

• 工业生物技术 •

# 利用辅因子工程策略提高酿酒酵母中 S-腺苷蛋氨酸的生物合成

陈雅维

河南科技大学 化工与制药学院, 河南 洛阳 471023

陈雅维. 利用辅因子工程策略提高酿酒酵母中 S-腺苷蛋氨酸的生物合成. 生物工程学报, 2018, 34(2): 246–254.

Chen YW. Cofactor engineering strategy for enhanced S-adenosylmethionine production in *Saccharomyces cerevisiae*. Chin J Biotech, 2018, 34(2): 246–254.

**摘要:** 通过代谢工程策略改造酿酒酵母胞内辅因子的形式和浓度, 分析辅因子 NADPH 对于产物 S-腺苷蛋氨酸 (SAM) 合成的作用并总结能量代谢和其他物质代谢的规律, 为高产 SAM 菌株的代谢工程改造提供理论基础。由于酿酒酵母中的 NADPH 在线粒体和细胞质中的代谢相对独立, 因此以酿酒酵母 BY4741 单倍体模式菌株为研究对象, 研究了不同亚细胞结构内 NADPH 对于产物合成的影响。通过激光共聚焦显微镜证实了 NADH 激酶在酿酒酵母线粒体和细胞质中的表达。实验结果表明 NADPH 的提高有利于酿酒酵母胞内 SAM 的合成。发酵 24 h, 菌株 NBYSM-1 胞内 SAM 浓度较对照菌提高 3.28 倍, 菌株 NBYSM-2 胞内 SAM 浓度提高 1.79 倍。其中重组菌株 NBYSM-1 合成 SAM 的能力和胞内 NADPH/NADP<sup>+</sup> 比率均明显高于重组菌株 NBYSM-2。因此, NADPH 调控策略有望成为提高 SAM 产量的有力工具并应用于其他辅因子依赖化合物的合成。

**关键词:** S-腺苷蛋氨酸, 辅因子, 酿酒酵母, NADPH

## Cofactor engineering strategy for enhanced S-adenosylmethionine production in *Saccharomyces cerevisiae*

Yawei Chen

College of Chemical and Pharmaceutical Engineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, Henan, China

**Abstract:** In order to study the role of cofactor engineering in enhancing the production of S-adenosylmethionine (SAM), we altered the form and concentration of cofactor in *Saccharomyces cerevisiae* through gene recombination. Effects of cofactor on product synthesis, carbon and energy metabolism were analyzed aiming to provide a theoretical basis for a successful metabolic engineering of SAM producing strains. Because NADPH metabolism in mitochondrion and cytoplasm of

**Received:** April 27, 2017; **Accepted:** July 3, 2017

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 21606073).

**Corresponding author:** Yawei Chen. Tel/Fax: +86-379-64231914; E-mail: yaweichen@aliyun.com

国家自然科学基金 (No. 21606073) 资助。

网络出版时间: 2017-09-06

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20170906.1514.005.html>

*S. cerevisiae* is relatively independent, the effect of intracellular NADPH availability on the production of SAM was studied in different compartments of *S. cerevisiae* BY4741. The expression of NADH kinase in mitochondria (*POS5* encoded) and cytoplasm (*POS5Δ17* encoded) was separately confirmed using a laser scanning confocal microscope. NADPH regulation strategy enhanced SAM production. Compared with the control strain, the intracellular SAM concentration of strain NBYSM-1 was increased by 3.28 times, and the intracellular SAM concentration of strain NBYSM-2 was increased by 1.79 times at 24 h fermentation. In addition, SAM titer and NADPH/NADP<sup>+</sup> ratio in strain NBYSM-1 were significantly higher than that of strain NBYSM-2. Therefore, NADPH regulation strategy will be a valuable tool for SAM production and could further improve the synthesis of a large range of cofactor-driven chemicals.

**Keywords:** S-adenosylmethionine, cofactor, *Saccharomyces cerevisiae*, NADPH

S-腺苷蛋氨酸 (S-adenosylmethionine, 简称 SAM) 存在于所有生物细胞中, 是维持细胞正常生理功能的一种活性小分子物质<sup>[1]</sup>。SAM 在临床上应用广泛, 对治疗急慢性肝病<sup>[2-3]</sup>、骨关节炎<sup>[4]</sup>、神经综合征<sup>[5]</sup>和抑郁症<sup>[6-7]</sup>等多种疾病都有一定的疗效。此外, SAM 也常用于保健品和化妆品中。

SAM 工业化生产的方法主要有化学法、酶法、全细胞催化法和微生物发酵法。其中微生物发酵法生产 SAM 具有工艺流程简单、产量高、底物廉价易得等优势而被广泛应用。酿酒酵母是美国 FDA 认定的安全模式生物 (Generally recognized as safe, GRAS), 常用于代谢工程改造生产药品及食品添加剂。此外, 酿酒酵母中的 S-腺苷蛋氨酸合成酶 (Methionine adenosyltransferase, MAT) 活性高, 而且还具备独特的液泡贮存 SAM 的机制, 因此酿酒酵母作为主要的 SAM 天然发酵菌株被广泛使用。酿酒酵母发酵生产 SAM 的研究主要集中在发酵条件优化控制方面<sup>[8-10]</sup>, 少有基因工程<sup>[11-12]</sup>方面的研究, 而且忽视了辅因子对于 SAM 合成的重要影响。

辅因子是一类可以和蛋白结合并对蛋白行使正常催化功能所必需的非蛋白质类化合物。与传统的代谢工程针对酶分子的改造不同, 辅因子工程通过直接调控细胞内关键酶的辅因子浓度和形式来实现代谢流的最大化, 快速将碳物质流导向目标代谢产物<sup>[13]</sup>。作为胞内重要微环境的辅因子 ATP/ADP、NADH/NAD<sup>+</sup>、NADPH/NADP<sup>+</sup>

等参与了微生物细胞内大量的代谢反应过程, 将物质代谢途径串联或并联成复杂的网络体系, 最终使得物质代谢流的分配受到辅因子形式和浓度的牵制。因此辅因子工程策略在微生物菌株改造方面将成为有利的工具, 用于提高目标代谢物的浓度、产率、生产能力<sup>[14-15]</sup>以及增强微生物对于环境的耐受<sup>[16]</sup>等等。

SAM 在微生物体内合成过程中受到底物 L-蛋氨酸和 ATP 含量的限制。目前的做法通常是在培养基中加入 L-蛋氨酸以及调控发酵工艺来满足 SAM 合成过程中对于限制性底物的需求。事实上, 辅因子 NADPH 对于 L-蛋氨酸的合成具有重要作用。如果能通过辅因子工程策略提高菌株自身的 L-蛋氨酸合成能力, 对于 SAM 高产菌株的构建具有重要意义。

本文通过代谢工程手段在酿酒酵母线粒体及细胞质中引入 NADH 激酶 Pos5p, 分别扰动细胞质及线粒体中的 NADPH 水平, 研究 NADPH 变化对于 SAM 合成的影响, 并分析细胞氧化还原平衡扰动对于物质代谢及产物合成的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

#### 1.1.1 菌株和质粒

实验中所用的菌株和质粒见表 1。

#### 1.1.2 引物

实验中所用的引物列于表 2。

表 1 本研究所用菌株及质粒

Table 1 Strains and plasmids in this study

Strains	Description	Source
<i>E. coli</i> Trans 10	Cloning host	Beijing TransGen Biotech Company
BY4741	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Lab collection
BY4741-MH	BY4741 <i>his3::HIS3, met15::MET15</i>	Lab collection
PBYSM-0	BY4741-MH/pRS425/YCplac33	This study
NBYSM-1	BY4741-MH/pRS425- <i>POS5Δ17</i>	This study
NBYSM-2	BY4741-MH/pRS425- <i>POS5</i>	This study
Plasmids		
pRS425	<i>leu2</i> , 2μm origin	Novagen
pUC19- $P_{TEF1}$ - $T_{PGI}$	Harboring constitutive promoter $P_{TEF1}$ and terminator $T_{PGI}$	Lab collection
pET28a- <i>gfp</i>	Harboring <i>gfp</i>	Lab collection
pRSFD- <i>POS5Δ17</i>	<i>POS5Δ17</i> cloned into pRSFuet-1	[17]
pUC19- $P_{TEF1}$ - <i>POS5Δ17</i> - $T_{PGI}$	$P_{TEF1}$ - <i>POS5Δ17</i> - $T_{PGI}$	This study
pUC19- $P_{TEF1}$ - <i>POS5</i> - $T_{PGI}$	$P_{TEF1}$ - <i>POS5</i> - $T_{PGI}$	This study
pRS425- <i>POS5Δ17</i>	$P_{TEF1}$ - <i>POS5Δ17</i> - $T_{PGI}$	This study
pRS425- <i>POS5</i>	$P_{TEF1}$ - <i>POS5</i> - $T_{PGI}$	This study

表 2 用于基因扩增的引物

Table 2 Primers used for PCR

Primer name	Primer sequence (5'-3')
<i>Sac</i> I - <i>POS5Δ17</i> -F	TTC <u>GAGCTC</u> ATGAGTACGTTGGATTCAACA
<i>Sal</i> I - <i>POS5Δ17</i> -R	ACGCGT <u>CGACTT</u> AATCATTATCAGTCTGTCT
<i>Sac</i> I - <i>POS5</i> -F	TTC <u>GAGCTC</u> ATGTTTGTCAGGGTTAAATTG
<i>Sal</i> I - <i>POS5</i> -R	ACGCGT <u>CGACTT</u> AATCATTATCAGTCTGTCT
<i>Spe</i> I - $P_{TEF1}$ -F	GG <u>ACTAGT</u> TATAGCTTCAAAATGTTTCTAC
<i>Xma</i> I - $T_{PGI}$ -R	TCCCC <u>CGGGG</u> TATACTGGAGGCTTCAT
<i>POS5</i> ( <i>gfp</i> )-R	AAGAGACAGACTGATAATGATATGAGTAAAGGAGAAGAAGACTTTT
<i>gfp</i> ( <i>POS5</i> )-F	AGACAGACTGATAATGATATGAGTAAAGGAGAAGAAGACTTTTC
<i>Sal</i> I - <i>gfp</i> ( <i>POS5</i> )-R	ACGCGT <u>CGACTT</u> AATATTTAAGAGCGATTTGTTCTATTTGTATAGTTCATCCA

The underlined characters indicated restriction sites for plasmid construction.

### 1.1.3 酶与试剂

Phusion High-Fidelity DNA 聚合酶和各种限制性内切酶均购自 NEB 公司。T4 DNA 连接酶为 TaKaRa (大连) 公司产品。2×*Taq* Mix 购自博迈德生物技术公司。SAM 标准品及辅因子测定相关酶及试剂购自 Sigma 公司。酵母提取物、胰蛋白酶为 Oxoid 公司产品。其余试剂等均为国产。引物

由华大科技 (北京) 公司合成。

### 1.2 分子操作

#### 1.2.1 酿酒酵母不同区域 NADPH 再生重组菌株的构建

以 pRSFD-*POS5Δ17* 为模板, *Sac* I -*POS5Δ17*-F/*Sal* I -*POS5Δ17*-R 为引物, PCR 扩增得到不带信号肽的 *POS5Δ17* 基因。以酿酒酵母基因组为

模板, *Sac* I-*POS5-F/Sal* I-*POS5-R* 为引物, PCR 扩增得到 *POS5* 基因。分别将质粒 pUC19-*P<sub>TEF1</sub>-T<sub>PGI</sub>* 和目的基因 *POS5Δ17/POS5* 用 *Sac* I/*Sal* I 酶切, 琼脂糖凝胶电泳, 回收酶切片段, T4 DNA 连接酶过夜连接, 转化, 菌落 PCR, 将筛得的阳性克隆接入 LB 培养基中, 过夜培养, 提取质粒送测。测序正确获得 pUC19-*P<sub>TEF1</sub>-POS5Δ17-T<sub>PGI</sub>* 和 pUC19-*P<sub>TEF1</sub>-POS5-T<sub>PGI</sub>*。

分别以测序正确的重组质粒 pUC19-*P<sub>TEF1</sub>-POS5Δ17-T<sub>PGI</sub>* 和 pUC19-*P<sub>TEF1</sub>-POS5-T<sub>PGI</sub>* 为模板<sup>[17]</sup>, 以 *Spe* I-*P<sub>TEF1</sub>-F/Xma* I-*T<sub>PGI</sub>-R* 为引物扩增获得带有 NADPH 再生基因表达盒的片段, 并将基因片段和表达载体 pRS425 用 *Spe* I 和 *Xma* I 酶切, 电泳, 胶回收, 过夜连接, 转化 *E. coli* Trans 10。将菌落 PCR 验证得到的阳性克隆单菌落接种至试管 LB 培养基中过夜培养, 提质粒, 送测, 得到重组质粒 pRS425-*P<sub>TEF1</sub>-POS5Δ17-T<sub>PGI</sub>* 和 pRS425-*P<sub>TEF1</sub>-POS5-T<sub>PGI</sub>*。

培养 50 mL 酿酒酵母 BY4741-MH, 制备感受态并用醋酸锂法转化导入重组质粒, 将菌液涂布在 SC 选择性固体培养基平板上, 30 °C 培养 2–4 d。将长出的单克隆菌落接种至 4 mL 选择性 SC 液体培养基中, 30 °C 摇床培养 24–48 h。进行菌落 PCR 验证是否转入重组质粒。将含有重组质粒的菌液于选择性 SC 平板上划线, 取单菌落再验证一次是否为目的菌株, 将带有重组质粒的菌株保存至甘油管, 用于后续的发酵实验。带有 pRS425-*P<sub>TEF1</sub>-POS5Δ17-T<sub>PGI</sub>* 的菌株命名为 NBYSM-1, 带有 pRS425-*P<sub>TEF1</sub>-POS5-T<sub>PGI</sub>* 的菌株命名为 NBYSM-2, 带有空质粒 pRS425 的菌株作为对照 PBYSM-0。

### 1.2.2 NADPH 再生系统在酿酒酵母细胞中的定位表征菌株构建

以 pRSFD-*POS5Δ17* 为模板, *Sac* I-*POS5Δ17-F/POS5Δ17(gfp)-R* 为引物, PCR 扩增得到带有 *gfp*

重叠序列的 *POS5Δ17* 基因。以酿酒酵母基因组为模板, *Sac* I-*POS5-F/POS5(gfp)-R* 为引物, PCR 扩增得到带有 *gfp* 重叠序列的 *POS5* 基因。以 pET28a-*gfp* 为模板, 以 *gfp(POS5)-F/Sal* I-*gfp(POS5)-R* 为引物, 扩增得到带有 *POS5* 重叠序列的 *gfp* 片段。通过 overlap PCR 分别将 *POS5* 和 *gfp* 以及 *POS5Δ17* 和 *gfp* 融合在一起。分别将质粒 pUC19-*P<sub>TEF1</sub>-T<sub>PGI</sub>* 和目的基因 *POS5-gfp* 和 *POS5Δ17-gfp* 用 *Sac* I/*Sal* I 酶切, 按照 1.2.1 所述的方法即可获得测序正确的重组质粒 pUC19-*P<sub>TEF1</sub>-POS5Δ17-gfp-T<sub>PGI</sub>* 和 pUC19-*P<sub>TEF1</sub>-POS5-gfp-T<sub>PGI</sub>*。同理, 构建重组质粒 pRS425-*P<sub>TEF1</sub>-POS5Δ17-gfp-T<sub>PGI</sub>* 和 pRS425-*P<sub>TEF1</sub>-POS5-gfp-T<sub>PGI</sub>*, 并进行酿酒酵母转化, 获得阳性克隆菌株。

## 1.3 菌种保藏及培养条件

### 1.3.1 菌种保藏

挑取划线纯化后的酿酒酵母单菌落接种于 YPD (10 g/L 酵母粉, 20 g/L 蛋白胨, 20 g/L 葡萄糖) 或者 SC 液体培养基中 (6.7 g/L YNB, 20 g/L 葡萄糖, 1.4 g/L 复合氨基酸, 不含亮氨酸和尿嘧啶), 30 °C 培养 24 h。取 300 μL 50% 无菌甘油与 700 μL 种子发酵液均匀混合, 置于 -80 °C 超低温冰箱备用。

### 1.3.2 种子培养

将斜面或者平板上的菌落接入 50 mL YPD 或者 SC 液体培养基中 (加入相应的氨基酸母液), 30 °C 培养 24 h 获得种子液。

### 1.3.3 摇瓶培养

本实验所用的摇瓶发酵培养基为 SC 培养基和 YPD 培养基。按照初始  $OD_{600}$  为 0.1 加入相应体积的种子液至摇瓶中, 30 °C 培养。

## 1.4 分析方法

### 1.4.1 生物量测定

取 1 mL 发酵液稀释一定倍数, 使用分光光度计测定样品在 600 nm 波长下的吸光度作为菌

体生物量。

#### 1.4.2 SAM 的萃取及含量测定

发酵液离心后用 10% (W/V) 高氯酸在 30 °C 下振荡萃取 2 h。13 000 r/min 离心 10 min，通过 0.22 μm 滤膜后，置于 -20 °C 待测。

SAM 的浓度测定采用 HPLC (岛津, 日本) 方法。色谱条件: C18 色谱柱 (北京艾杰尔科技有限公司, 中国); 紫外检测器: 260 nm; 流动相: 0.01 mol/L 甲酸铵, 用乙酸调节 pH 至 3.5; 流速: 1.0 mL/min<sup>[18]</sup>。

#### 1.4.3 其他代谢物测定

乙醇和甘油等副产物使用 HPLC 方法 (赛默飞, 美国) 测定。色谱条件为: 色谱柱: HPX-87H (伯乐, 美国); 检测器: 示差折光检测器和紫外检测器 (254 nm); 柱温: 50 °C; 流动相: 5 mmol/L 硫酸; 流速: 0.6 mL/min<sup>[19]</sup>。

#### 1.4.4 NAD (H) 和 NADP (H) 的含量测定

胞内的 NADPH、NADP<sup>+</sup>、NADH 和 NAD<sup>+</sup> 的浓度采用循环酶催化法测定<sup>[20]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 NADH 激酶在酿酒酵母线粒体及细胞质中的定位表征

已有文献报道 NADH 激酶 Pos5p 定位于酿酒酵母线粒体基质中<sup>[21]</sup>。为确保强启动子 P<sub>TEF1</sub> 对于 NADH 激酶在细胞质及线粒体中的表达, 分别将 POS5 和 POS5Δ17 基因<sup>[22]</sup>与 *gfp* 基因进行融合表达, 利用激光共聚焦显微镜确定 NADH 激酶在细胞中的位置。从图 1A 可看出, 未融合 GFP 的菌株没有产生荧光。图 1B 表明不带信号肽的 NADH 激酶 Pos5p 定位于酿酒酵母细胞质中, 使得整个细胞充满荧光。图 1C 可明显看出有线状的荧光结构, 这说明带信号肽的 NADH 激酶 Pos5p 定位于酿酒酵母线粒体中, 与文献报道的线粒体结构一致<sup>[21]</sup>。

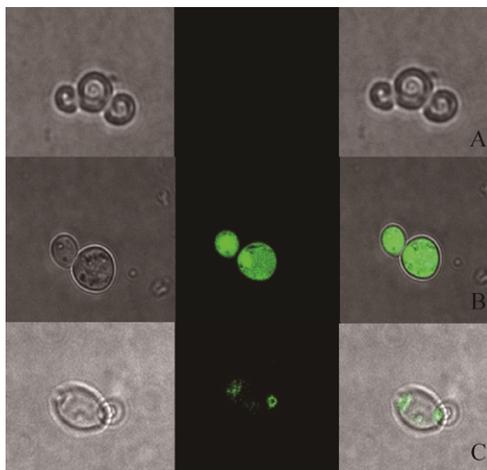


图 1 NADH 激酶在酿酒酵母细胞中的定位 (A: 对照菌 BY4741; B: Pos5p (POS5Δ17 编码) 在细胞质中的定位; C: Pos5p (POS5 编码) 在线粒体中的定位)

Fig. 1 Localization of NADH kinase in the *S. cerevisiae*. (A) Control strain BY4741. (B) Pos5p (POS5Δ17 encoded) localized in the cytoplasm. (C) Pos5p (POS5 encoded) localized in the mitochondrion matrix.

### 2.2 NADPH 再生系统对于胞内吡啶核苷酸的扰动

分别研究了 NADPH 再生菌株在 SC 培养基中发酵 15 h 和 24 h 的胞内吡啶核苷酸水平, 结果见图 2。重组菌 NBYSM-1 和 NBYSM-2 在不同发酵时间下, 胞内的 NADPH 水平和 NADPH/NADP<sup>+</sup>均高于对照菌 PBYSM-0。其中, 发酵 15 h, 菌株 NBYSM-2 胞内的 NADH/NAD<sup>+</sup>下降了 36.83%, NADPH/NADP<sup>+</sup>提高了 28.63%。菌株 NBYSM-1 胞内的 NADH/NAD<sup>+</sup>下降了 15.62%, NADPH/NADP<sup>+</sup>提高了 11.96%。与发酵 15 h 的情况相似, 发酵 24 h 重组酿酒酵母 NBYSM-1 胞内的 NADPH/NADP<sup>+</sup>比率要远远高于 NBYSM-2, 但是 NADH/NAD<sup>+</sup>比率略低于 NBYSM-2。

### 2.3 分区域调控 NADPH 对于 SAM 合成的影响

从图 3 可以看出, 对照菌株的生物量略高于重组菌株。可能是由于重组菌中的 NADPH 再生

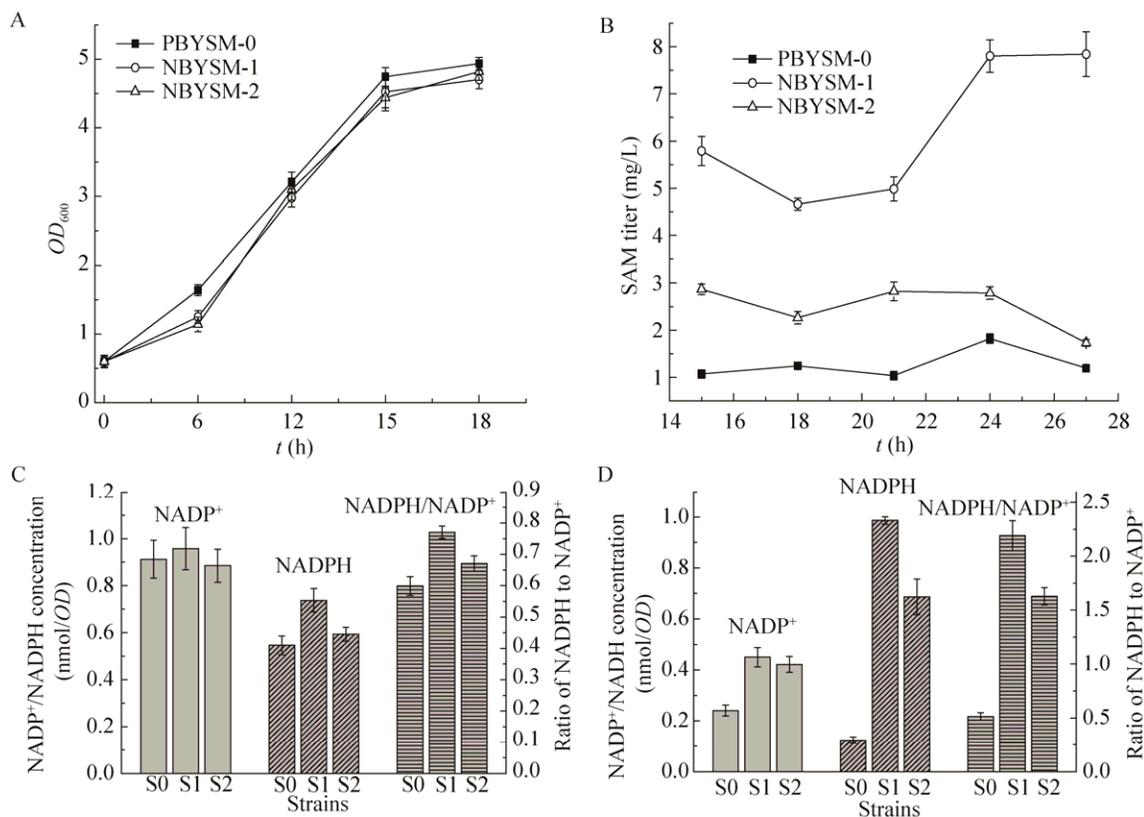


图2 NADPH 调控策略改造菌株发酵不同时间胞内吡啶核苷酸的浓度变化 (A: 发酵 15 h 胞内  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  浓度以及  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  比率; B: 发酵 15 h 胞内  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  浓度以及  $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$  比率; C: 发酵 24 h 胞内  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  浓度以及  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  比率; D: 发酵 24 h 胞内  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  浓度以及  $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$  比率)

Fig. 2 Effects of the NADPH regulation strategy on the concentration of intracellular pyridine nucleotide in the control and recombinant strains under different cultivating time. Intracellular concentrations of  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  and  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  ratio at 15 h (A), concentrations of  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  and  $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$  ratio at 15 h (B), concentrations of  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  and  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  ratio at 24 h (C) and concentrations of  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  and  $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$  ratio at 24 h (D) were evaluated. S0: PBYSM-0; S1: NBYSM-1; S2: NBYSM-2.

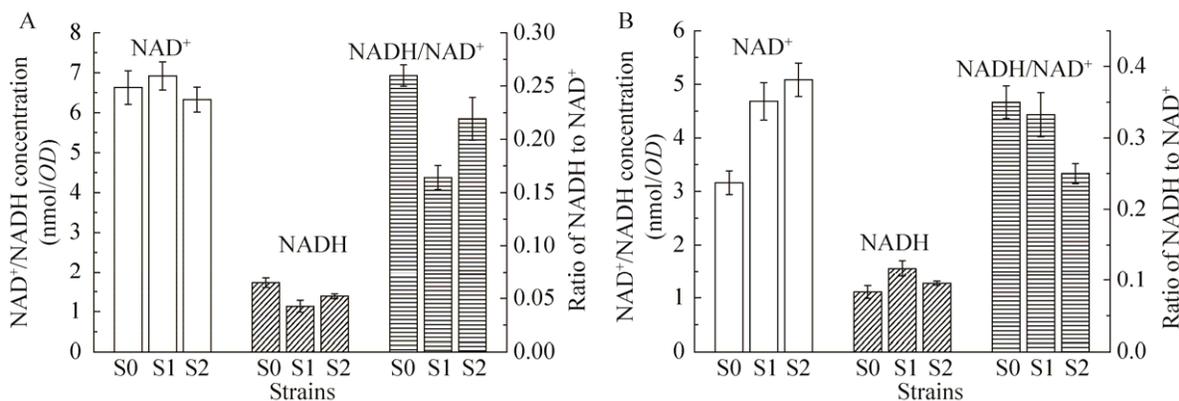


图3 NADPH 调控策略对于不同菌株发酵的生物量 (A) 及 SAM 浓度 (B) 的影响

Fig. 3 Effects of the NADPH regulation strategy on the biomass (A) and SAM titer (B) in the control and recombinant strains.

系统消耗 NADH 生成 NADPH, 而减少了 NADH 氧化磷酸化合成 ATP 的水平, 从而使得菌体生长略低于对照菌。不同菌株胞内 SAM 含量相差较大, 其中 NADPH 再生的两株菌中胞内 SAM 含量均远远高于对照菌。与对照菌 PBYSM-0 相比, 菌株 NBYSM-1 发酵 24 h 胞内 SAM 浓度提高 3.28 倍, 菌株 NBYSM-2 胞内 SAM 浓度提高 1.79 倍。而在 NADPH 再生的两株菌中, 线粒体内 NADPH 再生的菌株 NBYSM-2 胞内的 SAM 含量要低于 NBYSM-1。其中发酵 24 h, 菌株 NBYSM-1 胞内 SAM 浓度比菌株 NBYSM-2 高 1.8 倍。

### 3 讨论

酿酒酵母中 NADPH 的产生来源主要是磷酸戊糖途径 (PPP) 的氧化部分以及异柠檬酸脱氢酶、乙醛脱氢酶和苹果酸酶的催化反应。但是操作 PPP 氧化部分的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶<sup>[23]</sup>以及异柠檬酸脱氢酶来调控酿酒酵母胞内 NADPH 水平, 会消耗 1 个碳产生 CO<sub>2</sub>, 降低产物得率。此外, 通过中心代谢途径的关键酶来调控胞内氧化还原平衡会对整体的代谢流产生较大影响。而通过引入单独靶向辅因子相关反应的酶能更有效直接地调控胞内辅因子水平, 同时在尽量不影响其他物质代谢途径的前提下解析辅因子对产物合成的影响。

细菌来源的转氢酶可以将 NADH 直接转化为 NADPH。然而在酿酒酵母中表达转氢酶, 却起到相反的催化效果, NADPH 被转化为 NADH<sup>[24]</sup>。另外一种方法则是引入 ATP 介导的 NADH 激酶将 NADH 转化为 NADPH。尽管 Pos5p 被认为是酿酒酵母线粒体内 NADPH 的主要来源, 关于它的机理研究还是不甚清晰<sup>[21]</sup>。从图 2 和图 3 中可知, 菌株 NBYSM-1 胞内 NADPH、NADPH/NADP<sup>+</sup> 比率以及 SAM 浓度均高于对照菌 PBYSM-0 和重组菌 NBYSM-2。这说明 NADH 激酶在酿酒酵母

细胞质中的表达对 SAM 合成起到一定的促进作用。

乙醇和甘油的生成都需要消耗 NADH, 但实际在好氧发酵条件下, 乙醇和甘油的生成途径不同。甘油主要是由于发酵过程糖酵解中产生的过剩 NADH 被氧化而产生, 而乙醇则是由有氧呼吸途径产生。理论上, NADH 的减少均会影响甘油和乙醇这些 NADH 依赖的副产物的生成。从图 4 可看出, 对照菌 PBYSM-0 和 NBYSM-1 菌株生成的乙醇浓度相近, 而线粒体中 NADPH 提高的菌株 NBYSM-2 乙醇浓度有所上升。由图 4 B 可知, 3 株菌的甘油生成能力差异较为明显, 重组菌株合成甘油的能力均有不同程度降低, 其中 NBYSM-2 菌株的甘油浓度降低最多。有文献报

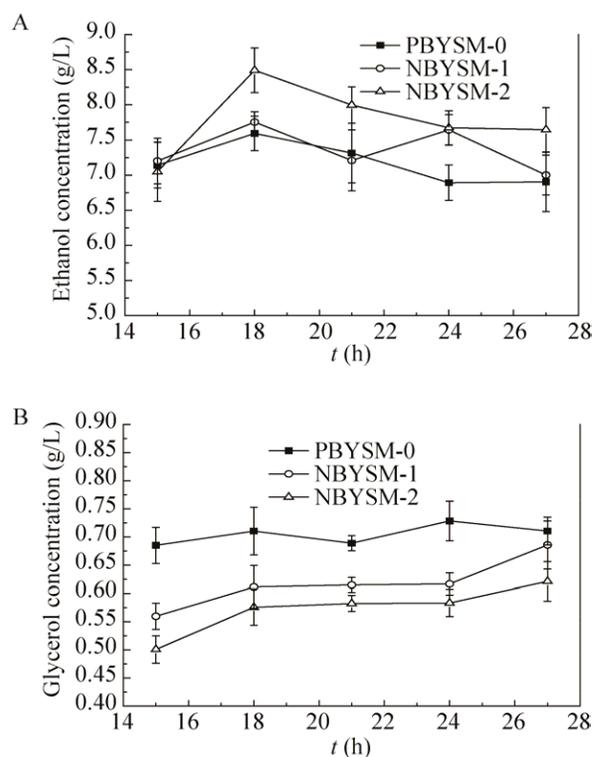


图 4 NADPH 调控策略对菌株发酵中乙醇 (A) 和甘油 (B) 浓度的影响

Fig. 4 Effects of the NADPH regulation strategy on the ethanol titer (A) and glycerol titer (B) in the control and recombinant strains.

道分别在细胞质中表达了形成水的 NADH 氧化酶 (来源于肺炎链球菌的 *nox* 基因) 以及交替氧化酶 (来源于荚膜组织胞浆菌的 *aox* 基因), 发现表达了 *aox* 基因的菌株中乙醇生成量大幅度下降, 而表达 *nox* 基因的菌株的甘油生产量大大降低<sup>[25]</sup>。有报道表明通过敲除 *GDH1* (编码细胞质中 NADPH 依赖的谷氨酸脱氢酶) 改变细胞氧化还原平衡, 会减少甘油的生成<sup>[26]</sup>。虽然 NADH 激酶介导的 NADPH 再生系统是以消耗 1 分子 NADH 来产生 1 分子 NADPH, 但是胞内的 NAD (H) 和 NADP (H) 涉及到数个代谢网络的代谢反应, 不能简单地用等比例换算来分析结果。

综上所述, 甘油的减少和乙醇的增多是由于打乱了细胞复杂的氧化还原平衡所致。而 NADH 的减少和 NADPH 的增多, 最终使得重组菌的细胞质和线粒体均处于略高的氧化态。从 SAM 浓度的提高和副产物甘油、乙醇的变化可以看出, NADPH 再生系统起到了一定的物质重新分配作用, 消耗了 NADH, 提高了 NADPH 的胞内水平, 从而促进了酿酒酵母中 SAM 的合成。

然而辅因子 NADPH 调控 SAM 合成的能力有限, 最终没有获得 SAM 产量的大幅度提升。这可能是由于辅因子牵涉胞内众多反应, 难以实现产物定向调控。此外, SAM 的合成过程不仅仅受到 NADPH 的限制, ATP 的不足同样会影响 SAM 的合成。因此, 后续的研究可以考虑同时调控胞内 ATP 以及 NADPH 水平和比例, 以进一步提高 SAM 产量, 为构建高产 SAM 的菌株奠定基础。

## REFERENCES

- [1] Lu SC. *S*-adenosylmethionine. *Int J Biochem Cell Biol*, 2000, 32(4): 391–395.
- [2] Lieber CS, Packer L. *S*-adenosylmethionine: molecular, biological, and clinical aspects—an introduction. *Am J Clin Nutr*, 2002, 76(5): 1148S–1150S.
- [3] Anstee QM, Day CP. *S*-adenosylmethionine (SAME) therapy in liver disease: a review of current evidence and clinical utility. *J Hepatol*, 2012, 57(5): 1097–1109.
- [4] Blewett HJH. Exploring the mechanisms behind *S*-adenosylmethionine (SAME) in the treatment of osteoarthritis. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2008, 48(5): 458–463.
- [5] Bottiglieri T. *S*-adenosyl-L-methionine (SAME): from the bench to the bedside—molecular basis of a pleiotrophic molecule. *Am J Clin Nutr*, 2002, 76(5): 1151S–1157S.
- [6] van der Watt G, Laugharne J, Janca A. Complementary and alternative medicine in the treatment of anxiety and depression. *Curr Opin Psychiatry*, 2008, 21(1): 37–42.
- [7] Williams AL, Girard C, Jui D, et al. *S*-adenosylmethionine (SAME) as treatment for depression: a systematic review. *Clin Invest Med*, 2005, 28(3): 132–139.
- [8] Han GQ, Hu XQ, Wang XY. Co-production of *S*-adenosyl-L-methionine and L-isoleucine in *Corynebacterium glutamicum*. *Enzyme Microb Technol*, 2015, 78: 27–33.
- [9] Wei XN, Cao MJ, Li J, et al. Synthesis of *S*-adenosyl-L-methionine in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioproc Eng*, 2014, 19(6): 958–964.
- [10] Kant HR, Balamurali M, Meenakshisundaram S. Enhancing precursors availability in *Pichia pastoris* for the overproduction of *S*-adenosyl-L-methionine employing molecular strategies with process tuning. *J Biotechnol*, 2014, 188: 112–121.
- [11] Dippe M, Brandt W, Rost H, et al. Rationally engineered variants of *S*-adenosylmethionine (SAM) synthase: reduced product inhibition and synthesis of artificial cofactor homologues. *Chem Commun*, 2015, 51(17): 3637–3640.
- [12] Kanai M, Masuda M, Takaoka Y, et al. Adenosine kinase-deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae* accumulates *S*-adenosylmethionine because of an enhanced methionine biosynthesis pathway. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(3): 1183–1190.
- [13] Kim S, Hahn JS. Efficient production of 2,3-butanediol in *Saccharomyces cerevisiae* by

- eliminating ethanol and glycerol production and redox rebalancing. *Metab Eng*, 2015, 31: 94–101.
- [14] Semkiv MV, Dmytruk KV, Abbas CA, et al. Increased ethanol accumulation from glucose via reduction of ATP level in a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae* overexpressing alkaline phosphatase. *BMC Biotechnol*, 2014, 14(42): 1–9.
- [15] Siedler S, Lindner SN, Bringer S, et al. Reductive whole-cell biotransformation with *Corynebacterium glutamicum*: improvement of NADPH generation from glucose by a cyclized pentose phosphate pathway using *pfkA* and *gapA* deletion mutants. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(1): 143–152.
- [16] Shima J, Ando A, Takagi H. Possible roles of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase and mitochondrial function in tolerance to air-drying stress revealed by genome-wide screening of *Saccharomyces cerevisiae* deletion strains. *Yeast*, 2008, 25(3): 179–190.
- [17] Chen YW, Xu DB, Fan LH, et al. Manipulating multi-system of NADPH regulation in *Escherichia coli* for enhanced S-adenosylmethionine production. *RSC Adv*, 2015, 5(51): 41103–41111.
- [18] Chen YW, Lou SY, Fan LH, et al. Control of ATP concentration in *Escherichia coli* using synthetic small regulatory RNAs for enhanced S-adenosylmethionine production. *FEMS Microbiol Lett*, 2015, 362(15): fmv115.
- [19] Wang MM, Fan LH, Tan TW. 1-Butanol production from glycerol by engineered *Klebsiella pneumoniae*. *RSC Adv*, 2014, 4(101): 57791–57798.
- [20] Bernofsky C, Swan M. An improved cycling assay for nicotinamide adenine dinucleotide. *Anal Biochem*, 1973, 53(2): 452–458.
- [21] Outten CE, Culotta VC. A novel NADH kinase is the mitochondrial source of NADPH in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, 2003, 22(9): 2015–2024.
- [22] 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.
- [23] Bruinenberg PM. The NADP(H) redox couple in yeast metabolism. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1986, 52(5): 411–429.
- [24] Nissen TL, Anderlund M, Nielsen J, et al. Expression of a cytoplasmic transhydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae* results in formation of 2-oxoglutarate due to depletion of the NADPH pool. *Yeast*, 2001, 18(1): 19–32.
- [25] Vemuri GN, Eiteman MA, McEwen JE, et al. Increasing NADH oxidation reduces overflow metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(7): 2402–2407.
- [26] dos Santos MM, Thygesen G, Kötter P, et al. Aerobic physiology of redox-engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains modified in the ammonium assimilation for increased NADPH availability. *FEMS Yeast Res*, 2003, 4(1): 59–68.

(本文责编 郝丽芳)