

6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶在产油细菌浑浊红球菌 PD630 脂质积累中的作用

张冬冬, 赵利娜, 咎新艺, 唐鑫, 宋元达*

(食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122)

摘要: 产油微生物脂质合成的过程已基本清晰: 乙酰辅酶 A 和还原力 NADPH 在脂肪酸合酶 (FAS) 的作用下合成脂肪酸。产油微生物菌体内主要有苹果酸酶 (ME)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (G6PDH)、6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶 (6PGDH) 和异柠檬酸脱氢酶 (ICDH) 为其脂质合成提供所需还原力 NADPH。为了研究 6PGDH 在浑浊红球菌 PD630 (*Rhodococcus opacus* PD630) 脂质积累中的作用, 作者将编码氧化磷酸戊糖途径 (oxPPP) 中 6PGDH 的基因 *gnd* 在 *R. opacus* PD630 中过表达。结果表明, 与对照菌株相比较, 过表达 *gnd* 的重组菌株总脂肪酸含量提高了 20%~30%, 且 6PGDH 酶活力和 *gnd* 的转录水平也显著提高。由此可见, 6PGDH 在 *R. opacus* PD630 脂质合成中具有重要的作用, 能为其提供所需的还原力 NADPH, 以促进其脂质的积累。

关键词: 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶; 脂质生物合成; NADPH; 产油微生物; 浑浊红球菌 PD630

中图分类号: Q 785 文章编号: 1673-1689(2019)03-0061-08 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.03.009

Role of 6-Phosphogluconate Dehydrogenase in Lipid Accumulation of Oleaginous Bacteria *Rhodococcus opacus* PD630

ZHANG Dongdong, ZHAO Lina, ZAN Xinyi, TANG Xin, SONG Yuanda*

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The process of lipid biosynthesis in oleaginous microorganisms is basically clear; both the reducing power NADPH and the building block acetyl-CoA are required by fatty acid synthase (FAS) to synthesize fatty acids. In oleaginous microorganisms, the main enzymes involved in the provision of reducing power NADPH are malic enzyme (ME), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGDH), and isocitrate dehydrogenase (ICDH). In this study, the genes coding for 6-phosphogluconate dehydrogenase (*gnd*) from the oxidative pentose phosphate pathway (oxPPP) were over-expressed in the oleaginous bacteria *Rhodococcus opacus* PD630 to analyze its effect on lipid accumulation. The results showed that over-expression of *gnd*

收稿日期: 2016-01-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(31271812)。

* 通信作者: 宋元达(1964—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事功能脂质的生物合成及其分子机制方面的研究。

E-mail: ysong@jiangnan.edu.cn

引用本文: 张冬冬, 赵利娜, 咎新艺, 等. 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶在产油细菌浑浊红球菌 PD630 脂质积累中的作用[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(03): 61-68.

increased the content of lipid (w/w) by 20%~30% compared with the control strain. Meanwhile, the activities and the mRNA levels of 6PGDH in the overexpressing strains were higher than that of the control. Therefore, it was concluded that 6PGDH enhanced the lipid accumulation through promoting the generation of NADPH in the oleaginous bacteria *R. opacus* PD630.

Keywords: 6-phosphogluconate dehydrogenase, lipid biosynthesis, NADPH, oleaginous microorganisms, *Rhodococcus opacus* PD630

在过去的几十年里,由于能源紧缺及化石能源工业对环境造成的污染,人们对能够生产大量可再生能源的产油微生物产生了极大的研究兴趣^[1]。同时,来自微生物发酵生产的脂肪酸还是交通燃料和化工产品(表面活性剂、润滑剂)合成的前体,因此十分有必要研究和开发一些能够高产脂的微生物菌株^[2]。在燃气工程附近污染土壤中发现的浑浊红球菌 PD630(*Rhodococcus opacus* PD630),在以葡萄糖酸为碳源、氮源限制的条件下,可以合成高达细胞干质量 76%的脂质^[3-4]。相关研究报道:以甜菜糖浆和蔗糖为混合碳源连续培养 *R. opacus* PD630 时,其菌体的生物量能够达到 37.4 g/L,且脂质含量高达 51.9%^[5]。由此可见,产油细菌 *R. opacus* PD630 能够作为生产生物柴油的潜在菌株^[6-8]。此外,由于其全基因组序列已公布^[9]和完善的遗传操作系统^[9-12], *R. opacus* PD630 已经成为研究产油细菌细胞代谢与脂质合成机制的模式菌株^[13]。同时,也增加了 *R. opacus* PD630 利用廉价可再生原料(如木质纤维素水解产物)^[14-15] 进行发酵生产“高价值单细胞油脂”的可能性以及成为其它特殊应用的潜在菌株^[12,16]。

目前,产油微生物脂质合成的途径已经基本明确:一个关键步骤是提供生物脂质合成所需的必要前体乙酰辅酶 A,另一个关键步骤是提供辅助因子还原力 NADPH^[17]。NADPH 不仅是微生物脂质合成的必需还原力,也是激发菌体内大多数酶促反应的动力,其中包括 DNA、RNA 和蛋白质等生物大分子的合成^[18-20]。在研究 NADPH 的产量与实际通过氧化磷酸戊糖路径(oxPPP)碳流量之间的关系时,发现在许多真核及原核微生物中 oxPPP 是产生 NADPH 的一条主要途径^[20-23]。而且,已有很多研究基于增加 oxPPP 的碳流量来提高 NADPH 的产量,如直接过表达 oxPPP 相关的酶^[23-26];或间接增加 oxPPP 的碳流量,敲除磷酸葡萄糖异构酶^[27-28]或磷酸果糖激酶^[29-30]等。研究表明,在 *R. opacus* PD630 中葡萄糖-

6-磷酸脱氢酶(G6PDH)不仅控制着 oxPPP 同时还控制着 Entner-Doudoroff(ED)路径^[13,31]。作者所在实验室前期的 13C 代谢流量分析表明:在高氮和低氮两种不同的产脂培养条件下,*R. opacus* PD630 对 oxPPP 和 ED 路径的偏好性不同,在高产脂的培养条件下,通过 oxPPP 的碳流量是通过 ED 路径碳流量的 5 倍左右,而 6PGDH 正是导致这两种路径流量产生变化最主要的原因,因此 6PGDH 很有可能是影响其脂质积累的一个关键节点。

为了研究 6PGDH 在产油细菌 *R. opacus* PD630 脂质积累中的作用,作者将编码 6PGDH 的基因 *gnd* 在 *R. opacus* PD630 中过表达,并分析过表达重组菌株脂质含量的变化,以期进一步获得产油细菌 *R. opacus* PD630 脂质积累的分子机制。

1 材料与方法

1.1 菌株、培养条件及质粒

实验所用菌株和质粒见表 1。大肠杆菌 Top10 (*Escherichia coli* Top10) 于 37 °C 摇床 200 r/min 在 Luria-Bertani (LB) 培养基中进行培养。*R. opacus* PD630 (DSMZ44193)^[31] 于 28 °C、200 r/min,在 LB 培养基或含有微量元素 SL6^[32]的 MSM^[33]培养基中进行培养。葡萄糖(10 g/L)作为碳源,NH₄Cl(1 g/L)用作氮源,细胞在 250 mL 摇瓶中进行培养,其中含有 50 mL MSM 培养基。调节活化菌株的浓度使得所有发酵培养接种的初始菌体浓度相同。培养 48、72、96 h 后离心收集菌体,用 NaCl(0.9 g/dL)洗涤菌体细胞两次,之后冷冻干燥至恒质量或直接在 -80 °C 储藏用于下一步的实验分析。对于 *E. coli* Top10 和 *R. opacus* PD630 选择培养所用的抗体终质量浓度均为 50 μg/mL 的卡那霉素(Km),发酵培养基中所用的诱导剂为乙酰胺终质量浓度为 0.5 g/dL^[11]。固体培养基通过加入 1.5 g/dL 的琼脂来制备。

1.2 重组质粒的构建

通过 NCBI 网站查找出, *R. opacus* PD630 中有 5 种同源基因 *gnd* 编码 6PGDH。由于基因 *gnd* 是同源过表达, 提取 *R. opacus* PD630 的基因组为模板, 利用相对应的引物进行 PCR 扩增从其基因组中分离得到目的基因片段, 上下游引物分别含有 *Bam*HI 和 *Xba*I 酶切位点。扩增得到的 PCR 产物经过 1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳后进行胶回收, 同时质粒 pJAM2 分别加入 *Bam*HI 和 *Xba*I 进行双酶切, 酶切后的 DNA 片段和 PCR 产物分别按一定比例混合, 利用 T4 连接酶进行连接, 得到重组质粒 pJAM2/*gnd*1、pJAM2/

*gnd*2、pJAM2/*gnd*3、pJAM2/*gnd*4 和 pJAM2/*gnd*5。重组质粒中目的基因片段位于乙酰胺酶(*ace*)启动子下游, 将以上构建得到的重组质粒用化学法转化到 *E. coli* Top10 的感受态细胞中, 在添加有 50 μg/mL Km 的 LB 固体平板上于 37 °C 培养 12~16 h, 随机选取每一种重组菌株的转化子进行 PCR 验证, 验证正确的阳性转化子送至上海桑尼生物科技有限公司进行基因测序验证。之后将测序正确的重组质粒电击转化至 *R. opacus* PD630, 得到过表达 *gnd* 的重组菌株。本实验所有的菌株及质粒见表 1, 所有的引物见表 2。

表 1 本研究所有的菌株及质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株或质粒	菌株特性	来源
大肠杆菌 Top10	用于所有克隆实验	作者所在实验室保藏
浑浊红球菌 PD630	野生型	作者所在实验室保藏
PD-pJAM2/ <i>gnd</i> 1	携带 pJAM2/ <i>gnd</i> 1 的 PD630 工程菌株; Km ^R	本研究构建
PD-pJAM2/ <i>gnd</i> 2	携带 pJAM2/ <i>gnd</i> 2 的 PD630 工程菌株; Km ^R	本研究构建
PD-pJAM2/ <i>gnd</i> 3	携带 pJAM2/ <i>gnd</i> 3 的 PD630 工程菌株; Km ^R	本研究构建
PD-pJAM2/ <i>gnd</i> 4	携带 pJAM2/ <i>gnd</i> 4 的 PD630 工程菌株; Km ^R	本研究构建
PD-pJAM2/ <i>gnd</i> 5	携带 pJAM2/ <i>gnd</i> 5 的 PD630 工程菌株; Km ^R	本研究构建
PD-pJAM2	携带 pJAM2 的 PD630 工程菌株; Km ^R	本研究构建
pJAM2	<i>E. coli</i> - <i>Mycobacterium</i> - <i>Rhodococcus</i>	Triccas. et. al. [34]
pJAM2/ <i>gnd</i> 1	携带基因 <i>gnd</i> 1 的 pJAM2 衍生物; Km ^R	本研究构建
pJAM2/ <i>gnd</i> 2	携带基因 <i>gnd</i> 2 的 pJAM2 衍生物; Km ^R	本研究构建
pJAM2/ <i>gnd</i> 3	携带基因 <i>gnd</i> 3 的 pJAM2 衍生物; Km ^R	本研究构建
pJAM2/ <i>gnd</i> 4	携带基因 <i>gnd</i> 4 的 pJAM2 衍生物; Km ^R	本研究构建
pJAM2/ <i>gnd</i> 5	携带基因 <i>gnd</i> 5 的 pJAM2 衍生物; Km ^R	本研究构建

注: Km^R, 具有卡那霉素抗性

1.3 *R. opacus* PD630 的电击转化

R. opacus PD630 的电击转化所用感受态细胞的制作方法: 从划线平板上挑取单菌落于含有 0.85 g/dL 甘氨酸和 1 g/dL 蔗糖的 LB 培养基中培养, 当其 OD 值达到 0.6 时, 在 4 °C 条件下离心收集菌体, 冰浴 10 min, 离心后用预冷的无菌水洗涤一次, 再用 10 g/dL 预冷甘油重悬菌体后分装至 1.5 mL 的无菌 EP 管中, 于 -80 °C 保存。电击转化方法在 Kalscheuer 等^[12]报道的基础上做一些优化。具体方法为: 100 μL 感受态细胞与 5 μL DNA 混合后, 40 °C 水浴 5 min, 冰上放置 10 min 后立即转移至电极间隙尺寸为 2 mm 的预冷电击杯中进行脉冲电击

(电击条件: 25 μF, 2.4 kV/cm, 600 Ω)。电击之后的混合液转接至 1 mL LB 培养基中, 在 28 °C 下培养 4 h, 之后取少量菌液均匀涂布到含 50 μg/mL Km 的 LB 固体选择性培养基中培养 3~5 d 得到阳性转化子, 用对应的引物 MF/MR (扩增目的基因) 和 *ace*F/*ace*R (扩增乙酰胺酶启动子基因) 进行菌液 PCR 验证。

1.4 脂质分析

离心收集 48、72、96 h 的菌体并用 0.9 g/dL 的 NaCl 溶液清洗两次, 置于 -80 °C 预冷, 之后进行冷冻浓缩干燥。准确称取冷冻干燥之后的菌粉 8~10 mg 于 4 mol/L 的盐酸中水解, 之后用氯仿/甲醇 (体积比 2:1) 进行萃取, 为定量分析加入正十三烷酸

表 2 本研究用到的引物名称及序列

Table 2 Oligonucleotides used as PCR primers in this study

引物名称	引物序列(5'-3')	用途
PD- <i>gnd1</i> -F	CGCGGATCCGGACTGGTCCGTCTGGGCAA	用于扩增 <i>gnd1</i> 基因
PD- <i>gnd1</i> -R	CGCTCTAGATCAGCCGATCCCGCGGGTT	
PD- <i>gnd2</i> -F	CGCGGATCCTCAGACGCCCCGACCGCCAA	用于扩增 <i>gnd2</i> 基因
PD- <i>gnd2</i> -R	CGCTCTAGATCAGCGGTTCCGCTCTCCG	
PD- <i>gnd3</i> -F	CGCGGATCCACTATCGACAACACTGAGGG	用于扩增 <i>gnd3</i> 基因
PD- <i>gnd3</i> -R	CGCTCTAGATCAGGCGCTGCACCTTCGCT	
PD- <i>gnd4</i> -F	CGCGGATCCAGATCGGGTTGGTC	用于扩增 <i>gnd4</i> 基因
PD- <i>gnd4</i> -R	CGCTCTAGACTACGTTCCAGAACC	
PD- <i>gnd5</i> -F	CGCGGATCCAAGTTGGCGATCATCGGATG	用于扩增 <i>gnd5</i> 基因
PD- <i>gnd5</i> -R	CGCTCTAGATCAGACCACGGCGGGGTGT	
<i>gnd1</i> -F	TGGGACTGAACATGCGTGAG	RT-qPCR 引物
<i>gnd1</i> -R	ACTCGACCAACGCTTCGAG	
<i>gnd2</i> -F	GCGGCAGCATTGTCTACTA	RT-qPCR 引物
<i>gnd2</i> -R	CTTTGTCCACCCTGCGGTAG	
<i>gnd3</i> -F	TCCTCAACCGCATCAAGGAC	RT-qPCR 引物
<i>gnd3</i> -R	CGTAGTAGGACAGCGACGAC	
<i>gnd4</i> -F	AGAACGGCTATGGGCTGATG	RT-qPCR 引物
<i>gnd4</i> -R	TTCGATGCCGTTGTGGATCA	
<i>gnd5</i> -F	TGAGGTCGTTCTCTGCGATG	RT-qPCR 引物
<i>gnd5</i> -R	GACAGGAAGGCTCCGGATTG	
<i>MF</i>	AGAGAAAGGGAGTCCACATGCC	空质粒验证引物
<i>MR</i>	AGGATGTCAGTGGTGGTGGTGG	
<i>aceF</i>	AGTCACGGTACCAAGCTTTCTAG	目的基因验证引物
<i>aceR</i>	ACAGCGGATGGTTCCGATAATGC	

注:a 下划线的 6 个碱基序列为 pJAM2 质粒上 *Bam*HI 和 *Xba*I 两个酶切位点

($C_{13:0}$)作为内标,质量分数 10%的盐酸/甲醇对其进行甲酯化处理。甲酯化之后的样品取 10 μ L 进行气相分析,气相程序设置为:起始温度为 60 $^{\circ}$ C,以 10 $^{\circ}$ C/min 的速度升温到 120 $^{\circ}$ C,停留 3 min,再以 5 $^{\circ}$ C/min 的速度升温到 190 $^{\circ}$ C,之后以 4 $^{\circ}$ C/min 的速度升温至 220 $^{\circ}$ C,停留 20 min, N_2 作为载气,流量为 3 mL/min。

1.5 相关基因转录水平及酶活力的分析

对于过表达重组菌株 *gnd* 基因转录水平的分析,收集 48、72、96 h 的菌体,4 $^{\circ}$ C 条件下离心收集发酵培养的菌体,收集的菌体立即于 -80 $^{\circ}$ C 保存用于后续转录水平分析。RNA 的提取和 cDNA 的分析所用的方法基于 Hoynes 等^[35]建立方法的基础上做一些改进。为了定量分析,用能够在相近菌种 *Rhodococcus jostii* RHA1 中稳定表达的 DNA 聚合酶 IV 作为内参^[36]。转录水平倍数的计算根据

Schmittgen 和 Livak^[37]建立的公式计算得出。

6PGDH 酶活力的分析测定所用的细胞粗提取物用 Tang 等^[38]改进过的标准方法。离心收集菌体用去离子水清洗两遍,在液氮下进行研磨之后用 BufferA (100 mmol/L KH_2PO_4 /KOH, pH 7.5 含有 20 g/dL 甘油,1 mmol/L 盐酸苯甲脒和 1 mmol/L DTT) 悬浮。提取悬浮液于 4 $^{\circ}$ C、10 000 g 离心 30 min,上清液用作酶活力的测定。蛋白质质量浓度用 Bradford^[39]法确定。

2 结果与讨论

2.1 *gnd* 过表达重组菌株的构建

由 NCBI 公布的 *R. opacus* PD630 的全基因组序列,可以查找到编码 6PGDH 的同源基因有 5 个,将它们分别命名为 *gnd1*(894 bp)、*gnd2*(1 455 bp)、*gnd3*(1 452 bp)、*gnd4*(912 bp)和 *gnd5*(882 bp)。图

1 是质粒 pJAM2, 含有乙酰胺酶启动子, 其下游有 *Bam*HI 和 *Xba*I 两个酶切位点供插入目的基因, 并且带有可作为选择性标记的 Km 抗性基因。以 *R. opacus* PD630 的基因组为模板, 利用对应的引物体外扩增出目的基因片段, 克隆到质粒 pJAM2 上, 获得过表达 6PGDH 的重组质粒 pJAM2/*gnd*1、pJAM2/*gnd*2、pJAM2/*gnd*3、pJAM2/*gnd*4 和 pJAM2/*gnd*5。然后, 通过电击转化的方法将这些重组质粒及空质粒 pJAM2 分别转化到 *R. opacus* PD630 中, 再将这些转化子在含 Km 的选择性培养基上培养, 以获得所需的过表达重组菌株和对照菌株。

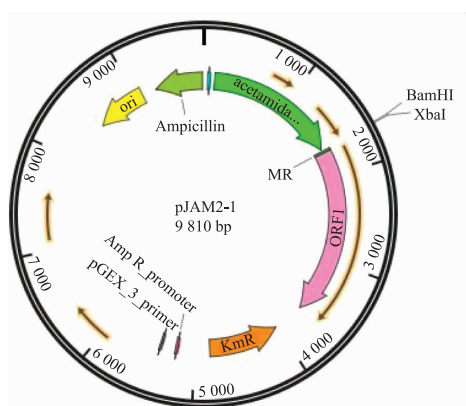
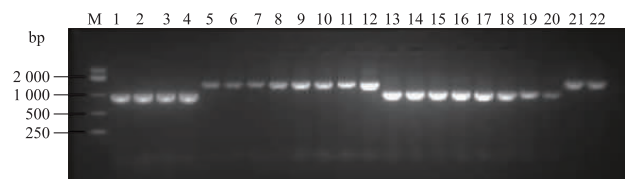


图 1 用于携带目的基因的质粒 pJAM2 的结构

Fig. 1 Structure of plasmid pJAM2-gene for target gene-overexpressing in *R. opacus* PD630

为了验证目的基因是否成功转入 *R. opacus* PD630 中, 以 MF/MR 和 aceF/aceR 为引物, 重组菌株和对照菌株的基因组为模板进行 PCR 验证, 其 PCR 扩增片段结果见图 2。由图 2 可知, 目的基因已经成功转入 *R. opacus* PD630 中。选取每个过表达基因的 3 个转化子进行发酵培养, 每个过表达重组菌株中产脂量最高的一株 (命名为 PD-pJAM2/



M: DNA Marker; 1~4: PD-pJAM2/*gnd*1 的 4 个转化子; 5~8: PD-pJAM2/*gnd*2 的 4 个转化子; 9~12: PD-pJAM2/*gnd*3 的 4 个转化子; 13~16: PD-pJAM2/*gnd*4 的 4 个转化子; 17~20: PD-pJAM2/*gnd*5 的 4 个转化子; 21~22: PD-pJAM2 的 2 个转化子。

图 2 转化子的 PCR 验证

Fig. 2 PCR confirmation of transformants

*gnd*1、PD-pJAM2/*gnd*2、PD-pJAM2/*gnd*3、PD-pJAM2/*gnd*4、PD-pJAM2/*gnd*5 和对照菌株 PD-pJAM2) 用于后续实验。

2.2 *gnd* 过表达重组菌株脂质积累的分析

为了分析 *gnd* 过表达重组菌株脂质积累的情况, 将筛选出的过表达重组菌株分别在 MSM 培养基中进行发酵培养, 收集 48、72、96 h 的菌体用于提取脂质。过表达重组菌株和对照菌株的总脂肪酸质量分数见图 3。从图 3 可以看出, 各个过表达重组菌株的总脂肪酸质量分数与对照菌株相比均有显著的提高。脂质质量分数增加最多的菌株是 PD-pJAM2/*gnd*3, 其总脂肪酸质量分数在 48 h 时高达 31.98%, 比对照菌株提高了 27.8%。而且, 过表达重组菌株的总脂肪酸质量分数随着培养时间的增加而逐渐降低, 重组菌株的生物量在 48 h (对数生长期的后期) 时, 其总脂肪酸质量分数达到最高, 与之前 Hernández 等^[10]的研究结果相符。

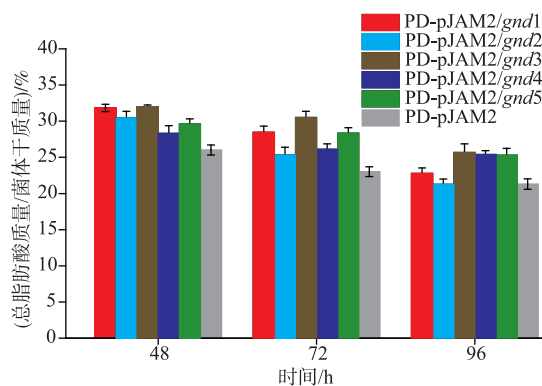


图 3 在 24、48、72 h 不同时间点过表达菌株和对照菌株的总脂肪酸质量分数

Fig. 3 Total amount of fatty acids content in the overexpressing strains and control strain at 24, 48, 72 h

由此可见, 过表达 *gnd* 能够促进 *R. opacus* PD630 的脂质积累。之前已有很多研究发现, oxPPP 是脂质生物合成所需还原力 NADPH 的主要来源, 在产油真菌高山被孢霉^[10]和卷枝毛霉^[24]中过表达 oxPPP 相关酶的重组菌株脂质含量均提高了 20% 以上; 也有很多在原核生物中研究 oxPPP 相关酶对 NADPH 的影响^[40-42]。有研究表明, 在大肠杆菌中过表达 G6PDH 比过表达 6PGDH 能够更有效地产生 NADPH^[20]。然而在 *R. opacus* PD630 中以葡萄糖为碳源的培养条件下通过 G6PDH 的碳流量高达 90%

以上^[13],因此过表达 G6PDH 达到增加 NADPH 产量的空间不大。作者通过过表达 6PGDH 来增加脂质合成所需的还原力 NADPH, 实验结果也证明过表达 6PGDH 能够促进了 *R. opacus* PD630 的脂质积累量, 这为我们进一步研究 *R. opacus* PD630 脂质合成机制提供了可靠的依据。

2.3 *gnd* 过表达重组菌株 6PGDH 酶活力及 *gnd* 转录水平的分析

为了分析过表达重组菌株 6PGDH 酶活性的情况, 分别收集了 48、72、96 h 的菌体对其进行 6PGDH 酶活力的测定, 结果见图 4。由图 4 可知, 过表达重组菌株的 6PGDH 酶活力显著高于对照菌株, 且随着培养时间的延长其酶活力不断增加。

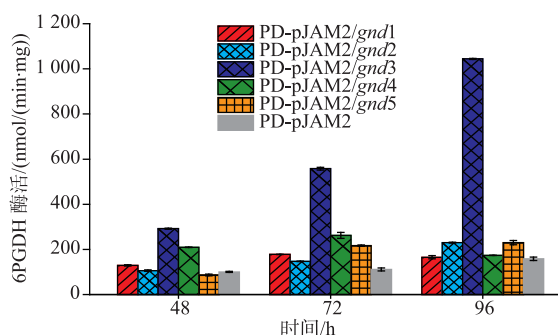


图 4 在 24、48、72 h 不同时间点过表达菌株和对照菌株 6PGDH 的酶活性

Fig. 4 Activities of 6PGDH in the overexpressing strains and control strain at 24, 48, 72 h

为了分析研究 *gnd* 过表达重组菌株 *gnd* 的转录水平, 提取重组菌株和对照菌株的 RNA 进行 RT-qPCR 分析, 结果见图 5。由图 5 可知, 重组菌株的 *gnd* 转录水平均较对照菌株提高了 4~10 倍。通过对过表达重组菌株脂质积累量、酶活和转录水平

的综合分析, 目的基因 *gnd* 在过表达重组菌株中能够正常地转录与翻译, 并且过表达重组菌株通过提高 6PGDH 酶活力以产生更多的还原力 NADPH, 从而促进其脂肪酸的合成。

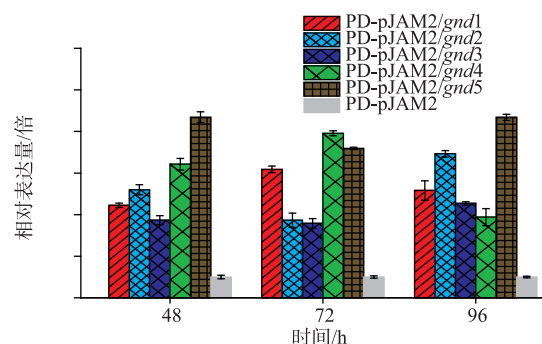


图 5 在 24、48、72 h 不同时间点过表达菌株和对照菌株 *gnd1*, *gnd2*, *gnd3*, *gnd4* 和 *gnd5* 的表达水平

Fig. 5 Expression levels of *gnd1*, *gnd2*, *gnd3*, *gnd4* and *gnd5* genes in the overexpressing strains and control strain at 24, 48, 72 h

3 结语

本研究 *R. opacus* PD630 过表达重组菌株中 6PGDH 酶活力及编码基因 *gnd* 的转录水平较对照组均有所提高, 且脂质积累量较对照组也提高了 20%~30%。这些结果都表明在 *R. opacus* PD630 中, 由 6PGDH 产生的 NADPH 能够促进其脂肪酸的生物合成, 从而使 *R. opacus* PD630 能够积累更多的脂肪酸, 也为更好地了解其脂质生物合成的机制提供了依据。我们还需要进一步研究在 *R. opacus* PD630 中其它能够产生还原力 NADPH 的酶对脂质积累的作用, 从而增大其成为第二代生物柴油生产菌株的可能性。

参考文献:

- [1] BEOPOULOS A, NICAUD J M, GAILLARDIN C. An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 90(4): 1193-1206.
- [2] HE L, XIAO Y, GEBRESELASSIE N et al. Central metabolic responses to the overproduction of fatty acids in *Escherichia coli* based on ¹³C-metabolic flux analysis[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2014, 111(3): 575-585.
- [3] ALVAREZ H M, MAYER F, FABRITIUS D et al. Formation of intracytoplasmic lipid inclusions by *Rhodococcus opacus* strain PD630[J]. *Archives of Microbiology*, 1996, 165(6): 377-386.
- [4] ALVAREZ H, KALSCHUEER R, STEINBUCHER A. Accumulation and mobilization of storage lipids by *Rhodococcus opacus* PD630 and *Rhodococcus ruber* NCIMB 40126[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2000, 54(2): 218-223.
- [5] VOSS I, STEINBUCHER A. High cell density cultivation of *Rhodococcus opacus* for lipid production at a pilot-plant scale[J].

- Applied Microbiology and Biotechnology**, 2001, 55(5):547-555.
- [6] WALTERMANN M, LUFTMANN H, BAUMEISTER D et al. *Rhodococcus opacus* strain PD630 as a new source of high-value single-cell oil Isolation and characterization of triacylglycerols and other storage lipids[J]. **Microbiology**, 2000, 146(5):1143-1149.
- [7] KOSA M, RAGAUSKAS A J. Bioconversion of lignin model compounds with oleaginous *Rhodococci*[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2012, 93(2):891-900.
- [8] HERNANDEZ M A, COMBA S, ARABOLAZA A et al. Overexpression of a phosphatidic acid phosphatase type 2 leads to an increase in triacylglycerol production in oleaginous *Rhodococcus* strains[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2014, 99(5):2191-2207.
- [9] HOLDER J W, ULRICH J C, DEBONO A C, et al. Comparative and functional genomics of *Rhodococcus opacus* PD630 for biofuels development[J]. **Plos Genetics**, 2011, 7(9):e1002219.
- [10] HERNANDEZ M A, ARABOLAZA A, RODRIGUEZ E et al. The *atf2* gene is involved in triacylglycerol biosynthesis and accumulation in the oleaginous *Rhodococcus opacus* PD630[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2013, 97(5):2119-2130.
- [11] PAN J, WU F, WANG J et al. Enhancement of desulfurization activity by enzymes of the *Rhodococcus dsz* operon through coexpression of a high sulfur peptide and directed evolution[J]. **Fuel**, 2013, 112:385-390.
- [12] KALSCHUEER R, ARENSKOTTER M, STEINBUCHER A. Establishment of a gene transfer system for *Rhodococcus opacus* PD630 based on electroporation and its application for recombinant biosynthesis of poly (3-hydroxyalkanoic acids)[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 1999, 52(4):508-515.
- [13] HOLLINSHEAD W D, HENSON W R, ABERNATHY M, et al. Rapid metabolic analysis of *Rhodococcus opacus* PD630 via parallel ¹³C-metabolite fingerprinting[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 2016, 113(1):91-100.
- [14] KUROSAWA K, WEWETZER S J, SINSKEY A J. Engineering xylose metabolism in triacylglycerol-producing *Rhodococcus opacus* for lignocellulosic fuel production[J]. **Biotechnol Biofuels**, 2013, 6:134.
- [15] WANG B, REZENOM Y H, CHO K C, et al. Cultivation of lipid-producing bacteria with lignocellulosic biomass: effects of inhibitory compounds of lignocellulosic hydrolysates[J]. **Bioresource Technology**, 2014, 161:162-170.
- [16] KUROSAWA K, PLASSMEIER J, KALINOWSKI J, et al. Engineering l-arabinose metabolism in triacylglycerol-producing *Rhodococcus opacus* for lignocellulosic fuel production[J]. **Metabolic Engineering**, 2015, 30:89-95.
- [17] RATLEDGE C. The role of malic enzyme as the provider of NADPH in oleaginous microorganisms: a reappraisal and unsolved problems[J]. **Biotechnology Letters**, 2014, 36(8):1557-1568.
- [18] MILLER W L, AUCHUS R J. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders[J]. **Endocrine Reviews**, 2010, 32(1):81-151.
- [19] SINGH R, LEMIRE J, MAILLOUX R J, et al. A novel strategy involved anti-oxidative defense: the conversion of NADH into NADPH by a metabolic network[J]. **PLoS One**, 2008, 3:e2682.
- [20] LEE W H, KIM M D, JIN Y S, et al. Engineering of NADPH regenerators in *Escherichia coli* for enhanced biotransformation[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2013, 97(7):2761-2772.
- [21] ZHAO L, ZHANG H, WANG L, et al. ¹³C-metabolic flux analysis of lipid accumulation in the oleaginous fungus *Mucor circinelloides*[J]. **Bioresource Technology**, 2015, 197:23-29.
- [22] WASYLENKO T M, AHN W S, STEPHANOPOULOS G. The oxidative pentose phosphate pathway is the primary source of NADPH for lipid overproduction from glucose in *Yarrowia lipolytica*[J]. **Metabolic Engineering**, 2015, 30:27-39.
- [23] HAO G, CHEN H, GU Z, et al. Metabolic engineering of *Mortierella alpina* for arachidonic acid production with glycerol as carbon source[J]. **Microbial Cell Factories**, 2015, 14(1):1-6.
- [24] ZHAO L, TANG X, LUAN X, et al. Role of pentose phosphate pathway in lipid accumulation of oleaginous fungus *Mucor circinelloides*[J]. **RSC Advances**, 2015, 5(118):97658-97664.
- [25] SANDOVAL J M, ARENAS F A, VASQUEZ C C. Glucose-6-phosphate dehydrogenase protects *Escherichia coli* from tellurite-mediated oxidative stress[J]. **PLoS One**, 2011, 6(9):e25573-e25573.
- [26] SANDOVAL J, ARENAS F, GARCIA J, et al. *Escherichia coli* 6-phosphogluconate dehydrogenase aids in tellurite resistance by

- reducing the toxicant in a NADPH-dependent manner[J]. **Microbiological Research**, 2015, 177:22-27.
- [27] CHEMLER JA, FOWLER ZL, MCHUGH K P, et al. Improving NADPH availability for natural product biosynthesis in *Escherichia coli* by metabolic engineering[J]. **Metabolic Engineering**, 2010, 12(2):96-104.
- [28] KABIR M M, SHIMIZU K. Fermentation characteristics and protein expression patterns in a recombinant *Escherichia coli* mutant lacking phosphoglucose isomerase for poly (3-hydroxybutyrate) production [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2003, 62(2-3):244-255.
- [29] CHIN J W, CIRINO P C. Improved NADPH supply for xylitol production by engineered *Escherichia coli* with glycolytic mutations[J]. **Biotechnology Progress**, 2011, 27(2):333-341.
- [30] WANG Y, SAN K Y, BENNETT G N. Improvement of NADPH bioavailability in *Escherichia coli* through the use of phosphofructokinase deficient strains[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2013, 97(15):6883-6893.
- [31] ALVAREZ H M. Central Metabolism of Species of the Genus *Rhodococcus*[M]. New York:Springer, 2010:91-108.
- [32] ABELIOVICH A, KAPLAN S. Bacteriophages of *Rhodopseudomonas spheroides*: isolation and characterization of a *Rhodopseudomonas spheroides* bacteriophage[J]. **Journal of Virology**, 1974, 13(6):1392-1399.
- [33] SCHLEGEL H, KALTWASSER H, GOTTSCHALK G. Ein submersverfahren zur kultur wasserstoffoxydierender bakterien: wachstumsphysiologische untersuchungen[J]. **Archiv für Mikrobiologie**, 1961, 38(3):209-222.
- [34] TRICCAS J A, PARISH T, BRITTON W J, et al. An inducible expression system permitting the efficient purification of a recombinant antigen from *Mycobacterium smegmatis*[J]. **FEMS Microbiology Letters**, 1998, 167(2):151-156.
- [35] HOYNES-O' Connor A, MOON T S. Programmable genetic circuits for pathway engineering[J]. **Current Opinion in Biotechnology**, 2015, 36:115-121.
- [36] LEBLANC J C, GONCALVES E R, MOHN W W. Global response to desiccation stress in the soil actinomycete *Rhodococcus jostii* RHA1[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2008, 74(9):2627-2636.
- [37] SCHMITTGEN T D, LIVAK K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method[J]. **Nature Protocols**, 2008, 3(6):1101-1108.
- [38] TANG X, CHEN H, CHEN Y Q, et al. Comparison of biochemical activities between high and low lipid-producing strains of *Mucor circinelloides*: an explanation for the high oleaginity of strain WJ11[J]. **PLoS One**, 2015, 10(6):e0128396.
- [39] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. **Analytical Biochemistry**, 1976, 72(1):248-254.
- [40] RICHHARDT J, BRINGER S, BOTT M. Role of the pentose phosphate pathway and the entner-doudoroff pathway in glucose metabolism of *Gluconobacter oxydans* 621H[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2013, 97(10):4315-4323.
- [41] LIM S J, JUNG Y M, SHIN H D, et al. Amplification of the NADPH-related genes *zwf* and *gnd* for the oddball biosynthesis of PHB in an *E. coli* transformant harboring a cloned *phbCAB* operon[J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2002, 93(6):543-549.
- [42] SALIOLA M, TRAMONTI A, LANINI C, et al. Intracellular NADPH levels affect the oligomeric state of the glucose 6-phosphate dehydrogenase[J]. **Eukaryotic Cell**, 2012, 11(12):1503-1511.