

烟酸转磷酸核糖激酶和丙酮酸羧化酶共表达对大肠杆菌 BA002 产丁二酸的影响

曹伟佳¹, 苟冬梅¹, 梁丽亚¹, 刘嵘明¹, 陈可泉¹, 马江锋^{1,2}, 姜岷¹

1 南京工业大学生物与制药工程学院 材料化学工程与国家重点实验室, 江苏 南京 211816

2 中国石化扬子石油化工有限公司南京研究院, 江苏 南京 210048

曹伟佳, 苟冬梅, 梁丽亚, 等. 烟酸转磷酸核糖激酶和丙酮酸羧化酶共表达对大肠杆菌 BA002 产丁二酸的影响. 生物工程学报, 2013, 29(12): 1855-1859.

Cao WJ, Gou DM, Liang LY, et al. Effect of co-expression of nicotinic acid phosphoribosyl transferase and pyruvate carboxylase on succinic acid production in *Escherichia coli* BA002. Chin J Biotech, 2013, 29(12): 1855-1859.

摘要: 大肠杆菌 BA002 是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*) 的工程菌。厌氧条件下 NADH 不能及时再生为 NAD⁺, 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生长代谢。*pncB* 是烟酸转磷酸核糖激酶 (NAPRTase) 的编码基因, 通过过量表达 *pncB* 基因能够提高 NAD(H) 总量与维持合适的 NADH/NAD⁺, 从而恢复了厌氧条件下重组菌 *E. coli* BA014 (BA002/pTrc99a-*pncB*) 的生长和产丁二酸的性能。然而, BA014 在厌氧发酵过程中有大量丙酮酸积累, 为进一步提高菌株的丁二酸生产能力, 减少副产物丙酮酸的生成, 共表达 NAPRTase 和来自于乳酸乳球菌 NZ9000 中丙酮酸羧化酶 (PYC) 的编码基因 *pyc*, 构建了重组菌 *E. coli* BA016 (BA002/pTrc99a-*pncB-pyc*)。3 L 发酵罐结果表明, BA016 发酵 112 h 后, 共消耗了 35.00 g/L 的葡萄糖。发酵结束时, 菌体 OD₆₀₀ 为 4.64, 产生了 25.09 g/L 丁二酸。通过共表达 *pncB* 和 *pyc* 基因, 使 BA016 的丙酮酸积累进一步降低, 丁二酸产量进一步提高。

关键词: 烟酸转磷酸核糖激酶, 丙酮酸羧化酶, 丁二酸, NADH/NAD⁺, 厌氧发酵

Received: April 9, 2013; **Accepted:** July 11, 2013

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 21076105), National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2009CB724701), A Project Funded by the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions, National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2011AA02A203), Program for New Century Excellent Talents in University (No. NCET-12-0732).

Corresponding author: Jiangfeng Ma. Tel: +86-25-58139937; Fax: +86-25-58139927; E-mail: bioengine@njut.edu.cn

Min Jiang. Tel: +86-25-83172078; Fax: +86-25-84172062; E-mail: jiangmin@njut.edu.cn

国家自然科学基金(No. 21076105), 国家重点基础研究发展计划(973 计划)(No. 2009CB724701), 江苏高校优势学科建设工程项目, 国家高技术研究发展计划 (863 计划)(No. 2011AA02A203), 新世纪优秀人才支持计划 (No. NCET-12-0732) 资助。

Effect of co-expression of nicotinic acid phosphoribosyl transferase and pyruvate carboxylase on succinic acid production in *Escherichia coli* BA002

Weijia Cao¹, Dongmei Gou¹, Liya Liang¹, Rongming Liu¹, Kequan Chen¹, Jiangfeng Ma^{1,2}, and Min Jiang¹

¹ State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 211816, Jiangsu, China

² Nanjing Research Institute of Sinopec Yangzi Petrochemical Company Limited, Nanjing 210048, Jiangsu, China

Abstract: *Escherichia coli* BA002, in which the *ldhA* and *pflB* genes are deleted, cannot utilize glucose anaerobically due to the inability to regenerate NAD^+ . To restore glucose utilization, overexpression of nicotinic acid phosphoribosyltransferase (NAPRTase) encoded by the *pncB* gene, a rate-limiting enzyme of NAD(H) synthesis pathway, resulted in a significant increase in cell mass and succinate production under anaerobic conditions. However, a high concentration of pyruvate was accumulated. Thus, co-expression of NAPRTase and the heterologous pyruvate carboxylase (PYC) of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 in recombinant *E. coli* BA016 was investigated. Results in 3 L fermentor showed that OD_{600} is 4.64 and BA016 consumed 35.00 g/L glucose and produced 25.09 g/L succinate after 112 h under anaerobic conditions. Overexpression of *pncB* and *pyc* in BA016, the accumulation of pyruvic acid was further decreased, and the formation of succinic acid was further increased.

Keywords: nicotinic acid phosphoribosyl transferase, pyruvate carboxylase, succinic acid, NADH/NAD^+ , anaerobic fermentation

大肠杆菌 NZN111 由于缺乏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*) 而使副产物乳酸和甲酸的生产途径阻断, 具有潜在生产丁二酸的能力。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 NADH 再生为 NAD^+ 的过程, 造成辅酶不平衡, 导致该菌株厌氧条件下不能利用葡萄糖进行生长^[1-3]。烟酸转磷酸核糖激酶 (NAPRTase) 是 NAD(H)合成系统中的限速酶^[4-6]。Liang 等^[7]通过在 NZN111 中过量表达 NAPRTase 基因 *pncB*, NAD^+ 的浓度提高了 6.2 倍, NADH/NAD^+ 的比例大大降低, 从而细胞生长和丁二酸产量有了大幅度提高。然而, 发酵过程中伴随着大量的副产物丙酮酸生成, 这是因为葡萄糖磷酸转移酶系统 (简称 PTS) 摄入胞外葡萄糖时, 需要

消耗磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 生成副产物丙酮酸, 直接影响了丁二酸生产得率^[8-9]。丙酮酸羧化酶 (PYC) 可催化丙酮酸到丁二酸前体草酰乙酸的反应, 在重组大肠杆菌中表达有利于减少丙酮酸生成, 提高丁二酸产量^[10-12]。

本研究通过在 *E. coli* BA002 (*E. coli* K12 Δ *ldhA*、 Δ *pflB*) 共表达烟酸转磷酸核糖激酶和外源丙酮酸羧化酶, 构建了重组菌 BA016 (BA002/pTrc99a-*pncB*-*pyc*), 增加 NAD(H)的总量, 降低 NADH/NAD^+ 比例, 同时减少了副产物丙酮酸的积累并促进了丁二酸的合成。

1 材料与方法

1.1 材料

BA002、BA014、BA015 (BA002/pTrc99a-*pyc*)

和 BA016, 由南京工业大学生物过程与系统工程实验室自主构建; 质粒 pTrc99a, 由南京师范大学邵蔚蓝教授惠赠。所有菌株用 20% 甘油保藏在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。发酵培养基: 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, 氨苄青霉素的终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。血清瓶发酵为添加 20 g/L 葡萄糖和 16 g/L 碱式碳酸镁; 发酵罐发酵为添加 35 g/L 葡萄糖和 28 g/L 碱式碳酸镁。加入终浓度分别为 0.5 mmol/L 烟酸和 0.3 mmol/L 诱导剂 IPTG (异丙基- β -D-硫代半乳糖苷) 以诱导表达 NAPRTase 和 PYC。

1.2 方法

1.2.1 培养方法

种子培养: 将保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的菌种在加有氨青霉素的平板上活化, 挑单菌落于 5 mL 种子培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 12 h。

发酵培养: 接 1 mL 种子培养液加入到 150 mL LB, 有氧培养 6 h。将种子液以 15% 的接种量接入装有 1.5 L 发酵培养基的 3 L 发酵罐中, 温度和搅拌速率分别维持在 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 170 r/min。以 0.2 L/min 的速率持续通入 CO_2 。

1.2.2 分析方法

细胞生长用紫外可见分光光度计于波长 600 nm 处测定吸光度值, 有机酸、葡萄糖用高效液相色谱

法 (HPLC) 检测。

测定蛋白浓度用 Bradford 法^[13], 以牛血清白蛋白 (BSA) 为标准。NAPRTase 酶活测定参照文献[14]。PYC 酶活测定参照文献[15]。辅酶 NADH 与 NAD^+ 的浓度根据酶循环机理^[16]测定。

2 结果与分析

2.1 对照菌与重组菌在血清瓶中纯厌氧发酵

由表 1 可知: 72 h 纯厌氧发酵后, BA002 细胞干重仅为 0.52 g/L, 合成了 1.57 g/L 丁二酸, 1.90 g/L 丙酮酸。重组菌株 BA014 恢复了生长能力和发酵产酸能力, 细胞干重是对照菌的 3.33 倍, 合成丁二酸 5.04 g/L, 但积累了 4.71 g/L 的丙酮酸。而 BA015 细胞干重为 0.93 g/L, 虽然丙酮酸减少至 0.29 g/L, 但合成的丁二酸只有 3.61 g/L。重组菌 BA016 合成 15.68 g/L 的丁二酸, 比对照菌增加了 7.97 倍, 而丙酮酸只有 0.15 g/L。表 2 可知 72 h 厌氧条件下诱导后, BA016 中 PYC 的酶活增加至 1.87 U/mg。BA014 和 BA016 中 NAPRTase 的酶活明显高于 BA002 中的 NAPRTase 酶活。表 2 可以看出, 重组菌株 BA016 中 NADH/NAD^+ 的比例从 BA002 中的 0.60 下降至 BA014 中的 0.16 和 BA016 中的 0.05, 该比例不断趋于辅酶平衡。

表 1 不同菌株在 LB 培养基中 72 h 纯厌氧发酵结果

Table 1 Results of exclusively anaerobic fermentations of the strains after 72 h in LB media

Strains	DCW (g/L)	Glucose consumed (g/L)	Fermentation products (g/L)		
			Succinic acid	Pyruvic acid	Acetic acid
BA002	0.52±0.51	3.3±0.4	1.57±0.12	1.90±0.11	ND
BA014	1.73±0.53	9.2±0.5	5.45±0.23	4.71±0.18	ND
BA015	0.93±0.46	4.5±0.4	3.61±0.16	0.29±0.12	ND
BA016	1.68±0.52	19.5±0.6	15.68±0.45	0.15±0.23	1.34±0.34

^a Each value is the mean of three parallel replicates \pm standard deviation.

^b ND: not detected.

表 2 不同菌株发酵 72 h 后 PYC 酶活、NAPRTase 酶活和 NAD(H) 的测定**Table 2 Enzyme assays and determination of the amount of NAD(H) in anaerobic fermentations of the strains after 72 h**

Strains	PYC activity (U/mg)	NAPRTase activity (U/mg)	Determination of the amount of NAD(H)			
			NADH ($\mu\text{mol/g}$)	NAD ⁺ ($\mu\text{mol/g}$)	NAD(H) ($\mu\text{mol/g}$)	NADH/NAD ⁺
BA002	ND	0.82±0.02	1.45±0.02	2.43±0.01	3.88±0.05	0.60±0.06
BA014	ND	10.51±0.23	2.12±0.03	13.25±0.22	15.37±0.23	0.16±0.02
BA016	1.87±0.12	17.99±0.35	1.97±0.04	39.01±0.34	40.98±0.32	0.05±0.01

^a Each value is the mean of three parallel replicates ± standard deviation.

^b ND: not detected.

2.2 BA016 在 3 L 发酵罐中的纯厌氧发酵

由图 1 可以看出,发酵 112 h 后,共消耗了 35 g/L 的葡萄糖,菌体 OD_{600} 为 4.64,产生了 25.09 g/L 丁二酸。41 h 时,丙酮酸的浓度积累到 3.23 g/L,随后开始下降,52 h 时为 0.09 g/L,而乙酸增加至 2.35 g/L。表 3 可以看出 41 h 相比于 0 h 的 PYC 酶活显著增加至 0.88 U/mg,此时代谢流从丙酮酸转向丁二酸的前体物草酰乙酸,这很可能是丙酮酸下降的原因。此外,41 h 到 64 h, NADH/NAD⁺ 下降了 4 倍,丁二酸的生产效率达到最高,为 0.4 g/(L·h)。说明下降的 NADH/NAD⁺ 对菌株生长和合成丁二酸具有促进作用。64 h 后虽然葡萄糖消耗速率仍然很高,但是丁二酸生产效率下降,此时碳通量流向部分副产物的支路。酶活 PYC 的下降导致丙酮酸的积累,菌株在后期厌氧发酵时, NADH 的不足导致苹果酸及富马酸的积累。

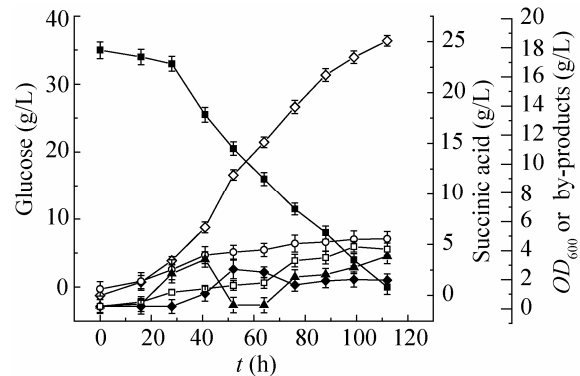


图 1 BA016 在 3 L 发酵罐中厌氧发酵的细胞生长 (OD_{600})、葡萄糖消耗及有机酸的生成

Fig. 1 Anaerobic fermentation in 3 L fermentor by BA016. OD_{600} (open circle), glucose (filled square), succinic acid (open diamond), acetic acid (filled diamond), pyruvic acid (filled triangle), malic acid (open square).

表 3 3 L 发酵罐中不同时间段 PYC 的酶活和 NADH/NAD⁺ 的比例**Table 3 Determination of specific enzyme activity of PYC and NAD(H) at different time in 3 L fermentor**

Time (h)	PYC activity (U/mg)	NADH ($\mu\text{mol/g}$)	NAD ⁺ ($\mu\text{mol/g}$)	NAD(H) ($\mu\text{mol/g}$)	NADH/NAD ⁺
0	0.14±0.01	2.82±0.03	20.82±0.12	23.64±0.14	0.06±0.02
41	0.88±0.02	1.80±0.05	31.03±0.10	32.83±0.20	0.05±0.01
64	0.57±0.03	0.57±0.04	43.98±0.22	44.54±0.31	0.01±0.00
112	0.41±0.03	1.51±0.03	27.05±0.13	28.56±0.15	0.05±0.02

REFERENCES

- [1] Bunch PK, Mat-Jan F, Lee N, et al. The *ldhA* gene encoding the fermentative lactic acid dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Microbiology*, 1997, 143: 187–195.
- [2] Singh A, Lynch MD, Gill RT, et al. Genes restoring redox balance in fermentation-deficient *E. coli* NZN111. *Metab Eng*, 2009, 11: 347–354.
- [3] Mat-Jan F, Alam KY, Clark DP, et al. Mutants of *Escherichia coli* deficient in the fermentative lactate dehydrogenase. *J Bacteriol*, 1989, 171: 342–348.
- [4] Gokarn RR, Eiteman MA, Altman E, et al. Metabolic analysis of *Escherichia coli* in the presence and absence of the carboxylating enzymes phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate carboxylase. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(5): 1844–1850.
- [5] Heuser F, Schroer K, Itz S, et al. Enhancement of the NAD(P)(H) pool in *Escherichia coli* for biotransformation. *Eng Life Sci* 2007, 7(4): 343–353.
- [6] 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: 182–192.
- [7] Liang LY, Liu RM, Wang GM, et al. Regulation of NAD(H) pool and NADH/NAD⁺ ratio by overexpression of nicotinic acid phosphoribosyltransferase for succinic acid production in *Escherichia coli* NZN111. *Enzyme Microbiol Technol*, 2012, 51: 286–293.
- [8] Gosset G. Improvement of *Escherichia coli* production strains by modification of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. *Microb Cell Factories*, 2005, 4: 14.
- [9] Clark DP. The fermentation pathways of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*, 1989, 63(3): 223–234.
- [10] Gokarn RR, Evans JD, Walker JR, et al. The physiological effects and metabolic alterations caused by the expression of *Rhizobium etli* pyruvate carboxylase in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 56: 188–195.
- [11] Vemuri GN, Eiteman MA, Altman E, et al. Effects of growth mode and pyruvate carboxylase on succinic acid production by metabolically engineered strains of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2002a, 68(4): 1715–1727.
- [12] Vemuri GN, Eiteman MA, Altman E, et al. Succinate production in dual-phase *Escherichia coli* fermentations depends on the time of transition from aerobic to anaerobic conditions. *J Ind Microbiol Biot*, 2002b, 28: 325–332.
- [13] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248–254.
- [14] Vinitzky A, Grubmeyer C. A new paradigm for biochemical energy coupling: *Salmonella typhimurium* nicotinate phosphoribosyltransferase. *J Biol Chem*, 1993, 268: 26004–26010.
- [15] Payne J, Morris JG. Pyruvate carboxylase in *Rhodospseudomonas spheroides*. *J Gen Microbiol*, 1969, 59: 97–101.
- [16] Li J, Chen KQ, Huang XM, et al. Establishment of the determination of NAD⁺ and NADH in the anaerobic fermentation of organic acids. *Food Sci Technol*, 2008, 33(12): 254–257 (in Chinese).
- 李建, 陈可泉, 黄秀梅, 等. 厌氧发酵有机酸体系中 NAD⁺和 NADH 测定方法的建立. *食品科技*, 2008, 33(12): 254–257.

(本文责编 郝丽芳)