



工业微生物还原型辅酶 的代谢调控研究进展

陈宏文¹, 刘 薇¹, 杜 钰¹, 陈 国¹, 方柏山²

(¹华侨大学化工学院, 福建 厦门 361021; ²厦门大学化学化工学院, 福建 厦门 361005)

摘 要: 还原型辅酶 (NADPH) 主要参与细胞合成代谢, 是微生物代谢网络中含量最丰富的氧化还原辅酶之一。辅酶工程作为代谢工程的重要分支, 通过改变微生物胞内辅酶再生途径, 进而改变细胞内代谢产物构成。本文在归纳 NADPH 产生途径和调控的基础上, 分析和评述了工业微生物基于辅酶工程的 NADPH 代谢调控研究进展, 包括过量表达 NADPH 代谢相关酶、敲除 NADPH 代谢相关基因及引入特定代谢途径等策略, 指出今后的研究重点在于深入理解 NADPH 调控与中心碳代谢网络的相互作用, 为利用代谢工程进行细胞工厂改造提供基础。

关键词: 还原型辅酶 ; 辅酶工程 ; 代谢调控 ; 工业微生物

中图分类号: Q 552 文献标志码: A 文章编号: 1000-6613 (2012) 11-2535-07

Progress of operation of NADPH metabolism in industrial strains

CHEN Hongwen¹, LIU Wei¹, DU Yu¹, CHEN Guo¹, FANG Baishan²

(¹School of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, Fujian, China; ²School of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China)

Abstract: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), a hemoprotein reductase, or in older notation, triphosphopyridine nucleotide is one of the most abundant redox cofactors in the metabolic network. It is the main electron donor in anabolism and is mainly used in the biosynthesis of biomass precursors. As an important branch of metabolism engineering, cofactor engineering changes the NADPH regeneration pathways and rebuilds the components of metabolic products. In this paper, we introduce the pathways in which NADPH is generated and reviewed the strategies to operate NADPH, including overexpression of enzymes, deletion of genes associated with NADPH metabolism or introduction of heterogeneous NADPH metabolic pathways. More attention should be focused on deeper understanding of the interplay between the operation of NADPH and central carbon metabolic networks in the future.

Key words: NADPH; cofactor engineering; metabolic operation; industrial strain

代谢工程技术的进步, 为优化微生物的代谢和表达调控网络、增加目标代谢产物的产量和积累速度、提高发酵过程的经济性, 提供了比传统诱变技术更为合理的手段。然而, 代谢流改造过程中常常得不到预想结果, 原因之一就是代谢流改变的同时往往引起了辅酶氧化还原的不平衡。辅酶在细胞中涉及的反应广泛, 辅酶浓度的改变不仅会影响产物形成, 还会使代谢流发生广泛变化^[1]。

在辅酶层面上调控碳代谢流的辅酶工程, 通过

改造微生物胞内辅酶的再生途径、调控微生物胞内辅酶浓度和氧化还原态比率、定向改变和优化微生物细胞代谢功能及氧化还原酶催化的产物构成, 有

收稿日期: 2012-05-07; 修改稿日期: 2012-06-26。

基金项目: 国家自然科学基金 (41176111)、教育部留学回国人员科研启动基金 (2010)、福建省高等学校新世纪优秀人才支持计划 (07FJRC03)、中央高校基本科研业务费 (JB-ZR1112) 及华侨大学科研基金 (12BS132) 项目。

第一作者及联系人: 陈宏文 (1969-), 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向微生物代谢工程。E-mail: chenhw@hqu.edu.cn。

助于辅酶氧化还原达到平衡,从而实现代谢流最大化、快速化地导向目标代谢产物^[2-3]。细胞生化代谢网络中,含量最丰富的氧化还原辅酶是还原型辅酶

(NADH)和还原型辅酶(NADPH)。NADH主要参与分解代谢,生物质的分解过程产生NADH,有氧条件下,NADH通过呼吸链提供大量ATP;NADPH主要参与合成代谢,如氨基酸、脂类及核苷酸等细胞组成物质的合成均需NADPH提供还原力,对细胞正常生长和代谢有重要影响。NADH的代谢调控已有详细介绍^[3],本文主要围绕NADPH,详细分析归纳不同微生物NADPH产生途径和目前基于辅酶工程的NADPH代谢调控策略,为利用代谢工程进行细胞工厂改造提供基础。

1 细胞内 NADPH 合成途径和代谢调控

微生物细胞内 NADPH 主要通过中心碳代谢途径合成。其中,磷酸戊糖途径(PPP途径)的不可逆氧化阶段是 NADPH 的主要来源。如图 1 所示,依赖 NADP⁺的 6-磷酸葡萄糖脱氢酶(G6PDH, EC1.1.1.49)和 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(6PGDH, EC1.1.1.44)在氧化生成 1mol 6-磷酸葡萄糖酸和氧化脱羧生成 1mol 5-磷酸核酮糖过程中,分别产生 1mol NADPH。

原核生物如大肠杆菌^[4]在有氧分批发酵条件下,胞内 35%~45%的 NADPH 来自 PPP 途径;另外 35%~45%的 NADPH 由转氢酶催化产生。转氢酶有两种——膜定位嘧啶核苷酸转氢酶(PntAB,

EC1.6.1.2)和位于细胞质中的可溶性转氢酶(UdhA, EC1.6.1.1),参见图 2。它们能介导 NADH 和 NADPH 之间的相互转化,其中 PntAB 通常催化 NADPH 生成,同时消耗 ATP, UdhA 通常催化 NADH 生成,无需能量参与,细菌中仅肠杆菌科同时拥有 PntAB 和 UdhA,酵母等真核生物体内至今未发现这两种酶^[1,4];大肠杆菌还有 20%~25%的 NADPH 来自三羧酸循环(TCA 循环),由依赖 NADP⁺的异柠檬酸脱氢酶(Icd, EC1.1.1.42, 见图 1)催化产生。

酵母等真核生物不含转氢酶,氢离子不能在 NADPH 和 NADH 之间直接转移,且线粒体和细胞质分开运作,胞内 NADPH 氧化还原代谢相比原核生物更加复杂^[5]。以酿酒酵母^[5-6]为例,在细胞质中,催化生成 NADPH 的酶主要有:PPP 途径的 G6PDH 和 6PGDH、依赖 NADP⁺的异柠檬酸脱氢酶及依赖 NADP⁺的乙醛脱氢酶(ALD6, EC1.2.1.4, 见图 1)。酿酒酵母异柠檬酸脱氢酶有 3 种同工酶^[7],分别是线粒体中的 Idp1P、胞质中的 Idp2P 和过氧化物酶体中的 Idp3P。只有 Idp2p 催化的反应才为胞质提供 NADPH, Idp1P 和 Idp3P 在 NADPH 供给上并无显著作用^[8]。ALD6 虽也为胞质提供 NADPH,但它不会在 NADPH 缺乏时被诱导表达^[9]。因此,PPP 途径仍是酿酒酵母细胞质中 NADPH 的主要来源。在线粒体中,酿酒酵母涉及 NADPH 合成的酶主要有 NADH 激酶(POS5, EC2.7.1.86, 见图 3)和依赖 NADP⁺的苹果酸酶(MaeB, EC1.1.1.40, 见图 1)。NADH 激酶依赖 ATP 将 NADH 直接转化为 NADPH,

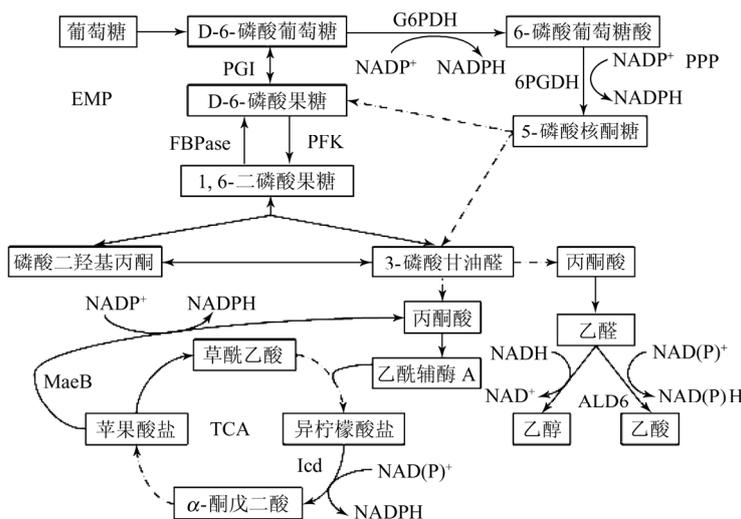


图 1 PPP 途径和 TCA 循环中 NADPH 代谢 (图中虚线箭头表示多步反应)

PGI—磷酸葡萄糖异构酶; G6PDH—6-磷酸葡萄糖脱氢酶; 6PGDH—6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶; PFK—磷酸果糖激酶; FBPase—果糖-1,6-二磷酸酶; Icd—异柠檬酸脱氢酶; ALD6—乙醛脱氢酶; MaeB—苹果酸酶

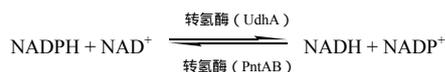


图 2 转氢酶的催化反应

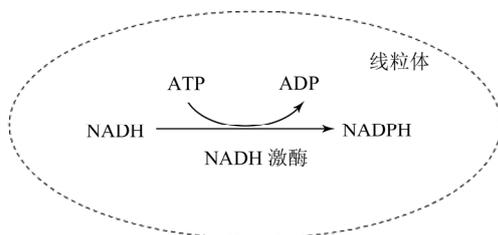


图 3 NADH 激酶的催化反应

是酿酒酵母线粒体中 NADPH 的主要来源^[10]。

微生物胞内 NADPH 的消耗主要通过同化作用。同化作用利用中心碳代谢途径的中间代谢物，合成 75 ~ 100 个细胞原件、辅酶以及辅基，维持细胞正常生长代谢。此过程需消耗大量 ATP 和 NADPH，如合成 1 g 大肠杆菌干细胞需消耗 41 mol ATP 和 18 mol NADPH^[1]。由此可见，胞内 NADPH 的生成和消耗同胞内很多重要的代谢途径相关联，维持细胞内辅酶的平衡对于细胞生长、代谢以及产物的合成都非常关键。

为了维持细胞正常生长和代谢，细胞必须精确调控胞内 NADPH 的供应与需求。如在大肠杆菌中^[11]，NADPH 过量合成时，转氢酶 UdhA 可氧化过量 NADPH 起到调节作用。但在异源表达依赖 NADPH 木糖还原酶的大肠杆菌工程菌中^[12]，缺失 UdhA 未能提高 NADPH 浓度，无法满足工程菌合成木糖醇所需的 NADPH，大肠杆菌中转氢酶的 NADPH 调节作用还有待进一步研究。

除了转氢酶的 NADPH 调控作用外，大肠杆菌还有一些其它的调控方式。如生长速度减慢或磷酸葡萄糖异构酶 PGI 基因(见图 1)缺失使得 NADPH 过量时，大肠杆菌可利用葡萄糖氧化的分支途径(如乙醛酸氧化分支途径)减少 NADPH 的合成，维持 NADPH 的平衡^[13]。研究还发现对于 G6PDH 基因(见图 1)缺失的大肠杆菌，其最大生长速度和细胞得率并未因 PPP 途径删除导致的 NADPH 合成减少而受到影响，这是因为大肠杆菌还可通过加倍 TCA 循环代谢流和激活依赖 NADP⁺ 苹果酸酶(MaeB, 见图 1)酶活力的调控方式，合成细胞生长所需的 NADPH^[13]。

对于不含转氢酶的微生物，往往通过严格控制 NADPH 的合成来满足细胞生长需要。在 14 株半子

囊菌酵母^[14]和酿酒酵母^[15]研究中发现，其 PPP 途径的代谢流与细胞得率成正比关系，这说明 PPP 途径代谢流受到细胞合成时 NADPH 需求量的调控。

此外，依赖 NADP⁺ 的异柠檬酸脱氢酶 Icd 和乙醛脱氢酶 ALD 也参与了 NADPH 的调控。酿酒酵母在葡萄糖限制的恒化培养过程中^[16]，研究发现随着细胞生长速率的增加，PPP 途径代谢流却出现下降，推测 PPP 途径减少的 NADPH 供给，可通过依赖 NADP⁺ Icd 和 ALD 产生的 NADPH 来弥补。目前关于 NADPH 合成的代谢网络调控研究并不多，有待更加深入和系统的了解。

2 基于辅酶工程的 NADPH 代谢调控在工业微生物中应用

基于辅酶工程的 NADPH 代谢调控包括内源和外源调控两种方法。其中外源调控主要采用生化工程方法，通过添加外源代谢物^[17]、不同还原态碳源^[18]或烟酰胺辅酶前体^[19]等实现对 NADPH 代谢的调控，而内源调控则通过基因工程和代谢工程手段，调控同 NADPH 代谢相关的酶和反应途径，本文着重介绍近年来广泛采用的 NADPH 内源调控策略。许多生物转化过程需大量 NADPH，产物合成往往因 NADPH 的供应不足而受到限制。根据 NADPH 合成与代谢的途径，基于辅酶工程的 NADPH 代谢调控策略主要包括——过量表达 NADPH 代谢相关酶、敲除 NADPH 代谢相关基因及引入特定代谢途径。

2.1 过量表达 NADPH 代谢相关酶

PPP 途径是原核生物、真核生物胞质中 NADPH 的主要来源，过量表达 PPP 途径中的 G6PDH 和 6PGDH 常成为促进 NADPH 合成的首选调控策略。如 Poulsen 等^[20]在黑曲霉中过量表达 6PGDH，其表达量可达野生型的 2 ~ 13 倍，胞内 NADPH 浓度可增加 2 ~ 9 倍。

该策略在实际生物转化中已显现成效。譬如利用工业微生物大规模生产非天然氨基酸、手性醇及其它精细化学品，常需外源表达依赖 NADPH 的特定氧化还原酶以促进目标代谢物合成。这些额外增加的 NADPH 需求，因细胞自身 NADPH 调控能力的限制，往往会造成胞内 NADPH 氧化还原态的不平衡。外源添加 NADPH 成本昂贵，不适合工业化生产，而通过提高胞内 NADPH 浓度，可保证外源表达的氧化还原酶其催化反应正常进行。如在外源表达 GDP-D-甘露糖-4,6-脱水酶和依赖 NADPH 的

GDP-4-酮-6-脱氧甘露糖异构还原酶的重组大肠杆菌中过量表达 G6PDH,胞内 NADPH 供应充足,其 GDP-L-果糖产量可由 (38.9 ± 0.6) mg/L 提高至 (55.2 ± 0.5) mg/L^[21]。在外源表达依赖 NADPH 的环己酮单加氧酶的大肠杆菌中过量表达 G6PDH,其 ϵ -己丙酯产量可提高 39%^[22]。同样,对于非外源氧化还原酶基因表达而胞内产物合成需大量 NADPH 时,过量表达 G6PDH 和 6PGDH 也有助于提高其产量。如谷氨酸棒杆菌是工业生产 L-赖氨酸的传统菌株,其每生产 1 mol 赖氨酸需消耗 4 mol NADPH,若过量表达 G6PDH 或果糖-1,6-二磷酸酯酶(FBPase, EC3.1.3.11, 见图 1),可增加胞内 PPP 途径代谢流,有效再生 NADPH,从而提高 L-赖氨酸产量^[18, 23-24]。利用含 *phbCAB* 操纵子的大肠杆菌生产 PHB(聚 beta-羟基丁酸),因其乙酰乙酰辅酶 A 还原酶需 NADPH 作为辅因子,过量表达 G6PDH 可使其胞内 NADPH/NADP⁺比率提高 6 倍, TCA 循环代谢流减少、更多代谢流进入 PHB 合成途径,最终菌株 PHB 产量可提高 41%^[25]。上述这种调控策略在真核生物中也有应用,如在外源表达依赖 NADPH 木糖还原酶的酿酒酵母中过量表达 G6PDH,胞内 NADPH 供应充足,其木糖醇产量可提高 25%^[26]。

过量表达 PPP 途径中 NADPH 合成关键酶是目前应用较广的 NADPH 代谢调控策略,但 PPP 途径代谢流增加会削弱 TCA 循环和糖酵解途径(EMP 途径)代谢流,有时会不利于细胞生长。过量表达 PntAB 或 UdhA 则不会干扰中心碳代谢,且可再生 NADPH,该方法在原核细胞谷氨酸棒杆菌、大肠杆菌中得到应用。如 Kabus 等^[27]在谷氨酸棒杆菌中异源表达来自大肠杆菌的 PntAB,成功检测到 PntAB 酶活力可达 0.7 U/mg 蛋白质。将该工程菌置于含 10%蔗糖的最小培养基上生长,其分泌的 L-赖氨酸浓度可提高 3 倍。Ailen 等^[28]则利用大肠杆菌 UdhA 所催化的可逆反应,通过高拷贝的质粒过量表达 UdhA,同时共表达 *phbCAB* 操纵子,使得该菌株的 PHB 产量由 49%提高至 66%。

但 Jeun 等^[29]在含有木糖还原酶的酿酒酵母中异源表达来自棕色固氮菌的可溶性转氢酶 UdhA,却发现其只会促使 NADPH 和 NAD⁺向 NADH 和 NADP⁺转化,最终木糖醇产量下降至 70%。同时由于 NADH 的补充,乙醇脱氢酶活力增强,菌株的乙醇产量略有增加。在重组酿酒酵母中过量表达 PntAB^[30]或 UdhA^[31],反应方向也是利用 NADPH

和 NAD⁺产生 NADH 和 NADP⁺,辅酶产生方向与重组酿酒酵母利用木糖生产乙醇所需方向相反,无法提高生产乙醇的能力。因此,在真核细胞如酿酒酵母中,过量表达原核细胞的转氢酶目前尚不能得到理想应用,这方面有待深入研究。此外, PntAB 催化生成 NADPH 需消耗 ATP,同时伴随着 NADH/NAD⁺比例下降,故应用此策略需综合考虑。

过量表达 NADH 激酶或苹果酸酶,也有可能重组代谢流、提高 NADPH 浓度。Panagiotou 等^[32]在构巢曲霉中过量表达 NADH 激酶,促进了线粒体 NADPH 合成,细胞比生长速率提高了 20%。Moreira dos Santos 等^[5]在重组酿酒酵母中过量表达线粒体苹果酸酶、丙酮酸羧化酶和无线粒体定位信号的苹果酸酶、丙酮酸羧化酶,通过苹果酸酶催化 NADPH 生成,丙酮酸羧化酶促使 NADH 消耗,在重组酿酒酵母线粒体和细胞质中获得了 PntAB 效果。虽然这些研究结果还未应用于重组酿酒酵母利用木糖生产酒精过程中,但为真核细胞 NADPH 调控提供了另外的思路。

还有研究发现,锌指蛋白 STB5 是调控 NADPH 合成的关键蛋白,其可同 PPP 途径中的大多数基因结合,并调控这些基因表达。STB5 还可抑制磷酸葡萄糖异构酶(PGI, EC5.3.1.9, 见图 1)表达,促使 6-磷酸葡萄糖进入 PPP 途径,生成更多 NADPH^[33]。Hector 等^[34]在酿酒酵母中表达 STB5 或受其调控的未知功能蛋白 YMR315W,胞内 NADPH 量均有提高,且细胞对过氧化物的耐受力增强。虽然这两个蛋白的具体作用机理仍不清晰,但这一研究结果也为 NADPH 代谢调控提供了新的思路。

2.2 敲除 NADPH 代谢相关基因或削弱 NADPH 代谢相关酶活力

敲除编码 G6PDH 的基因 *zwf* 和编码 6PGDH 的基因 *gnd*,是减少 PPP 途径代谢流、削弱 NADPH 合成的最直接手段。Jeppsson 等^[35]为减少生产乙醇的酿酒酵母中木糖醇的积累,分别敲除了 *zwf* 基因和 *gnd* 基因。其中在敲除 *zwf* 的工程菌中 NADPH/NADP⁺比率降低了 3~5 倍,木糖醇积累减少,菌株产乙醇能力增强,但木糖利用率削弱了 84%。在此基础上,他们借助合成启动子文库,构建可调控 G6PDH 酶活的基因工程菌,发现保留 1% 和 6% G6PDH 酶活力的工程菌,木糖利用率可分别提高至原敲除菌的 2.8 倍和 5.1 倍^[36]。

此外,敲除 EMP 途径中的某些基因,可降低 EMP 途径代谢流,促进更多代谢流进入 PPP 途径以

合成 NADPH。如 Chin 等为提高木糖醇产量，分别敲除了大肠杆菌 EMP 途径中编码 PGI 的基因 *pgi*^[12] 和编码磷酸果糖激酶 (PFK, EC2.7.1.11, 见图 1) 的基因 *pfk*^[37]。虽菌株生长略受抑制，胞内 NADPH/NADP⁺ 比率却有所提高。在葡萄糖和木糖的混合培养基上培养这类静息菌株，消耗 1 mol 葡萄糖可得到 5.1 mol 木糖醇。作者同时也研究了在此基础上敲除转氢酶基因 *sthA* 对菌株生长和代谢的影响。虽工程菌胞内 NADPH/NADP⁺ 比率更高，但木糖醇产量增长并不显著。由此推测，工程菌对 NADPH 的需求可能有一个阈值，NADPH/NADP⁺ 比率同木糖醇产量的相关性仍需进一步研究。

敲除 *pgi* 对于酿酒酵母^[38]、黑曲霉^[20]等真核生物是致命的，因此，Oh 等^[39]在过量表达 G6PDH 的重组酿酒酵母中，通过 ADH 启动子调控 PGI 表达，在不影响菌株生长的情况下衰减该酶活力，有效提高胞内 NADPH 供给，最终木糖醇产量提高了 1.9 倍。

2.3 引入特定代谢途径

由于 PPP 途径代谢流增加会催化产生二氧化碳，造成碳源的浪费，为此人们通过引入特定代谢途径而不是通过 PPP 途径再生 NADPH，也获得了应用。如 Verho 等^[40]在异源表达木糖还原酶、木糖醇脱氢酶的重组酿酒酵母中，敲除编码 G6PDH 的基因 *zwf*，异源表达来自乳酸克鲁维酵母的依赖 NADP⁺ 的 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH, EC 1.2.1.13) 基因，用 GAPDH 代替 G6PDH，使 NADPH 通过 NADP-GAPDH 途径再生，同时降低了 NADH 还原、缓解了胞内辅因子不平衡，最终重组菌的乙醇产量提高了 50%。Irene 等^[41]则用来自丙酮丁醇梭杆菌的 NADP⁺ 依赖型 GAPDH 代替大肠杆菌的 NAD⁺ 依赖型 GAPDH，重组大肠杆菌通过 EMP 途径合成 NADPH，每消耗 1 mol 葡萄糖可产生 2 mol NADPH，被证实可有效生产番茄红素和 ϵ -己内酯。

3 结 语

以上研究结果表明，通过辅酶工程手段，过量表达 NADPH 代谢相关酶、敲除 NADPH 代谢相关基因或引入特定代谢途径，对于增加 NADPH 供给、维持胞内氧化还原辅因子平衡和过量积累目的产物获得了较好的应用效果，显示出辅因子调控对中心代谢网络的作用。但由于微生物代谢网络结构和代谢网络调控的高度复杂性，目前从代谢网络全局系

统深入理解辅因子调控与中心碳代谢途径相互作用机制方面的研究仍非常欠缺。

随着后基因组时代系统生物学和高通量分析技术的诞生和发展，为定量研究辅因子调控对微生物代谢物组、通量组、蛋白质组和转录组的影响，进而揭示辅因子调控与中心碳代谢网络之间的关系奠定基础。目前，已有科学家通过化学计量模型预测出提高 NADPH 供给的最佳基因型组合^[42]；或是从菌株的特殊表型出发，以反向代谢工程思路，运用高通量组学分析技术，定位非直观的 NADPH 代谢改造靶点^[24, 43-44]。随着代谢工程的发展，探索不同 NADPH/NADP⁺ 比率下代谢通量、蛋白表达、转录水平等的改变，揭示胞内 NADPH 调控与微生物功能的关系，可为细胞工厂基因改造提供更多的思路。

参 考 文 献

- [1] Blank L M, Ebert B E, Buehler K, et al. Redox biocatalysis and metabolism: Molecular mechanisms and metabolic network analysis[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2010, 13(3): 349-394.
- [2] 侯进. 酿酒酵母辅酶工程[D]. 济南: 山东大学, 2009.
- [3] 秦义, 董志姚, 刘立明, 等. 工业微生物中 NADH 的代谢调控[J]. *生物工程学报*, 2009(2): 161-169.
- [4] Sauer U, Canonaco F, Heri S, et al. The soluble and membrane-bound transhydrogenases UdhA and PntAB have divergent functions in NADPH metabolism of *Escherichia coli*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(8): 6613.
- [5] Moreira dos Santos M, Raghevedran V, Kotter P, et al. Manipulation of malic enzyme in *Saccharomyces cerevisiae* for increasing NADPH production capacity aerobically in different cellular compartments[J]. *Metabolic Engineering*, 2004, 6(4): 352-363.
- [6] Hou J, Vemuri G N, Bao X, et al. Impact of overexpressing NADH kinase on glucose and xylose metabolism in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 82(5): 909-919.
- [7] Minard K I, Jennings G T, Loftus T M, et al. Sources of NADPH and expression of mammalian NADP⁺-specific isocitrate dehydrogenases in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(47): 31486.
- [8] Minard K I, McAlister-Henn L. Sources of NADPH in yeast vary with carbon source[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(48): 39890.
- [9] Grabowska D, Chelstowska A. The ALD6 gene product is indispensable for providing NADPH in yeast cells lacking glucose-6-phosphate dehydrogenase activity[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(16): 13984.
- [10] Outten C E, Culotta V C. A novel NADH kinase is the mitochondrial source of NADPH in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *The EMBO Journal*, 2003, 22(9): 2015-2024.
- [11] Afolabi P, Mohammed F, Amaratunga K, et al. Site-directed mutagenesis and X-ray crystallography of the PQQ-containing

- quinoprotein methanol dehydrogenase and its electron acceptor, cytochrome c (L) [J]. *Biochemistry*, 2001, 40 (33): 9799-9809.
- [12] Chin J W, Khankal R, Monroe C A, et al. Analysis of NADPH supply during xylitol production by engineered *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 102 (1): 209-220.
- [13] Fischer E, Sauer U. A novel metabolic cycle catalyzes glucose oxidation and anaplerosis in hungry *Escherichia coli*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278 (47): 46446-46451.
- [14] Blank LM, Lehmbeck F, Sauer U. Metabolic flux and network analysis in fourteen hemiascomycetous yeasts[J]. *FEMS Yeast Research*, 2005, 5 (6-7): 545-558.
- [15] Jouhten P, Rintala E, Huuskonen A, et al. Oxygen dependence of metabolic fluxes and energy generation of *Saccharomyces cerevisiae* CEN. PK113-1A[J]. *BMC Systems Biology*, 2008, 2 (1): 60.
- [16] Frick O, Wittmann C. Characterization of the metabolic shift between oxidative and fermentative growth in *Saccharomyces cerevisiae* by comparative ¹³C flux analysis[J]. *Microbial Cell Factories*, 2005, 4 (1): 30.
- [17] Yeo J S, Park J Y, Yeom S H, et al. Enhancement of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) productivity by the two-stage supplementation of carbon sources and continuous feeding of NH₄Cl[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2008, 13 (1): 14-24.
- [18] Georgi T, Rittmann D, Wendisch V F. Lysine and glutamate production by *Corynebacterium glutamicum* on glucose, fructose and sucrose: Roles of malic enzyme and fructose-1,6-bisphosphatase[J]. *Metabolic Engineering*, 2005, 7 (4): 291-301.
- [19] Knepper A, Schleicher M, Klauke M, et al. Enhancement of the NAD(P) (H) Pool in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Engineering in Life Sciences*, 2008, 8 (4): 381-389.
- [20] Poulsen B R, Nohr J, Douthwaite S, et al. Increased NADPH concentration obtained by metabolic engineering of the pentose phosphate pathway in *Aspergillus niger*[J]. *Febs Journal*, 2005, 272 (6): 1313-1325.
- [21] Byun S G, Kim M D, Lee W H, et al. Production of GDP-l-fucose, l-fucose donor for fucosyloligosaccharide synthesis, in recombinant *Escherichia coli*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 74 (4): 768-775.
- [22] Lee W H, Park J B, Park K, et al. Enhanced production of ϵ -caprolactone by overexpression of NADPH-regenerating glucose 6-phosphate dehydrogenase in recombinant *Escherichia coli* harboring cyclohexanone monooxygenase gene[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 76 (2): 329-338.
- [23] Becker J, Klopffrogge C, Herold A, et al. Metabolic flux engineering of L-lysine production in *Corynebacterium glutamicum*—over expression and modification of G6P dehydrogenase[J]. *Journal of Biotechnology*, 2007, 132 (2): 99-109.
- [24] Becker J, Klopffrogge C, Zelder O, et al. Amplified expression of fructose 1,6-bisphosphatase in *Corynebacterium glutamicum* increases in vivo flux through the pentose phosphate pathway and lysine production on different carbon sources[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71 (12): 8587-8596.
- [25] 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.
- [26] Kwon D H, Kim M D, Lee T H, et al. Elevation of glucose 6-phosphate dehydrogenase activity increases xylitol production in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2006, 43 (1-4): 86-89.
- [27] Kabus A, Georgi T, Wendisch V F, et al. Expression of the *Escherichia coli* *pntAB* genes encoding a membrane-bound transhydrogenase in *Corynebacterium glutamicum* improves L-lysine formation[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 75 (1): 47-53.
- [28] Sánchez A M, Andrews J, Hussein I, et al. Effect of overexpression of a soluble pyridine nucleotide transhydrogenase (UdhA) on the production of poly(3-hydroxybutyrate) in *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology Progress*, 2006, 22 (2): 420-425.
- [29] Jeun Y S, Kim M D, Park Y C, et al. Expression of *Azotobacter vinelandii* soluble transhydrogenase perturbs xylose reductase-mediated conversion of xylose to xylitol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2003, 26 (3-6): 251-256.
- [30] Anderlund M, Nissen T L, Nielsen J, et al. Expression of the *Escherichia coli* *pntA* and *pntB* Genes, encoding nicotinamide nucleotide transhydrogenase, in *Saccharomyces cerevisiae* and its effect on product formation during anaerobic glucose fermentation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65 (6): 2333-2340.
- [31] Nissen T L, 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[J]. *Yeast*, 2001, 18 (1): 19-32.
- [32] Panagiotou G, Grotkjær T, Hofmann G, et al. Overexpression of a novel endogenous NADH kinase in *Aspergillus nidulans* enhances growth[J]. *Metabolic Engineering*, 2009, 11 (1): 31-39.
- [33] Larochelle M, Drouin S, Robert F, et al. Oxidative stress-activated zinc cluster protein *Stb5* has dual activator/repressor functions required for pentose phosphate pathway regulation and NADPH production[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2006, 26 (17): 6690.
- [34] Hector R E, Bowman M J, Skory C D, et al. The *Saccharomyces cerevisiae* *YMR315W* gene encodes an NADP (H)-specific oxidoreductase regulated by the transcription factor *Stb5p* in response to NADPH limitation[J]. *New Biotechnology*, 2009, 26 (3-4): 171-180.
- [35] Jeppsson M, Johansson B, Hahn-Hagerdal B, et al. Reduced oxidative pentose phosphate pathway flux in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains improves the ethanol yield from xylose[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68 (4): 1604.
- [36] Jeppsson M, Johansson B, Jensen P R, et al. The level of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity strongly influences xylose fermentation and inhibitor sensitivity in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains[J]. *Yeast*, 2003, 20 (15): 1263-1272.
- [37] 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.
- [38] Heux S, Cadiere A, Dequin S. Glucose utilization of strains lacking *PGI1* and expressing a transhydrogenase suggests differences in the pentose phosphate capacity among *Saccharomyces cerevisiae* strains[J]. *FEMS Yeast Research*, 2008, 8 (2): 217-224.

- [39] Oh Y J , Lee T H , Lee S H , et al. Dual modulation of glucose 6-phosphate metabolism to increase NADPH-dependent xylitol production in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic* , 2007 , 47 (1-2): 37-42.
- [40] Verho R , Londesborough J , Penttila M , et al. Engineering redox cofactor regeneration for improved pentose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Applied and Environmental Microbiology* , 2003 , 69 (10): 5892.
- [41] Martínez I , Zhu J , Lin H , et al. Replacing *Escherichia coli* NAD-dependent glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) with a NADP-dependent enzyme from *Clostridium acetobutylicum* facilitates NADPH dependent pathways[J]. *Metabolic Engineering* , 2008 , 10 (6): 352.
- [42] Chemler J A , Fowler Z L , 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.
- [43] Hibi M , Yukitomo H , Ito M , et al. Improvement of NADPH-dependent bioconversion by transcriptome-based molecular breeding[J]. *Applied and Environmental Microbiology* , 2007 , 73 (23): 7657.
- [44] Bro C , Regenber B , Nielsen J. Genome-wide transcriptional response of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with an altered redox metabolism[J]. *Biotechnology and Bioengineering* , 2004 , 85 (3): 269-276.

（上接第 2525 页）

- [53] 吴琳, 徐兴祥, 王禄增, 等. 泡沫碳化硅细胞相容性及动物体内植入实验研究[J]. *无机材料学报*, 2010 (2): 211-215.
- [54] Lévêque J, Rouzineau D, Prévost M, et al. Hydrodynamic behaviour and mass transfer performance of SiC foam[J]. *International Journal of Chemical Reactor Engineering* , 2010 , 8 (1): 1542-1580.
- [55] Lévêque J, Rouzineau D, Prévost M, et al. Hydrodynamic and mass transfer efficiency of ceramic foam packing applied to distillation[J]. *Chemical Engineering Science* , 2009, 64 (11) : 2607-2616.
- [56] 高国华. 新型多孔泡沫塔盘和规整填料的多尺度模拟研究[D]. 天津: 天津大学, 2011.
- [57] 曾菁. 新型规整填料的研究与性能研究[D]. 天津: 天津大学, 2012.
- [58] 刘学宽. 碳化硅泡沫塔板的流体力学性能和传质性能的研究[D]. 天津: 天津大学, 2012.
- [59] 刘霞. 碳化硅泡沫塔板的流体力学性能和传质性能的研究[D]. 天津: 天津大学, 2012.
- [60] Indranil G. Heat transfer correlation for high-porosity open-cell foam[J]. *International Journal of Heat and Mass Transfer* , 2009, 52 (5-6) : 1488-1494.
- [61] Boomsma K, Poulikakos D, Zwick F. Metal foams as compact high performance heat exchangers[J]. *Mechanics of Materials* , 2003, 35 (12) : 1161-1176.
- [62] Lu T J, Stone H A, Ashby M F. Heat transfer in open-cell metal foams[J]. *Acta Materialia* , 1998, 46 (10) : 3619-3635.

（上接第 2530 页）

- [17] Ito A, Li D, Ohsawa Y, et al. A new approach to improve the high-voltage cyclic performance of Li-rich layered cathode material by electrochemical pre-treatment[J]. *J. Power Sources*, 2008, 183 (1): 344-346.
- [18] Ito A, Sato Y, Sanada T, et al. Local structure of Li-rich layered cathode material $\text{Li}[\text{Ni}_{0.17}\text{Li}_{0.2}\text{Co}_{0.07}\text{Mn}_{0.56}]\text{O}_2$ [J]. *Electrochemistry (Tokyo, Jpn.)* , 2010, 78 (5): 380-383.
- [19] Ito A, Sato Y, Sanada T, et al. *In situ* X-ray absorption spectroscopic study of Li-rich layered cathode material $\text{Li}[\text{Ni}_{0.17}\text{Li}_{0.2}\text{Co}_{0.07}\text{Mn}_{0.56}]\text{O}_2$ [J]. *J. Power Sources*, 2011, 196 (16): 6828-6834.
- [20] Ito A, Shoda K, Sato Y, et al. Direct observation of the partial formation of a framework structure for Li-rich layered cathode material $\text{Li}[\text{Ni}_{0.17}\text{Li}_{0.2}\text{Co}_{0.07}\text{Mn}_{0.56}]\text{O}_2$ upon the first charge and discharge[J]. *J. Power Sources*, 2011, 196 (10): 4785-4790.
- [21] Bréger J, Jiang M, Dupré N, et al. High-resolution X-ray diffraction, DIFFaX, NMR and first principles study of disorder in the $\text{Li}_2\text{MnO}_3\text{-Li}[\text{Ni}_{1/2}\text{Mn}_{1/2}]\text{O}_2$ solid solution[J]. *J. Solid State Chem.*, 2005, 178 (9): 2575-2585.
- [22] 赵煜娟, 冯海兰, 赵春松, 等. 锂离子电池富锂正极材料 $x\text{Li}_2\text{MnO}_3\cdot(1-x)\text{LiMO}_2$ ($\text{M}=\text{Co, Fe, Ni}_{1/2}\text{Mn}_{1/2}\dots$) 的研究进展[J]. *无机材料学报*, 2011, 26 (7): 673-679.
- [23] Johnson C S, Li N, Lefief C, et al. Anomalous capacity and cycling stability of $x\text{Li}_2\text{MnO}_3\cdot(1-x)\text{LiMO}_2$ electrodes ($\text{M}=\text{Mn, Ni, Co}$) in lithium batteries at 50 [J]. *Electrochem. Commun.*, 2007, 9 (4): 787-795.
- [24] Wu Y, Manthiram A. Effect of surface modifications on the layered solid solution cathodes $(1-z)\text{Li}[\text{Li}_{1/3}\text{Mn}_{2/3}]\text{O}_2\text{-}(z)\text{Li}[\text{Mn}_{0.5-z}\text{Ni}_{0.5-z}\text{Co}_z]\text{O}_2$ [J]. *Solid State Ionics*, 2009, 180 (1): 50-56.
- [25] Armstrong A R, Holzapfel M, Novák P, et al. Demonstrating oxygen loss and associated structural reorganization in the lithium battery cathode $\text{Li}[\text{Ni}_{0.2}\text{Li}_{0.2}\text{Mn}_{0.6}]\text{O}_2$ [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128 (26): 8694-8698.