

## 产甘油假丝酵母与酿酒酵母胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶基因的功能比较\*

陈献忠<sup>1,2)</sup> 方慧英<sup>3)</sup> 饶志明<sup>1,3)</sup> 沈 微<sup>1,2)</sup> 诸葛斌<sup>1,3)</sup> 王正祥<sup>1,2)</sup> 诸葛健<sup>1,3)\*\*</sup>

(<sup>1)</sup>江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122; <sup>2)</sup>江南大学生物工程学院生物资源与生物能源研究中心, 无锡 214122;

<sup>3)</sup>江南大学生物工程学院工业微生物生物反应过程研究中心, 无锡 214122)

**摘要** 胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶(GPD)是酿酒酵母细胞甘油合成过程中的关键限速酶。尽管高产甘油菌株产甘油假丝酵母基因组中编码该酶的基因 *CgGPD* 已经被克隆出来, 但是具体的功能, 特别是与酿酒酵母 *GPD1* 和 *GPD2* 基因的功能比较值得进一步研究。以酿酒酵母渗透压敏感型的 *gpd1/gpd2* 和 *gpd1* 突变株为宿主, 分别导入 *CgGPD*、*GPD1* 和 *GPD2* 基因, 比较分析了 *CgGPD*、*GPD1* 和 *GPD2* 基因在高渗透压胁迫条件下和厌氧环境中的表达调控, 及其对细胞甘油合成能力的影响。研究发现, *GPD1* 基因受到渗透压诱导表达, *GPD2* 基因在细胞厌氧条件下起着氧化还原平衡调节作用, 而 *CgGPD* 基因不仅能够渗透压胁迫条件下通过过量快速合成甘油调节渗透压平衡, 而且能够在厌氧培养环境中互补 *GPD2* 基因的缺失, 使 *gpd1/gpd2* 缺失突变株能够正常生长, 同时提高了突变株的甘油合成能力。结果表明, *CgGPD* 基因在 *gpd1/gpd2* 缺失突变株中既具有 *GPD1* 基因的功能, 又能发挥 *GPD2* 基因的功能。

**关键词** 产甘油假丝酵母, 3-磷酸甘油脱氢酶, 甘油合成, 渗透压调节, 氧化还原平衡

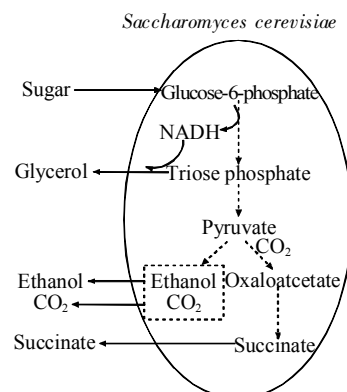
**学科分类号** Q935, Q936

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2008.00363

对酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)而言, 厌氧培养和提高外界环境渗透压是促进细胞合成甘油的两个比较有效而简单的手段, 在这两种生理胁迫下研究细胞的甘油代谢, 能够深入地揭示细胞的氧化还原调节和胁迫适应机制<sup>[1]</sup>。在 *S. cerevisiae* 细胞中, NAD<sup>+</sup> 依赖性的 3-磷酸甘油脱氢酶(NAD<sup>+</sup>-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase, GPD)是甘油合成途径的限速酶<sup>[2]</sup>, GPD 存在两个同工酶分别是 *GPD1* 和 *GPD2*, 其编码基因分别是 *GPD1* 和 *GPD2*, 其中 *GPD1* 是渗透压诱导型, *GPD2* 则受厌氧条件诱导表达。

当酵母细胞在厌氧环境中培养时, 由于缺乏作为电子最终受体游离氧的存在, 阻断了由电子传递链把还原型 NADH 再生成氧化型 NAD<sup>+</sup> 的氧化还原调节路线。同时, 由于在合成细胞组分的生化过程中会产生大量的 NADH, 而由葡萄糖生成乙醇的过程是氧化还原电势中性的, 结果是细胞内 NAD<sup>+</sup>/NADH 的比率不断降低, 使得胞内氧化还原电势严重失衡。为了维持厌氧条件下酵母细胞胞内氧化还原电势中性的状态, 由磷酸二羟丙酮

(DHAP)到 3-磷酸甘油(G3P)伴随消耗 NADH 的生化反应成为调节胞内氧化还原平衡的最主要方式之一(图 1), 而催化这个反应的酶正是由 *GPD2* 基因



**Fig. 1** The schematic pathways of glycerol production and NADH consumption in *S. cerevisiae* under the anaerobic culture condition

\* 国家自然科学基金(20676053)和长江学者和创新团队发展计划(IRT0532)资助项目。

\*\* 通讯联系人. Tel: 0510-85918109, E-mail: jianzhuge@hotmail.com

收稿日期: 2008-05-18, 接受日期: 2008-09-08

编码的胞浆  $\text{NAD}^+$  依赖性的 3-磷酸甘油脱氢酶<sup>[3,4]</sup>, 此时甘油是除了酒精和二氧化碳之外最重要的副产物(图 1)。尽管不少学者在厌氧条件或渗透压诱导甘油合成的代谢机理方面进行了深入的研究, 但这些研究主要集中于来源酿酒酵母自身基因的表达调控<sup>[5,6]</sup>, 而异源 *GPD* 基因的表达调控与 *GPD1/GPD2* 基因的功能比较报道较少, 值得进一步研究。

产甘油假丝酵母(*Candida glycerinogenes*)是优良的甘油生产酵母, 已经成功地应用于发酵甘油工业中。王正祥等<sup>[7]</sup>对 *C. glycerinogenes* 过量合成甘油机理的研究发现, 细胞的耐高渗性可能与其生长相偶联, 并且在甘油的高速积累期, 胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶是甘油合成的关键限速酶。最近, 我们成功地克隆了来源于 *C. glycerinogenes* 基因组的胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶基因(*CgGPD*), 其上游调控序列和蛋白质序列均具有自身的特性, 初步的功能鉴定表明 *CgGPD* 是受渗透压诱导表达<sup>[8]</sup>, 但是与来源于 *S. cerevisiae* 的 *GPD1* 和 *GPD2* 基因相比 *CgGPD* 基因的表达调控知之甚少。因此, 本文以 *S. cerevisiae* 及其渗透压敏感型的 *gpd1/gpd2* 和 *gpd1* 突变株为宿主, 比较分析了来源于 *C. glycerinogenes* 的 *CgGPD* 基因和来源于酿酒酵母的 *GPD1* 和 *GPD2* 基因, 在不同生理胁迫条件下的表达以及对细胞甘油合成能力的影响, 结果表明, *CgGPD* 基因不仅受渗透压诱导表达, 还参与细胞的氧化还原平衡调节。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株、质粒及培养条件。**产甘油假丝酵母(*C. glycerinogenes*)WL2002-5 和大肠杆菌(*Escherichia coli*)JM109 均由本实验室保藏; 酿酒酵母 YSH642 (W303-1A *gpd1Δ::TRP1 gpd2Δ::URA3*)和 YSH392 (W303-1A *gpd1 Δ::TRP1*)由瑞典 Goteborg 大学 Hohmann 教授馈赠; 酿酒酵母(*S. cerevisiae*)W303-1A 和用于基因表达的穿梭质粒 YEplac181 由南非 Stellenbosch 大学 Prior 教授馈赠; pGEM T-Vector 用于基因的亚克隆和序列测定, 购自

Promega 公司。LB 培养基用于 *E. coli* JM109 的生长, 培养温度 37℃。YEPD 培养基用于 *C. glycerinogenes* WL2002-5 和 *S. cerevisiae* 的培养、保藏; 添加相应氨基酸的 YNB 培养基用于 *S. cerevisiae* W303-1A 转化子的筛选; LB, YNB 和 YEPD 培养基的组成和配制见参考文献[9]。

**渗透压胁迫实验:** 细胞在 YEPD 培养液中预培养至对数生长后期, 加入等体积的预热至 30℃ 1.4 mol/L NaCl 的 YEPD, 在 30℃ 摇床继续培养, 以未加入高盐培养基时作为对照, 分别在设定时间点取样分析胞内甘油含量和 GPD 酶活。

**厌氧培养:** YNB 培养基中补充麦角固醇 (10 mg/L)和吐温 80(420 mg/L)<sup>[10]</sup>, 250 ml 具塞磨口三角瓶中装液量为 50 ml, 于 30℃ 厌氧摇瓶柜中培养, 定时取样。麦角固醇和吐温 80 不能灭菌, 溶于无水乙醇中经 0.2 μm 微孔滤膜过滤除菌后备用。接种前培养基先经氮气置换数分钟。种子培养按耗氧方式培养。

**1.1.2 主要试剂和工具用酶。**实验用各种限制性内切酶和 *LA Taq* DNA 聚合酶以及 CIAP、T4 DNA 连接酶购自宝生物工程(大连)有限公司; 质粒小量抽提试剂盒、胶回收试剂盒购自北京博大泰克生物基因技术有限公司; Zymolyase 20<sup>T</sup> 购自日本 SEIKAGAKV 公司; RNase 和麦角固醇购自 Sigma 公司; 山梨醇购自 AMRESCO 公司; 其余为国产试剂纯。

### 1.2 方法

**1.2.1 DNA 操作。***C. glycerinogenes* 和 *S. cerevisiae* 酵母基因组 DNA 的提取按参考文献[9]操作, 其余常规的分子操作实验均按参考文献[11]进行。DNA 序列测定由上海生工生物技术有限公司完成。

#### 1.2.2 表达载体的构建。

重组酵母表达载体 YEplac-GPD1 和 YEplac-GPD2 的构建过程分别如下。

**重组载体 YEplac-GPD1 的构建:** 根据 GenBank 公布的 *GPD1* 基因序列设计一对引物 GPD1U 和 GPD1R(本研究所用引物均列于表 1), 并在上下游引物的 5'端分别引入 *Hind*Ⅲ和 *Eco*R I

Table 1 Oligonucleotide primers used in this study

| Primer name | Sequence in 5' to 3' orientation | Primers length | PCR product length | Restriction sites introduced |
|-------------|----------------------------------|----------------|--------------------|------------------------------|
| GPD1U       | CCCAAGCTTGAACATAGCTGAAAATACTTC   | 30-mer         | 3.21 kb            | <i>Hind</i> Ⅲ                |
| GPD1R       | CCGGAATTCGAGAAATGACATAATGCTAAT   | 30-mer         |                    | <i>Eco</i> R I               |
| GPD2U       | CGCGTCGACCGCCTGATCGTGACCTAGAC    | 29-mer         | 2.73 kb            | <i>Sal</i> I                 |
| GPD2R       | CGGGGTACCGCCCATGTGGAGAATTACTGC   | 30-mer         |                    | <i>Kpn</i> I                 |

限制酶位点,以酿酒酵母 *S. cerevisiae* W303-1A 基因组为模板 PCR 扩增 *GPD1* 基因及其上下游调控序列. PCR 反应条件为:利用 *LA Taq* DNA 聚合酶,先 95℃ 变性 4 min;然后 94℃ 变性 50 s, 56℃ 退火 2.5 min, 72℃ 延伸 3 min, 进行 30 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min. 胶回收 3.2 kb 的 PCR 产物后分别用 *Hind*Ⅲ 和 *Eco*R I 酶切,然后与经过同样限制酶作用的载体 YEplac181 进行连接、转化,获得重组载体命名为 YEplac-GPD1.

重组载体 YEplac-GPD2 的构建:设计一对引物 GPD2U 和 GPD2R,并在上下游引物的 5'端分别引入 *Sal* I 和 *Kpn* I 限制酶位点,以酿酒酵母 *S. cerevisiae* W303-1A 基因组为模板 PCR 扩增 *GPD2* 基因及其上下游调控序列. PCR 反应条件为:利用 *Ex Taq* DNA 聚合酶,先 95℃ 变性 5 min;然后 94℃ 变性 50 s, 56℃ 退火 90 s, 72℃ 延伸 2 min, 进行 30 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min. 割胶回收 2.7 kb 的 PCR 产物后分别用 *Sal* I 和 *Kpn* I 酶切、纯化,然后与经过同样限制酶作用的酵母表达载体 YEplac181 进行连接、转化,获得重组质粒命名为 YEplac-GPD2. 重组酵母表达载体 YEplacCgGPD 已在参考文献[8]中构建成功. 酵母转化按参考文献[9]利用醋酸锂方法进行.

**1.2.3 细胞粗酶液的提取方法.** 粗酶提取物的制备参照文献[12]并略作改动:将发酵液样品离心收集菌体,菌体先经预冷的相同渗透压的培养基和破壁缓冲液各洗涤一次,再重悬于破壁缓冲液(100 mmol/L pH 7.5 的磷酸盐缓冲液,含 1 mmol/L DTT、2 mmol/L  $MgCl_2$ )中. 洗涤后的菌体按菌体湿重:总悬浮体积为 1:8~1:10 的比例用破壁缓冲液悬浮,再于 4℃ 超声波(MSE 型)破壁(工作 1 s, 间隔 3 s)15 min. 未破碎的细胞于 4℃ 冷冻离心机中 10 000 r/min 离心 20 min 而被除去,上清液即为用于酶活测定的粗酶提取物.

#### 1.2.4 分析方法.

胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶(ctGPD)酶活测定:按 Blomberg 等<sup>[13]</sup>的方法,并略做改动. 反应体系由 20 mmol/L 咪唑-HCl 缓冲液(pH 7.0)、1 mmol/L DTT、1 mmol/L  $MgCl_2$ 、0.09 mmol/L NADH 和 0.67 mmol/L DHAP 组成. 在 30℃ 的反应温度,以加入 DHAP 为 0 时,线性范围为 2 min,在 340 nm 处测定 30 s 和 90 s 时的吸光度. 一个单位酶活定义为:在 30℃ 温度下的上述反应体系内一分钟消耗 1  $\mu$ mol NADH 所需的酶量.

蛋白质含量的测定:采用 Bradford 法<sup>[14]</sup>测定,以 BSA 为标准蛋白.

胞内甘油测定:取两份等量的 10 ml 培养液离心收集细胞,用相同的培养基洗涤细胞 2 次,其中一份用于细胞干重的测定. 另一份悬浮于 2 ml 无菌水中,细胞在沸水中煮沸 12 min, 12 000 r/min 高速离心 15 min,取上清液用于测定胞内甘油含量.

胞外甘油测定:取适量发酵液 12 000 r/min 高速离心 15 min 后,取上清液用于测定胞外甘油含量. 甘油含量用 HPLC 测定(色谱柱, Bio-Rad Aminex HPX-87H;柱温 60℃;流动相, 5 mmol/L 硫酸;流速 0.6 ml/min;检测器, RI, Dionex),所有样品先经 0.2  $\mu$ m 纤维素微孔滤膜过滤处理.

葡萄糖浓度用生物传感仪 SBA-40B 测定.

生物量的测定:取 10 ml 发酵液于 4 000 r/min 离心 15 min,菌体用去离子水洗涤、离心 2 次,再于 80℃ 干燥至恒重,测得菌体干重(DCW).

## 2 结 果

### 2.1 *CgGPD*、*GPD1* 和 *GPD2* 基因编码蛋白序列及生物信息学比较

在对已克隆的 *CgGPD* 基因序列分析时发现存在着两个重叠的开放阅读框,其差别仅在 N 端相差 27 个氨基酸残基. 根据 Kozak 规则确定蛋白质分子质量较小的 DNA 序列为该基因的开放阅读框,同时经过实验验证该编码蛋白具有提高酿酒酵母合成甘油的能力<sup>[15]</sup>. 然而有趣的是,在酿酒酵母 *GPD2* 基因中发现有同样的现象,即在 *GPD2* 基因中存在着两个重叠的编码框,仅在 N 端相差 48 个氨基酸残基,如表 2 所示. 针对不同的编码框蛋白,研究者利用亚细胞定位在线分析软件 PSORT II (<http://psort.nibb.ac.jp/form2.html>)和 MIPS MitoProt II (<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>)<sup>[16]</sup>预测发现,在含有 432 个氨基酸的 *GPD2* 蛋白 N 端部分 17 个氨基酸残基是作为线粒体靶序列而存在,能够被切割成识别线粒体的前导肽,同时以 *GPD2* 基因启动子融合绿色荧光蛋白(GFP)基因进行蛋白质亚细胞定位研究进一步表明,该蛋白质部分氨基酸序列是存在于线粒体的<sup>[17]</sup>,而作者以含 384 个氨基酸的 *GPD2* 蛋白进行预测分析,结果表明该蛋白质存在于胞浆中. 有趣的是,来源于产甘油假丝酵母的 *CgGPD* 基因两个编码框经不同的在线预测软件分析获得了十分相似的结果,如表 2 所示. 那么 *CgGPD* 基因与 *GPD2* 基因功能是否具有一定的相关性很值得研

究. 另外, 序列分析表明, 在 *GPD2* 基因的上游调控序列尽管存有两个胁迫应答元件(stress response element, STRE), 但研究表明该基因的表达却并不受渗透压诱导表达.

Table 2 Comparison of amino acid sequences encoded by *CgGPD*, *GPD1* and *GPD2*, respectively and prediction for subcellular localization

| Genes                      | ORF   | Amino acid residues | STRE No. <sup>3)</sup> | Cleaved site <sup>4)</sup> | PSORT score for cytoplasmic <sup>5)</sup> | MitoProt score for mitochondrial <sup>6)</sup> |
|----------------------------|-------|---------------------|------------------------|----------------------------|-------------------------------------------|------------------------------------------------|
| <i>CgGPD</i> <sup>1)</sup> | 1 187 | 388                 | 4                      | 21                         | 0.478                                     | 0.129                                          |
| <i>CgGPD</i> <sup>2)</sup> | 1 248 | 415                 | 4                      | 48                         | 0.217                                     | 0.995                                          |
| <i>GPD1</i>                | 1 176 | 391                 | 4                      | 23                         | 0.435                                     | 0.233                                          |
| <i>GPD2</i> <sup>1)</sup>  | 1 155 | 384                 | 2                      | 0                          | 0.652                                     | 0.005                                          |
| <i>GPD2</i> <sup>2)</sup>  | 1 323 | 432                 | 2                      | 17                         | 0.043                                     | 0.993                                          |

<sup>1)</sup>The shorter ORF by sequence analysis; <sup>2)</sup>The longer ORF by sequence analysis; <sup>3)</sup>Stress response element numbers within 1.5 kb upstream regulatory sequence in the indicated gene; <sup>4)</sup>The prediction length of target sequence splitted with mitochondrial in the indicated gene by MitoProt programme; <sup>5)</sup>The prediciton reliability in cytoplasmic for protein subcellular localization by PSORT programme; <sup>6)</sup>The probability score of protein as mitochondrial presequence by MitoProt programme.

2.2 重组载体 YEplac-*CgGPD*、YEplac-*GPD1* 和 YEplac-*GPD2* 酵母表达载体的构建

作者分别构建了 3 个重组酵母表达载体: YEplac-*CgGPD*、YEplac-*GPD1* 和 YEplac-*GPD2* 以比较在外界胁迫条件下 *CgGPD*、*GPD1* 和 *GPD2* 基因在酿酒酵母细胞中发挥的功能.

根据 GenBank 已公布的 *GPD1* 基因序列设计引物, 用于扩增 3.2 kb 的 *GPD1* 基因包括上游 1.9 kb 长的调控序列, 经限制酶切割后, 与 YEplac181 连接, 重组质粒命名为 YEplac-*GPD1*, 质粒酶切鉴定图谱见图 2. 根据 GenBank 已公布的 *GPD2* 基因序列设计引物, 用于扩增 2.7 kb 的 *GPD2* 基因, 其中包含编码框上游 1.1 kb 长的调控序列, 经适当限制酶作用后, 与 YEplac181 连接, 获得重组质粒命名为 YEplac-*GPD2*, 重组表达载体的酶切鉴定分析如图 3 所示. 重组质粒命名为 YEplac-*CgGPD*<sup>[8]</sup>.

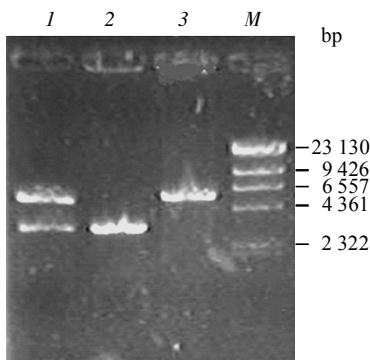


Fig. 2 Restriction analysis of YEplac-*GPD1*  
1: YEplac-*GPD1* *Eco*R I /*Hind* III; 2: PCR product of *GPD1*;  
3: YEplac181/*Eco*R I /*Hind* III; M:  $\lambda$ /*Hind* III DNA marker.

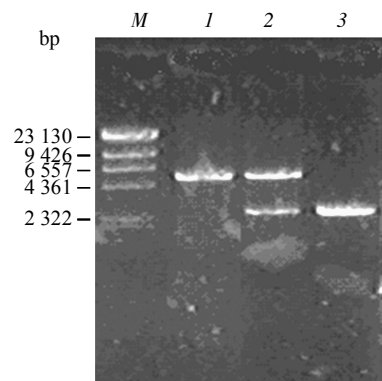


Fig. 3 Restriction analysis of YEplac-*GPD2*  
1: YEplac181/*Sal* I /*Kpn* I; 2: YEplac-*GPD2* *Sal* I /*Kpn* I; 3: PCR product of *GPD2*; M:  $\lambda$ /*Hind* III DNA marker.

2.3 过量表达 *CgGPD*、*GPD1* 和 *GPD2* 基因对突变株在渗透压胁迫下生长的影响

将成功构建的 3 种不同的重组质粒分别导入酿酒酵母 *gpd1/gpd2* 突变株中, 筛选获得酵母转化子. 将细胞分别在普通 YEPD 和含有 1 mol/L NaCl 的 YEPD 培养基中进行培养, 不同转化子的生长趋势如图 3 所示. 在不添加盐的培养基中, 渗透压敏感突变株与含有不同基因的转化子之间, 生长速度和生长能力以及最大细胞量没有显著差异 (图 4a). 然而由图 4b 可以看出, 在含有 1 mol/L NaCl 的 YEPD 培养基中, 过量表达 *CgGPD* 和 *GPD1* 基因能够使 *gpd1/gpd2* 突变株降低对渗透压的敏感性, 提高细胞对渗透压胁迫的适应能力, 并且发现, 含有 *GPD1* 基因突变株的生长能力更强一

些, 生长速度也要稍快于表达有 *CgGPD* 基因的突变株, 而表达有 *GPD2* 基因的 *gpd1/gpd2* 细胞在高渗透压生长能力有一定的提高, 但与前二者相比,

延迟期较长, 生长速度缓慢, 最大细胞生物量也远低于前二种酵母转化子. 对照菌株 *gpd1/gpd2* (YEplac181) 的生长则完全受到抑制.

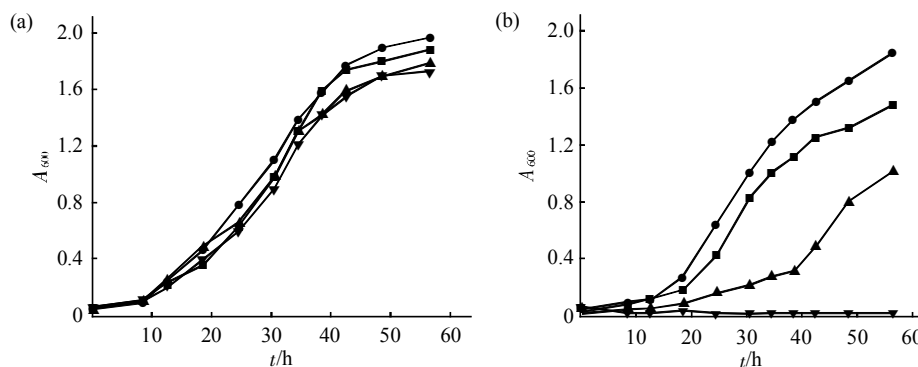


Fig. 4 Growth pattern of *gpd1/gpd2* cells harboring *CgGPD*, *GPD1* and *GPD2* respectively in the osmotic condition

■—■: YEplac-*CgGPD*; ●—●: YEplac-*GPD1*; ▲—▲: YEplac-*GPD2*; ▼—▼: YEplac181. (a) YEPD. (b) YEPD + 1 mol/L NaCl.

#### 2.4 *CgGPD*、*GPD1* 和 *GPD2* 基因表达对突变株在渗透压胁迫下甘油合成能力的影响

尽管 *GPD2* 基因的表达不依赖于高渗透压应答途径 (high osmolarity glycerol, HOG) 的调控<sup>[3]</sup>, 但是有研究表明, 在一定的生长条件限制下, 酿酒酵母细胞中缺失 *GPD1* 和 *GPD2* 的任何一个基因时, 过量表达另外一个基因时都能在一定程度上互补缺失基因的功能. 比较分析了分别含有 *CgGPD*、*GPD1* 和 *GPD2* 基因的突变株在渗透压胁迫条件下胞内甘油合成和积累及其胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶的表达情况. 图 5 表明了分别表达有 3 个基因的 *gpd1/gpd2* 突变株细胞在渗透压诱导下胞内甘油含量的变化及其 GPD 酶活的改变情况. 在渗透压胁迫刺激下, *gpd1/gpd2*(YEplac-*CgGPD*) 和 *gpd1/gpd2* (YEplac-*GPD1*) 转化子胞内甘油含量(图 5a)和 GPD

酶活(图 5b)显著快速上升, 并且二者的变化趋势十分相似. *gpd1/gpd2*(YEplac-*GPD2*) 的胞内甘油和 GPD 酶活水平在渗透压胁迫条件下有一定的提高, 但是变化幅度远低于前两种酵母转化子, 而对照菌株 *gpd1/gpd2* (YEplac181) 无论是正常条件下还是渗透压冲击条件下胞内甘油和 GPD 酶活均没有显著变化, 并且均处于相当低的水平. 结果表明, 在渗透压敏感突变株 *gpd1/gpd2* 中, *CgGPD* 和 *GPD1* 基因的表达受到渗透压的诱导调控, 能够在短时间内提高胞内甘油合成能力和积累水平, 而在突变株中过量表达 *GPD2* 基因仅能够部分弥补突变株合成甘油能力的缺失, 但是不能完全互补 *GPD1* 基因的功能, 对照菌株 *gpd1/gpd2* (YEplac181) 的甘油合成能力严重降低并且不受渗透压的诱导.

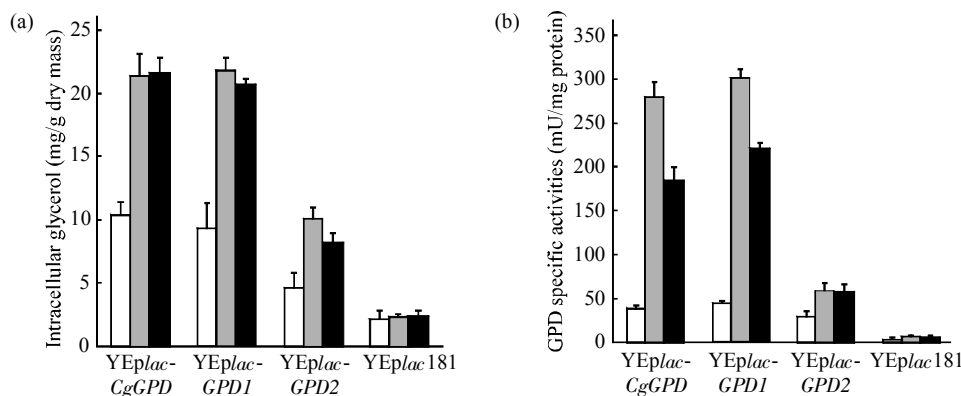


Fig. 5 The accumulation of intracellular glycerol content(a) and osmotic induction of indicated genes expression(b) in *S. cerevisiae gpd1/gpd2* mutant expressed of *CgGPD*, *GPD1* and *GPD2*, respectively under high osmotic stress conditions

Vertucak bars represent the standard deviation of each data point ( $n=3$ ). □: 0 min; ■: 30 min; ■: 90 min.

2.5 厌氧培养条件下 *CgGPD*、*GPD1* 和 *GPD2* 基因表达对突变株的影响

大量研究表明，在厌氧条件下酵母细胞的甘油合成过程是  $\text{NAD}^+$  再生的十分重要的途径<sup>[3, 18, 19]</sup>，并且由 *GPD2* 基因编码的 3-磷酸甘油脱氢酶发挥着关键性限速作用。*GPD2* 基因的缺失导致突变株细胞在厌氧环境中生长受到明显抑制，而 *gpd1/gpd2* 双缺失突变株生长完全受到抑制<sup>[9]</sup>，那么过量表达 *CgGPD* 的突变株在厌氧条件下的生长和甘油合成是否受到影响呢？为此，考察了表达有 *CgGPD*、*GPD1* 和 *GPD2* 基因的 *gpd1/gpd2* 突变株和 *gpd1* 突变株在厌氧条件下的生长情况，结果如图 5 所示。在厌氧培养环境中，表达有 *CgGPD* 基因的 *gpd1/gpd2* 突变株能够正常生长，其生长速度与 *gpd1/gpd2*

*gpd2*(YEplac*GPD2*)转化子相比略显缓慢，最大细胞量也稍有差距，但是与 *gpd1/gpd2*(YEplac*GPD2*)转化子相比，无论是生长速度还是细胞生物量都明显地快于后者(图 6a)。由结果可知，过量表达 *GPD1* 基因仅能一定程度上互补 *GPD2* 基因的功能，而过量表达 *CgGPD* 基因则具有与 *GPD2* 基因相似的功能。厌氧环境严格限制了对照菌株 *gpd1/gpd2* (YEplac181)的生长，但是当有厌氧转移到好氧条件下进行培养时，细胞则能够快速生长繁殖(图 6a)。由图 6b 可知，*gpd1* 突变株在厌氧环境中能够正常地生长，细胞生长能力与表达有 *CgGPD*、*GPD1* 或 *GPD2* 基因的酵母转化子没有显著差别，这也证明了与 *GPD2* 基因相比，*GPD1* 基因的缺失对酵母细胞在厌氧条件下的生长没有明显的影响。

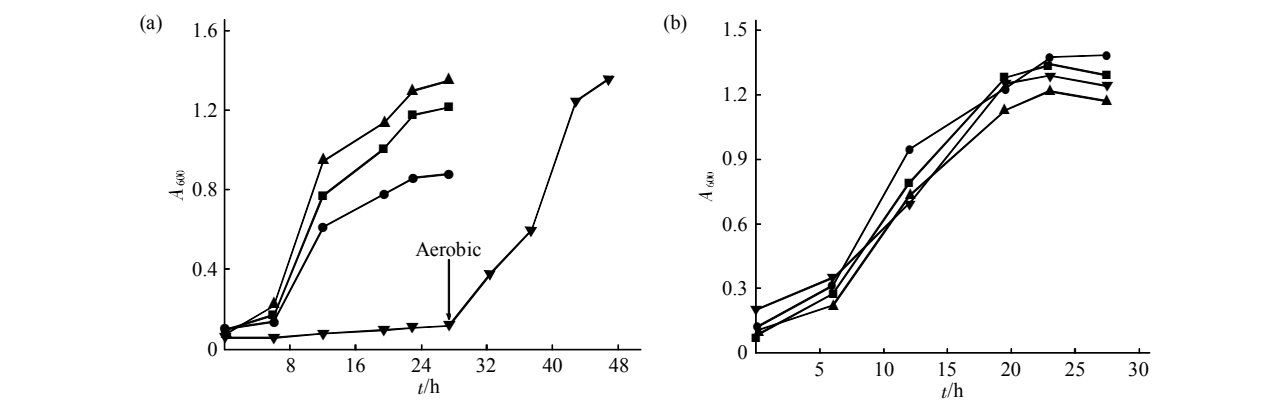


Fig. 6 Growth pattern of *gpd1/gpd2*(a) and *gpd1*(b) mutant harbouring *CgGPD*, *GPD1* and *GPD2* respectively under anaerobic conditions  
Arrow indicated the time point to transfer aerobic condition. ■—■: YEplac-*CgGPD*; ●—●: YEplac-*GPD1*; ▲—▲: YEplac-*GPD2*; ▼—▼: YEplac181.

不同酵母转化子厌氧培养至对数生长中期后，取样测定发酵液中甘油含量和胞内 GPD 酶活。由表 3 可知，在厌氧条件下表达有 *CgGPD* 和 *GPD2* 基因的突变株甘油合成和 3-磷酸甘油脱氢酶活力均明显高于表达有 *GPD1* 基因的突变株。对照菌株

*gpd1* 突变株尽管在厌氧条件下能够正常生长，但产甘油能力和 GPD 酶活要低于重组菌株。而对照菌株 *gpd1/gpd2* 在厌氧培养基中的生长则受到完全抑制。由此可以进一步验证了 *GPD1* 基因不参与厌氧条件下细胞的氧化还原调节。

| Table 3 Comparison of glycerol production and GPD specific activity of the <i>gpd1/gpd2</i> and <i>gpd1</i> mutants employing <i>CgGPD</i> , <i>GPD1</i> and <i>GPD2</i> under anaerobic conditions |                                              |             |                                                |             |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|-------------|------------------------------------------------|-------------|
| Strains                                                                                                                                                                                             | Total glycerol content /(g•L <sup>-1</sup> ) |             | GPD specific activities/(mU•mg <sup>-1</sup> ) |             |
|                                                                                                                                                                                                     | <i>gpd1/gpd2</i>                             | <i>gpd1</i> | <i>gpd1/gpd2</i>                               | <i>gpd1</i> |
| YEplac181                                                                                                                                                                                           | ND                                           | 1.12 ± 0.23 | ND                                             | 26.8 ± 3.6  |
| YEplac- <i>CgGPD</i>                                                                                                                                                                                | 2.31 ± 0.17                                  | 2.49 ± 0.14 | 55.3 ± 5.5                                     | 64.7 ± 8.3  |
| YEplac- <i>GPD1</i>                                                                                                                                                                                 | 1.15 ± 0.32                                  | 1.77 ± 0.15 | 25.4 ± 4.3                                     | 38.2 ± 10.0 |
| YEplac- <i>GPD2</i>                                                                                                                                                                                 | 2.74 ± 0.81                                  | 3.26 ± 0.28 | 76.9 ± 7.4                                     | 75.3 ± 5.4  |

ND: not determined. Data are means of triplicate determinations ( $\bar{x} \pm s$  in parentheses).

### 3 讨 论

酿酒酵母细胞不仅能在好氧条件下快速生长,即使在完全厌氧环境中只要补充适量的麦角固醇和不饱和脂肪酸也能正常地生长繁殖<sup>[10]</sup>,此时甘油是除了酒精和二氧化碳之外最重要的副产物。但是不同的培养条件能够改变细胞的物质代谢和能量代谢模式,基因组的转录水平分析表明,当酵母细胞由有氧条件转到厌氧条件下培养时会引起细胞的组成成分和碳源代谢迅速改变,其中最明显的改变之一就是氧化还原代谢调节途径的变化<sup>[20]</sup>。

当 *GPD1* 基因缺失后,酵母突变株表现出高度的渗透压敏感性,在高渗透压培养环境中不能正常生长,同时细胞的甘油合成能力显著下降<sup>[12]</sup>,而 *GPD2* 基因的缺失对细胞的耐渗透压能力和渗透压胁迫条件下的甘油合成能力没有显著影响。当酵母细胞处于厌氧环境中时, *GPD2* 基因的缺失导致细胞在厌氧环境中甘油合成能力和细胞生长能力显著下降,而 *GPD1* 基因的敲除对细胞在厌氧环境中甘油的合成基本没有影响<sup>[21]</sup>。在厌氧条件下, *GPD2* 基因的诱导表达促使细胞合成甘油,同时将胞内积累的过量 NADH 再氧化为 NAD<sup>+</sup>,维持胞内必需的氧化还原电势平衡<sup>[19]</sup>, *GPD2* 基因的缺失导致细胞在厌氧环境中甘油合成能力与野生型对照相比下降 40% 左右,而产生乙醇的能力提高了约 8%。而 *GPD1* 基因的敲除对细胞在厌氧环境中甘油的合成基本没有影响<sup>[21]</sup>。因此,酿酒酵母细胞的 3-磷酸甘油穿梭体系能够重新氧化 NADH 生成 NAD<sup>+</sup>,是氧化还原调节的重要途径<sup>[19]</sup>。

产甘油假丝酵母作为工业化应用的生产菌株尽管在生理生化,发酵工艺和甘油代谢机理方面做了深入的研究<sup>[22]</sup>,但是由于遗传背景的复杂性使得分子水平研究进展较为缓慢。前期的研究表明,产甘油假丝酵母细胞可能是二倍体(数据未发表),且在基因组中仅有一个 *CgGPD* 基因编码胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶,并没有发现存在编码同工酶的第二个基因<sup>[8]</sup>。在酿酒酵母中存在 *GPD1* 和 *GPD2* 两个不同的基因编码胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶,并且这两个异构酶具有显著不同的表达调节机制。在酿酒酵母中 *CgGPD* 基因表达受渗透压调节表达,同时能够大幅度提高细胞在高浓度葡萄糖下的甘油合成能力<sup>[8,15]</sup>。*CgGPD*、*GPD1* 和 *GPD2* 基因的生物信息学比较分析表明, *CgGPD* 和 *GPD2* 在序列特征上具有一定的相似性。胁迫条件下基因的功能表达表

明,厌氧条件下在 *gpd1/gpd2* 突变株中表达 *CgGPD* 基因能够显著提高细胞生长能力和甘油合成能力,说明该基因与 *GPD2* 基因一样发挥着氧化还原调节的能力。

尽管我们的研究结果显示, *CgGPD* 基因既受到渗透压诱导表达又参与氧化还原调节,但该基因在产甘油假丝酵母细胞中更详细的功能,包括 *CgGPD* 基因表达调控与高渗透压甘油途径(HOG)的关系,及其好氧条件下甘油合成与 NAD<sup>+</sup> 的再生等重要问题需要进一步研究,这也是我们下一步研究的重点。

### 参 考 文 献

- 1 Hohmann S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2002, **66** (2): 300~372
- 2 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
- 3 Ansell R, Granath K, Hohmann S, *et al*. The two isoenzymes for yeast NAD<sup>+</sup>-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by *GPD1* and *GPD2* have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *Embo J*, 1997, **16** (9): 2179~2187
- 4 Bjorkqvist S, Ansell R, Adler L, *et al*. Physiological response to anaerobicity of glycerol-3-phosphate dehydrogenase mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63** (1): 128~132
- 5 Valadi A, Granath K, Gustafsson L, *et al*. Distinct intracellular localization of Gpd1p and Gpd2p, the two yeast isoforms of NAD<sup>+</sup>-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase, explains their different contributions to redox-driven glycerol production. *J Biol Chem*, 2004, **279** (38): 39677~39685
- 6 Modig T, Granath K, Adler L, *et al*. Anaerobic glycerol production by *Saccharomyces cerevisiae* strains under hyperosmotic stress. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **75** (2): 289~296
- 7 王正祥, 诸葛健, 曹 钰, 等. 产甘油假丝酵母甘油代谢关键酶的研究. *微生物学报*, 2000, **40** (2): 180~187  
Wang Z X, Zhuze J, Cao Y, *et al*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2000, **40** (2): 180~187
- 8 Chen X, Fang H, Rao Z, *et al*. Cloning and characterization of a NAD<sup>+</sup>-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene from *Candida glycerinogenes*, an industrial glycerol producer. *FEMS Yeast Res*, 2008, **8** (5): 725~734
- 9 Rose M D, Winston F, Hieter P. *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*. 2000 ed., Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1998. 205
- 10 Andreasen A A, Stier T J. Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*. II. Unsaturated fatty acid requirement for growth in a defined medium. *J Cell Physiol*, 1954, **43** (3): 271~281
- 11 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 27~31
- 12 Albertyn J, Hohmann S, Thevelein J M, *et al*. *GPD1*, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is

- regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol Cell Biol*, 1994, **14** (6): 4135~4144
- 13 Blomberg A, Adler L. Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 1989, **171** (2): 1087~1092
  - 14 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248~254
  - 15 陈献忠, 方慧英, 沈 微, 等. 产甘油假丝酵母甘油合成关键酶编码基因的克隆. 遗传, 2008, **30** (4): 508~514  
Chen X, Fang H, Shen W, *et al.* Hereditas (Beijing), 2008, **30** (4): 508~514
  - 16 Claros M G, Vincens P. Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem*, 1996, **241** (3): 779~786
  - 17 Kawamoto S, Yamada T, Tanaka A, *et al.* Distinct subcellular localization of NAD-linked and FAD-linked glycerol-3-phosphate dehydrogenases in N-alkane-grown *Candida tropicalis*. *FEBS Lett*, 1979, **97** (2): 253~256
  - 18 Pahlman A K, Granath K, Ansell R, *et al.* The yeast glycerol 3-phosphatases Gpp1p and Gpp2p are required for glycerol biosynthesis and differentially involved in the cellular responses to osmotic, anaerobic, and oxidative stress. *J Biol Chem*, 2001, **276** (5): 3555~3563
  - 19 Larsson C, Pahlman I L, Ansell R, *et al.* The importance of the glycerol 3-phosphate shuttle during aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 1998, **14** (4): 347~357
  - 20 Geertman J-M A, van Maris A J A, van Dijken J P, *et al.* Physiological and genetic engineering of cytosolic redox metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* for improved glycerol production. *Metabolic Engineering*, 2006, **8** (6): 532~542
  - 21 Nissen T L, Hamann C W, Kielland-Brandt M C, *et al.* Anaerobic and aerobic batch cultivations of *Saccharomyces cerevisiae* mutants impaired in glycerol synthesis. *Yeast*, 2000, **16** (5): 463~474
  - 22 Wang Z X, Zhuge J, Fang H, *et al.* Glycerol production by microbial fermentation: a review. *Biotechnol Adv*, 2001, **19** (3): 201~223

## Comparative Characterization of Genes Encoding Glycerol 3-phosphate Dehydrogenase From *Candida glycerinogenes* and *Saccharomyces cerevisiae*\*

CHEN Xian-Zhong<sup>1,2</sup>, FANG Hui-Ying<sup>3</sup>, RAO Zhi-Ming<sup>1,3</sup>, SHEN Wei<sup>1,2</sup>,  
ZHUGE Bin<sup>1,3</sup>, WANG Zheng-Xiang<sup>1,2</sup>, ZHUGE Jian<sup>1,3</sup>\*\*

<sup>(1)</sup>Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Education Ministry, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

<sup>(2)</sup>Research Center of Bioresource and Bioenergy, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

<sup>(3)</sup>Research Center of Industrial Microbiology & Bio-process, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract** NAD<sup>+</sup>-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase (GPD) are rate limiting for glycerol production in *Saccharomyces cerevisiae*. Recently, the gene *CgGPD* encoding glycerol 3-phosphate dehydrogenase homologous to *GPD* genes in other yeasts was cloned from *Candida glycerinogenes* WL2002-5, an excellent industrial glycerol producer. However, the knowledge about *CgGPD* expression regulation, especially difference with *GPD1* and *GPD2* from *S. cerevisiae* is so less. A functional comparison of *CgGPD* from *C. glycerinogenes* with *GPD1* and *GPD2* from *S. cerevisiae* was undertaken, using *S. cerevisiae* *gpd1/gpd2* and *gpd1* osmosensitive mutants as expression systems. The functions of three indicated genes in *S. cerevisiae* was characterized for osmoregulation under high osmotic stress and redox regulation under anaerobic condition with various transformants. The results showed that *gpd1/gpd2* mutants harbouring *CgGPD* and *GPD1* can restore osmotolerance and increase glycerol production ability under hyperosmotic stress but mutant expressed *GPD2* can not. When cells were cultured under the anaerobic condition, the growth pattern of mutants harbouring *CgGPD* and *GPD2* are similar, however the mutant harbouring *GPD1* grows slowly and the growth of the control suppresses thoroughly. Furthermore, *gpd1/gpd2* mutant employing either *CgGPD* or *GPD2* can increase glycerol production ability and improve GPD specific enzyme activity in anaerobic incubation, but *gpd1/gpd2* mutant expressed *GPD1* has no the similar results under the same condition. This indicated that *CgGPD* may involve in both osmoregulation and redox balance and can complement *GPD1* and *GPD2* in *gpd1/gpd2* mutant.

**Key words** *Candida glycerinogenes*, NAD<sup>+</sup>-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase, glycerol production, osmoregulation, redox balance

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2008.00363

\*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (20676053) and Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University of MOE, China (IRT0532).

\*\*Corresponding author. Tel: 86-510-85918109, E-mail: jianzhuge@hotmail.com

Received: May 18, 2008 Accepted: September 8, 2008