

文章编号:1673-1689(2008)02-0084-04

嗜热乙醇杆菌中醇脱氢酶 E 的功能与调控

彭惠¹, 毛忠贵¹, 武国干², 邵蔚蓝^{*1,2}

(1. 食品科学与技术国家重点实验室 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 南京师范大学 微生物工程重点实验室, 江苏 南京 210097)

摘 要: 对嗜热乙醇杆菌中的醇脱氢酶 E(alcohol dehydrogenase E, AdhE)进行了克隆、表达和鉴定,证明先前报道的醛脱氢酶其实是 AdhE。对 AdhE 在乙醇代谢中的功能与调控进行了研究。通过分析测定 AdhE 的酶学性质、AdhE 在嗜热乙醇杆菌的不同生长时期的表达情况以及 AdhE 高表达时嗜热乙醇杆菌产乙醇/乙酸的比率变化,证明了 AdhE 的主要生理功能是促使乙醇产生。分析了嗜热乙醇杆菌在山梨糖(强还原性碳源)、葡萄糖(氧化还原性居中的碳源)和葡萄糖醛酸(强氧化性碳源)诱导培养下的 AdhE 表达量,证明氧化还原力是 AdhE 的表达调控信号之一。

关键词: 嗜热乙醇杆菌;醇脱氢酶 E;功能;调控

中图分类号:Q 554

文献标识码: A

Function and Regulation of the Alcohol Dehydrogenase E of *Thermoanaerobacter ethanolicus*

PENG Hui¹, MAO Zhong-gui¹, Wu Guo-gan², SHAO Wei-lan^{*1,2}

(1. National Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. The Key Laboratory of Microbiology Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: An alcohol dehydrogenase (AdhE) gene (*adhE*) from *Thermoanaerobacter ethanolicus* was cloned and identified in *Escherichia coli*. The results indicated that the acetaldehyde dehydrogenase reported previously was AdhE. To probe the function of AdhE, the recombinant AdhE was characterized, and the expression of AdhE in different growth stage of *T. ethanolicus* was analyzed. These data show that the AdhE is optimized for ethanol formation and not its consumption. The regulation of the *adhE* gene was investigated by the accumulation of reducing equivalents. When sugar alcohols such as sorbitol were used as carbon sources, the *adhE* expression was obviously increased compared with expression when glucose was the carbon sources, whereas when oxidized sugar derivatives such as gluconate were used, the expression was limitedly increased. The NADH/NAD ratio was suggested to be a signal for regulation of *adhE*.

Key words: *Thermoanaerobacter ethanolicus*; alcohol dehydrogenase E; function; regulation

收稿日期:2007-05-07.

基金项目:国家 973 计划项目(2004CB71960502);国家自然科学基金项目(30170511).

作者简介:彭惠(1979-),女,湖南溆浦人,工学博士,主要从事微生物分子生物学的研究.

* 通讯作者:邵蔚蓝(1958-),女,江苏盐城人,理学博士,教授,博士生导师,主要从事微生物分子生物学的研究.

Email:wlsao@jssmail.com.cn

嗜热乙醇杆菌 *Thermoanaerobacter ethanolicus* 是一种革兰氏阳性高温厌氧细菌,能广泛地以廉价的淀粉、木聚糖等已糖和戊糖为底物发酵,在底物质量浓度小于 1 g/dL 时产生乙醇和 CO₂ 为主的代谢产物,其中乙醇产量可达 8%,具有良好的工业应用前景^[1]。该菌中乙醇代谢途径是丙酮酸转化为乙酰 CoA,然后乙酰 CoA 通过乙醛生成乙醇。但是当底物质量浓度超过 1 g/dL 时,丙酮酸会大量流向产乳酸的途径,导致乙醇产率低于乳酸^[2],这说明了乙醇代谢的复杂调控系统。深入研究该途径,有助于将此菌改造成工业生产乙醇的菌株,为目前日益紧张的能源危机提供新的出路。

醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase E, AdhE; EC 1.2.1.10, EC 1.1.1.2)是近年来新发现的脱氢酶家族。AdhE 最主要特征是由两个保守的结构域组成,即醛脱氢酶结构域(aldehyde dehydrogenase, Aldh)和醇脱氢酶结构域(alcohol dehydrogenase, Adh)。因此 AdhE 可以连续催化乙酰 CoA 通过乙醛生成乙醇,是乙醇代谢的关键酶^[3-5]。国际上已经报道的 AdhE 共有 9 个,国内未见报道。以往对嗜热乙醇杆菌中的乙醇代谢的报道中推测乙醇的产生是由醇脱氢酶 B 和一个相对分子质量 100 000 的醛脱氢酶,没有 AdhE 的报道^[6-7]。作者所在研究室再次纯化了该醛脱氢酶^[8],首次证明嗜热乙醇杆菌中存在双功能的 AdhE,并探讨了该 AdhE 的功能与调控模式。另外初步判断该 AdhE 和纯化的醛脱氢酶极有可能是同一蛋白质。

1 材料与方法

1.1 材料、仪器与设备

嗜热乙醇杆菌 JW200(ATCC 31550)由美国佐治亚大学微生物系 J. Wiegel 实验室惠赠;大肠杆菌 JM109 购自 Promega 公司;表达质粒 pTrc99a 购自 Novagen 公司;限制性内切酶、Pyrobest DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶为宝生物公司产品;乙酰 CoA、CoASH、NAD、NADH 和 NADP 购自 Roche 公司;其它试剂均为分析纯。岛津 GC-17A 气相色谱仪, HSS-4A 顶空进样装置。

1.2 实验方法

1.2.1 嗜热乙醇杆菌的培养 培养方法见文献[2]。进行不同氧化还原力的碳源培养时,酵母粉质量浓度为 0.02 g/dL,碳源质量浓度为 0.8 g/dL, 69 °C 培养 6 h。

1.2.2 嗜热乙醇杆菌 JW200 中 adhE 基因的克隆 纯化醛脱氢酶后,根据 GeneBank 上最新公布的

嗜热乙醇杆菌 ATCC33223 全基因组测序结果。利用两个关键信息:纯酶的大小是 100 000 和来源于 *Clostridium beijerinckii* 中的醛脱氢酶的保守序列,在线使用 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)对嗜热乙醇杆菌 ATCC33223 全基因组序列进行了分析比对。没有发现单独的醛脱氢酶,仅寻找到一个命名为“含金属离子的醇脱氢酶”符合条件。根据该基因 N 端和 C 端序列设计引物: adhE-n: ATGCCTACCTTATTACAAG; adhE-c: TTATTCTCCATAGGCTTTTC。以菌株 JW200 的基因组为模板,使用高度保真的 Pyrobest DNA 聚合酶进行 PCR 扩增。PCR 产物酶切后与用 SmaI 酶切好的 pTrc99a 连接,产生质粒 pTrc-adhE。该质粒由上海生工测序。

1.2.3 AdhE 的酶活测定 双功能的 AdhE 催化三步反应:1) 催化乙酰 CoA 生成乙醛;2) 催化乙醛和 CoA 共同生成乙酰 CoA;3) 催化乙醛生成乙醇。其中前两个反应体现醛脱氢酶活性,第三个反应体现醇脱氢酶活性。质粒 pTrc-adhE 转化大肠杆菌 JM109, IPTG 诱导表达后,收集细胞,破壁。粗酶液在 65 °C 热处理 10 min, 30 000 g 离心,取上清液在 65 °C 测定 AdhE 的各个反应以鉴定 AdhE。选择 AdhE 的第二个反应作为测定嗜热乙醇杆菌的粗酶液中 AdhE 含量的反应。酶活通过测定产生的 NADH 在 340 nm 处吸光度值。空白对照用等体积的去离子水代替 CoA。酶活定义以 1 μmol/min 的速率氧化 NAD 为一个酶活单位。具体方法见文献[6,8]。

1.2.4 蛋白质质量浓度的测定 用 Bradford 法测定蛋白质质量浓度^[9],以小牛血清白蛋白为标准蛋白质。

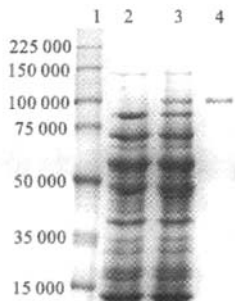
1.2.5 乙醇和乙酸浓度的测定 用气相色谱法测定,色谱条件为色谱柱:DB-1 大口径毛细管柱 30 mm×0.53 mm×1.5 μm;柱温:50 °C;气化室:140 °C;检测器:FID, 250 °C;载气:N₂, 5 mL/min;顶空设置:VIAL 75 °C;SYRINGE 75 °C;Cond Time 20 min;Anal. Time 5 min。顶空进样量 300 μL。

2 结果与讨论

2.1 AdhE 的鉴定

嗜热乙醇杆菌 JW200 中的 adhE 基因序列和 ATCC33223 中的相似性为 95.9%,氨基酸序列相似性为 97.1%。GenBank 登陆号为 DQ836061。质粒 pTrc-adhE 在大肠杆菌中的表达见图 1。重组

的 AdhE 和纯化的天然 AdhE 大小一致,为 100 000。热处理后的大肠杆菌裂解液残余的蛋白质质量约是热处理前蛋白质质量的 20%。热处理后的大肠杆菌胞内蛋白质在 65 ℃不能检测到 AdhE 的酶活。热处理后的重组大肠杆菌的粗酶液在 65 ℃测得的酶活分别为 0.38 U/mg(乙酰 CoA 生成乙醛的反应)、0.42 U/mg(乙醛和 CoA 共同生成乙酰 CoA)和 0.099 U/mg(乙醛生成乙醇)。没有测到乙醇生成乙醛的活性。该结果证明:1)嗜热乙醇杆菌的醇脱氢酶确实是双功能的 AdhE;2)AdhE 的活性中醛脱氢酶活性要高于醇脱氢酶活性,其主要生理功能可能是负责乙醇产生;3)先前报道的醛脱氢酶极有可能是 AdhE。



1. 标准蛋白质相对分子质量; 2. 热处理后的大肠杆菌 JM109/ pTrc99a; 3. 热处理后的大肠杆菌 JM109/ pTrc-adhE; 4. 纯化的天然 AdhE。

图 1 重组 AdhE 在大肠杆菌中的表达

Fig. 1 Expression of the recombinant AdhE in *Escherichia coli*

2. 2 不同生长时期的嗜热乙醇杆菌中 AdhE 的表达

乙醇的代谢是动态平衡的过程,但是总体而言,乙醇的产量随着菌体的生长而逐渐增加。在菌生长早期,乙醇的产生大于消耗,因此乙醇逐渐积累,到了平稳期以后,乙醇的积累和消耗达到平衡,乙醇的体积分数维持在菌能耐受的最高值。因此,促使乙醇生成的酶的表达应该是在早期大量表达,平稳期后减少表达或者不表达;分解乙醇的酶的表达情况则相反。嗜热乙醇杆菌中的 AdhE 在不同生长时期的表达量见图 2。AdhE 在菌的生长全程都有表达,但表达量不同。在平稳期以前,AdhE 的表达量随着菌体的生长而增加;进入平稳期后表达量迅速下降。由此推测,AdhE 的主要生理功能可能是负责乙醇产生。

2. 3 不同氧化还原力碳源培养的嗜热乙醇杆菌中 AdhE 的表达

嗜热乙醇杆菌在碳源质量浓度小于 1 g/dL 时,

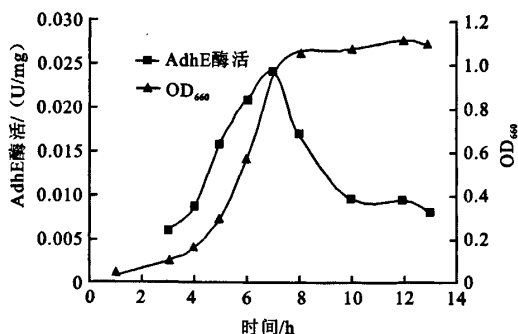


图 2 AdhE 在嗜热乙醇杆菌 JW200 中不同生长时期的表达

Fig. 2 Expression of AdhE in different growth stage of *T. ethanolicus*

几乎不产乳酸,但当碳源质量浓度超过 1 g/dL 后,会产生大量乳酸,乙醇产率下降。丰富的碳源会使丙酮酸流向乙酰 CoA,乙酰 CoA 再生成更多 ATP。然而,丙酮酸大量转化为乙酰 CoA,会产生大量 NADH,打破氧化还原力的平衡,引起代谢流从产醇转化为产酸。为了研究氧化还原力对嗜热乙醇杆菌中 AdhE 的表达是否会产生影响以及产生什么样的影响,作者选择了还原性碳源、氧化性碳源和介于这两种极性之间状态的碳源分别培养嗜热乙醇杆菌。分析这三种情况下 AdhE 表达量的变化。

糖醇类物质例如山梨糖,是属于还原性碳源。代谢时山梨糖转化为丙酮酸的过程中,每 6 个碳产生 3 个 NADH;而氧化性的糖如葡糖醛酸,代谢时转化为丙酮酸的过程产生的 NADH 比葡萄糖少;葡萄糖的性质介于这两类糖之间,在转化为丙酮酸的过程中,每 6 个碳产生 2 个 NADH [10]。用这 3 种物质做惟一碳源培养嗜热乙醇杆菌,可以诱导胞内的氧化还原力发生相应的变化。

出人意料的是,3 种碳源诱导的 AdhE 表达量不是按照碳源的氧化还原性呈单向递增或者递减。氧化还原性居中的葡萄糖诱导的 AdhE 表达量最低,为 (0.193 ± 0.035) U/mg,还原性的山梨糖和氧化性的葡糖醛酸诱导的 AdhE 表达量分别为 (0.811 ± 0.042) U/mg 和 (0.347 ± 0.051) U/mg,都比葡萄糖高。如果葡萄糖的诱导量为 1 的话,这 3 种情况的比例为:山梨糖:葡萄糖:葡糖醛酸 = 4.2 : 1 : 1.8。还原性的山梨糖产生的 NADH 最多,诱导 AdhE 表达的效果最好。而氧化性的葡糖醛酸产生的 NADH 最少,也能诱导 AdhE 较多的表达。由此得出结论:1)嗜热乙醇杆菌的 AdhE 表达确实受到氧化还原力的调控;2)AdhE 的表达不受

辅基 NADH 的浓度调控,而可能是受到 NADH/NAD 的比例的调控。通常受到氧化还原力调控的蛋白质,在氧化还原力的快速循环时期,蛋白质的表达量也最高^[10]。也就是说,此类蛋白质在菌体的对数生长期表达量最高,而到了平稳期后,表达量会下降。AdhE 在菌不同生长时期的表达符合该情况,这从另一个角度支持了 AdhE 表达受到氧化还原力的调控的结论。

据报道,大肠杆菌和 *Salmonella typhimurium* 中的 AdhE 的表达受到辅基浓度调控,AdhE 的表达量在山梨糖、葡萄糖和葡糖醛酸中依次减少^[10-11]。虽然调控 AdhE 表达的信号都是氧化还原力,但是嗜热乙醇杆菌中的 AdhE 调控模式应该与大肠杆菌和 *S. typhimurium* 中不一样。

2.4 嗜热乙醇杆菌在不同氧化还原力的碳源培养下的乙醇/乙酸比率

底物质量浓度小于 1 g/dL 时,丙酮酸主要转化为乙醇和少量乙酸。不同氧化还原力碳源培养的嗜热乙醇杆菌中产生的乙醇/乙酸的摩尔分数依次为 5.19 (山梨糖)、4.83 (葡萄糖)和 4.85 (葡糖醛酸)。山梨糖培养的嗜热乙醇杆菌中的 AdhE 表达量最高,其乙醇/乙酸的比率也最高,这证明了 Ad-

hE 的主要生理功能是负责乙醇的产生。葡糖醛酸培养的嗜热乙醇杆菌的乙醇/乙酸的比率和葡萄糖培养的基本一致,可能是由于葡糖醛酸诱导的 AdhE 表达量仅稍高于葡萄糖诱导的,因此对最终乙醇/乙酸的产率影响效果不显著。

3 结 语

1) 克隆表达了来源于嗜热乙醇杆菌 JW200 的一个醇脱氢酶,通过酶学性质证明该醇脱氢酶是双功能的 AdhE。

2) 从 3 个方面的研究了 AdhE 的生理功能。AdhE 的醛脱氢酶活性要高于醇脱氢酶活性,并且醇脱氢酶活性中没有催化乙醇生成乙醛的活性;AdhE 主要在嗜热乙醇杆菌生长前期大量表达;提高 AdhE 的表达量可以促使乙醇/乙酸的比率增加。由此可见,AdhE 在乙醇代谢中的主要作用是促使乙醇产生。

3) 用不同氧化还原力的碳源诱导培养的嗜热乙醇杆菌中,AdhE 表达量在还原性的山梨糖培养时最高,在氧化性的葡糖醛酸培养时次之,在氧化还原性居中的葡萄糖培养时最低。这说明 AdhE 的表达受 NADH/NAD 比例的调控。

参考文献(References):

- [1] Burdette D S, Jung S H, Zeikus J G. Physiological function of dehydrogenases and long-chain (C_{30}) fatty acids in alcohol tolerance of *Thermoanaerobacter ethanolicus*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(12): 1914-1918.
- [2] Hild H M, Struckey D C, Leak D J. Effect of nutrient limitation on product formation during continuous fermentation of xylose with *Thermoanaerobacter ethanolicus* JW200 Fe(7) [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, 60: 678-686.
- [3] Fontaine L, Salles I M, Girbal L, et al. Molecular characterization and transcriptional analysis of adhE2, the gene encoding the NADH-dependent aldehyde/alcohol dehydrogenase responsible for butanol production in alcohologenic cultures of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 [J]. *J Bacteriol*, 2002, 184(7): 821-830.
- [4] Kessler D, Leibrecht I, Knappe J. Pyruvate-formate-lyase-deactivase and acetyl-CoA reductase activities of *Escherichia coli* reside on a polymeric protein particle encoded by adhE [J]. *FEBS Lett*, 1991, 281(9): 59-63.
- [5] Arnau J, Jrgensen F, Madsen S M, et al. Cloning of the *Lactococcus lactis* adhE gene, encoding a multifunctional alcohol dehydrogenase, by complementation of a fermentative mutant of *Escherichia coli*[J]. *J Bacteriol*, 1998, 180(5): 3049-3055.
- [6] Burdette D S, Zeikus J G. Purification of acetaldehyde dehydrogenase and alcohol dehydrogenases from *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E and characterization of the secondary alcohol dehydrogenase (ZAdh) as a bifunctional alcohol dehydrogenase-acetyl-CoA reductive thioesterase [J]. *Biochem J*, 1994, 302(7):163-170.
- [7] 蒋宇, 邵蔚蓝. 嗜热厌氧乙醇杆菌乙醇代谢途径的初步研究 [J]. 南京师大学报:自然科学版, 2005, 28(3): 69-73. JIANG Yu, SHAO Wei-lan. Primary study on ethanol production pathway in *Thermoanaerobacter ethanolicus*[J]. *Journal of Nanjing Normal University: Natural Science Edition*, 2005, 28(3): 69-73. (in Chinese)
- [8] 彭惠, 毛忠贵, 武国干, 等. 嗜热厌氧乙醇菌 JW200 中乙醛脱氢酶的纯化 [J]. 南京师大学报:自然科学版, 2007, 30(1): 78-81. PENG Hui, MAO Zhong-gui, WU Guo-gan, et al. Purification of acetaldehyde dehydrogenase from *Thermoanaerobacter ethanolicus* JW200[J]. *Journal of Nanjing Normal University: Natural Science Edition*, 2007, 30(1): 78-81. (in Chinese)
- [9] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 42-122.
- [10] Leonardo M R, Cunningham P R, Clark D P. Anaerobic regulation of the adhE gene, encoding the fermentative alcohol dehydrogenase of *Escherichia coli*[J]. *J Bacteriol*, 1993, 175(3): 870-878.
- [11] Dailly Y P, Bunch P, Clark D P. Comparison of the fermentative alcohol dehydrogenase of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*[J]. *Microbios*, 2001, 103(406): 179-196.

(责任编辑:李春丽)