

# 过量表达烟酸转磷酸核糖激酶对大肠杆菌 NZN111 产丁二酸的影响

刘嵘明, 马江锋, 梁丽亚, 徐冰, 王光明, 张敏, 姜岷

南京工业大学 生物与制药工程学院 材料化学工程国家重点实验室, 南京 210009

**摘要:** 大肠杆菌 NZN111 厌氧发酵的主要产物为丁二酸, 是发酵生产丁二酸的潜力菌株。但是由于敲除了乳酸脱氢酶的编码基因 (*ldhA*) 和丙酮酸甲酸裂解酶的编码基因 (*pflB*), 导致辅酶 NADH/NAD<sup>+</sup> 不平衡, 厌氧条件下不能利用葡萄糖生长代谢。构建烟酸转磷酸核糖激酶的重组菌 *Escherichia coli* NZN111/pTrc99a-*pncB*, 在厌氧摇瓶发酵过程中通过添加 0.5 mmol/L 的烟酸、0.3 mmol/L 的 IPTG 诱导后重组菌的烟酸转磷酸核糖激酶 (Nicotinic acid phosphoribosyl transferase) 酶活较出发菌株提高了 11 倍, 辅酶 NAD(H) 的总量提高了 3.85 倍, 特别是 NAD<sup>+</sup> 的浓度提高了 5.17 倍, NADH/NAD<sup>+</sup> 的比例从 0.640 下降到 0.125, 使重组菌株在厌氧条件下具有生长和代谢葡萄糖的能力。

**关键词:** 烟酸转磷酸核糖激酶, 大肠杆菌 NZN111, 丁二酸, 两阶段发酵

## Effect of overexpression of nicotinic acid phosphoribosyl transferase on succinic acid production in *Escherichia coli* NZN111

Rongming Liu, Jiangfeng Ma, Liya Liang, Bing Xu, Guangming Wang, Min Zhang, and Min Jiang

State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China

**Abstract:** *Escherichia coli* strain NZN111 is a promising candidate for the fermentative production of succinate. However, because lactate dehydrogenase and pyruvate formate lyase were inactivated in NZN111, this strain had an unbalanced NADH/NAD<sup>+</sup> ratio and could not use glucose under anaerobic conditions. In this study, a recombinant strain *E. coli* NZN111/pTrc99a-*pncB* was constructed to overexpress the nicotinic acid phosphoribosyl transferase gene (*pncB*). Under anaerobic conditions with the addition of 0.5 mmol/L nicotinic acid and 0.3 mmol/L isopropyl beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG), the specific nicotinic acid phosphoribosyl transferase (NAPRTase, EC 2.4.2.11) activity in the recombinant strain was 11-fold higher than that in *E. coli* NZN111, the concentration of NAD(H) was increased by 3.85-fold, especially the concentration of NAD<sup>+</sup> was increased by 5.17-fold and NADH/NAD<sup>+</sup> was decreased from 0.640 to 0.125. The recombinant strain regained the capability of growth and glucose utilization under anaerobic conditions.

Received: February 16, 2011; Accepted: April 11, 2011

Corresponding author: Min Jiang. Tel: +86-25-83172078; E-mail: jiangmin@njut.edu.cn

**Keywords:** nicotinic acid phosphoribosyl transferase, *Escherichia coli* NZN111, succinic acid, dual-phase fermentation

丁二酸 (Succinic acid) 是一种重要的“C4 平台化合物”, 广泛应用于食品、医药、农业领域, 可作为合成 1,4-丁二醇、四氢呋喃、N-甲基吡咯烷酮及可降解生物高分子材料聚丁二酸丁二醇酯 (PBS) 等的原料。微生物发酵法生产丁二酸可以摆脱常规化学合成法对石油的依赖, 且开辟了温室气体二氧化碳利用的新途径, 具有广阔的应用前景<sup>[1]</sup>。

大肠杆菌 NZN111 为敲除了乳酸脱氢酶的编码基因 (*ldhA*)、丙酮酸甲酸裂解酶的编码基因 (*pflB*) 的菌株, 其厌氧发酵的主要产物为丁二酸, 几乎不产乳酸和甲酸, 是发酵生产丁二酸的潜力菌株。但同时由于 NADH 依赖的乳酸脱氢酶 (LDH) 无法合成而限制了糖酵解过程中形成的 NADH 再生为 NAD<sup>+</sup> 的过程, 造成辅酶不平衡, 导致该菌株厌氧条件下无法利用葡萄糖进行生长并造成丙酮酸的大量积累<sup>[2-3]</sup>。其自发突变株大肠杆菌 AFP111 由于突变了葡萄糖专性转运系统中的 *ptsG* 基因, 降低了其在 EMP 途径中 NADH 的产生速率, 恢复了 NAD(H) 平衡, 使得菌株在厌氧条件下能够利用葡萄糖, 且产物主要为丁二酸<sup>[4]</sup>。因此, 在高产丁二酸大肠杆菌菌株构建过程中, 确保胞内辅酶 NAD(H) 的平衡是重组大肠杆菌高产丁二酸的关键因素之一。在两阶段发酵生产丁二酸过程中, 当采用碳限制策略后厌氧发酵阶段胞内 NAD(H) 总量较未采用碳限制策略时提高了近 50%, 同时 NADH/NAD<sup>+</sup> 比例也由 0.55 提高至 1.25<sup>[5]</sup>, 因此, 提高 NAD(H) 总量与维持合适 NADH/NAD<sup>+</sup> 比例对于提高还原性终端产物丁二酸的生产效率而言均是非常重要的, 若能将两者兼顾实现, 将可大幅度提高其生产效率。图 1 是大肠杆菌的厌氧混合酸发酵途径<sup>[6]</sup>。

大肠杆菌中 NAD(H) 的生物合成及分解途径如图 2 所示, San 等<sup>[7-8]</sup>在研究辅因子调控对大肠杆菌代谢流分布的影响过程中, 通过过量表达烟酸转磷酸核糖激酶使胞内 NAD(H) 量提高了 41.7%。Heuser 等<sup>[9]</sup>

通过过量表达烟酸转磷酸核糖激酶和 NAD 合成酶, 使菌株胞内 NAD(H) 总量提高了 2 倍多, 并将其应用到酶转化合成 (R)-甲基-3-羟基丁胺过程中, 使得 NAD(H) 的量不再成为限制因素, 从而提高了酶转化的效率。但是在大肠杆菌产丁二酸的代谢工程领域, 还没有明确提出, 通过过量表达 NAD(H) 生物合成途径中关键酶的方法来提高丁二酸产量。大肠杆菌 NZN111 由于敲除了乳酸脱氢酶的编码基因 (*ldhA*)、丙酮酸甲酸裂解酶的编码基因 (*pflB*), 导致辅酶 NADH/NAD<sup>+</sup> 不平衡, 厌氧条件下不能利用葡萄糖生长代谢。本研究构建了烟酸转磷酸核糖激酶 (NAPRTase) 的重组菌大肠杆菌 NZN111/pTrc99a-*pncB*, 通过辅酶 NAD(H) 补救合成途径提高 NAD<sup>+</sup> 的生成<sup>[10-11]</sup>, 使菌株 NADH/NAD<sup>+</sup> 比例恢复平衡, 在厌氧条件下能够利用葡萄糖生长, 提高还原三羧酸循环中关键酶酶活, 并减少丙酮酸的积累, 增加丁二酸的产量。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 DH5 $\alpha$  由本实验室保藏, 质粒 pTrc99a 由南京师范大学邵蔚蓝教授惠赠, *E. coli* NZN111 (*ldhA*::Kan *Pfl*::cam) 由南伊利诺伊卡本代尔大学 Clark 教授惠赠, 作为宿主菌和对照菌。

#### 1.1.2 主要试剂

氨苄青霉素、氯霉素、硫酸卡那霉素, 购自上海生工生物工程有限公司; 基因组提取试剂盒和琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自北京天根生化科技有限公司; 质粒小量快速提取试剂盒为上海申能博彩生物科技有限公司产品; DNA 片段回收试剂盒、限制性内切酶、Pyrobest DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶为大连宝生物有限公司产品; 酵母提取物和胰蛋白胨为 Oxoid 公司产品; CO<sub>2</sub> 气体购自南京上元工业气体厂; 发酵罐为美国 NBS 公司 BIOFLO110

系列 7 L 发酵罐。其他试剂为国产分析纯。

## 1.2 方法

### 1.2.1 *pncB* 基因的克隆

引物设计：参照 *pncB* 基因序列（来源于 *E. coli*

K12 基因组，GenBank Accession No. 0009435）设计，由上海申能博彩生物科技有限公司合成。分别在上下游引物的 5'端引入了 *Nco* I 和 *Hind* III 限制性酶切位点，引物序列如表 1 所示。

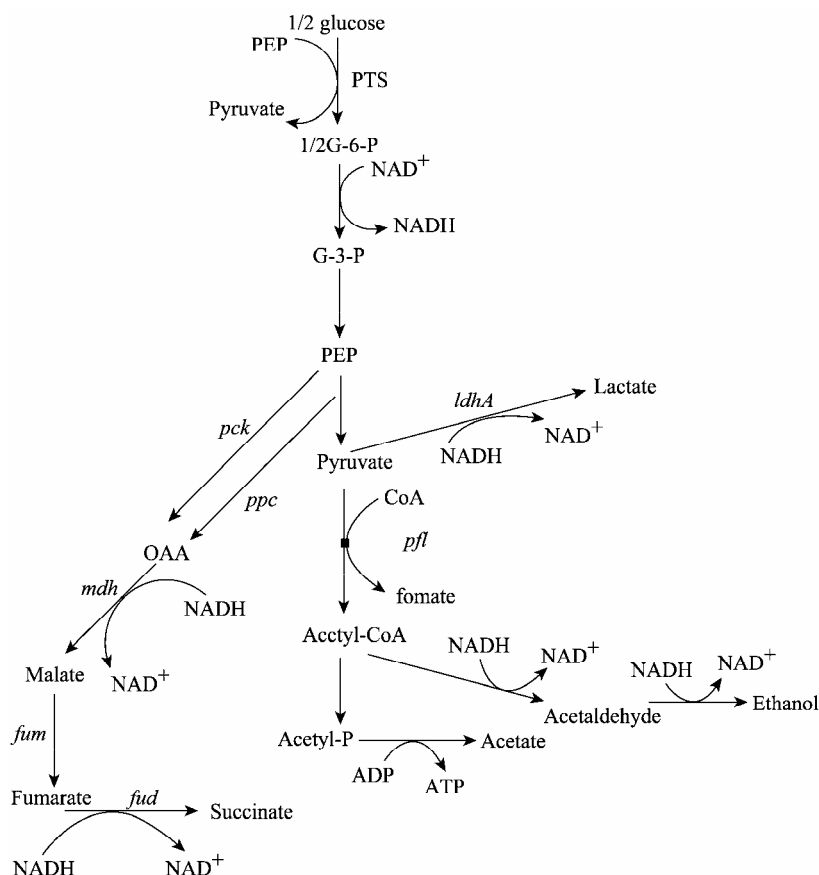


图 1 大肠杆菌厌氧混合酸发酵途径<sup>[6]</sup>

Fig. 1 Pathways of anaerobic mixed acid fermentation for *Escherichia coli*<sup>[6]</sup>.

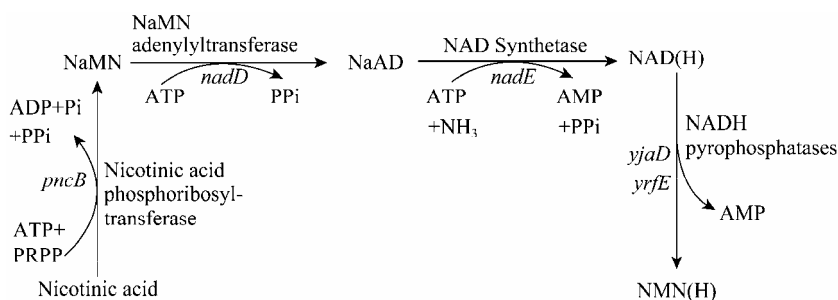


图 2 大肠杆菌 NAD(H) 的生物合成与分解途径

Fig. 2 NAD(H) metabolism in *Escherichia coli*. NaMN: nicotinic acid mononucleotide; NaAD: nicotinic acid adenine dinucleotide; NAD: nicotinamide adenine dinucleotide; PRPP: phosphoribosyl pyrophosphate; NMN: nicotinamide mononucleotide.

表 1 本研究中用到的引物

Table 1 Primers used in the study

| Primer name | Primer sequence (5'-3')          | Size (bp) |
|-------------|----------------------------------|-----------|
| Forward     | CGGGATCCATGACACAATTCGCTTCTCCTG   | 30        |
| Reverse     | CCCAAGCTTAATATCCGGCAACCAATTAAGTC | 32        |

PCR 反应体系: 上下游引物 (50 pmol/ $\mu$ L) 各 1  $\mu$ L, 模板 DNA (100 ng/ $\mu$ L) 0.5 $\mu$ L, 10 $\times$ buffer 5  $\mu$ L, dNTPs (10 mmol/L) 1  $\mu$ L, DNA 聚合酶 (2.5 U/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 37.5  $\mu$ L, 总体积 50  $\mu$ L。

反应条件: 94  $^{\circ}$ C, 5 min; 94  $^{\circ}$ C 45 s, 55  $^{\circ}$ C 45 s, 72  $^{\circ}$ C 72 s, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C, 10 min。

### 1.2.2 重组质粒的构建

将纯化后的 *pncB* 基因片段以及质粒 pTrc99a 进行 *Nco* I 和 *Hind* III 双酶切反应, 把双酶切后得到的片段在 T4 DNA 连接酶的作用下 16  $^{\circ}$ C 连接过夜, 构建重组质粒 pTrc99a-*pncB* 并转化于大肠杆菌 NZN111 感受态。涂布含氯霉素、硫酸卡那霉素和氨苄青霉素平板后挑选抗性克隆, 提取质粒后进行 *Hind* III 单酶切及 *Nco* I /*Hind* III 的双酶切鉴定。

### 1.2.3 重组烟酸转磷酸核糖激酶的诱导表达

菌体转化: CaCl<sub>2</sub> 法<sup>[12]</sup>。有氧诱导: 37  $^{\circ}$ C、200 r/min 培养菌体到 OD<sub>600</sub> 约为 0.7 左右, 加入 IPTG 至终浓度为 0.3 mmol/L, 烟酸至终浓度为 0.5 mmol/L, 30  $^{\circ}$ C、170 r/min 诱导 8 h。

### 1.2.4 酶活检测

样品处理: 采取超 3 s 停 5 s 的策略共超声破碎 3 min, 于 4  $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 15 min, 取上清即粗酶液, 测定酶活。

总蛋白浓度测定参照 Bradford 法<sup>[13]</sup>, 以 BSA (牛血清白蛋白) 为标准。

标准反应体系如下<sup>[14]</sup>: 45 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 15 mmol/L MgCl<sub>2</sub> (pH 7.5), 4.5 mmol/L ATP, 1.5 mmol/L PRPP, 0.15 mmol/L 烟酸, 4 mmol/L 磷酸烯醇式丙酮酸, 0.2 mmol/L NADH, 13 U 乳酸脱氢酶, 13 U 丙酮酸激酶。30  $^{\circ}$ C 连续监测 340 nm

处吸光值的变化, 根据测定的标准曲线换算成底物浓度。

酶活定义为: 30  $^{\circ}$ C、1 min 内催化 1 mmol 的烟酸转化为烟酸单核苷酸所需要的酶量, 即 1 U。比酶活定义为每毫克蛋白含有的酶活 (U/mg)。

### 1.2.5 辅酶 NADH 与 NAD<sup>+</sup> 浓度的测定<sup>[15]</sup>

反应时依次添加 150  $\mu$ L 上述的细胞提取液、0.9 mL 的纯水、1.8 mL 的混合反应液 (等体积的 1.0 mol/L 甘氨酸二肽/烟酸缓冲液、纯乙醇、40 mmol/L EDTA、4.2 mmol/L 噻吩兰和双倍体积的 16.6 mmol/L PES 混合, 30  $^{\circ}$ C 水浴 10 min) 和 150  $\mu$ L 的乙醇脱氢酶 (500 U/mL), 迅速混匀后, 测定波长 570 nm 处的吸光度值 A<sub>570</sub>, 作出测定得到的吸光度值 A<sub>570</sub> 随时间变化曲线, 并将所得到曲线的斜率带到标准曲线中去, 得到待测样品中 NADH 与 NAD<sup>+</sup> 的浓度。

### 1.2.6 培养基及培养条件

有氧培养基: LB 培养基: 酵母粉 5 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 氯化钠 5 g/L, pH 7.0, 氯霉素、硫酸卡那霉素和氨苄青霉素的终浓度分别为 25  $\mu$ g/mL、30  $\mu$ g/mL 和 100  $\mu$ g/mL。

厌氧血清瓶发酵用培养基: 30 mL LB 液体培养基, 添加 0.48 g 碱式碳酸镁, 20 g/L 葡萄糖, 终浓度为 0.5 mmol/L 的烟酸, 抗生素添加同有氧培养基, 添加终浓度为 0.3 mmol/L 的诱导剂 IPTG (异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷) 以诱导表达 NAPRTase。

### 1.2.7 培养方法

有氧摇瓶培养: 将保存于-80  $^{\circ}$ C 的菌种在加有相应抗生素的平板上活化, 挑单菌落到 5 mL LB 试管, 37  $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 10 h, 1% 接种量接种到

好氧培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 5 h。

厌氧血清瓶发酵: 转接 10% 的菌液到血清瓶中, 通入过滤除菌后的 CO<sub>2</sub> 气体 2 min, 保证血清瓶中为厌氧环境, 加入终浓度 0.3 mmol/L 的 IPTG、0.5 mmol/L 的烟酸, 30 °C、170 r/min 发酵 48 h。

### 1.2.8 最佳生长条件的确定

#### 1) 菌株最佳诱导起始生长量的确定

厌氧血清瓶发酵时, 分别在初始 OD<sub>600</sub> 值为 0.5、0.7、0.9 的培养液中加入终浓度 0.3 mmol/L 的 IPTG、0.5 mmol/L 的烟酸, 30 °C 厌氧发酵, 170 r/min, 发酵周期 48 h, 留样测定 OD<sub>600</sub>, 以及高效液相色谱法 (HPLC) 检测丁二酸含量。

#### 2) IPTG 诱导最佳浓度的确定

厌氧血清瓶发酵时, 在初始 OD<sub>600</sub> 值为 0.7 的培养液中加入 IPTG 终浓度分别为 0.1、0.3、0.5 以及终浓度为 0.5 mmol/L 的烟酸, 30 °C 厌氧发酵, 170 r/min, 发酵周期 48 h, 留样测定 OD<sub>600</sub>, 以及高效液相色谱法 (HPLC) 检测丁二酸含量。

#### 3) 烟酸最佳浓度的确定

厌氧血清瓶发酵时, 在初始 OD<sub>600</sub> 值为 0.7 的培养液中加入烟酸终浓度分别为 0.1、0.3、0.5、1 mmol/L 的 IPTG, 厌氧发酵 30 °C, 170 r/min, 发酵周期 48 h, 留样测定 OD<sub>600</sub>, 以及高效液相色谱法 (HPLC) 检测丁二酸含量。

### 1.2.9 发酵及代谢物分析

细胞生长是用紫外可见分光光度计于波长 600 nm 处测定吸光度值, 细胞干重 (Dry cell weight, DCW) 是由 DCW 与 OD<sub>600</sub> 测定的标准曲线换算得到, 换算公式为: DCW (g/L)=0.4×OD<sub>600</sub>。培养基中的葡萄糖用生物传感仪 (SBA40C, 生产厂家是山东省科学院生物研究所) 检测, 有机酸用高效液相色谱法 (HPLC) 检测, 色谱柱为 Prevail Organic Acid, 流动相为 25 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 2.5, 流速 1.0 mL/min, 紫外检测波长 215 nm。

## 2 结果与分析

### 2.1 烟酸转磷酸核糖激酶的克隆与表达

用限制性内切酶 *Nco* I 和 *Hind* III 双酶切 PCR 扩增后的目的基因片段 *pncB* 和载体 pTrc99a (图 3), 酶切产物纯化后用 T4 DNA 连接酶进行连接, 构建表达载体 pTrc99a-*pncB*, 构建流程如图 4 所示。

重组质粒经单酶切鉴定的条带大小预期为 5 474 bp, 经双酶切鉴定的条带大小预期为 4 120 bp 和 1 354 bp, 图 5 结果显示与预期一致, 并经测序后目的基因序列与公布的序列 100% 匹配。

### 2.2 重组烟酸转磷酸核糖激酶的诱导表达

37 °C、200 r/min 培养菌体到 OD<sub>600</sub> 为 0.7 左右, 加入 IPTG 至终浓度为 0.3 mmol/L, 烟酸至终浓度为 0.5 mmol/L, 30 °C、170 r/min 诱导 8 h 后, 对大肠

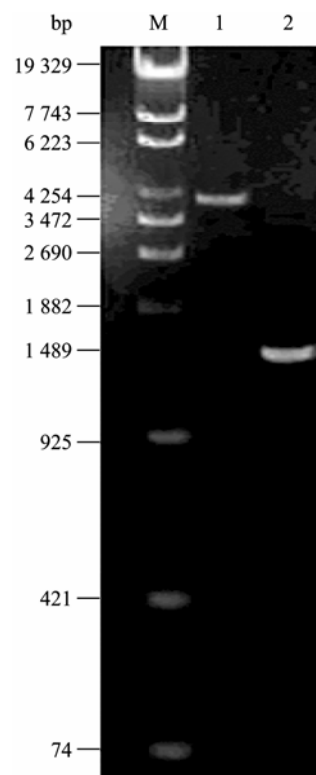


图 3 质粒 pTrc99a 和 *pncB* 的双酶切鉴定

Fig. 3 Identification of pTrc99a and *pncB* by enzyme digestion. M: DNA marker; 1: pTrc99a digested with *Nco* I and *Hind* III (4 120 bp); 2: *pncB* digested with *Nco* I and *Hind* III (1 354 bp).

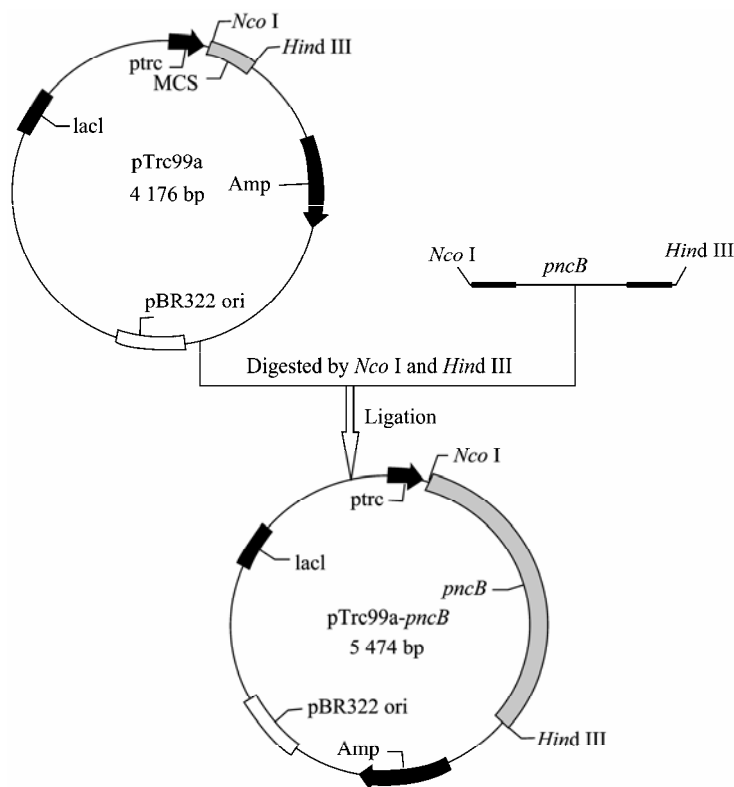


图 4 pTrc99a-*pncB* 表达载体的构建图谱

Fig. 4 Construction of pTrc99a-*pncB* expression vector.

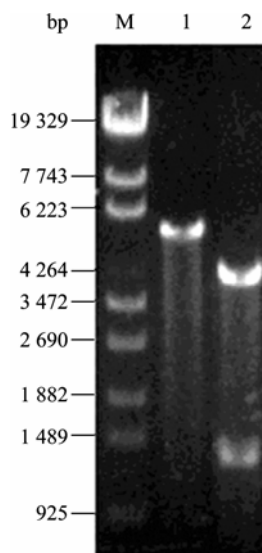


图 5 重组质粒 pTrc99a-*pncB* 单、双酶切鉴定

Fig. 5 pTrc99a-*pncB* identified by single endonuclease digestion and double endonuclease digestion. M: DNA marker; 1: pTrc99a-*pncB* digested with *Hind* III (5474 bp); 2: pTrc99a-*pncB* digested with *Nco* I and *Hind* III (4120 bp, 1354 bp).

杆菌 NZN111/pTrc99a 和构建的重组菌株进行粗酶液的相应酶活测定, 以及 NADH 和 NAD<sup>+</sup>测定, 结果如表 2 所示。

由表 2 可知: 重组菌烟酸转磷酸核糖激酶比酶活为 12.854 U/mg, 而对应的受体菌仅为 0.972 U/mg, 重组菌的比酶活提高了 12.23 倍。可见重组菌中的烟酸转磷酸核糖激酶基因得到了过量表达, NADH 的浓度提高了 7.08 倍, NAD<sup>+</sup>的浓度提高了 1.86 倍, NAD(H) 的总量提高了 2.30 倍, 可见烟酸转磷酸核糖激酶基因的过量表达可以使 NAD(H) 总量明显提高。

## 2.3 最佳生长条件的确定

### 2.3.1 菌株最佳诱导起始生长量的确定

图 6 表明, 以出发菌株大肠杆菌 NZN111 和大肠杆菌 NZN111/pTrc99a 作为对照菌株, 加入 IPTG 诱导 *pncB* 表达, 生物量和丁二酸产量比对照菌株都有很大提高。以不同的初始  $OD_{600}$  值加入 IPTG 诱导

表 2 对照菌与重组菌的比酶活、NADH、NAD<sup>+</sup>以及 NAD(H) 的浓度  
Table 2 Specific enzyme activity of NAPRTase, the concentration of NADH, NAD<sup>+</sup> and NAD(H) in the control strain and in the recombinant strain

| Strains                                    | Specific enzyme activity (U/mg) | NADH (μmol/g) | NAD <sup>+</sup> (μmol/g) | NAD(H) (μmol/g) |
|--|---------------------------------|---------------|---------------------------|-----------------|
| <i>E. coli</i> NZN111/pTrc99a              | 0.972                           | 0.264         | 2.912                     | 3.176           |
| <i>E. coli</i> NZN111/pTrc99a- <i>pncB</i> | 12.854                          | 2.133         | 8.342                     | 10.475          |

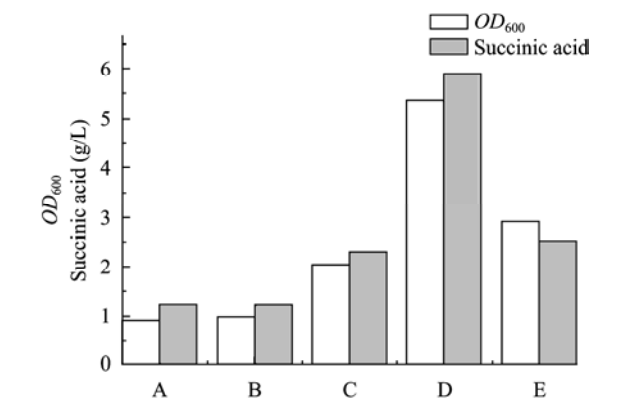


图 6 菌体不同初始  $OD_{600}$  值加入 IPTG 进行诱导后对菌体生物量及丁二酸产量的影响  
Fig. 6 Effect of different  $OD_{600}$  with IPTG on the cell mass and succinate concentration at the end of the fermentation of NZN111/pTrc99a-*pncB*. A: NZN111; B: NZN111/pTrc99a with 0.5 mmol/L nicotinic acid but without IPTG; C-E: NZN111/pTrc99a-*pncB* with 0.5 mmol/L nicotinic acid and 0.3 mmol/L IPTG added at  $OD_{600}$  reached 0.5 (C), 0.7 (D) and 0.9 (E).

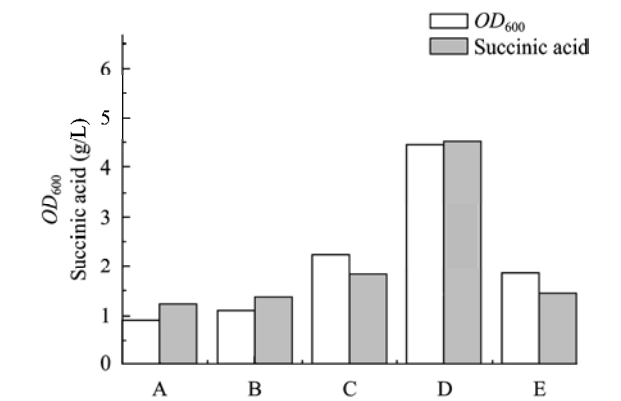


图 7 不同浓度的 IPTG 诱导对菌体生物量及丁二酸产量的影响  
Fig. 7 Effect of different concentration of IPTG on the cell mass and succinate concentration. A: NZN111 with 0.5 mmol/L nicotinic acid and 0.3 mmol/L IPTG; B: NZN111/pTrc99a with 0.5 mmol/L nicotinic acid and 0.3 mmol/L IPTG; C-E: NZN111/pTrc99a-*pncB* with 0.5 mmol/L nicotinic acid induced with different concentration of IPTG (C: 0.1 mmol/L; D: 0.3 mmol/L; E: 0.5 mmol/L).

表达, 均能在一定程度上提高菌体的生物量和丁二酸产量, 随着初始  $OD_{600}$  值的增高, 生物量和丁二酸的产量随之提高, 在初始  $OD_{600}$  值为 0.7 时生物量和丁二酸的产量最高, 继续增加初始  $OD_{600}$  值, 生物量和丁二酸的产量反而降低, 这可能是初始  $OD_{600}$  值过高, 导致 IPTG 诱导效果下降, 使 *pncB* 表达效果降低。

2.3.2 IPTG 诱导最佳浓度的确定

图 7 表明, IPTG 添加终浓度为 0.3 mmol/L 时, 生物量和丁二酸的产量最高。实验结果显示, 在一定范围内, IPTG 浓度越高, 生物量和丁二酸的产量越高, 当超过 0.3 以后, 生物量和丁二酸的产量不仅没有提高, 反而减少, 一方面, 这可能是由于 IPTG 本身具有细胞毒性, 浓度过高, 对菌体的生长代谢影响过大; 另一方面, 也可能是高浓度的 IPTG 会诱导外源基因的高表达, 过高的酶活会加重菌体生长和基础代谢负担, 反而不利于目标代谢物的生产。

2.3.3 烟酸最佳浓度的确定

图 8 表明, 烟酸添加终浓度为 0.5 mmol/L 时, 生物量和丁二酸的产量最高。烟酸浓度越高, 生物量和丁二酸的产量越高, 当超过 0.5 mmol/L, 生物量和丁二酸的产量下降, 可能是烟酸过量, 抑制了菌体代谢<sup>[16]</sup>。

2.4 厌氧摇瓶发酵

有氧培养菌液 10% 转接厌氧血清瓶, 使初始  $OD_{600}$  值为 0.7, 添加终浓度为 0.3 mmol/L 的 IPTG 以及 0.5 mmol/L 的烟酸, 48 h 后测定细胞干重、NAPRTase 的酶活及辅酶 NAD<sup>+</sup>、NADH 的量, 并测定残糖及丁二酸的含量, 结果如表 3 所示。

表 3 厌氧血清瓶培养后各种参数的测定结果

Table 3 Results of these parameters on anaerobic fermentation in sealed bottles

|                           | Strains               |  |
|---------------------------|-----------------------|--|
|                           | <i>E. coli</i> NZN111 | <i>E. coli</i> NZN111/pTrc99a- <i>pncB</i> |
| Time (h)                  | 48                    | 48   |
| DCW (g/L)                 | 0.444±0.002           | 2.812±0.011                                |
| NAPRTase (U/mg)           | 0.812±0.021           | 9.740±0.031                                |
| NAD <sup>+</sup> (μmol/g) | 3.004±0.016           | 18.548±0.031                               |
| NADH (μmol/g)             | 1.924±0.043           | 2.312±0.052                                |
| NAD(H) (μmol/g)           | 4.928±0.031           | 23.880±0.043                               |
| NADH/NAD <sup>+</sup>     | 0.640±0.013           | 0.125±0.032                                |
| Glucose consumed (g/L)    | 0                     | 14±0.500                                   |
| Succinic acid (g/L)       | 0.312±0.012           | 7.056±0.132                                |
| Pyruvic acid (g/L)        | 0.412±0.022           | 7.243±0.112                                |

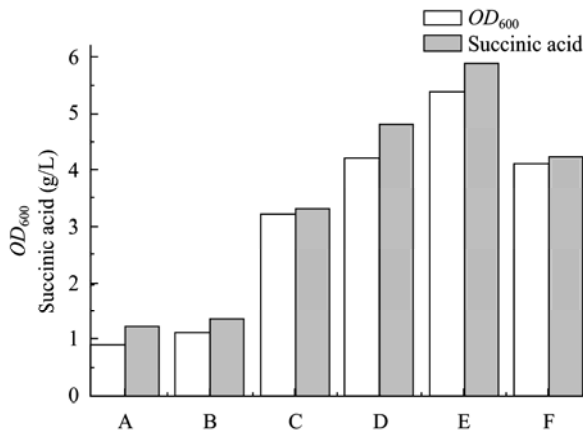


图 8 不同浓度的烟酸进行诱导后对菌体生物量及丁二酸产量影响

Fig. 8 Effect of different concentration of nicotinic acid on the cell mass and succinate concentration. A: NZN111 with 0.5 mmol/L nicotinic acid and 0.3 mmol/L IPTG; B: NZN111/pTrc99a with 0.5 mmol/L nicotinic acid and 0.3 mmol/L IPTG; C-E: NZN111/pTrc99a-*pncB* with 0.3 mmol/L IPTG with different concentration of nicotinic acid (C: 0.1 mmol/L; D: 0.3 mmol/L; E: 0.5 mmol/L; F: 1mmol/L).

细胞的生长需要充足的 NAD<sup>+</sup>来进行葡萄糖的氧化, 大肠杆菌 NZN111 由于同时失活了丙酮酸甲酸裂解酶与乳酸脱氢酶, NADH 不能及时再生为 NAD<sup>+</sup>, 引起胞内辅酶 NAD(H) 的不平衡, 最终导致厌氧条件下菌株不能利用葡萄糖代谢生长<sup>[17]</sup>。由表 3 可知, 重组菌细胞干重是对照菌的 6.5 倍,

NAPRTase 比酶活提高了 11 倍, NAD<sup>+</sup> 的浓度提高了 5.17 倍, 表明过量表达烟酸转磷酸核糖激酶提高了 NAD<sup>+</sup> 的含量, 在一定程度上恢复了出发菌株代谢葡萄糖的能力, 恢复了厌氧条件下大肠杆菌 NZN111 的生长。

重组菌与对照菌相比, 48 h 内可以消耗 14 g/L 的葡萄糖产 7.05 g/L 的丁二酸, 而对照菌几乎没有丁二酸生成。辅酶 NAD(H) 的总量提高了 3.85 倍, 特别是 NAD<sup>+</sup> 的浓度提高了 5.17 倍, NADH/NAD<sup>+</sup> 的比例由 0.640 降低为 0.125, 由此可见, 提高 NAD(H) 总量与维持合适 NADH/NAD<sup>+</sup> 比例对于提高还原性终端产物丁二酸的生产效率而言均是非常重要的, 若能将两者兼顾实现, 将可大幅度提高其生产效率。

3 结论

本研究构建了重组大肠杆菌 NZN111/pTrc99a-*pncB*, 有氧诱导时烟酸转磷酸核糖激酶比酶活比对照菌提高了 12.23 倍, NADH 的浓度提高了 7.08 倍, NAD<sup>+</sup> 的浓度提高了 1.86 倍, NAD(H) 的总量提高了 2.30 倍。表明过量表达烟酸转磷酸核糖激酶, 能够提高菌体内 NAD(H) 的总量, 对进一步调控细胞



氧化还原电位提高丁二酸产量,减少副产物有着积极作用。而在厌氧摇瓶发酵过程中,合适的诱导条件能够提供菌体生长代谢的良好条件和合适的过表达基因的酶活,有利于菌体生产目标代谢物。通过添加终浓度为 0.3 mmol/L 的 IPTG 和 0.5 mmol/L 的烟酸使烟酸转磷酸核糖激酶在大肠杆菌 NZN111 胞内得到过量表达,烟酸转磷酸核糖激酶酶活较对照菌提高了 11 倍,辅酶 NAD(H) 的总量提高了 3.85 倍,特别是  $\text{NAD}^+$  的浓度提高了 5.17 倍,补充了充足的  $\text{NAD}^+$  来进行葡萄糖的氧化,在厌氧条件下,使菌株能够利用葡萄糖代谢生长,重组菌细胞干重是对照菌的 6.5 倍,  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  的比例由 0.640 降低为 0.125,使丁二酸的产量大大提高。在还原性三羧酸循环中,富马酸还原酶以及苹果酸脱氢酶等都能够消耗  $\text{NADH}$ ,生成  $\text{NAD}^{+[18-19]}$ , Goldberg 等<sup>[20]</sup> 和 Wang 等<sup>[21]</sup> 曾研究过在大肠杆菌中过量表达富马酸还原酶提高  $\text{NAD}^+$  的再生, Wang 等<sup>[22]</sup> 通过过量表达苹果酸脱氢酶提高  $\text{NAD}^+$  的再生,都能提高丁二酸的产量。而本研究首次明确提出,通过过量表达辅酶 NAD(H) 补救合成途径中关键酶的方法,来提高辅酶 NAD(H) 的生成,提高丁二酸的产量,为确定基于 NAD(H) 调控丁二酸高收率、高生产强度的生物合成策略,为建立厌氧发酵制备还原性产物的柔性平台技术打下良好的基础。

## REFERENCES

- [1] McKinlay JB, Vieille C, Zeikus GJ. Prospects for a bio-based succinate industry. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 76(4): 727–740.
- [2] Wu H, Li ZM, Zhou L, et al. Improved succinic acid production in the anaerobic culture of an *Escherichia coli* *PfIB ldhA* double mutant as a result of enhanced anaplerotic activities in the preceding aerobic culture. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(24): 7837–7843.
- [3] Vemuri GN, Eiteman MA, Altman E. Effects of growth mode and pyruvate carboxylase on succinic acid production by metabolically engineered strains of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(4): 1715–1727.
- [4] Vemuri GN, Eiteman MA, Altman E. Succinate production in dual-phase *Escherichia coli* fermentations depends on the time of transition from aerobic to anaerobic conditions. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2002, 28(6): 325–332.
- [5] Jiang M, Liu SW, Ma JF, et al. Effect of growth phase feeding strategies on succinate production by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(4): 1298–1300.
- [6] Clark DP. The fermentation pathways of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev*, 1989, 5(3): 223–234.
- [7] Berrios- Rivera SJ, San KY, Bennett GN. The effect of NAPRTase overexpression on the total levels of NAD, the  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  ratio, and the distribution of metabolites in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2002, 4(3): 238–247.
- [8] San KY, Bennett GN, Berríos-Rivera SJ, et al. Metabolic engineering through cofactor manipulation and its effects on metabolic flux redistribution in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2002, 4(2): 182–192.
- [9] Heuser F, Schroer K, Ltüz S, et al. Enhancement of the  $\text{NAD(P)(H)}$  pool in *Escherichia coli* for biotransformation. *Eng Life Sci*, 2007, 7(4): 343–353.
- [10] Foster JW, Kinney DM, Moat AG. Pyridine nucleotide cycle of *Salmonella typhimurium*: isolation and characterization of *pncA*, *pncB*, and *pncC* mutants and utilization of exogenous nicotinamide adenine dinucleotide. *J Bacteriol*, 1979, 137(3): 1165–1175.
- [11] Stancek M, Schnell R, Rydén-Aulin M. Analysis of *Escherichia coli* nicotinate mononucleotide adenyllyltransferase mutants *in vivo* and *in vitro*. *BMC Biochem*, 2005, 6: 16.
- [12] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, 1: 24–25.
- [13] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE. *Short Protocols in Molecular Biology*. Beijing: Science Press, 1999: 240–251.
- [14] Vinitzky A, Grubmeyer C. A new paradigm for biochemical energy coupling-salmonella-typhimurium nicotinate phosphoribosyltransferase. *J Biol Chem*, 1993, 268(34): 26004–26010.
- [15] Li J, Chen KQ, Huang XM, et al. Establishment of the determination of  $\text{NAD}^+$  and  $\text{NADH}$  in the anaerobic fermentation of organic acids. *Food Sci Technol*, 2008,

- 33(12): 254–257.
- 李建, 陈可泉, 黄秀梅, 等. 厌氧发酵有机酸体系中  $\text{NAD}^+$  和  $\text{NADH}$  测定方法的建立. 食品科技, 2008, 33(12): 254–257.
- [16] Wubbolts MG, Terpstra P, van Beilen JB, et al. Variation of cofactor levels in *Escherichia coli*. Sequence-analysis and expression of the *pncB* gene encoding nicotinic-acid phosphoribosyltransferase. J Biol Chem, 1990, 265(29): 17665–17672.
- [17] Singh A, Lynch MD, Gill RT. Genes restoring redox balance in fermentation-deficient *E. coli* NZN111. Metab Eng, 2009, 11(6): 347–354.
- [18] Yoshida A, Nishimura T. Enhanced hydrogen production from glucose using *ldh*- and *frd*-inactivated *Escherichia coli* strains. Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 73(1): 67–72.
- [19] Maklashina E, Berthold DK, Gill RT. Anaerobic expression of *Escherichia coli* succinate dehydrogenase: Functional replacement of fumarate reductase in the respiratory chain during anaerobic growth. J Bacteriol, 1998, 180(22): 5989–5996.
- [20] Goldberg I, Lonberg HK, Bagley EA. Improved conversion of fumarate to succinate by *Escherichia coli* strains amplified for fumarate reductase. Appl Environ Microbiol, 1983, 45(6): 1838–1847.
- [21] Wang X, Gong CS, Tsao GT. Bioconversion of fumaric acid to succinic acid by recombinant *Escherichia coli*. Appl Biochem Biotechnol, 1998, 70(1): 919–928.
- [22] Wang W, Z Li. Production of succinate by a *pflB ldhA* double mutant of *Escherichia coli* overexpressing malate dehydrogenase. Bioprocess Biosyst Eng, 2009, 32(6): 737–745.