

工业微生物中 NADH 的代谢调控

秦义, 董志姚, 刘立明, 陈坚

江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122

摘要: NADH 是微生物代谢网络中的一种关键辅因子。调节微生物胞内 NADH 的形式与浓度是定向改变和优化微生物细胞代谢功能, 实现代谢流最大化、快速化地导向目标代谢产物的重要手段之一。以下在详尽总结了 NADH 生理功能的基础上, 从生物工程(添加外源电子受体、不同氧化还原态底物及 NAD 合成前体物、调节培养环境和氧化还原电势)和代谢工程(过量表达 NADH 代谢相关酶、缺失 NADH 竞争途径及引入 NADH 外源代谢途径)两方面分析、归纳了 NADH 代谢调控策略, 进而凝练出调控 NADH/NAD⁺ 比率调节微生物细胞代谢功能研究方面亟待解决的 3 个科学问题及可能的解决途径。

关键词: NADH, 形式与浓度, 调控策略, 工业微生物

Manipulation of NADH metabolism in industrial strains

Yi Qin, Zhiyao Dong, Liming Liu, and Jian Chen

The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract: Nicotinamide adenine nucleotide (NADH), the key cofactor in the metabolic network, plays an essential role in biochemical reaction and physiological function of industrial strains. Manipulation of NADH availability and form is an efficient and easy way to redirect the carbon flux to the target metabolites in industrial strains. We reviewed the physiological function of NADH. Detailed strategies to manipulate NADH availability are addressed. NADH manipulation to enhance metabolic function of industrial strains was discussed and potential solutions were suggested.

Keywords: NADH, availability and form, manipulation strategy, industrial strain

利用源于生物质的己糖或戊糖为原料生产重要生物基化学品的工业发酵, 是工业生物技术的核心研究领域之一。在利用微生物过量合成生物基化学品的过程中, 需要考虑的问题是: 如何优化或改变微生物的代谢网络和表达调控网络, 以提高目标代

谢产物的产量和积累速度或合成新的代谢物? 实际上, 对微生物代谢过程的理解、开发和利用是否能达到或者超过化学加工水平, 是提高发酵过程经济性的关键。基因工程技术的进步, 为菌株改良和生理学特性的认识提供了比传统诱变技术更为合理的

Received: August 4, 2008; **Accepted:** November 13, 2008

Supported by: the National Outstanding Youth Foundation of China (No. 20625619), the National Natural Science Foundation of China (Nos. 30670066, 20706025), the National High-tech Research Development Plan of China (863 Program) (No. 2006AA02Z201), and the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program) (No. 2007CB714303).

Corresponding author: Jian Chen. Tel: +86-510-85918307; Fax: +86-510-85918309; E-mail: jchen@jiangnan.edu.cn

Liming Liu. E-mail: mingll@jiangnan.edu.cn

国家杰出青年基金(No. 20625619), 国家自然科学基金(Nos. 30670066, 20706025), 国家“863 计划”(No. 2006AA02Z201)和国家“973 项目”(No. 2007CB714303)资助。

手段。基因工程所采取的主要手段是: 1) 阻断目标代谢产物的降解途径; 2) 强化目标代谢产物的生物合成途径; 3) 解除生物合成途径的代谢调节。这些手段在提高目标代谢产物的产量、产率和生产强度方面已被证实是非常有效的。然而, 并不是从途径中任意选择某个基因进行过量表达或基因敲除就能够实现代谢工程的目标。举例来说, 提高糖酵解速度是所有以糖质原料为底物的工业发酵过程共同关心的问题。但单独或者共同过量表达糖酵解途径的限速酶的基因, 并不能显著提高酵解速度。同时, 在代谢流改造过程中, 目标代谢产物的得率降低、副产物大量积累的问题也日益显现^[1]。上述问题的实质在于: 除了采用代谢工程重构代谢网络外, 还应当对微生物代谢网络结构和工程进行准确分析的基础上, 重视细胞表达调控网络的研究。也就是说, 不仅要定向改变代谢流的方向并使通量最大化, 还要定向改变和优化微生物的功能。而调节微生物细胞内辅因子的形式和浓度是改变和优化微生物功能的关键性因素之一。

1998年, 荷兰 Delft 大学 Hugenholtz J 研究小组在乳酸乳球菌 (*Streptococcus lactis*) 中过量表达来源于变异链球菌 (*Streptococcus mutans*) 编码 NADH 氧化酶的 *nox-2* 基因, 使 NADH 氧化酶活性

提高 150 倍, 导致重组菌迅速转入混合酸发酵, 且转换程度取决于 NADH 氧化酶酶活水平^[1]。由于 NADH 是碳代谢和氮代谢的关键辅因子, 这一研究借助于基因工程手段直接操纵 NADH 等辅因子在微生物细胞内的含量和形式, 比改进代谢网络中若干节点处的酶活性对碳代谢流的影响更为有效^[2]。而这种过量表达多种碳代谢途径所共享的 NADH 氧化酶系统, 在 NADH 层面上调控碳代谢流的策略, 形成了代谢工程的一个重要分支——辅因子工程。

辅因子工程是采用分子生物学的手段, 改造细胞内辅因子的再生途径, 调控微生物细胞内辅因子的形式和浓度, 定向改变和优化微生物细胞代谢功能, 实现代谢流最大化、快速化地导向目标代谢产物。辅因子工程所涉及的辅因子有: ATP/ADP/AMP、NADH/NAD⁺、NADPH/NADP⁺、乙酰辅酶 A 及其衍生物、维生素和微量元素。其中, NADH/NAD⁺ 作为重要的辅因子全程参与了微生物细胞内 300 多个氧化还原反应^[3,4](图 1)。以下在详尽分析 NADH 和 NAD⁺ 及其比率的生理作用的基础上, 从生化工程和代谢工程两个方面详述了 NADH、NAD⁺ 含量及其比率的调控策略, 并就 NADH 调节研究中遇到的难题, 提出了可能的手段。

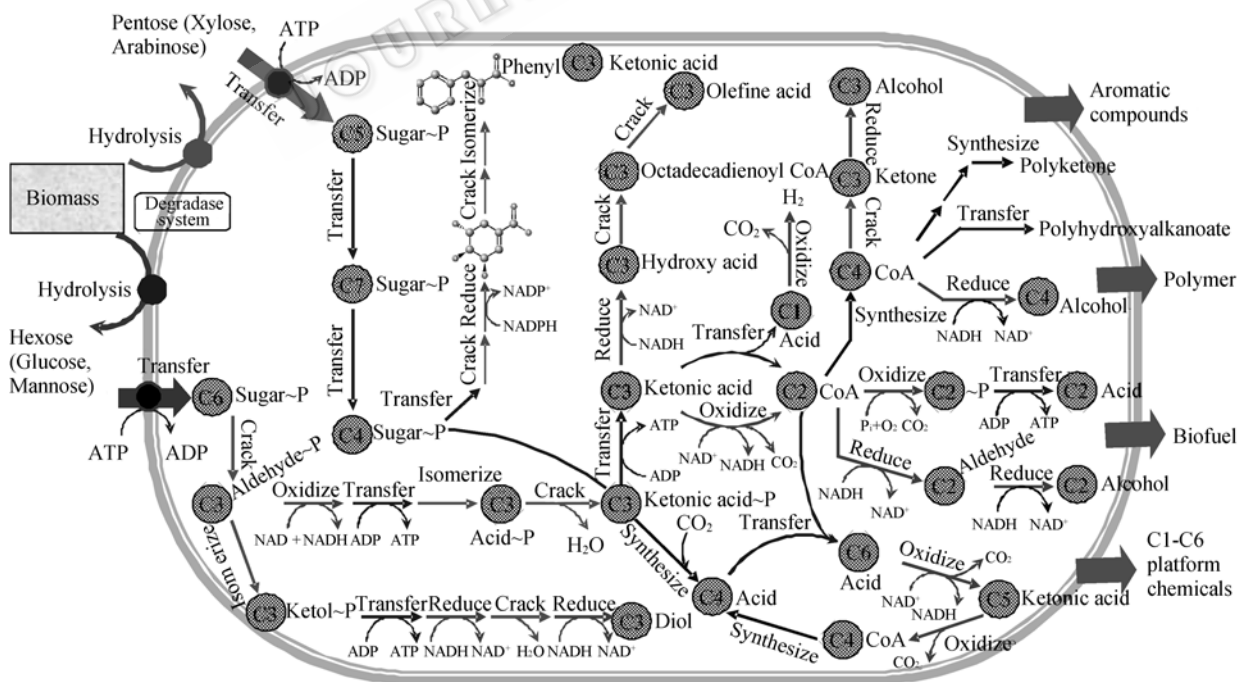


图 1 辅因子 NADH/NAD⁺ 全程参与微生物细胞合成各类代谢产物

Fig. 1 NADH/NAD⁺ was involved in 300 metabolic reactions.

1 NADH 生理代谢功能

NADH 作为重要的辅因子, 参与了微生物细胞内 300 多个氧化还原反应^[3-6], 其生理代谢功能体现在: 1) 调控能量代谢: NADH 通过线粒体内的电子传递链, 利用氧作为最终电子受体, 产生大量 ATP^[7, 8]; 2) 调节微生物胞内氧化还原状态: NADH/NAD⁺ 比率反映了微生物细胞内的氧化还原状态; 3) 调控碳代谢流: NADH 通过自身或所产生的 ATP 激活或抑制代谢途径中关键酶的活性实现对碳代谢流流向及其通量的调控; 4) 调节线粒体功能: NADH 通过影响线粒体通透性^[9]、控制线粒体膜上的电压依从性阴离子通道^[10]和增加线粒体膜电位^[11]等途径改变线粒体活性; 5) 调控细胞生命周期^[12]。

分析 NADH 的生理功能表明, 调控 NAD (H⁺)

代谢能有效地调节微生物细胞的生长及其代谢功能^[13]。调控 NAD (H⁺) 代谢的方式包括外源和内源两种(表 1): 外源调节主要是指采用生化工程的方法, 通过添加外源电子受体^[14]、不同还原态碳源^[15]和 NAD⁺ 前体物^[16], 改变溶氧^[17]、温度^[18]及胞外氧化还原电位^[19]等实现对 NADH 代谢的调控; 而内源调节则是指通过代谢工程的策略调节与 NAD(H⁺) 代谢相关酶的活性, 如删除 NADH 竞争代谢途径或构建 NAD (H⁺) 代谢途径^[20]。

2 基于生化工程的 NADH 代谢调控

好氧条件下, 微生物以分子氧为最终电子受体, 通过线粒体内的电子传递链将 NADH 氧化为 NAD⁺, 而在微氧或者厌氧条件下, NADH 的氧化则主要通过发酵途径实现。与电子传递链比较, 发酵途径氧

表 1 NADH 代谢调控方式

Table 1 The manipulation strategies of NADH

Manipulation strategies	Results/conclusion	Ref erence
Biochemical engineering		
Feeding external electron acceptors		
Acetaldehyde	Decreased NADH/NAD ⁺ ratio	[7]
Fumarate or nitrate	Decreased NADH/NAD ⁺ ratio	[21]
Acetoin	Decreased NADH level	[22, 23]
Pyruvate, citrate, O ₂ , or fructose	Decreased NAD(P)H level	[24]
Furfural	Decreased NADH level	[25]
Carbon sources with different oxidation states		
Sorbitol	Increased NADH availability	[15]
Gluconate	Decreased NADH/NAD ⁺ ratio	[3]
NAD ⁺ precursor		
Nicotinic acid	Increased NAD ⁺ level	[7]
Culture conditions		
Lower temperature	Increased NADH/NAD ⁺ ratio	[18]
Increased dissolved oxygen level	Increased NADH availability	[17]
Extracellular oxidoreduction potential	Decreased NAD ⁺ /NADH ratio at relatively oxidative environment	[26]
Metabolic engineering		
Overexpressing enzymes association with NADH metabolism		
Nicotinic acid phosphoribosyltransferase	Increased NAD ⁺ levels and decreased NADH/NAD ⁺ ratio	[27]
Eliminating NADH competition pathways		
Inactivating aldehyde dehydrogenase	Increased NADH availability	[28]
Deactivating <i>adhE</i> , <i>ldhA</i> and <i>ack-pta</i> , simultaneously	Increased NADH availability	[29]
Introducing heterogeneous NADH metabolic pathways		
H ₂ O-NADH oxidase	Decreased NADH level and NADH/NAD ⁺ ratio	[30]
Alternative oxidase	Decreased NADH/NAD ⁺ ratio	[31]
NAD ⁺ -dependent formate dehydrogenase	Increased NADH availability	[3, 5]

化 NADH 效率较低, 导致胞内 NADH/NAD⁺ 比率升高^[22,24]。为了在微氧或厌氧条件维持微生物细胞内最佳的 NADH/NAD⁺ 比率或为进一步调节微生物代谢功能, 以促进目标代谢产物的生产, 通常采用添加电子受体、改变底物氧化还原状态和调节环境条件等策略以实现 NADH/NAD⁺ 比率的调节。

2.1 添加外源电子受体调控 NADH 代谢

已有研究表明, 醛、酮、酸、分子氮或硝酸盐均能作为外源电子受体, 加速 NADH 氧化, 维持细胞处于最佳氧化还原状态 (NADH/NAD⁺ 比率)^[21, 25, 32, 33]。在利用异型发酵乳酸菌发酵己糖生产有机酸的过程中, 添加一定的外源电子受体 (果糖、丙酮酸或柠檬酸等) 有效地加速了 NAD(P)H 代谢速度, 降低副产物赤藻糖醇和甘油的积累, 显著加速乳酸菌的生长^[24]。另一方面, 在利用 *Saccharomyces cerevisiae* TMB3001 和 *Fusarium oxysporum* 发酵木糖生产乙醇的过程中添加乙偶姻作为外源电子受体, 有效地增加了胞内 NAD⁺ 含量, 提高了乙醇的产率^[22, 23, 25]。光滑球拟酵母呼吸缺陷型突变菌株在电子传递链阻断条件下, 添加 4 mmol/L 的外源电子受体乙醛, 将 NADH/NAD⁺ 降低到 0.22, 使葡萄糖消耗速度和丙酮酸产量提高了 26.3% 和 22.5%^[7]。机会致病菌 *Pseudomonas aeruginosa* PA14 能以吩嗪作为外源电子受体以有效降低胞内 NADH 水平^[32]。

2.2 添加不同还原态底物对 NADH 代谢的调控

碳源根据其在代谢过程中所产的 NADH 量不同

而分为-1、0 和+1 氧化态(图 2)。美国 Rice 大学 San KY 研究小组在稀释率为 0.1 h⁻¹ 恒化厌氧培养系统中发现, 随着碳源氧化态的增大, NADH/NAD⁺ 比率从 0.51(葡萄糖酸)增加到 0.75(葡萄糖)和 0.94(山梨醇), 导致中心代谢流产物乙醇(消耗 2 mol NADH)对乙酸(不消耗 NADH)的比率随之改变。以葡萄糖酸、葡萄糖和山梨醇为碳源时, 乙醇对乙酸(Et/Ac)比率分别为 0.29、1 和 3.62。而在好氧条件下, 这一比率为 0、0 和 0.81^[3]。基于上述发现, Sánchez AM 在恒化培养系统中以不同氧化态碳源为调节 NADH 含量的手段, 以研究 NADH 对碳代谢流流向和通量的影响^[5]。而在琥珀酸的发酵过程中添加山梨醇, 增加重组 *E. coli* 胞内 NADH 的含量, 使琥珀酸的产量和产率分别提高了 96% 和 81%^[15]。

2.3 NAD⁺ 合成前体促进胞内 NAD(H⁺) 代谢

微生物细胞利用自身合成的或从培养基中吸收的烟酸、烟碱作为前体, 在磷酸核糖转移酶的作用下经 3 步反应合成 NAD⁺(图 3)。为此, Liu LM 等在光滑球拟酵母发酵生产丙酮酸过程添加 8 mg/L NAD⁺ 合成前体烟酸, 使葡萄糖消耗速度和丙酮酸产量分别增加了 48.4% 和 29%^[7]。此外, 烟碱核糖通过烟碱核糖激酶的磷酸化作用和腺苷裂解酶的腺苷酰作用合成 NAD⁺^[16,34], 从而为提高胞内 NADH 和 NAD⁺ 含量提供了新的思路 (图 3)。

2.4 环境条件对 NADH 代谢的调控

微生物细胞所处的外部环境条件, 如溶氧、温

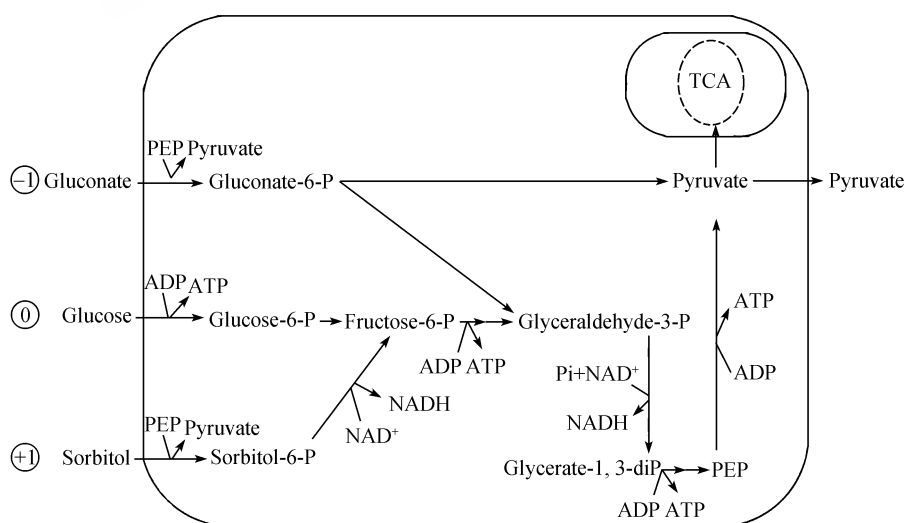
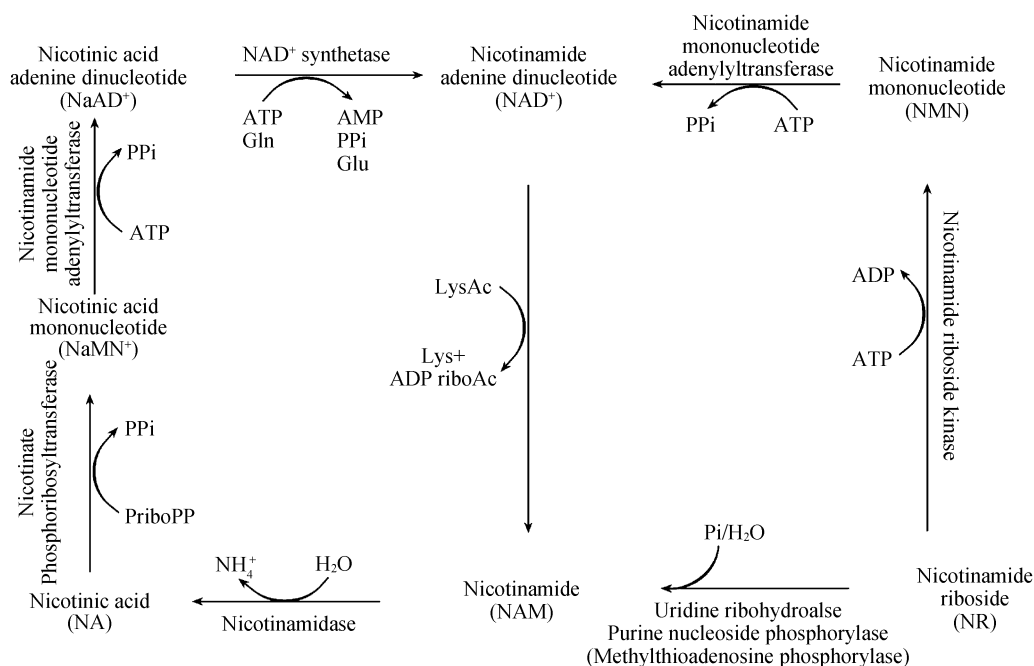


图 2 葡萄糖、山梨醇及葡萄糖酸的氧化还原状态

Fig. 2 The difference of the oxidation state of carbon source.

图 3 球拟假丝酵母中 NAD⁺生物合成途径Fig. 3 Pathways of NAD⁺ biosynthesis in *Candida glabrata*.

度的变化导致与之相关的 NADH、ATP 合成和消耗,从而使微生物细胞内的物质代谢途径发生显著变化^[35]。在氧限制的条件下 *Aspergillus niger* 主要通过依赖于 NAD⁺的甘露醇-1-磷酸脱氢酶实现 NADH 的氧化^[35]。当溶氧水平从 1% 增加到 10% 时, *T. glabrata* IFO 0005 胞内 NADH 浓度增加了 50%, 继续增加溶氧水平, 则不能增加胞内 NADH 含量^[17]。而在高溶氧的条件下, 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、苹果酸酶和依赖 NADP⁺的异柠檬酸脱氢酶活性和表达量明显上调, 而 TCA 循环中合成 NADH 的相关酶的活性明显抑制^[36,37]。Singh R 发现, 高溶氧条件下荧光假单胞菌调整 NAD⁺激酶和 NADP⁺磷酸化酶, 以增加胞内 NADPH 的供给, 限制 NADH 的合成^[36]。根据不同溶氧条件下细胞代谢对 NADH 的需求, Liu L 等在高浓度溶氧条件下添加外源电子受体乙醛对细胞的碳和能量代谢并不产生影响, 但在低溶氧条件下(20%)会降低 NADH/NAD⁺的比率, 导致丙酮酸产量、产率和生产强度与没有添加乙醛的对照组比较, 分别提高了 68%、44% 和 45%^[7]。在温度调控胞内 NADH 方面, 王翠华等发现较低的发醇温度能维持较高的胞内 NADH/NAD⁺水平^[18]。

2.5 氧化还原电势(ORP)的改变对 NADH 代谢的调控

氧化还原电位作为反映微生物培养环境氧化还

原状态的物理参数, 通过影响电子传递链中具有金属活性位点的关键酶活性, 影响 NADH/NAD⁺比率, 进而影响微生物代谢途径^[19, 26, 38, 39]。Du 等通过改变 *Klebsiella pneumoniae* 发酵液的氧化还原电位, 使胞内 NAD⁺/NADH 比率大于 4, 显著提高了细胞的比生长速率和 1,3-丙二醇的产量^[26]。

3 基于代谢工程的 NADH 代谢调控

根据微生物细胞内 NADH 合成与代谢的途径, 利用 DNA 重组技术加强、削弱、删除或者构建新的与 NADH 代谢相关的代谢途径, 从而实现胞内 NADH 含量的调控。

3.1 过量表达 NADH 代谢相关酶调控 NADH 代谢

在促进 NAD⁺合成方面, 发现 *E. coli* 中由 *pncB* 基因编码的烟酸磷酸核糖转移酶(NAPRTase; EC 2.4.2.11)催化生成烟酸单核苷酸(NAMN)的反应是 NAD 回补途径中的关键限速步骤。过量表达 *pncB* 基因, 导致胞内 NAD⁺、NADH 和总 NAD⁺分别提高了 81.8%、29.8% 和 41.7%, 而 NADH/NAD⁺比率降低了 41.6%^[27]; 类似地, 在过量表达未突变及操纵子区突变的 *pncB* 基因突变株 *E. coli* DH10B 中, NAD (H⁺)水平相应地提高了 26% 和 216%^[3]。Heuser F 等通过在 *E. coli* 中同时过量表达编码烟酸转磷酸核糖激酶和 NAD 合成酶的 *pncB* 和 *nadE* 基因, 使 NAD(H)

和 NADP(H)总量分别增加 7 倍和 2 倍^[40]。

在过量表达依赖于 NAD⁺的脱氢酶方面, Cordier H 等在酿酒酵母中过量表达编码胞质依赖 NAD⁺的乙醛脱氢酶基因 *ALD3*, 实现了 NADH 高效再生; 与此同时, 敲除编码依赖于 NAD⁺的乙醇脱氢酶基因 *ADH1*, 有效地降低了胞内 NADH 消耗, 使甘油产率和生产强度在好氧条件下分别达到 0.46 g/g 和 3.1 mmol/(g·g)^[20]。而在酿酒酵母中过量表达内源苹果酸酶, 解决了酿酒酵母中 NADH 和 NADPH 之间的不能自由转换, 实现了木糖还原酶、木糖醇脱氢酶氧化还原的平衡, 促进了酿酒酵母高效利用木糖为碳源发酵生产乙醇^[41, 42]。

3.2 缺失竞争利用 NADH 途径调控 NADH 代谢

如图 4 所示, 在利用工业微生物发酵生产目标代谢产物的过程中, 如何缺失或削弱 NADH 竞争代谢途径, 将 NADH 导向目标代谢途径, 是代谢工程研究的主要内容之一^[28, 43, 44]。在利用 *Klebsiella pneumoniae* 以甘油为底物合成 1,3-丙二醇的代谢途径中, 敲除竞争利用 NADH 的乙醛脱氢酶, 增加 NADH 导向 1,3-丙二醇氧化还原酶的通量, 使 1,3-丙二醇生产强度达到 14.05 mmol/(L·h)^[28]。

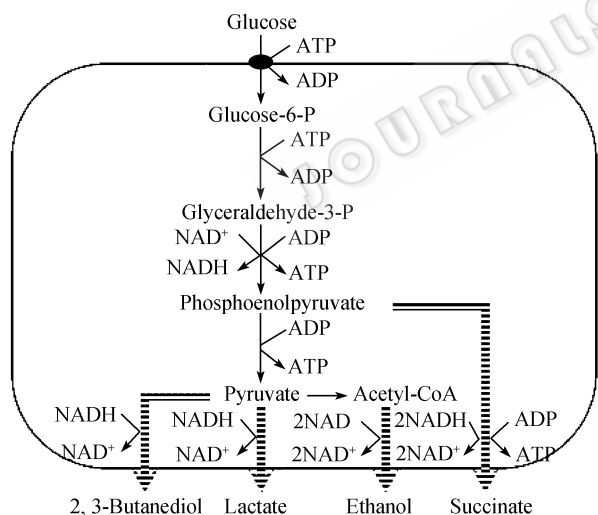


图 4 丙酮酸节点处 NADH 竞争代谢途径

Fig. 4 The NADH competing pathway at pyruvate node.

在葡萄糖发酵生产甘油的过程中, Geertman JMA 等综合采用了维持 1,6-磷酸果糖激酶和磷酸丙糖异构酶活性、削弱与甘油竞争 NADH 的代谢途径和加强线粒体基质氧化分解速度等策略, 以及添加甲酸促进胞质 NADH 生成速度, 使酿酒酵母生产甘

油产率突破理论值(1 mol 甘油/mol 葡萄糖), 达到 1.08 mol/mol 葡萄糖^[43]。类似地, Sánchez AM 通过删除 *E. coli* 中竞争利用 NADH 的乙醇及乙酸合成途径, 并过量表达丙酮酸羧化酶, 使琥珀酸产率达到 1.31 mol/mol 葡萄糖^[44]。在此基础上“开启”对 NADH 需求较小的乙醛酸循环途径, 将琥珀酸对 NADH 需求量从 2 mol 降为 1.5 mol, 实现了葡萄糖到琥珀酸的高效转化^[29]。

3.3 引入外源代谢途径调控 NADH 代谢

调控胞内 NADH 代谢的另一重要策略是在微生物细胞内引入外源氧化还原代谢相关酶, 改变胞内 NADH 生成或氧化途径, 从而改变 NADH/NAD⁺的比率, 实现微生物细胞内氧化还原状态的调控。

胞质 NADH 需通过“穿梭”途径进入线粒体, 实现 NADH 再氧化。如能在胞质中表达形成水的 NADH 氧化酶, 可直接将胞质中的 NADH 氧化为 NAD⁺, 提高 NADH 氧化速度和效率。de Felipe FL 等将来源于 *Streptococcus mutans* 中的 NADH 氧化酶过量表达于 *Lactococcus lactis* 中 (NADH 氧化酶活性提高了 150 倍), 在胞质中实现 NADH 的直接氧化, 提高了 NADH 氧化速度和效率, 显著降低 NADH/NAD⁺的比率, 使乳酸菌从单一的乳酸发酵转为混合酸发酵^[1]。同样, 在 *Saccharomyces cerevisiae* 中过量表达来源于乳酸菌 (*Lactococcus lactis*) 编码形成水的 NADH 氧化酶 *noxE* 基因, 导致胞内 NADH 和 NADH/NAD⁺ 分别下降 5 和 6 倍, 而葡萄糖消耗速度增加了 10%^[30]。此外, 在线粒体内表达更高氧化效率的 NADH 选择性氧化酶, 将 NADH 氧化途径从电子传递链导向选择性氧化酶途径, 显著降低 NADH/NAD⁺ 比率和 ATP 含量^[31]。为了提高厌氧条件下 NADH 氧化效率, Costenoble R 等在一株 *Gpd1p* 和 *Gpd2p* 双重缺陷的 *Saccharomyces cerevisiae* 中, 引入源于 *E. coli* 的编码依赖 NADH 的 1-磷酸甘露醇脱氢酶, 实现了 NADH 氧化途径的转变^[45]。

除加速 NADH 氧化外, 某些代谢产物合成过程中需要大量的 NADH, 因此, 如何提高 NADH 生成效率是提高目标代谢产物生产效率的关键因素。为此, Zhao HM 等过量表达来源于 *Pseudomonas stutzeri* 的亚磷酸脱氢酶 (PTDH), 在催化亚磷酸氧化为磷酸的同时将 NAD⁺ 还原为 NADH^[46, 47]。类似

地, Berríos-Rivera 将来源于 *Candida boidinii* 依赖 NAD 的甲酸脱氢酶取代 *E. coli* 中不依赖任何辅因子的甲酸脱氢酶, 构建了一条 NADH 高效再生途径, 使 NADH 合成效率从每摩尔葡萄糖提高到了 4 mol (好氧条件)和 3 mol (厌氧条件)^[4,48,49]。

4 结论与展望

综上, 针对微生物细胞的氧化还原状态, 目前的研究主要通过添加外源电子受体和不同氧化还原态底物、调节氧化还原电势、缺失 NADH 竞争途径及引入 NADH 外源代谢途径等策略调节胞内 NADH/NAD⁺ 比率而调节碳代谢流。然而, 将调控胞内 NADH/NAD⁺ 作为技术手段以优化微生物细胞生理代谢功能以促进微生物合成目标产物的代谢流最大化和快速化或合成新的代谢产物的研究则更少。就调控 NADH/NAD⁺ 比率以加强微生物细胞代谢功能还有 3 个关键科学问题亟待解决: 首先, 如何采用系统生物学和高通量的方法定量研究 NADH/NAD⁺ 比率对微生物代谢组学、流量组、蛋白质组和转录组的影响; 其次, 在掌握碳代谢流和辅因子流的变化规律基础上, 揭示 NADH/NAD⁺ 比率控制代谢流流向和通量分配的作用机制, 透彻理解微生物细胞的调控网络与代谢网络之间的关系; 再次, 发展基于 NADH/NAD⁺ 比率的碳代谢流最大化、快速化地导向目标代谢产物的策略? 最新发展起来的系统生物学和高通量测定技术, 为研究不同 NADH/NAD⁺ 比率下代谢指纹、代谢通量、蛋白表达、转录水平和信号转导的改变, 阐明微生物细胞调控网络与代谢网络之间的关系, 揭示胞内 NADH/NAD⁺ 比率与控制微生物功能的生理学机制奠定了坚实基础; 同时, 已公布的 650 株微生物的全基因组序列(updated, 2008 年 2 月 20 日)以及不断增加的模式微生物的转录组数据、蛋白质组数据和代谢组数据, 为从功能基因与蛋白、网络、调控、适应等方面透彻理解微生物代谢与调控网络, 提供了丰富的背景信息。

REFERENCES

- [1] de Felipe FL, Kleerebezem M, de Vos WM, *et al.* Cofactor engineering: A novel approach to metabolic engineering in *Lactococcus lactis* by controlled expression of NADH

oxidase. *J Bacteriol*, 1998, **180**(15): 3804–3808.

- [2] Hugenholtz J, Kleerebezem M. Metabolic engineering of lactic acid bacteria: Overview of the approaches and results of pathway rerouting involved in food fermentations. *Curr Opin Biotechnol*, 1999, **10**(5): 492–497.
- [3] 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**(2): 182–192.
- [4] Berríos-Rivera SJ, Bennett GN, San KY. Metabolic engineering of *Escherichia coli*: Increase of NADH availability by overexpressing an NAD(+)-dependent formate dehydrogenase. *Metab Eng*, 2002, **4**(3): 217–229.
- [5] Saanchez AM, Bennett GN, San KY. Effect of different levels of NADH availability on metabolic fluxes of *Escherichia coli* chemostat cultures in defined medium. *J Biotechnol*, 2005, **117**(4): 395–405.
- [6] Bakker BM, Overkamp KM, van Maris AJA, *et al.* Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev*, 2001, **25**(1): 15–37.
- [7] Liu LM, Li Y, Shi ZP, *et al.* Enhancement of pyruvate productivity in *Torulopsis glabrata*: Increase of NAD(+)-availability. *J Biotechnol*, 2006, **126**(2): 173–185.
- [8] Senior A. ATP synthesis by oxidative-phosphorylation. *Physiol Rev*, 1988, **68**(1): 177–231.
- [9] Zoratti M, Szabo I. The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta*, 1995, **1241**(2): 139–176.
- [10] Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science*, 1998, **281**(5381): 1309–1312.
- [11] La Piana G, Marzulli D, Gorgogliione V, *et al.* Porin and cytochrome oxidase containing contact sites involved in the oxidation of cytosolic NADH. *Arch Biochem Biophys*, 2005, **436**(1): 91–100.
- [12] Lin SJ, Ford E, Haigis M, *et al.* Calorie restriction extends yeast life span by lowering the level of NADH. *Genes Dev*, 2004, **18**(1): 12–16.
- [13] Ying W. NAD(+) and NADH in cellular functions and cell death. *Front Biosci*, 2006, **11**: 3129–3148.
- [14] Roustan JL, Sablayrolles JM. Impact of the addition of electron acceptors on the by-products of alcoholic fermentation. *Enzyme Microb Technol*, 2002, **31**(1-2): 142–152.
- [15] Lin H, Bennett GN, San KY. Effect of carbon sources differing in oxidation state and transport route on succinate production in metabolically engineered *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2005, **32**(3): 87–93.
- [16] Ma B, Pan SJ, Zupancic ML, *et al.* Assimilation of NAD(+)-precursors in *Candida glabrata*. *Mol Microbiol*, 2007, **66**(1): 14–25.
- [17] Qiang H, Shimuzu K. Effect of dissolved oxygen

- concentration on the intracellular flux distribution for pyruvate fermentation. *J Biotechnol*, 1999, **68**(2/3): 135–147.
- [18] Wang CH, Li YY, Chen CH, *et al.* Effects of temperature on the kinetics and level of energy charge and oxidation-reduction state in pyruvate biosynthesis. *Chin J Biotech*, 2006, **22**(2): 316–321.
王翠华, 李友元, 陈长华, 等. 温度对丙酮酸生物合成动力学、能荷和氧化-还原度的影响. *生物工程学报*, 2006, **22**(2): 316–321.
- [19] Husson F, Tu VP, Santiago-Gomez M, *et al.* Effect of redox potential on the growth of *Yarrowia lipolytica* and the biosynthesis and activity of heterologous hydroperoxide lyase. *J Mol Catal B: Enzym*, 2006, **39**(1-4): 179–183.
- [20] Cordier H, Mendes F, Vasconcelos I, *et al.* A metabolic and genomic study of engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains for high glycerol production. *Metab Eng*, 2007, **9**(4): 364–378.
- [21] de Graef MR, Alexeeva S, Snoep JL, *et al.* The steady-state internal redox state (NADH/NAD) reflects the external redox state and is correlated with catabolic adaptation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1999, **181**(8): 2351–2357.
- [22] Panagiotou G, Christakopoulos P. NADPH-dependent D-allose reductases and xylose fermentation in *Fusarium oxysporum*. *J Biosci Bioeng*, 2004, **97**(5): 299–304.
- [23] Panagiotou G, Christakopoulos P, Villas-Boas SG, *et al.* Fermentation performance and intracellular metabolite profiling of *Fusarium oxysporum* cultivated on a glucose-xylose mixture. *Enzyme Microb Technol*, 2005, **36**(1): 100–106.
- [24] Zaunmuller T, Eichert M, Richter H, *et al.* Variations in the energy metabolism of biotechnologically relevant heterofermentative lactic acid bacteria during growth on sugars and organic acids. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, **72**(3): 421–429.
- [25] Wahlbom CF, Hahn-Hagerdal B. Furfural, 5-hydroxymethyl furfural, and acetoin act as external electron acceptors during anaerobic fermentation of xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng*, 2002, **78**(2): 172–178.
- [26] Du CY, Yan H, Zhang YP, *et al.* Use of oxidoreduction potential as an indicator to regulate 1,3-propanediol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, **69**(5): 554–563.
- [27] Berrios-Rivera SJ, San KY, Bennett GN. The effect of NAPRTase overexpression on the total levels of nad, the NADH/NAD(+) ratio, and the distribution of metabolites in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2002, **4**(3): 238–247.
- [28] Zhang YP, Li Y, Du CY, *et al.* Inactivation of aldehyde dehydrogenase: A key factor for engineering 1,3-propanediol production by *Klebsiella pneumoniae*. *Metab Eng*, 2006, **8**(6): 578–586.
- [29] Sanchez AM, Bennett GN, San KY. Novel pathway engineering design of the anaerobic central metabolic pathway in *Escherichia coli* to increase succinate yield and productivity. *Metab Eng*, 2005, **7**(3): 229–239.
- [30] Heux S, Cachon R, Dequin S. Cofactor engineering in *Saccharomyces cerevisiae*: Expression of a h2o-forming NADH oxidase and impact on redox metabolism. *Metab Eng*, 2006, **8**(4): 303–314.
- [31] 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.
- [32] Price-Whelan A, Dietrich LE, Newman DK. Pyocyanin alters redox homeostasis and carbon flux through central metabolic pathways in *Pseudomonas aeruginosa* pa14. *J Bacteriol*, 2007, **189**(17): 6372–6381.
- [33] Panagiotou G, Christakopoulos P, Olsson L. The influence of different cultivation conditions on the metabolome of *Fusarium oxysporum*. *J Biotechnol*, 2005, **118**(3): 304–315.
- [34] Tempel W, Rabeh WM, Bogan KL, *et al.* Nicotinamide riboside kinase structures reveal new pathways to NAD⁺. *PLoS Biol*, 2007, **5**(10): 2220–2230.
- [35] Diano A, Bekker-Jensen S, Dynesen J, *et al.* Polyol synthesis in aspergillus niger: Influence of oxygen availability, carbon and nitrogen sources on the metabolism. *Biotechnol Bioeng*, 2006, **94**(5): 899–908.
- [36] Singh R, Mailloux RJ, Puiseux-Dao S, *et al.* Oxidative stress evokes a metabolic adaptation that favors increased NADPH synthesis and decreased NADH production in *Pseudomonas fluorescens*. *J Bacteriol*, 2007, **189**(18): 6665–6675.
- [37] Bonarius HPJ, Houtman JHM, Schmid G, *et al.* Metabolic-flux analysis of hybridoma cells under oxidative and reductive stress using mass balances. *Cytotechnology*, 2000, **32**(2): 97–107.
- [38] Riondet C, Cachon R, Wache Y, *et al.* Extracellular oxidoreduction potential modifies carbon and electron flow in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2000, **182**(3): 620–626.
- [39] Elliott SJ, Leger C, Pershad HR, *et al.* Detection and interpretation of redox potential optima in the catalytic activity of enzymes. *BBA-Bioenergetics*, 2002, **1555**(1-3): 54–59.
- [40] Heuser F, Schroer K, Lutz S, *et al.* Enhancement of the NAD(P)(H) pool in *Escherichia coli* for biotransformation. *Eng Life Sci*, 2007, **7**(4): 343–353.
- [41] Hou J, Shen Y, Bao XM. Research progress in cofactor engineering of xylose metabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *China Biotech*, 2006, **26**(2):

- 89-94.
侯进, 沈煜, 鲍晓明. 酿酒酵母木糖代谢工程中辅酶工程的研究进展. 中国生物工程杂志, 2006, **26** (2): 89-94.
- [42] dos Santos MM, Raghevedran V, Kotter P, *et al.* Manipulation of malic enzyme in *Saccharomyces cerevisiae* for increasing NADPH production capacity aerobically in different cellular compartments. *Metab Eng*, 2004, **6**(4): 352-363.
- [43] Geertman JMA, van Maris AJA, van Dijken JP, *et al.* Physiological and genetic engineering of cytosolic redox metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* for improved glycerol production. *Metab Eng*, 2006, **8**(6): 532-542.
- [44] Sanchez AM, Bennett GN, San KY. Efficient succinic acid production from glucose through overexpression of pyruvate carboxylase in an *Escherichia coli* alcohol dehydrogenase and lactate dehydrogenase mutant. *Biotechnol Prog*, 2005, **21**(2): 358-365.
- [45] Costenoble R, Adler L, Niklasson C, *et al.* Engineering of the metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* for anaerobic production of mannitol. *FEMS Yeast Res*, 2003, **3**(1): 17-25.
- [46] Metcalf WW, Wolfe RS. Molecular genetic analysis of phosphite and hypophosphite oxidation by *Pseudomonas stutzeri* wm88. *J Bacteriol*, 1998, **180**(21): 5547-5558.
- [47] Vrtis JM, White AK, Metcalf WW, *et al.* Phosphite dehydrogenase: An unusual phosphoryl transfer reaction. *J Am Chem Soc*, 2001, **123**(11): 2672-2673.
- [48] Jormakka M, Byrne B, Iwata S. Formate dehydrogenase-a versatile enzyme in changing environments. *Curr Opin Struct Biol*, 2003, **13**(4): 418-423.
- [49] Berrios-Rivera SJ, Bennett GN, San KY. The effect of increasing NADH availability on the redistribution of metabolic fluxes in *Escherichia coli* chemostat cultures. *Metab Eng*, 2002, **4**(3): 230-237.

《生物工程学报》对摘要的写作要求

1. 研究报告摘要: 基本要素包括研究目的、方法、结果和结论(不用单列标题书写)。目的(Purpose): 主要说明作者写此文章的目的, 或说明本文主要要解决的问题; 方法(Methods): 重点说明作者的主要工作过程及使用的方法。应用性文章如需要, 可注明条件、使用的主要设备和仪器。结果(Results): 本文最后得出的结果(实验数据部分)。结论(Conclusions): 如系基础研究, 应写明本文的创新之处, 及文章在讨论部分表述的观点; 如系应用性研究, 应尽可能提及本文结果和结论的应用范围和应用情况或应用前景。

2. 综述摘要: 包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望, 尤其要注意结合自己的研究工作。

3. 英文摘要的撰写要点: 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但比中文摘要更详尽。英文摘要完成后, 务必请英文较好、且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。

凡不符合要求的, 即使学术上可以达到刊出的水平, 本刊也将推迟发表。

(1) 建议使用第一人称, 尽量不使用第三人称和被动语态。

(2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊尽量不用, 这样可以免好多长句, 以求简单清晰。

(3) 尽量使用清晰简练的短句, 避免很长的句子。注意正确使用英文写作习惯和语法。

(4) 摘要应当使用过去时态, 语法正确, 句子通顺。

(5) 摘要中避免使用缩写语, 除非是那些人人皆知的(如DNA、ATP等), 或者确实是非常长, 而且出现多次的短语才允许用缩写语, 并且在第一次出现时要写出全称。

(6) 在英语摘要中, 不要使用任何汉字字符, 包括标点、括号、温度、希腊字母等。

(7) 句子的开头处最好不要使用数字。