



研究报告

代谢改造克雷伯氏菌合成 D-1,2,4-丁三醇

李玉石^{1,2} 刘郁青^{1,2} 杨程雨^{1,2} 陆信曜^{1,2} 宗红^{1,2} 诸葛斌^{*1,2}

1 江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122

2 江南大学生物工程学院工业微生物研究中心 江苏 无锡 214122

摘要:【背景】D-1,2,4-丁三醇(D-1,2,4-butanetriol, BT)是一种重要的四碳多元醇,应用范围广,以木糖为底物的四步生化反应是目前最高效的 BT 生物合成路线。但大肠杆菌宿主存在严重的碳代谢抑制,限制了工程菌在木糖葡萄糖混合糖下的生长和 BT 合成。然而克雷伯氏菌具有生长速度更快、葡萄糖木糖混合糖利用效果好等优点。【目的】在碳代谢抑制效应较弱的克雷伯氏菌中构建以木糖为底物的 BT 合成途径,以提高混合糖下 BT 合成能力。【方法】将来源于 *Clostridium crescenti* 的木糖脱氢酶基因 *xdh* 和来源于 *Lactococcus lactis* 的 2-酮异戊酸脱羧酶基因 *kivD* 及来源于 *Escherichia coli* W3110 的木糖酸脱水酶基因 *yjhG* 克隆至 *Klebsiella pneumoniae* ZG25, 得到重组菌 *K. pneumoniae* ZG25-BT, 对重组菌进行培养条件和培养基优化,进一步敲除 *xylA* 以提高 BT 产量。【结果】在 37 °C、200 r/min、接种量 1%、诱导时间 2 h、添加 10.0 g/L CaCO₃ 控制 pH 条件下,敲除 *xylA* 的重组菌在 1.5 倍 LB 培养基中以 30.0 g/L 木糖和 10.0 g/L 葡萄糖为底物, BT 的产量达到 4.52 g/L, 摩尔转化率为 0.21 mol/mol, 收率为 15%, 较优化前分别提高 150%、62% 和 67%。【结论】实现了 BT 在 *K. pneumoniae* ZG25 中的发酵生产,同时通过培养条件和培养基的优化及 *xylA* 的敲除提高了 BT 合成能力,为进一步实验奠定了基础。

关键词: 木糖, D-1,2,4-丁三醇, 克雷伯氏菌, 培养优化, CRISPR/Cas9

Production of D-1,2,4-butanetriol by engineering

*Klebsiella pneumoniae*LI Yu-Shi^{1,2} LIU Yu-Qing^{1,2} YANG Cheng-Yu^{1,2} LU Xin-Yao^{1,2} ZONG Hong^{1,2}
ZHUGE Bin^{*1,2}

1 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

2 Research Center of Industrial Microbiology, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

Abstract: [Background] D-1,2,4-butanetriol (BT) is an important four-carbon polyol with a wide range of applications in industries. The four-step biochemical reaction using xylose as a substrate is currently the most efficient BT biosynthetic route. However, the *Escherichia coli* host has serious carbon catabolite repression which limits the growth and BT synthesis of xylose and glucose sugar mixture. *Klebsiella*

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (21708016)

*Corresponding author: Tel: 86-510-85918150; E-mail: bzhuge@126.com

Received: 07-01-2020; Accepted: 13-04-2020; Published online: 09-05-2020

基金项目: 国家自然科学基金(21708016)

*通信作者: Tel: 0510-85918150; E-mail: bzhuge@126.com

收稿日期: 2020-01-07; 接受日期: 2020-04-13; 网络首发日期: 2020-05-09

pneumoniae has the advantages of faster growth rate, better utilization of xylose and glucose sugar mixture. **[Objective]** Establishing BT synthesis pathway using xylose as a substrate in *K. pneumoniae*, which has a weak carbon catabolite repression, to improve BT production of sugar mixture. **[Methods]** The heterologous pathway of BT biosynthesis was constructed in *K. pneumoniae* ZG25 by co-overexpressing the xylose dehydrogenase gene (*xdh*) from *Clostridium crescenti*, 2-ketoisovalerate decarboxylase gene (*kivD*) from *Lactococcus lactis*, and xylose dehydratase gene (*yjhG*) from *E. coli* W3110, obtaining recombinant strain *K. pneumoniae* ZG25-BT. After optimization of the medium and culture conditions and deletion of *xylA*, significant increase in BT production was achieved. **[Results]** The optimal procedure for BT production in recombinant *K. pneumoniae* ZG25-BT strain without the *xylA* was achieved in 1.5-fold LB medium under the conditions of 30.0 g/L xylose, 10.0 g/L glucose, 37 °C, 200 r/min rotation speed, adding 10.0 g/L CaCO₃ to control pH and 1% inoculation amount followed by 2 h of induction with the addition of IPTG, which made BT titer, molar conversion and yield up to 4.52 g/L, 0.21 mol/mol and 15%, respectively, representing a 150%, 62% and 67% increase compared with that of unoptimizable condition, respectively. **[Conclusion]** A fermentative process of BT production in *K. pneumoniae* ZG25 is achieved. Optimization of the culture conditions and medium and the knockout of *xylA* are applied to improve BT production. Furthermore, this work provides a useful host for the improved BT production through metabolic engineering.

Keywords: Xylose, D-1,2,4-butanetriol, *Klebsiella pneumoniae*, Culture optimization, CRISPR/Cas9

D-1,2,4-丁三醇(D-1,2,4-butanetriol, BT)是一种四碳多元醇,性质与甘油类似,在军事、医药等领域具有广泛的用途^[1]。在军工领域,BT作为1,2,4-丁三醇三硝酸酯的合成前体备受关注,有望取代危险性的硝化甘油,具有巨大的市场潜力。此外,BT还可用于卷烟添加剂和高分子材料交联剂等^[2-5]。

目前BT的生产主要采用条件苛刻、环境污染严重、产品转化率低的化学法^[2,6]。然而,原料成本低廉、反应条件温和、对环境友好的生物合成法日渐成熟,成为当前的研究热点。2003年,有研究者首次报道BT的生物合成法:利用*Pseudomonas fragi*和*Escherichia coli*两种微生物,以木糖或L-阿拉伯糖为底物,经四步酶促反应合成BT^[1]。之后研究人员将BT合成的4个关键酶基因在*E. coli*中进行表达,大大简化了流程工艺^[7]。*Saccharomyces cerevisiae*中同样成功实现BT合成,产量为1.70 g/L^[8]。近年来,本研究室和国内外其他团队对*E. coli*系统进行了大量研究以提高BT产量,但*E. coli*存在明显的碳代谢抑制现象,限制了混合糖下菌株生长和产物合成^[9-14]。前期研究发现,克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)具有生长速度更快、葡萄糖

木糖混合糖利用效果好等优点^[15-16]。

以木糖为底物的四步生化反应是目前最高效的BT生物合成路线。基于此,本研究在*K. pneumoniae* ZG25中构建BT合成途径,木糖经木糖脱氢酶(Xdh)氧化生成木糖酸,木糖酸经木糖酸脱水酶(YjhG)脱水生成2-酮-3-脱氧-木糖酸(2-keto-3-deoxy-xylonate, KDX),KDX经2-酮异戊酸脱羧酶(KivD)脱羧生成3,4-二羟基丁醛,最后经醇脱氢酶(YqhD)氧化生成BT(图1);通过进一步优化发酵条件,敲除木糖分支代谢途径*xylA*,提高重组*K. pneumoniae* ZG25-BT的BT产量,为后续研究提供新的思路和方法。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

研究中所用菌株与质粒见表1。

1.1.2 主要试剂和仪器

高保真酶、限制性内切酶购自宝生物工程(大连)有限公司;一步法克隆试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司;BT标准品购自西格玛奥德丽奇公司;胰蛋白胨和酵母提取物购自Oxiod公司;质粒提取试

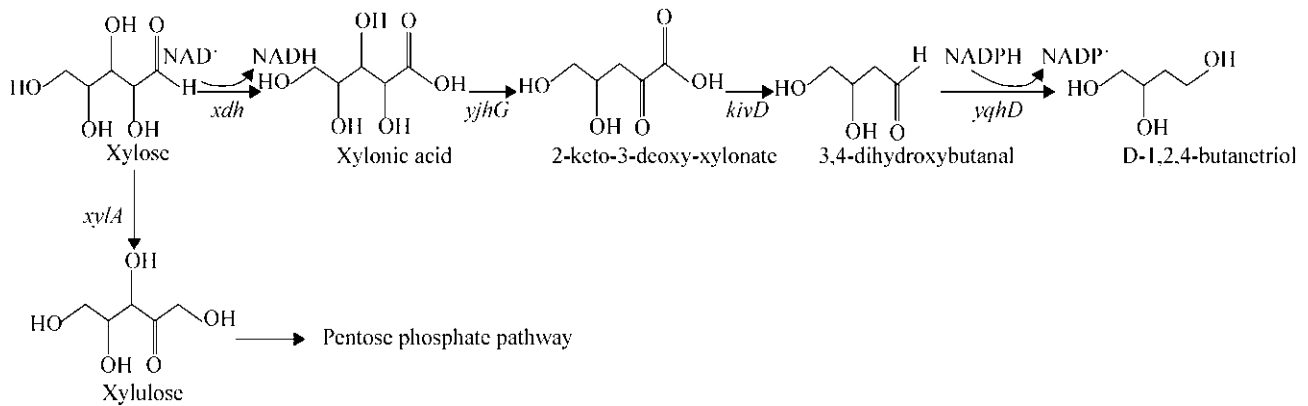


图 1 重组克雷伯氏菌利用木糖合成 BT 的代谢途径设计

Figure 1 The metabolic pathway design from xylose to BT in recombinant *K. pneumoniae*

注: *xdh*: 编码来自 *Caulobacter crescentus* 的木糖脱氢酶; *yjhG*: 编码来自 *E. coli* W3110 的木糖酸脱水酶; *kivD*: 编码来自 *Lactococcus lactis* 的 2-酮异戊酸脱羧酶; *yqhD*: 编码来自 *K. pneumoniae* ZG25 的醇脱氢酶; *xylA*: 编码来自 *K. pneumoniae* ZG25 的木糖异构酶。
 Note: *xdh*: Encoding xylose dehydrogenase from *Caulobacter crescentus*; *yjhG*: Encoding xylose dehydratase from *E. coli* W3110; *kivD*: Encoding 2-keto isovalerate decarboxylase from *Lactococcus lactis*; *yqhD*: Encoding alcohol dehydrogenase from *K. pneumoniae* ZG25; *xylA*: Encoding xylose isomerase from *K. pneumoniae* ZG25.

表 1 文中所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this work

菌株/质粒名称 Strains/Plasmids name	相关特性 Characteristics	来源 Sources
Strains		
<i>E. coli</i> JM109	<i>Escherichia coli</i> JM109 wild type; Cloning host	Our laboratory
<i>E. coli</i> W3110	<i>Escherichia coli</i> W3110 wild type; Source of <i>yjhG</i>	Our laboratory
<i>K. pneumoniae</i> ZG25	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ZG25 wild type	Our laboratory
<i>K. pneumoniae</i> ZG25-BT	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ZG25 carrying p <i>Etac-kivD-tac-yjhG-tac-xdh</i>	This work
<i>K. pneumoniae</i> ZG25-XA-BT	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ZG25 Δ <i>xylA</i> carrying p <i>Etac-kivD-tac-yjhG-tac-xdh</i>	This work
Plasmids		
pCas9	P _{cas-cas9} , Kan ^r	Our laboratory
pTargetF-PMB	pTarget added sgRNA, Spe ^r	This work
p <i>Etac</i>	Tac promoter; Source of <i>tac</i> , Kan ^r	Our laboratory
p <i>Etac-kivD-tac-xdh</i>	Tac promoter; Kan ^r	Our laboratory
p <i>Etac-kivD-tac-yjhG-tac-xdh</i>	Tac promoter; Kan ^r	This work

剂盒、纯化试剂盒、壮观霉素 (spectinomycin, Spe)、阿拉伯糖、卡那霉素 (kanamycin, Kan) 和异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG) 购自生工生物工程(上海)有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC)、气质联用仪 (gas chromatography mass spectrometry, GC-MS), 赛默飞世尔科技公司; 电转仪、PCR 仪, Eppendorf 公司。

1.1.3 培养基

LB 培养基(g/L): 酵母提取物 5.0, 胰蛋白胨 10.0, 氯化钠 10.0。

发酵培养基(g/L): 酵母提取物 5.0, 胰蛋白胨 10.0, 氯化钠 10.0, 葡萄糖 5.0, 木糖 20.0。

培养基使用前均 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

1.1.4 引物

研究中所用引物见表 2, 所有引物和测序均由苏州金唯智生物科技有限公司完成。

表 2 文中所用引物

Table 2 Primers used in this work

引物名称 Primers name	引物序列 Primers sequence (5'→3')
T ₁	agcggataacaattcccc <u>TCTAGAC</u> GGAGCTTATCGACTGCAC
T ₂	TGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCC
P ₁	ttcacacaggaacaATGTCTGTTTCGCAATATTTTTGC
P ₂	GATGATGATGGCTGCTGCC <u>CATGG</u> tcagttttattcataaaatcgcgcaa
xyIA-F ₁	AACGCGGAAAAGCAGGGC
xyIA-R ₁	TCCATATTCAGAGATGCGGCGAAT
xyIA-F ₂	atctctgaatatggaTGACCGGCGTCGCAACCA
xyIA-R ₂	CTTCGGCGCCGTAAAGCC
Sg-xyIA-F	tggcacaccttctgctggaaGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGT
Sg-xyIA-R	ttccagcagaaggtgccaACTAGTATTATACCTAGGACTGAGC

注：下划线部分为酶切位点，小写字母表示同源臂序列。

Note: The underlined are restriction enzyme cutting sites and the sequences of homologous arms are indicated with lowercase letters.

1.2 方法

1.2.1 表达质粒构建

采用 Primer 软件，以 NCBI 已报道的 *E. coli* W3110 中 *yjhG* 序列 (GenBank 登录号为 GCA_000010245.1) 为模板，设计引物 P₁ 和 P₂，以 p*Etac* 质粒为模板，设计引物 T₁ 和 T₂，分别通过 PCR 扩增得到 *yjhG* 片段和 *tac* 启动子序列 (所用引物见表 2)。

用 *Xba* I 和 *Nco* I 双酶切线性化 p*Etac-kivD-tac-xdh* 质粒^[9]。使用一步法克隆试剂盒连接基因片段和线性化质粒 (操作步骤见说明书)，连接产物转入 *E. coli* JM109 中，在 50 mg/L 的 Kan 抗性 LB 平板上筛选阳性转化子，菌落 PCR (引物 T₁ 和 P₂) 正确的基础上进行双酶切和基因测序验证，将序列正确的质粒命名为 p*Etac-kivD-tac-yjhG-tac-xdh*。

PCR 反应体系 (50 μL，菌落 PCR 为 10 μL)：上、下游引物 (10 μmol/L) 各 0.5 μL，模板 0.5 μL (菌落 PCR 挑取单菌落为模板)，ddH₂O 23.5 μL (菌落 PCR 为 4 μL)，2×PrimeSTAR HS DNA Polymerase 25 μL (菌落 PCR 为 5 μL)。PCR 反应条件：95 °C 4 min；94 °C 30 s，X °C 15 s，72 °C Y s，25 个循环；72 °C 5 min (X 根据引物的 T_m 值设置，Y 根据每分钟 1 000 bp 的扩增速度设置)。

1.2.2 测定方法

发酵产物采用 GC-MS 进行定性分析，具体方

法见参考文献 [17]。

发酵液中发酵产物采用 HPLC 测定。流动相为 5 mmol/L 的 H₂SO₄，色谱柱温度为 60 °C，流速为 0.6 mL/min。使用示差折光及紫外检测器，外标法定量。

木糖酸的测定方法见参考文献 [17]。SDS-PAGE 和酶活的检测方法见参考文献 [18-19]。生物量 (dry cell weight, DCW) 的测定和计算方法见参考文献 [20]。

1.2.3 摇瓶发酵及培养优化

挑取 50 mg/L 的 Kan 抗性 LB 平板上的 *K. pneumoniae* ZG25-BT 单菌落于 LB 液体培养基中，37 °C、200 r/min 培养过夜。将种子液以 1% 接种量 (体积比，下同) 转接至发酵培养基 (250 mL 装液 50 mL)，37 °C、200 r/min 培养；对应菌株加入终浓度为 50 mg/L 的 Kan 抗生素；需要诱导剂的菌株，培养 2 h 后加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG。所有发酵设置 3 个平行实验，发酵 48 h。

培养条件优化：依次研究不同诱导时间 (2、4、6 h)，不同接种量 (1%、5%、10%)，不同转速 (150、200、250 r/min)，不同 pH 条件 (有无添加 10.0 g/L CaCO₃) 对 *K. pneumoniae* ZG25-BT 生物量、木糖酸积累量、BT 产量的影响。

培养基组分优化：在培养条件优化的基础

上, 研究不同葡萄糖浓度(5.0、10.0、15.0 g/L), 不同木糖浓度(25.0、30.0、35.0 g/L)对 *K. pneumoniae* ZG25-BT 生物量、木糖酸积累量、BT 产量的影响; 并研究提高木糖浓度无法提高 *K. pneumoniae* ZG25-BT 的 BT 产量下, 葡萄糖的添加对 *K. pneumoniae* ZG25-BT 生物量、木糖酸积累量、BT 产量的影响(具体木糖浓度根据实验结果确定)。对糖浓度进行优化的基础上, 研究不同 LB 浓度(1×LB、1.5×LB、2×LB)对 *K. pneumoniae* ZG25-BT 生物量、木糖酸积累量、BT 产量的影响。

1.2.4 基因敲除菌的构建

根据参考文献[21]中报道的 CRISPR/Cas9 技术进行基因敲除。根据 NCBI 数据库公布的 *K. pneumoniae* (GeneBank 登录号为 CP000964.1)基因组信息设计 *xylA* 敲除所需引物(表 2), 分别构建含有 sgRNA 的 pTargetF-PMB^[19]和目的基因上、下游各 300 bp 的融合片段^[22]。将 pCas9 质粒电转入 *K. pneumoniae* ZG25。加入终浓度为 50 mmol/L 的阿拉伯糖诱导 pCas9 质粒表达, 将融合片段和 pTargetF-PMB 质粒电转入含有 pCas9 质粒的 *K. pneumoniae* ZG25, 涂布含有 50 mg/L Kan 和 100 mg/L Spe 的双抗性 LB 平板, 30 °C 培养过夜(不超过 24 h), 然后通过菌落 PCR (引物 *xylA*-F₁ 和 *xylA*-R₂, 反应体系和反应条件见 1.2.1)筛选阳性转化子。敲除成功的菌株在对数生长期加入 0.5 mmol/L IPTG 诱导消除 pTargetF-pMB 质粒; 42 °C 传代培养消除 pCas9 质粒。

2 结果与分析

2.1 *K. pneumoniae* ZG25 中 BT 合成途径的构建

pEtac-*kivD-tac-yjhG-tac-xdh* 质粒经酶切, 电泳检测(图 2)和测序结果表明载体 pEtac-*kivD-tac-yjhG-tac-xdh* 构建成功。

将表达载体 pEtac-*kivD-tac-yjhG-tac-xdh* 转化至 *K. pneumoniae* ZG25, 得到重组菌 *K. pneumoniae* ZG25-BT。*K. pneumoniae* ZG25-BT 培养 2 h, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导 48 h。SDS-PAGE 电泳分析见图 3。与 *K. pneumoniae*

ZG25 相比, *K. pneumoniae* ZG25-BT 胞内可溶性蛋白在 29、60 和 70 kD 处有明显的重组蛋白条带, 酶活检测发现重组蛋白均有催化活性(图 4), 表明重组蛋白表达成功。

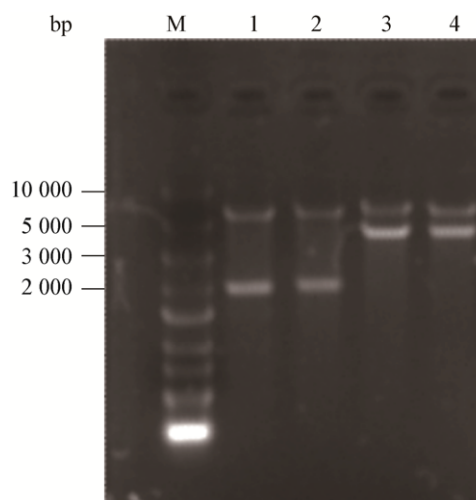


图 2 pEtac-*kivD-tac-yjhG-tac-xdh* 质粒的酶切验证
Figure 2 Enzyme digestion of pEtac-*kivD-tac-yjhG-tac-xdh* plasmid

注: M: 2503 DNA Marker; 1、2: *Apa* I 和 *Hind* III 双酶切 pEtac-*kivD-tac-xdh*; 3、4: *Apa* I 和 *Hind* III 双酶切 pEtac-*kivD-tac-yjhG-tac-xdh*。

Note: M: 2503 DNA Marker; 1, 2: The enzyme digestion products by *Apa* I and *Hind* III of pEtac-*kivD-tac-xdh*; 3, 4: The enzyme digestion products by *Apa* I and *Hind* III of pEtac-*kivD-tac-yjhG-tac-xdh*。

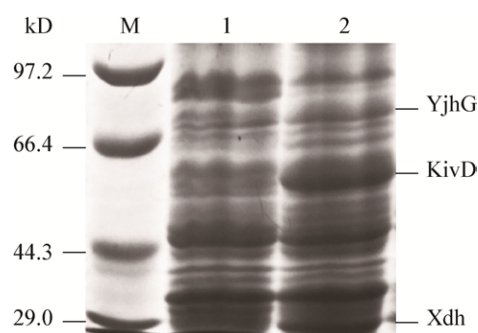


图 3 Xdh、KivD 和 YjhG 表达情况的 SDS-PAGE 电泳分析
Figure 3 SDS-PAGE analysis of Xdh, KivD and YjhG expression

注: M: 标准蛋白 Marker; 1: *K. pneumoniae* ZG25 胞内可溶性蛋白; 2: *K. pneumoniae* ZG25-BT 胞内可溶性蛋白。

Note: M: Protein Marker; 1: Intracellular soluble protein of the *K. pneumoniae* ZG25; 2: Intracellular soluble protein of the *K. pneumoniae* ZG25-BT.

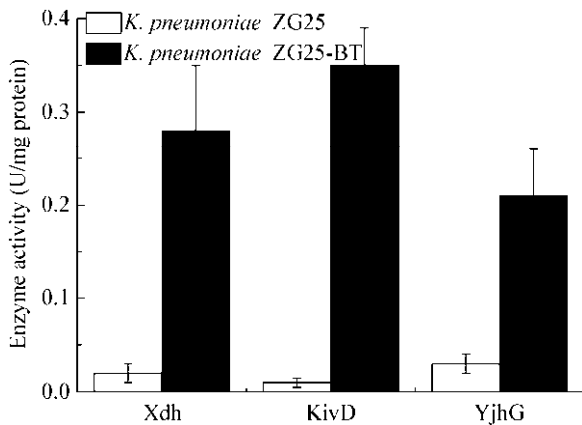


图4 *K. pneumoniae* ZG25 和 *K. pneumoniae* ZG25-BT 中 Xdh、KivD 和 YjhG 酶活检测

Figure 4 The enzyme activities of Xdh, KivD and YjhG in *K. pneumoniae* ZG25 and *K. pneumoniae* ZG25-BT

重组菌 *K. pneumoniae* ZG25-BT 以木糖为底物的发酵液经 GC-MS 分析, 发现存在 BT (图 5), 表明成功实现以木糖合成 BT。BT 产量为 1.81 g/L, 摩尔转化率为 0.13 mol/mol, 收率为 9%, 该收率为理论值的 9%。

2.2 摇瓶发酵培养条件优化

为进一步提高产量, 对诱导时间、接种量、转速、pH 等条件进行依次优化。其中, 诱导菌龄对最终生物量和产量影响不大(图 6A)。提高接种量对生物量略有影响, 但对 BT 合成无明显影响(图 6B)。200 r/min 时生物量为 2.87 g/L, BT 产量为 1.81 g/L, 分别比 150 r/min 时提高 70% 和 123%。虽然提高转速至 250 r/min 能提高 18% 生物量, 但 BT 产量无提高(图 6C)。添加 10.0 g/L CaCO₃ 对生物量无明显影响, 但中间产物木糖酸降低 43% (2.00 g/L), BT 产量提高 39% (2.52 g/L) (图 6D)。

2.3 摇瓶发酵培养基组分优化

2.3.1 葡萄糖、木糖浓度对重组菌发酵合成 BT 的影响

增加葡萄糖能够提高生物量、减少木糖酸积累。葡萄糖浓度为 10.0 g/L 时生物量、BT 产量和木糖酸积累量分别比 5.0 g/L 时提高 12%、12% (2.82 g/L) 和降低 20%。继续提高葡萄糖浓度到 15.0 g/L, 生物量和木糖酸积累量分别比 10.0 g/L

时提高 4% 和降低 8%, 但 BT 产量略有下降 4% (2.70 g/L) (图 7A)。

木糖浓度的增加对提高生物量无明显影响, 木糖浓度为 30.0 g/L 时 BT 产量相比 25.0 g/L 时提高 10% (2.90 g/L); 继续增加木糖浓度, 木糖酸积累量增加, 生物量和 BT 产量出现下降(图 7B)。

继续增加木糖浓度无法提高 BT 产量。进一步考察在此条件下添加葡萄糖的影响。分别设置 30.0 g/L 木糖、30.0 g/L 木糖+5.0 g/L 葡萄糖、35.0 g/L 木糖的 3 个浓度。由图 7C 可知, 30.0 g/L 木糖+5.0 g/L 葡萄糖下生物量、BT 产量和木糖酸积累量比 30.0 g/L 木糖时分别提高 16%、32% (2.90 g/L) 和 13%。35.0 g/L 木糖下仅生物量比 30.0 g/L 木糖时略有提高 7%, 但 BT 产量和木糖酸积累量无明显变化。

2.3.2 LB 浓度对重组菌发酵合成 BT 的影响

由前述的结果可知, 合适的木糖和葡萄糖浓度有利于提高生物量和 BT 产量。选择 30.0 g/L 木糖和 10.0 g/L 葡萄糖作为后续发酵液中糖浓度。此时培养基中碳源充足, 考察提高氮源条件下的重组菌发酵情况。由图 8 可知, 当 LB 浓度为 1.5 倍 LB 时, BT 产量最高, 达到 3.31 g/L, 相比 1 倍 LB 浓度时提高 11%, 生物量也略有提高; LB 浓度继续升高时, 虽然木糖酸积累量降低, 但是 BT 产量不再增加。经优化得到最适发酵条件为: 1.5×LB 基础培养基, 添加 30.0 g/L 木糖、10.0 g/L 葡萄糖, 接种量 1%, 诱导时间 2 h, 转速 200 r/min, 添加 10.0 g/L CaCO₃ 控制 pH。后续摇瓶发酵均采用此条件。

2.4 xylA 敲除对 BT 合成的影响

由于重组菌的磷酸戊糖代谢途径与 BT 途径竞争木糖碳流, 为提高木糖转化率, 敲除宿主菌的 xylA。PCR 验证表明基因敲除成功(图 9)。

K. pneumoniae ZG25-XA-BT 和 *K. pneumoniae* ZG25-BT 摇瓶发酵结果见图 10。*K. pneumoniae* ZG25-XA-BT 生物量降低 8%, 木糖酸积累量提高 44%, 但 BT 产量提高 37% (4.52 g/L), 摩尔转化率提高 34% (0.21 mol/mol), 收率提高 37% (15%)。表明 xylA 的敲除促进了 BT 合成, 产量和转化率均有提高。

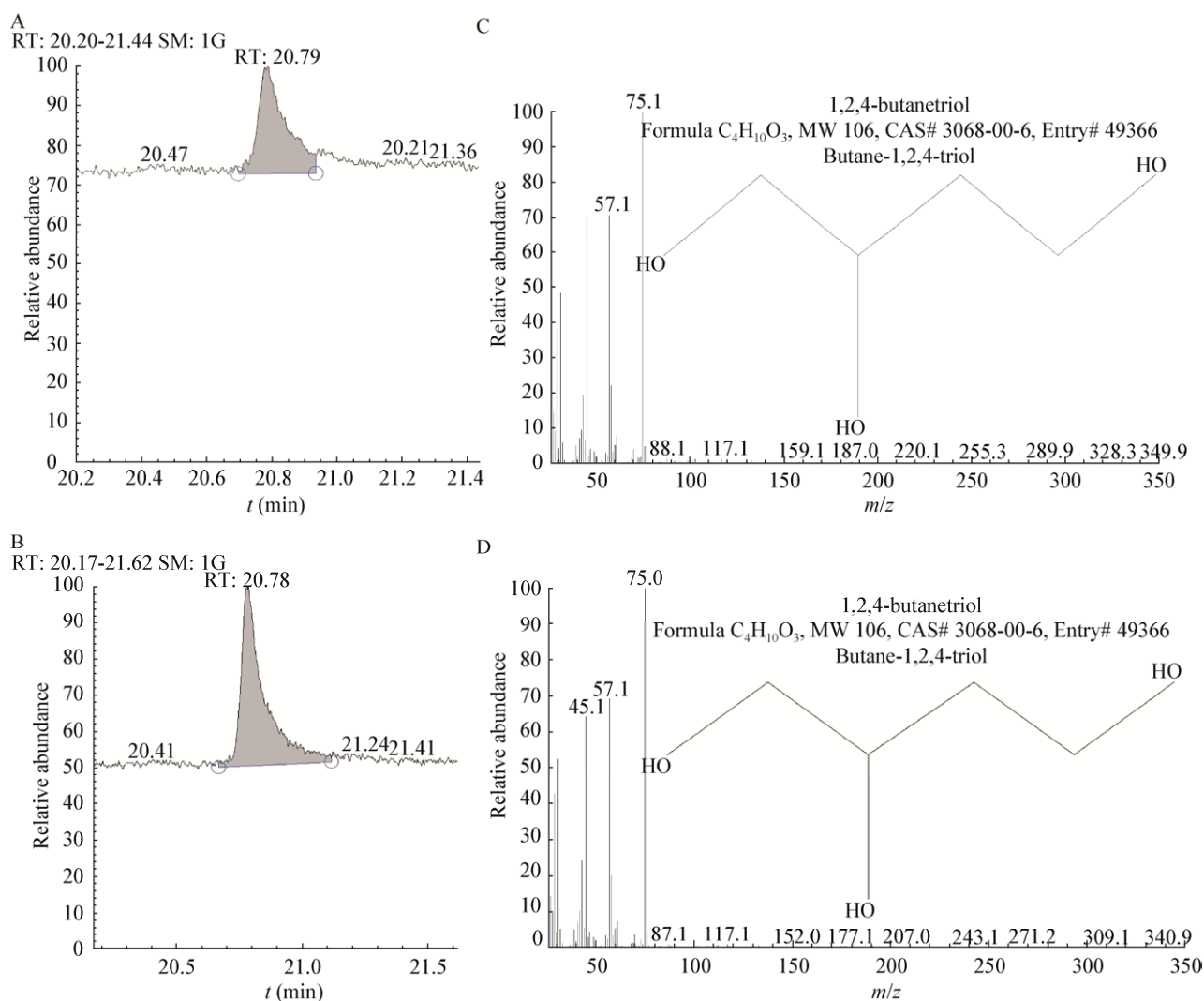


图 5 BT 标准样品和发酵液的 GC-MS 分析

Figure 5 The GC-MS analysis of BT standard and fermentation broth

注: A: GC 分析 BT 标准样品; B: GC 分析发酵液; C: MS 分析 BT 标准样品; D: MS 分析发酵液。

Note: A: The GC analysis of BT standard; B: The GC analysis of fermentation broth; C: The MS analysis of BT standard; D: The MS analysis of fermentation broth.

3 讨论

BT 作为一种非天然化合物迄今为止尚未在生物体内发现。本研究室和国内外研究人员利用 *E. coli* 系统对 BT 生物合成进行了大量研究。但在 *E. coli* 中构建以木糖为底物的 BT 合成途径后, BT 产量仅为 0.90 g/L, 收率为 3%, 摩尔转化率为 0.04 mol/mol^[14]。本研究在 *K. pneumoniae*

ZG25 中构建 BT 合成途径, 产量为 1.81 g/L, 收率为 9%, 摩尔转化率为 0.13 mol/mol, 与 *E. coli* 相比在产量、收率和摩尔转化率上均有明显优势^[23]。虽然有报道在 *S. cerevisiae* 中实现了 BT 合成, 但是发酵时间长达 96 h, 优化后 BT 产量为 1.70 g/L^[8], 但本研究 *K. pneumoniae* 发酵时间仅为 48 h, 优化后产量为 4.52 g/L。以上均表明 *K. pneumoniae* 是合成 BT 的优良宿主。

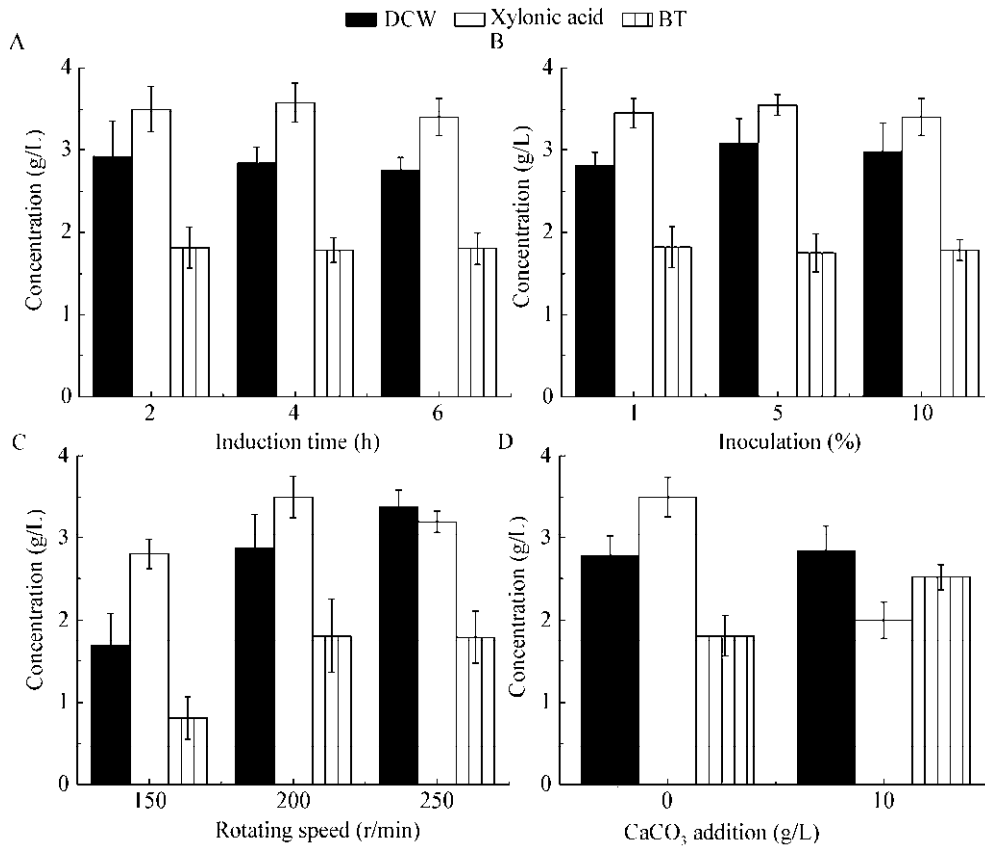


图6 不同培养条件对 *K. pneumoniae* ZG25-BT 生物量、木糖酸积累量及 BT 产量的影响

Figure 6 Effects of different culture conditions on the DCW, xylonic acid accumulation and BT production in *K. pneumoniae* ZG25-BT

注: A: 诱导时间; B: 接种量; C: 转速; D: 控制 pH.

Note: A: Induction time; B: Inoculation; C: Rotating speed; D: Control pH.

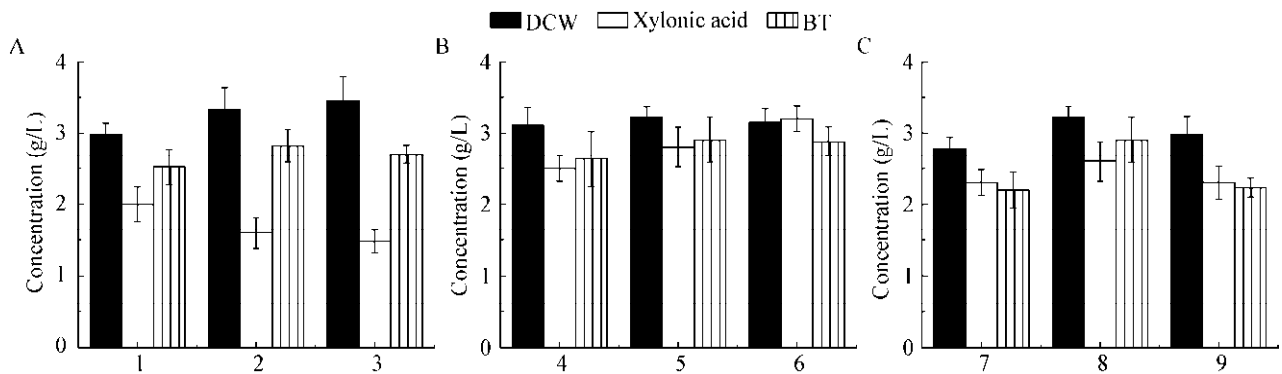


图7 葡萄糖(A)、木糖(B)浓度和葡萄糖添加(C)对 *K. pneumoniae* ZG25-BT 生物量、木糖酸积累量和 BT 产量的影响

Figure 7 Effects of glucose (A), xylose (B) concentrations and adding glucose (C) on the DCW, xylonic acid accumulation and BT production in *K. pneumoniae* ZG25-BT

注: A: 1: 添加 20.0 g/L 木糖和 5.0 g/L 葡萄糖; 2: 添加 20.0 g/L 木糖和 10.0 g/L 葡萄糖; 3: 添加 20.0 g/L 木糖和 15.0 g/L 葡萄糖. B: 4: 添加 25.0 g/L 木糖和 5.0 g/L 葡萄糖; 5: 添加 30.0 g/L 木糖和 5.0 g/L 葡萄糖; 6: 添加 35.0 g/L 木糖和 5.0 g/L 葡萄糖. C: 7: 添加 30.0 g/L 木糖; 8: 添加 30.0 g/L 木糖和 5.0 g/L 葡萄糖; 9: 添加 35.0 g/L 木糖.

Note: A: 1: Adding 20.0 g/L xylose and 5.0 g/L glucose; 2: Adding 20.0 g/L xylose and 10.0 g/L glucose; 3: Adding 20.0 g/L xylose and 15.0 g/L glucose. B: 4: Adding 25.0 g/L xylose and 5.0 g/L glucose; 5: Adding 30.0 g/L xylose and 5.0 g/L glucose; 6: Adding 35.0 g/L xylose and 5.0 g/L glucose. C: 7: Adding 30.0 g/L xylose; 8: Adding 30.0 g/L xylose and 5.0 g/L glucose; 9: Adding 35.0 g/L xylose.

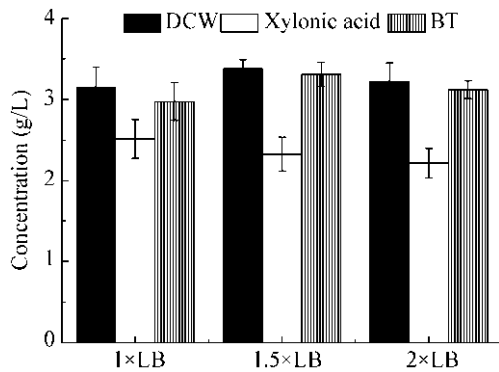


图 8 LB 浓度对 *K. pneumoniae* ZG25-BT 生物量、木糖酸积累量和 BT 产量的影响

Figure 8 Effects of LB concentrations on the DCW, xyloic acid accumulation and BT production in *K. pneumoniae* ZG25-BT

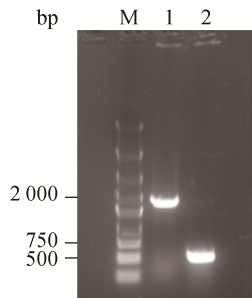


图 9 *xyIA* 敲除菌 PCR 验证

Figure 9 PCR verification of *xyIA* knockout mutants

注: A: M: 2503 DNA Marker; 1: *K. pneumoniae* ZG25-BT 中 *xyIA* PCR 产物; 2: *K. pneumoniae* ZG25-XA-BT 中 *xyIA* PCR 产物。
Note: A: M: 2503 DNA Marker; 1: PCR production of *xyIA* in *K. pneumoniae* ZG25-BT; 2: PCR production of *xyIA* in *K. pneumoniae* ZG25-XA-BT.

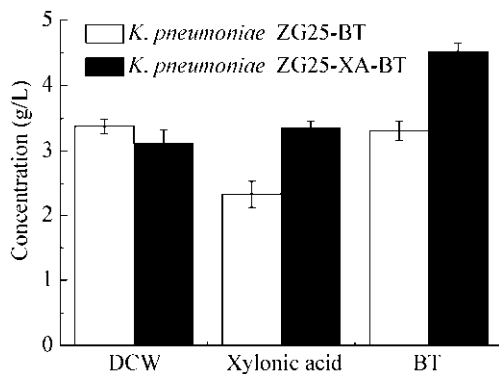


图 10 *K. pneumoniae* ZG25-XA-BT 和 *K. pneumoniae* ZG25-BT 摇瓶发酵结果分析

Figure 10 The shake fermentation results analysis in *K. pneumoniae* ZG25-XA-BT and *K. pneumoniae* ZG25-BT

接种量对增加 BT 产量无明显影响,而在 *E. coli* 中的研究表明 BT 产量随接种量增加而提高^[11]。与 *E. coli* 相比, *K. pneumoniae* 生长速度更快,能更快地进行 BT 合成。转速是控制溶氧水平的有效方法,木糖合成 BT 的第一步反应为氧化反应。充足的氧气使木糖向木糖酸转化高效进行,但木糖酸脱水酶的催化能力较弱,无法及时转化木糖酸,造成木糖酸的积累。高溶氧利于菌株生长代谢,一部分木糖经磷酸戊糖途径用于自身生长和代谢,生物量提高。BT 合成过程中会有木糖酸等酸性物质积累,导致 pH 不断下降,添加 CaCO_3 控制 pH 改善菌株生长环境有利于 BT 合成途径中 YjhG 等蛋白的表达,进而提高 BT 产量。在 *E. coli* 中的研究同样表明 pH 的控制是提高 BT 产量的一个重要因素^[11,18]。

本研究中木糖作为培养基中唯一碳源时,其流向磷酸戊糖途径用于重组菌自身生长代谢,但重组菌生长受限,BT 产量较低,继续添加木糖无助于 BT 合成,葡萄糖的加入可有效促进 BT 合成,原因可能是葡萄糖增强了重组菌的生长代谢,减弱了木糖向磷酸戊糖途径的代谢。然而大肠杆菌中的研究表明,补加葡萄糖不利于 *E. coli* 有效利用木糖合成 BT^[24]。同时 *E. coli* 存在较严重的碳代谢阻遏效应,当添加 10.0 g/L 葡萄糖时,发酵前 24 h 无 BT 合成,添加 20.0 g/L 时,发酵过程中无 BT 产生,限制了混合糖下产物的合成^[13]。有研究表明, *K. pneumoniae* 使用葡萄糖和木糖共同生成 2,3-丁二醇,两种糖的代谢速度相当^[15]。本研究中 *K. pneumoniae* 的碳代谢阻遏效应较弱,当增加葡萄糖浓度至 15.0 g/L 时,细胞才开始受到碳代谢抑制的影响,而 BT 产量仅略微下降 4%。木糖浓度的提高加快菌株对木糖的摄取,但受下游途径效率的影响,使得木糖和木糖酸在胞内大量积累,降低了底物的转化效率。另外, LB 浓度的提高提供了充足的氮源,有利于 YjhG 等外源蛋白的合成和菌株的生长, BT 产量进一步提高。

本研究中木糖分支代谢途径会竞争流向 BT 的碳流, 敲除 *xyIA* 后更多的木糖流向 BT 合成途径, 木糖酸的积累和 BT 产量均出现明显提高; 敲除 *xyIA* 后, 菌株虽无法利用木糖进行自身生长代谢, 但是 CaCO_3 的加入、氮源的充足供给和葡萄糖的补加, 利于 YjhG 等外源蛋白的合成和菌株的生长, BT 产量并未下降。在 *E. coli* 中敲除 *xyIA*, 生物量明显降低, 虽然单位菌体产量提高, 但是 BT 产量仍然降低(单一木糖碳源)^[18]或 *xyIA* 的敲除对 BT 产量提高不显著(木糖、葡萄糖混合糖)^[13]。

4 结论

本研究在 *K. pneumoniae* ZG25 中成功构建了 BT 的合成途径。在此基础上对培养条件和培养基进行优化, 最适发酵条件为: 1.5×LB 基础培养基, 添加 30.0 g/L 木糖、10.0 g/L 葡萄糖, 接种量 1%, 诱导时间 2 h, 转速 200 r/min, 添加 10.0 g/L CaCO_3 控制 pH。*K. pneumoniae* ZG25-XA-BT 摇瓶发酵 BT 产量提高到 4.52 g/L, 摩尔转化率为 0.21 mol/mol, 收率为 15%, 较优化前分别提高 150%、62% 和 67%。本研究为微生物发酵合成 BT 提供了新的思路和方法, 为进一步高效合成 BT 奠定了基础, 后续研究可对 BT 合成中副产物途径相关基因进行系统敲除, 以及优化发酵罐水平, 以提高 BT 产量。

REFERENCES

- [1] Niu W, Molefe MN, Frost JW. Microbial synthesis of the energetic material precursor 1,2,4-butanetriol[J]. Journal of the American Chemical Society, 2003, 125(43): 12998-12999
- [2] Luo AL, Qiao JJ, Song XC. Synthesis of 1,2,4-hydroxyl-butane[J]. Northwest Pharmaceutical Journal, 2007, 22(3): 144-145 (in Chinese)
罗阿利, 乔建军, 宋新潮. 1,2,4-丁三醇的合成工艺研究[J]. 西北药学杂志, 2007, 22(3): 144-145
- [3] Yamada-Onodera K, Norimoto A, Kawada N, et al. Production of optically active 1,2,4-butanetriol from corresponding racemate by microbial stereoinversion[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2007, 103(5): 494-496
- [4] Li CF, Xu BG. A review on the synthesis of 1,2,4-butanetriol[J]. Hunan Chemical Industry, 2000, 30(3): 9-11 (in Chinese)
李赤峰, 徐保国. 1,2,4-丁三醇合成工艺述评[J]. 湖南化工, 2000, 30(3): 9-11
- [5] Wang ZJ, Bao YY. Study of continual spraying nitration technique for the mixture of glycerine and 1,2,4-butanetriol[J]. Explosives, 1997(1): 6-7 (in Chinese)
王振江, 薄月英. 甘油/1,2,4-丁三醇混合醇连续喷雾硝化技术研究[J]. 火炸药, 1997(1): 6-7
- [6] Luk KC, Wei CC. Preparation of derivatives of (R)-1,2,4-butanetriol from L-ascorbic acid[J]. Synthesis, 1988(3): 226-228
- [7] Valdehuesa KNG, Liu HW, Ramos KRM, et al. Direct bioconversion of D-xylose to 1,2,4-butanetriol in an engineered *Escherichia coli*[J]. Process Biochemistry, 2014, 49(1): 25-32
- [8] Bamba T, Yukawa T, Guirimand G, et al. Production of 1,2,4-butanetriol from xylose by *Saccharomyces cerevisiae* through Fe metabolic engineering[J]. Metabolic Engineering, 2019, 56: 17-27
- [9] Jing PY, Cao X, Lu XY, et al. Modification of an engineered *Escherichia coli* by a combined strategy of deleting branch pathway, fine-tuning xylose isomerase expression, and substituting decarboxylase to improve 1,2,4-butanetriol production[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2018, 126(5): 547-552
- [10] Wang X, Xu NN, Hu SW, et al. D-1,2,4-butanetriol production from renewable biomass with optimization of synthetic pathway in engineered *Escherichia coli*[J]. Bioresource Technology, 2018, 250: 406-412
- [11] Sun L, Yang F, Zhu TC, et al. Optimization of 1,2,4-butanetriol synthetic pathway in *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2016, 32(1): 51-63 (in Chinese)
孙雷, 杨帆, 朱泰承, 等. 大肠杆菌合成 1,2,4-丁三醇的途径优化[J]. 生物工程学报, 2016, 32(1): 51-63
- [12] Zhang NN, Wang JB, Zhang Y, et al. Metabolic pathway optimization for biosynthesis of 1,2,4-butanetriol from xylose by engineered *Escherichia coli*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2016, 93-94: 51-58
- [13] Ma PF, Meng J, Zhou J, et al. Biosynthesis of D-1,2,4-butanetriol from D-xylose by recombinant *Escherichia coli*[J]. CIESC Journal, 2015, 66(7): 2620-2627 (in Chinese)
马鹏飞, 蒙坚, 周静, 等. 重组大肠杆菌利用 D-木糖合成 D-1,2,4-丁三醇[J]. 化工学报, 2015, 66(7): 2620-2627
- [14] Sun WL, Lu XY, Zong H, et al. Biosynthesis of D-1,2,4-butanetriol by an engineered *Escherichia coli*[J]. Microbiology China, 2014, 41(10): 1948-1954 (in Chinese)
孙文龙, 陆信曜, 宗红, 等. 代谢工程改造大肠杆菌合成 D-1,2,4-丁三醇[J]. 微生物学通报, 2014, 41(10): 1948-1954
- [15] Zhang GL, Deng H, Lu JJ, et al. Optimization of cofermentation of glucose and xylose for synthesis of

- 2,3-butanediol[J]. The Chinese Journal of Process Engineering, 2009, 9(6): 1174-1177 (in Chinese)
- 张根林, 邓辉, 鲁建江, 等. 葡萄糖和木糖双底物生物合成 2,3-丁二醇的条件优化[J]. 过程工程学报, 2009, 9(6): 1174-1177
- [16] Chen LN, Li XH, Tian PF. Co-culture of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2017, 15(4): 34-39 (in Chinese)
- 陈柳霓, 李笑寒, 田平芳. 大肠杆菌和肺炎克雷伯氏菌的共培养研究[J]. 生物加工过程, 2017, 15(4): 34-39
- [17] Liu HW, Valdehuesa KNG, Nisola GM, et al. High yield production of D-xylonic acid from D-xylose using engineered *Escherichia coli*[J]. Bioresource Technology, 2012, 115: 244-248
- [18] He SY. Blocking by-product pathways and strengthening key enzymes expression of D-1,2,4-butanetriol synthesis in recombinant *Escherichia coli*[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2016 (in Chinese)
- 何姝颖. 重组大肠杆菌 D-1,2,4-丁三醇合成中副产物途径的敲除及关键酶的强化表达[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2016
- [19] Zu JS. Construction of integrated 1,2,4-butanetriol synthesis strain and optimization of fermentation conditions[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2019 (in Chinese)
- 祖金珊. 整合型 1,2,4-丁三醇合成菌株的构建及发酵条件优化[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2019
- [20] Liu Q, Wang XW, Zhuge B, et al. Reducing the capsular polysaccharide synthesis of *Klebsiella pneumoniae* in 1,3-propanediol fermentation by genes knocking-out[J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2017, 36(9): 3447-3452 (in Chinese)
- 刘情, 王小婉, 诸葛斌, 等. 基因敲除弱化产 1,3-丙二醇 *Klebsiella pneumoniae* 荚膜多糖的合成[J]. 化工进展, 2017, 36(9): 3447-3452
- [21] Jiang Y, Chen B, Duan CL, et al. Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(7): 2506-2514
- [22] He JH, Le KY. CRISPR/Cas9-mediated *maA* knockout in *Escherichia coli*[J]. Journal of Biology, 2019, 36(6): 17-19 (in Chinese)
- 何京桦, 乐科易. 利用 CRISPR/Cas9 系统敲除大肠杆菌 *maA* 基因[J]. 生物学杂志, 2019, 36(6): 17-19
- [23] Yang M, Dong RA. Environmentally friendly synthesise of 1,2,4-butanetriol[J]. Life Science Instruments, 2016, 14(4): 11-14 (in Chinese)
- 杨萌, 董润安. D-1,2,4-丁三醇的绿色合成[J]. 生命科学仪器, 2016, 14(4): 11-14
- [24] Sun WL. The cloning of key genes and the recombinant construction involved in the biosynthesis of D-1,2,4-butanetriol[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2014 (in Chinese)
- 孙文龙. 生物法合成 D-1,2,4-丁三醇关键基因的克隆及重组菌的构建[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2014