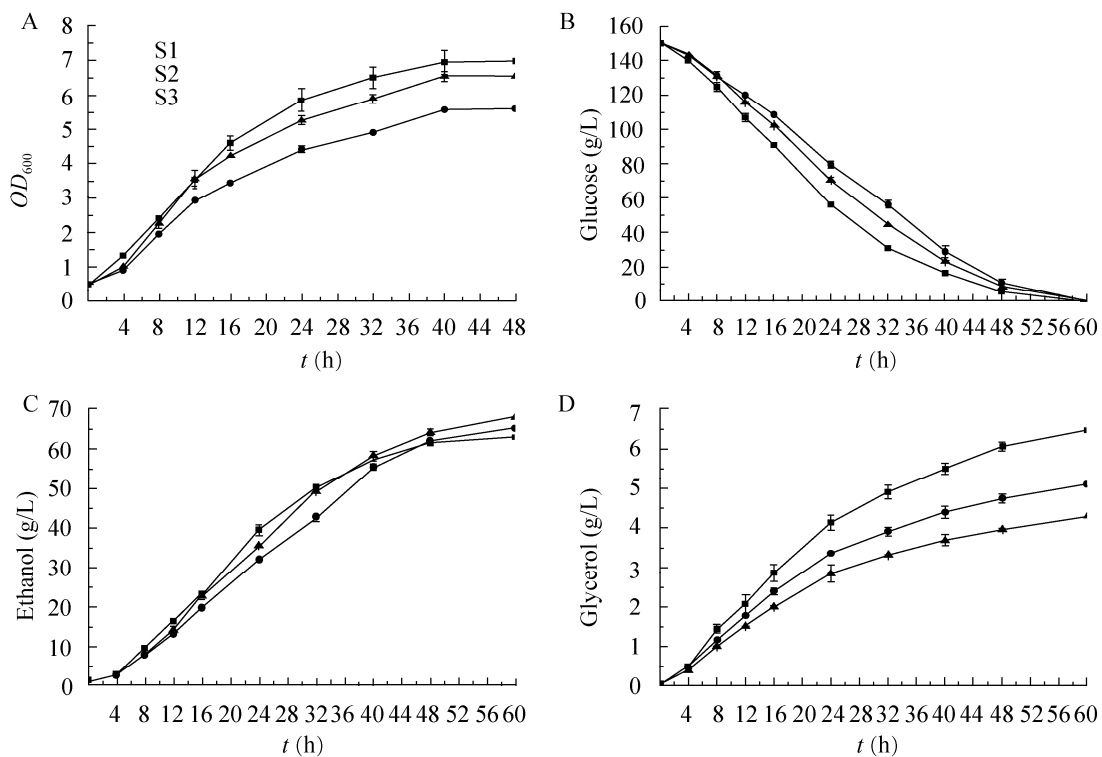


图4 重组菌 S3、S2 与原始菌 S1 的发酵性能比较

Fig. 4 The performance of strains S3, S2 and S1 in ethanol fermentation. (A) OD_{600} , optical density at 600 nm versus time. (B) the concentration of glucose versus time. (C) the concentration of ethanol versus time. (D) the concentration of glycerol versus time.

表4 重组菌 S3、S2 与 S1 在 15%葡萄糖浓度的基础发酵培养基上的乙醇发酵情况

Table 4 The performance of strains S3, S2 and S1 in ethanol fermentation on 15% glucose

Parameter	S1	S2	S3
Max. sp. growth rate (h^{-1})	0.266±0.001	0.193±0.002	0.260±0.001
Biomass yield (g DW/g glucose)	0.025±0.001	0.019±0.002	0.024±0.001
Ethanol yield (g/g glucose)	0.420±0.002	0.436±0.001	0.454±0.002
Glycerol yield (g/g glucose)	0.043±0.001	0.034±0.002	0.029±0.003
Acetate yield (mg/g glucose)	2.140±0.002	1.772±0.003	2.125±0.001
Pyruvate yield (mg/g glucose)	0.450±0.001	0.321±0.002	0.434±0.001

Values reported are the $\bar{x} \pm s$ deviation of three independent experiments.

3 讨论

甘油在酿酒酵母代谢过程中有着不可比拟的重要作用, 甘油的合成不仅能调节细胞渗透

压, 而且厌氧条件下还用于维持胞内的氧化还原平衡^[20]。甘油途径的阻断对乙醇的产量有一定程度的提高, 然而单纯地阻断或者削弱甘油途径, 并不能达到理想的结果^[21]。因此, 本实

验设计了一种整合型质粒,在敲除 *GPD2* 基因的基础上整合表达了 *POS5* 基因,从而达到 *GPD2* 敲除能削弱甘油的合成,同时 *POS5* 的过量表达能调节胞内氧化还原平衡的效果,最终使得重组菌在不影响菌株生理特性的前提下降低甘油产量,在一定程度上提高乙醇的产量。结果表明,敲除突变盒 *gpd2Δ::PGK1_{PT}-POS5-HyBR* 的转入,使得工业酒精酵母在不影响最大比生长速率的前提下,乙醇得率提高了 8%,甘油得率降低了 33.64%。同时也调节了胞内的氧化还原平衡。

在酿酒酵母生成乙醇的代谢途径中,甘油是最主要的副产物,甘油途径包括甘油合成途径和甘油分解途径,而这两个途径的改变对乙醇的产量可能都会产生影响。因此,从甘油途径对酿酒酵母进行基因改造,一方面包括阻断或削弱甘油合成途径,另一方面包括加强甘油分解途径(二羟丙酮途径)。甘油合成途径的关键酶基因是 *GPD2*,本实验已经敲除了 *GPD2*,达到了比较理想的效果。而甘油分解途径中存在两个关键酶,由 *GCY1* 编码的甘油脱氢酶和由 *DAK1* 编码的二羟丙酮激酶,这条途径用于转化甘油,来调节细胞的渗透压^[22]。Yu 等^[23-24]以甘油为碳源,在酿酒酵母中同时过表达 *GCY1* 和 *DAK1* 基因,得到的重组菌乙醇产量是野生菌株的 2.4 倍,证明了通过加强甘油分解途径来提高乙醇产量的策略是可行的。唐燕^[25]以葡萄糖为碳源,在工业酒精酵母中,整合表达 *GCY1* 和 *DAK1* 基因,重组菌比野生型酵母酒精得率提高了 2.9%,甘油产率降低了 24.9%。后期的实验可以将酿酒酵母的甘油合成和甘油分解途径相结合,同时选取最佳的辅酶代谢途径,即在敲除甘油合成关键酶基因 *GPD2* 的基础上,加强表达甘油分解关键酶基因 *GCY1* 和 *DAK1*,

从而尽量减少甘油的生成量,同时在细胞质中过表达辅酶基因 *POS5*,使胞内的 NADH 含量维持在合理的水平,最终使得乙醇的产量进一步提高。

REFERENCES

- [1] Hansen AC, Zhang Q, Lyne PW. Ethanol-diesel fuel blends-a review. *Bioresour Technol*, 2005, 96(3): 277-285.
- [2] Surisetty VR, Dalai AK, Kozinski J. Alcohols as alternative fuels: an overview. *Appl Catal A*, 2011, 404(1/2): 1-11.
- [3] Nissen TL, Kielland-Brandt MC, Nielsen J, et al. Optimization of ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering of the ammonium assimilation. *Metab Eng*, 2000, 2(1): 69-77.
- [4] Valadi H, Larsson C, Gustafsson L. Improved ethanol production by glycerol-3-phosphate dehydrogenase mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998, 50(4): 434-439.
- [5] Remize F, Barnavon L, Dequin S. Glycerol export and glycerol-3-phosphate dehydrogenase, but not glycerol phosphatase, are rate limiting for glycerol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng*, 2001, 3(4): 301-312.
- [6] Larsson K, Ansell R, Eriksson P, et al. A gene encoding sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) complements an osmosensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, 1993, 10(5): 1101-1111.
- [7] Shianna KV, Marchuk DA, Srand MK. Genomic characterization of *POS5*, the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial NADH kinase. *Mitochondrion*, 2006, 6(2): 99-106.
- [8] Strand MK, Stuart GR, Longley MJ, et al. *POS5* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a mitochondrial NADH kinase required for stability of mitochondrial DNA. *Eukaryot Cell*, 2003, 2(4):

- 809–820.
- [9] Stuart GR, Humble MM, Strand MK, et al. Transcriptional response to mitochondrial NADH kinase deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mitochondrion*, 2009, 9(3): 211–221.
- [10] Bro C, Birgitte R, Jochen F, et al. In silico aided metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved bioethanol production. *Metab Eng*, 2006, 8(2): 102–111.
- [11] Hou J, Lages NF, Oldiges M, et al. Metabolic impact of redox cofactor perturbations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng*, 2009, 11(4): 253–261.
- [12] Guo ZP, Zhang L, Ding ZY, et al. Minimization of glycerol synthesis in industrial ethanol yeast without influencing its fermentation performance. *Metab Eng*, 2011, 13(1): 49–59.
- [13] Gietz RD, Schiestl RH, Willems AR, et al. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*, 1995, 11(4): 355–360.
- [14] Gietz RD, Schiestl RH. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat Protoc*, 2007, 2(1): 31–34.
- [15] Shi F, Kawai S, Mori S, et al. Identification of ATP-NADH kinase isozymes and their contribution to supply of NADP(H) in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS J*, 2005, 272(13): 3337–3349.
- [16] Wang JZ. *The Technical Manuals of Protein*. Beijing: Science Press, 2000: 42–47 (in Chinese). 汪家政. *蛋白质技术手册*. 北京: 科学出版社, 2000: 42–47.
- [17] Liu LM, Li Y, Du GC, et al. Redirection of the NADH oxidation pathway in *Torulopsis glabrata* leads to an enhanced pyruvate production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 72(2): 377–385.
- [18] Hong P, Liu HW, Jin GH, et al. Determination of ATP, ADP, AMP, NAD⁺, NADH in skeletal muscle by HPLC. *Chin J Sports Med*, 2002, 21(1): 57–60 (in Chinese). 洪平, 刘虎威, 靳光华, 等. 高效液相色谱法测定骨骼肌 ATP, ADP, AMP, NAD⁺, NADH 含量. *中国运动医学杂志*, 2002, 21(1): 57–60.
- [19] Zhang L, Tang Y, Guo ZP, et al. Improving the ethanol yield by reducing glycerol formation using cofactor regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett*, 2011, 33(7): 1375–1380.
- [20] Nevoigt E, Stahl U. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev*, 1997, 21(3): 231–241.
- [21] Guo ZP, Zhang L, Ding ZY, et al. Interruption of glycerol pathway in industrial alcoholic yeasts to improve the ethanol production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 82(2): 187–292.
- [22] Norbeck J, Blomberg A. Metabolic and Regulatory changes associated with growth of *Saccharomyces cerevisiae* in 1.4 M NaCl. *J Biol Chem*, 1996, 272(9): 5544–5554.
- [23] Yu KO, Kim SW, Han SO. Engineering of glycerol utilization pathway for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour Technol*, 2010, 101(11): 4157–4161.
- [24] Yu KO, Kim SW, Han SO. Reduction of glycerol production to improve ethanol yield in an engineered *Saccharomyces cerevisiae* using glycerol as a substrate. *J Biotechnol*, 2010, 150(2): 209–214.
- [25] Tang Y. *The expression strategy for glycerol decomposition based on endocellular redox equilibrium in Saccharomyces cerevisiae*[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2012 (in Chinese). 唐燕. *基于工业酒精酵母胞内氧化还原平衡的甘油分解表达策略*[D]. 无锡: 江南大学, 2012.

(本文责编 陈宏宇)