

研究报告

副产物途径的缺失对大肠杆菌合成 D-1,2,4-丁三醇的影响

何姝颖^{1,2} 诸葛斌^{1,2*} 陆信曜^{1,2} 宗红^{1,2} 陈雯² 宋健³

(1. 江南大学 糖化学与生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)

(2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室 工业微生物研究中心 江苏 无锡 214122)

(3. 江南大学化学与材料工程学院 江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】敲除副产物途径,提高重组大肠杆菌 D-1,2,4-丁三醇(D-1,2,4-Butanetriol, BT)产量。【方法】利用 Red 重组技术敲除木糖途径 *xyLAB* 基因及 2-酮-3-脱氧木糖酸代谢途径的 *yagE* 及 *yjhH* 基因,考察其对重组菌生长、BT 生产及副产物积累的影响。【结果】敲除 *xyLAB* 基因后,重组菌生物量降低 57%,BT 产量降低 20%,单位菌体产量提高 84%,木糖酸积累量提高 52%。*yagE* 或 *yjhH* 基因单独缺失重组菌生物量分别提高 10%和 5%,BT 产量提高 36%和 14%。基因共同缺失后重组菌生物量降低了 21%,BT 产量提高 184%,达到 2.44 g/L,单位菌体产量提高 258%。而共同敲除两途径,生物量降低了 72%,虽然单位菌体产量提高了约 4 倍,但 BT 产量仅提高 43%。pH 调控下,重组菌木糖酸积累量下降,BT 产量进一步提高,最高达 3.11 g/L。【结论】*xyLAB* 基因缺失后,虽有利于提高 BT 途径的效率,但由于木糖无法进入 PPP 途径及木糖酸积累,造成生物量降低,不利于 BT 合成。单独敲除 *yagE* 或 *yjhH* 后 BT 产量略有提高,而共同敲除这两基因更为有效地调整碳流向 BT 合成偏转。两途径共同敲除利于 BT 的合成,但由于菌体量的减少,无法大量获得 BT。

关键词: D-1,2,4-丁三醇,敲除,木糖,大肠杆菌

Influence of the deficiency of by-product pathways on biosynthesis of D-1,2,4-butanetriol in *Escherichia coli*HE Shu-Ying^{1,2} ZHUGE Bin^{1,2*} LU Xin-Yao^{1,2} ZONG Hong^{1,2} CHEN Wen² SONG Jian³

(1. Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Research Centre of Industrial Microbiology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(3. School of Chemistry and Material, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Objective] In order to improve the D-1,2,4-butanetriol (BT) titer in recombinant**Foundation item:** Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20140138); 111 Project (No. 111-2-06); Six Talent Peaks Project in Jiangsu Province (No. 2014-XCL-017)***Corresponding author:** Tel: 86-510-85918106; E-mail: bzhuge@163.com**Received:** February 14, 2016; **Accepted:** April 15, 2016; **Published online** (www.cnki.net): June 21, 2016

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(No. BK20140138); 111 项目(No. 111-2-06); 江苏省六大人才高峰(No. 2014-XCL-017)

***通讯作者:** Tel: 86-510-85918106; E-mail: bzhuge@163.com

收稿日期: 2016-02-14; 接受日期: 2016-04-15; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-06-21

Escherichia coli, two by-product pathways were blocked. **[Methods]** The *xylAB*, *yagE* and *yjhH* were knocked out by Red system and the cell growth, BT production and accumulation of byproduct of the resultant strains were detected. **[Results]** The biomass and BT titer of *xylAB*-deficient strain were repressed by 57% and 20%, with the BT yield per cell increased by 84%. In contrast, the biomass of *yagE*-deficient and *yjhH*-deficient strains was increased by 10% and 5%, respectively. The BT titers of these two strains showed increase of 36% and 14%, respectively. Co-knocking out these two genes led to the decrease of biomass by 21%, but the BT titer was improved by 184%, up to 2.44 g/L, and BT yield per cell was increased by 258%. Meanwhile, blocking these two by-product pathways simultaneously resulted in the decrease of biomass by 72% and raised BT titer per cell by 4 times, and the final BT titer was showed 43% improvement. The xylonate titers of recombinant strains were decreased, and the BT titer was further improved by pH-controlled fermentation, up to 3.11 g/L. **[Conclusion]** Although knocking out *xylAB* is beneficial to BT produce, the repressed xylose utilization ability through the PPP pathway and accumulated xylonate lead to the reduced biomass and BT titer. Knocking out the *yagE* or *yjhH* showed slightly positive effect on BT production. Further co-deficiency of these two genes shifts more 2-keto-3-deoxy-xylonate (KDX) into BT pathway, leading to significantly improved BT titer. Finally, blocking these two by-product pathways shows negative effect on cell growth but slightly improvement on BT production.

Keywords: D-1,2,4-butanetriol, Knocking out, Xylose, *Escherichia coli*

D-1,2,4-丁三醇(D-1,2,4-butanetriol, BT)是一种重要的多元醇, 广泛用于军工、制药、化妆品等领域^[1-4]。其硝基类化合物丁三醇三硝酸酯(BTN)以热稳定性好、冲击感小、挥发性小等优点^[4], 正逐步取代三硝酸甘油酯成为新型的火箭推进剂。

目前, 工业上所用的 BT 主要用高温高压 NaBH₄ 催化条件下还原苹果酸^[5]或 2-丁烯-1,4-二醇(BTD)水合^[6]等化学法生产, 但是化学法存在不少弊端, 如生产条件严苛、催化剂价格昂贵、生产过程易造成环境污染以及副产物较多, 不利于后续的分离纯化等^[6]。相较于化学法, 生物法更环保、经济, 由于迄今为止尚未在生物体内发现 BT, 因此该化合物主要通过人工构建途径生物合成, 包括以木糖^[7]或苹果酸^[8]为底物两种技术路径。其中, 基于木糖代谢的 BT 途径更为高效, 主要包括: 木糖在木糖脱氢酶(*xdh*)作用下氧化成木糖酸, 木糖酸脱水形成 2-酮-3-脱氧-木糖酸(KDX), 再在苯甲酰甲酸脱羧酶(*mdlC*)催化下转化为 3,4-二羟基丁醛, 最后在醇脱氢酶(*yqhD*)作用下^[9]生成 BT (图 1)。目前, 提高 BT 生产的方法主要有以下两种: 一是筛选更高效催化的酶, 并调整各基因之间的表达水平, 使其达到平衡; 二是敲除

副产物途径, 增加到 BT 的碳流。数据库信息及文献报道表明, 在上述构建的 BT 合成途径中存在一些竞争碳流的副产物途径(图 1), 其中, 木糖异构酶(*xylA*)、木酮糖激酶(*xylB*)参与底物木糖的代谢, 醛缩酶(*yagE* 和 *yjhH*)对中间代谢产物 KDX 竞争性消耗^[10]。

本研究室前期将所筛选到的柄杆菌中的 *xdh* 基因和来源于恶臭假单胞菌中的 *mdlC* 基因克隆至 pEtac 质粒后, 在大肠杆菌中串联表达, 实现了木糖-BT 的转化, 但其产量仅为 0.9 g/L^[11]。本文在前期已构建的 BT 重组菌中敲除上述两个竞争性代谢途径, 以明确各副产物途径对 BT 合成的影响, 强化 BT 生产。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器: 蛋白胨、酵母提取物, Oxiod 公司; D-木糖, 上海国药; D-1,2,4-丁三醇, 上海阿拉丁化学试剂有限公司; 氨苄青霉素(Amp)、卡那霉素(Kan)、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG), 上海生工生物工程有限公司; *Taq* DNA 聚合酶, 大连宝生物有限公司; DNA 凝胶回收试

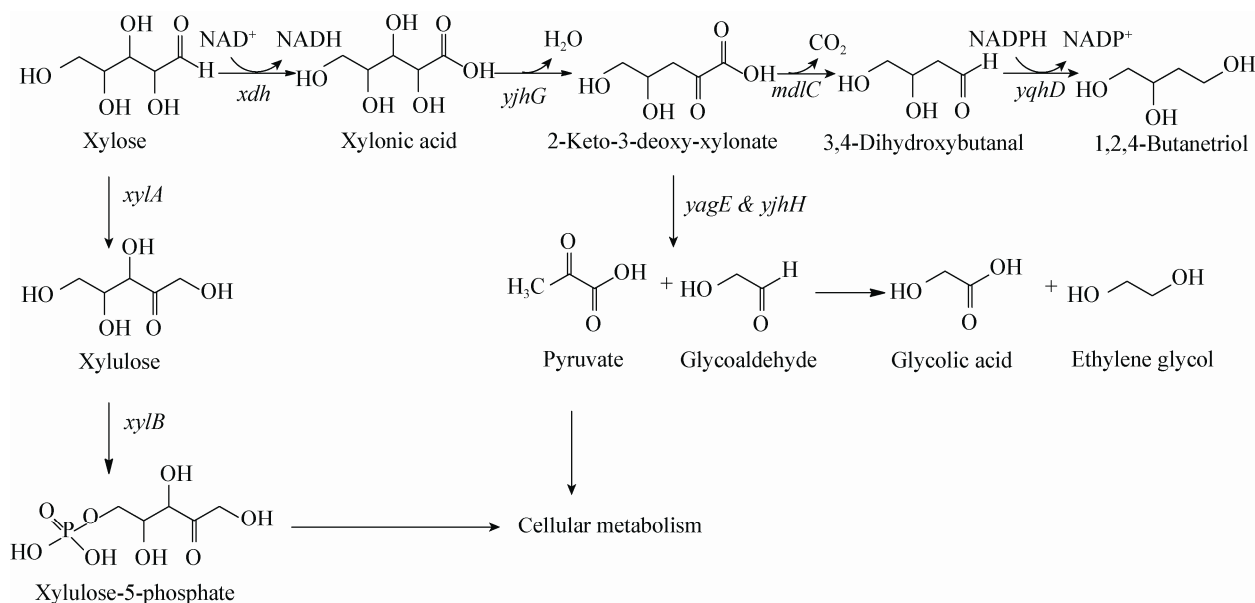


图1 重组大肠杆菌利用木糖生产D-1,2,4-丁三醇途径

Figure 1 The metabolic pathway from xylose to D-1,2,4-butanetriol in engineered *E. coli*

注：图1引用自文献[7]并稍作修改。

Note: Figure 1 is quoted from literature [7] and with some minor modifications.

剂盒、质粒提取试剂盒、DNA marker，上海捷瑞生物工程有限公司；色谱柱 Aminex HPX-87H column (300 mm×7.8 mm；9 μm)，Bio-Rad 公司。PCR 仪、电转仪，Eppendorf 公司。PCR 所用引物的合成由苏州泓迅生物科技有限公司完成。

1.1.2 菌株和质粒：研究中所用菌株和质粒见表1。

1.1.3 培养基：LB 种子培养基(g/L)：蛋白胨 10，酵母提取物 5，氯化钠 10。发酵培养基(g/L)：蛋白胨 10，酵母提取物 5，氯化钠 10，木糖 20。

1.1.4 引物：研究中所用引物见表2。

1.2 方法

1.2.1 缺失突变株的构建：大肠杆菌基因敲除采用 Red 重组法，根据 NCBI 上公布的 *E. coli* W3110 的 *xylAB*、*yagE* 和 *yjhH* 基因序列设计打靶片段引物，以 pKD4 或 pKD3 为模板扩增带有目的基因同源臂的抗性序列。将 30 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 培养过夜的带有 pKD46 的大肠杆菌按 1%接种量

转接入 LB 培养基中，同时加入 10 mmol/L 的阿拉伯糖进行诱导，待 OD_{600} 达到 0.5 左右时，用 10%甘油清洗菌体制备感受态，加入打靶片段后 1 800 V 电击处理 5 ms，培养 2 h 涂布相应抗性平板，挑取转化子进行验证。敲除成功的转化子置于 42 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 培养，去除 pKD46 后转入质粒 pCP20，消除基因组上的抗性。最后 42 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 培养消除质粒 pCP20，获得不带抗性的缺失菌。

1.2.2 摇瓶发酵：挑取平板上单菌落于液体 LB 培养基，37 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 培养过夜。将种子液以 1%的接种量接种于发酵培养基(250 mL 装液 50 mL)，37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 条件下培养至 OD_{600} 达到 0.6 时，加入 0.5 mmol/L IPTG 进行诱导，同时加入木糖至终浓度 20 g/L，继续培养至 54 h。所有发酵实验设置 3 个平行。pH 调控策略即在摇瓶发酵的基础上每 6 h 加入 4 mol/L 氢氧化钠溶液，将 pH 稳定于 7.0±0.5。

表 1 本研究所涉及的菌株和质粒
Table 1 The strains and plasmids used in this paper

菌株和质粒 Strains and plasmids	相关特性/用途 Characters/Applications	来源 Sources
<i>E. coli</i> W3110	<i>E. coli</i> W3110 野生菌	本研究中心保藏
<i>E. coli</i> W001	<i>E. coli</i> W3110 Δ <i>xylAB</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> W031	<i>E. coli</i> W3110 Δ <i>yagE</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> W032	<i>E. coli</i> W3110 Δ <i>yjhH</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> W003	<i>E. coli</i> W3110Δ <i>yagE</i> Δ <i>yjhH</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> W004	<i>E. coli</i> W3110Δ <i>xylAB</i> Δ <i>yagE</i> Δ <i>yjhH</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> W3110/(BT)	带有质粒 p <i>Etac-mdlC-tac-xdh</i> 的 <i>E. coli</i> W3110	本研究中心保藏
<i>E. coli</i> W001/(BT)	带有质粒 p <i>Etac-mdlC-tac-xdh</i> 的 <i>E. coli</i> W001	本研究构建
<i>E. coli</i> W031/(BT)	带有质粒 p <i>Etac-mdlC-tac-xdh</i> 的 <i>E. coli</i> W031	本研究构建
<i>E. coli</i> W032/(BT)	带有质粒 p <i>Etac-mdlC-tac-xdh</i> 的 <i>E. coli</i> W032	本研究构建
<i>E. coli</i> W003/(BT)	带有质粒 p <i>Etac-mdlC-tac-xdh</i> 的 <i>E. coli</i> W003	本研究构建
<i>E. coli</i> W004/(BT)	带有质粒 p <i>Etac-mdlC-tac-xdh</i> 的 <i>E. coli</i> W004	本研究构建
p <i>Etac-mdlC-tac-xdh</i> ^[11]	pBBR322 origin, Kan ^r	本研究中心保藏
pKD46	Amp ^r	本研究中心保藏
pKD4	Amp ^r , FRT- <i>kan</i> -FRT	本研究中心保藏
pCP20	Amp ^r	本研究中心保藏

注：Kan^r：卡那霉素抗性；Amp^r：氨苄青霉素抗性。
Note: Kan^r: Kanamycin resistance; Amp^r: Ampicillin resistance.

表 2 文中所用到的引物
Table 2 Primers used in this paper

引物名称 Primers name	引物序列 Primers sequences (5'→3')
<i>xylAB</i> -K1	<u>GAACCGAAACCGCAAGAACCGACCAAAACATCAATATGATTACGATGCCGCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC</u>
<i>xylAB</i> -K2	<u>GAATATCTCCGGCTCATGCCGCTGAACCCATAGCAATTTAGGCGCAGTAAAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTAT</u> TCTC
<i>xylAB</i> -C1	ATCGGTTTCCAGGGCAC
<i>xylAB</i> -C2	CGCAGACGCAAGTAATCTTTC
<i>yagE</i> -K1	<u>GAATCATTTCCCCTGTCTCCACCATTTTTACCGCCGACGGCCAGCTCGATGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCT</u> AGAG
<i>yagE</i> -K2	<u>CGTATCCAGCTGATACATCTGCGGAATTTGCAGCAAGGTCTGATGATACCGGAATTAGCCATGGTCCATATGA</u>
<i>yagE</i> -C1	CGCAGTCCGCGTTGTTC
<i>yagE</i> -C2	GGTTTTCAGCTGCGCCTTG
<i>yjhH</i> -K1	<u>AAGTTGCCGACTTCCTGATTAATAAAGGGGTCGACGGGCTGTTTATCTGTTAGGCTGGAGCTGCTTCG</u>
<i>yjhH</i> -K2	<u>TTGCTTCTCAGATGCTTCAAGAATCGGTGGTAAGCAATATGTCTCTACACCTCCTTAGTTCCTATTCCG</u>
<i>yjhH</i> -C1	GCATTATCCACCGGTATCCAG
<i>yjhH</i> -C2	GGTAAGCAGCACGTGGACTT

注：下划线部分为该基因的同源臂序列。
Note: The underlined sequences indicate homologous sequence to the respective gene.

1.2.3 检测方法：细胞生长：分光光度计比色法测 OD_{600} [12]。

代谢物检测：将发酵液 12 000 r/min 离心 10 min，取上清，用高效液相检测，色谱柱柱温 60 °C，流动相为 5 mmol/L H_2SO_4 ，流速 0.6 mL/min，进样量 10 μ L，示差检测器与紫外检测器同时检测，紫外检测波长 210 nm。

木糖酸检测方法见参考文献[13]。

2 结果与分析

2.1 副产物途径缺失突变株的构建

利用 Red 重组系统，在野生菌 *E. coli* W3110 中分别敲除木糖代谢途径的木糖异构酶基因 (*xylA*)、木酮糖激酶基因(*xylB*)和裂解 2-酮-3-脱氧-木糖酸的醛缩酶基因(*yagE* 和 *yjhH*)。转化子菌落 PCR 验证结果如图 2 所示，野生型大肠杆菌 *xylAB*

及 *yjhH* 敲除前基因片段大小约为 900 bp，*yagE* 基因片段大小约为 1 100 bp。而敲除后，*xylAB* 与 *yagE* 条带大小约为 1 600 bp，*yjhH* 基因片段大小约为 1 100 bp。根据条带大小挑取正确转化子，并消除其所带质粒和抗性。所得 *E. coli* W3110 $\Delta xylAB$ 、*E. coli* W3110 $\Delta yagE$ 、*E. coli* W3110 $\Delta yjhH$ ，双缺失菌株 *E. coli* W3110 $\Delta yagE \Delta yjhH$ 及三缺失菌 *E. coli* W3110 $\Delta xylAB \Delta yagE \Delta yjhH$ 分别命名为 *E. coli* W001、*E. coli* W031、*E. coli* W032、*E. coli* W003 和 *E. coli* W004。将质粒 pEtac-mdlC-tac-xdh 转入野生菌和缺失菌中，得到 BT 合成菌。

2.2 木糖代谢途径缺失对菌体生长及 BT 合成的影响

木糖转化为木酮糖随后进入磷酸戊糖途径 (PPP)，这一途径竞争流向 BT 的碳源，因此对 *xylAB* 进行敲除。如图 3A 所示，*xylAB* 的缺失使得重组菌的生物量降低了约 57%。与对照菌 *E. coli* W3110/(BT)相比，缺失菌 *E. coli* W001/(BT)的 BT 积累趋势大致相同，但 BT 产量下降了 20%，而单位菌体产量则提高了约 84% (图 3B)。这些结果表明木糖竞争途径的缺失使得 BT 途径的效率得到了提高，但不利于重组菌的生长，菌体量的降低导致了 BT 终产量的减少。其原因可能是 *xylAB* 缺失使得细胞无法利用木糖进入 PPP 途径为菌体生长提供能量和碳源。另外，*xylAB* 基因的敲除使得木糖被大量氧化为木糖酸，而下游木糖酸脱水酶催化能力有限，造成木糖酸积累量增加了 53%，发酵结束时 pH 降为 4.0 (对照 pH 约为 5.0) (图 4)，进一步影响了细胞生长和 BT 的积累。这之前报道的敲除 *xylAB* 后菌体量下降，木糖酸积累量提高的现象相一致 [14]。为了维持较高的菌体量，有学者通过补加葡萄糖 [14-15]，为菌体提供能量和碳源。而孙文龙的研究结果显示 [16]，补加其他碳源，不利于菌体有效利用木糖生产 BT，因此维持菌体生长与 BT 途径碳流间的平衡可能是高效生产 BT 的关键。

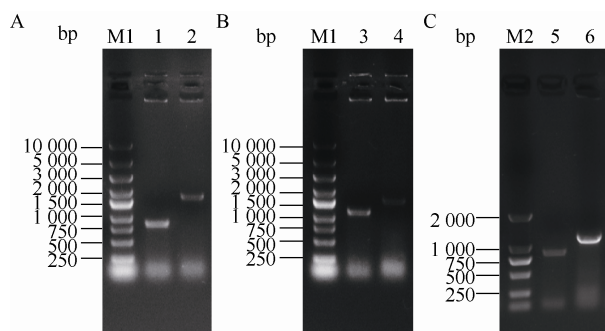


图 2 *xylAB* 基因(A)、*yagE* 基因(B)及 *yjhH* 基因(C)敲除的 PCR 验证

Figure 2 PCR verifications of *xylAB* (A), *yagE* (B) and *yjhH* (C) gene knockout mutants

注：M1：2503 DNA marker；1：*E. coli* 野生菌中 *xylAB* 基因 PCR 产物；2：*E. coli xylAB* 缺失菌中 PCR 产物；3：*E. coli* 野生菌中 *yagE* 基因 PCR 产物；4：*E. coli yagE* 缺失菌中该基因 PCR 产物；M2：2501 DNA marker；5：*E. coli* 野生菌中 *yjhH* 基因 PCR 产物；6：*E. coli yjhH* 缺失菌中此基因 PCR 产物。

Note: M1: 2503 DNA marker; 1: PCR of *xylAB* in *E. coli* W3110; 2: PCR of *xylAB* in *E. coli* $\Delta xylAB$; 3: PCR product of *yagE* in *E. coli* W3110 wild-type strain; 4: PCR product of *yagE* in *E. coli* $\Delta yagE$; M2: 2501 DNA marker; 5: PCR product of *yjhH* in *E. coli* W3110 wild-type strain; 6: PCR product of *yjhH* gene in *E. coli* $\Delta yjhH$.

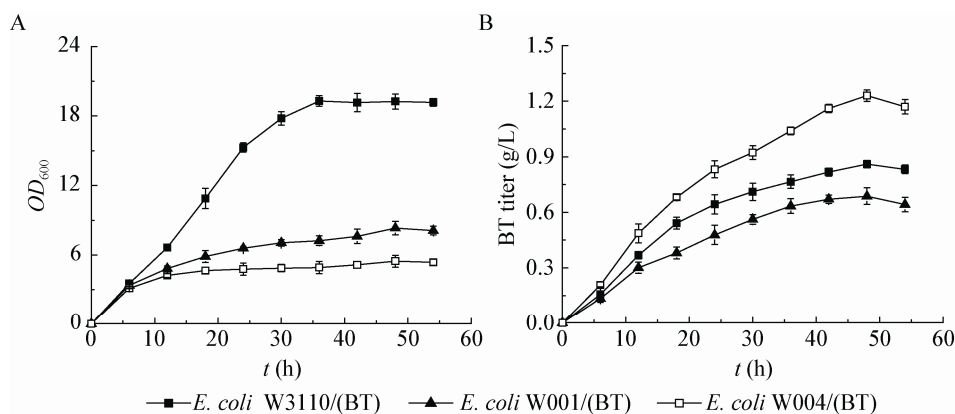
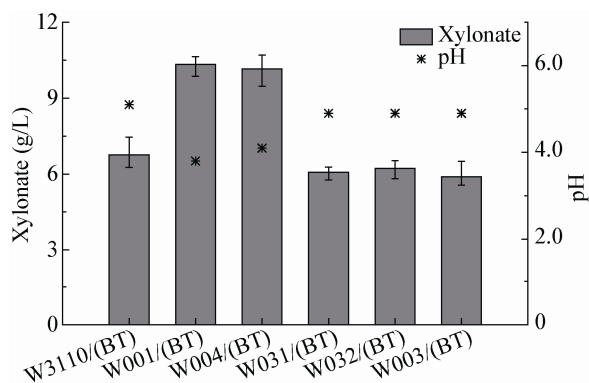


图3 重组菌利用木糖发酵过程中的生物量(A)和丁三醇产量(B)

Figure 3 The biomass (A) and BT titer (B) in the fermentation broth of the recombinant strains

图4 重组菌利用木糖发酵 48 h 时木糖酸积累量和 pH 值
Figure 4 The xylonate titer and the pH value at 48 h in the fermentation broth of the recombinant strains

2.3 2-酮-3-脱氧木糖酸代谢途径缺失对菌体生长及 BT 合成的影响

在 BT 合成途径中, MdlC 是来源于恶臭假单胞菌的四聚体蛋白^[17], 对木糖酸脱水产物 KDX 的催化能力较弱, 难以与宿主中的分支代谢途径(*yagE* 和 *yjhH*)竞争碳流(图 1), 影响 BT 的合成效率。基于此, 对 *yagE* 和 *yjhH* 进行敲除, 弱化副产物途径的分流作用。如图 5 所示, 敲除 *yagE* 基因后, *E. coli* W031/(BT) 的生物量相对于出发菌提高了约 10%, BT 产量提高了 36%。单独敲除 *yjhH* 基因后, 生物量相对于 *E. coli* W3110/(BT) 提高了 5%, BT 产量提高 14%。两株菌的单位菌体产量分别提高 24% 和 8%

(图 5)。而醛缩酶两基因共同敲除后, 重组菌生物量降低了 21%, 但 BT 产量提升了 184%, 达 2.44 g/L, 高于其它副产物途径敲除的报道^[7,15,18]。同时, 该菌株单位菌体产量提升了 258%。上述结果表明, *yagE* 或 *yjhH* 基因的单独缺失有利于菌体的生长, 而两基因共同缺失影响菌体的积累, 关于这两基因对菌体量作用还有待进一步研究。另外, *yagE* 或 *yjhH* 基因的单独缺失, 对菌株生产 BT 的能力影响不大, 但两基因共同缺失则能使更多的 KDX 流向 BT 生产方向, 显著提高 BT 合成效率。已有研究发现, 在 *E. coli* MG1655 野生菌与 *yagE*、*yjhH* 单缺失菌中构建 BT 途径后并未检测到 BT, 但共同敲除这两个基因时, BT 产量达 0.15 g/L, 实现了从无到有的突破^[15], 与本文结果相似。

2.4 两副产物途径共同缺失对菌体生长及 BT 合成的影响

我们注意到敲除 KDX 代谢途径, 木糖酸的积累量有小幅度的下降(分别下降了 10%、7% 和 12%) (图 4), 同时敲除两条副产物途径是否可以弱化木糖酸积累对菌体代谢的影响? 为进一步提高 BT 产量, 对 *xylAB*、*yagE* 及 *yjhH* 三个基因进行共敲除。如图 3 所示, 重组菌 *E. coli* W004/(BT) 生物量相比于 *E. coli* W3110/(BT) 下降了 72%, BT 产量提高了 43%, 为 1.23 g/L, 单位菌体产量提高约

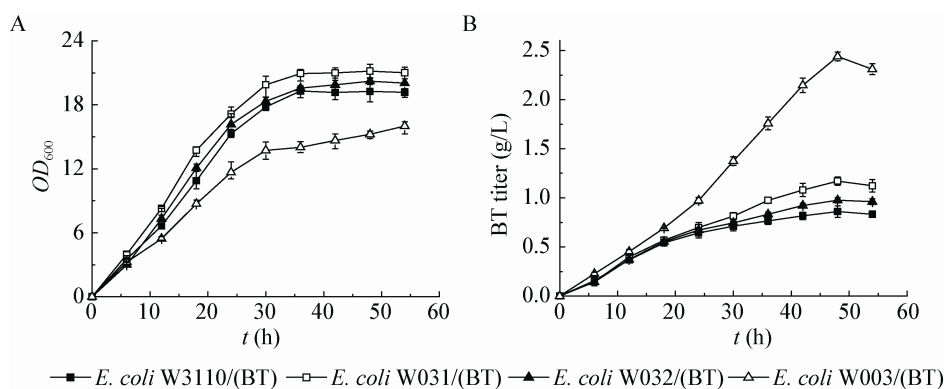


图5 醛缩酶缺失重组菌利用木糖发酵过程中的生物量(A)和丁三醇产量(B)
Figure 5 The biomass (A) and BT titer (B) of the recombinant strains

4 倍, 为本文所有菌株中单位产量最高者。同时, 木糖酸积累量仍比 *E. coli* W3110/(BT) 提高了 50%, pH 降为 4.1 (图 4)。这一结果再次验证了 *xylAB* 基因对细胞生长及 BT 高产的重要性, 直接敲除并不利于 BT 的积累。因此, Valdehuesa 等^[7] 和 Sun 等^[18] 在 *xylAB* 缺失的基础上敲除 KDX 分支代谢途径并不利于 BT 的积累和高产, 导致产量仅为 0.88 g/L 和 0.3 g/L。

2.5 pH 控制下菌体生长及代谢情况

重组大肠杆菌在 pH 非调控自然条件下, 发酵前 18 h 木糖酸大量积累, pH 明显下降, 这可能会对菌体生长及代谢造成影响。通过添加 4 mol/L 的 NaOH 溶液中和发酵液中的木糖酸, 使发酵液 pH 维持在 7.0 ± 0.5 , 发酵结果如图 6 所示。重组菌在 pH 调控条件下, 生长速度略有提升(图 6A), 30 h 左右菌体量达到最高值, 最大生物量与调控前无

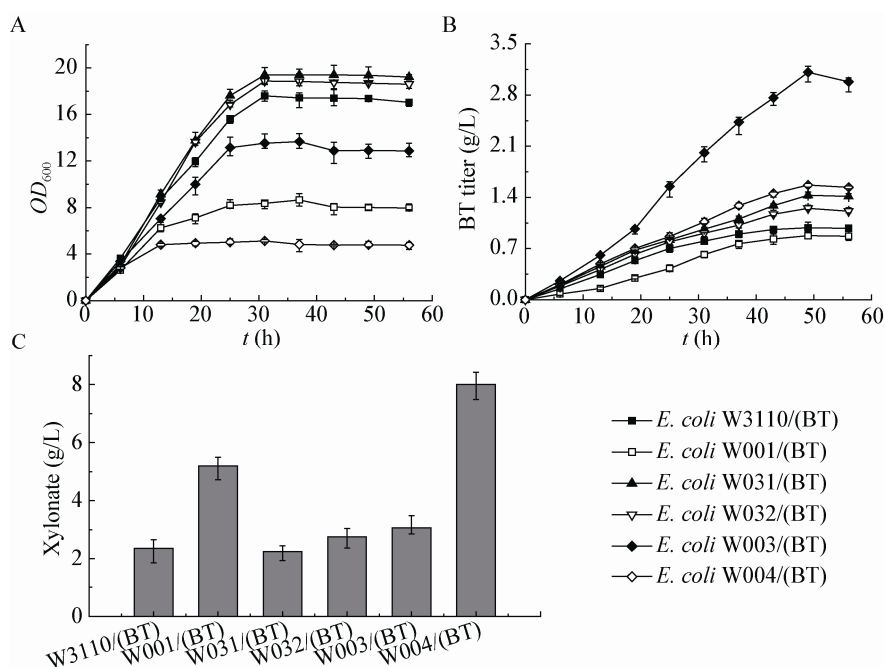


图6 pH 调控下重组菌利用木糖发酵过程中的生物量(A)、丁三醇产量(B)、48 h 时木糖酸积累量(C)

Figure 6 The biomass (A), BT titer (B) and xylonate titer at 48 h (C) of the recombinant strains under pH control strategy

明显区别。细胞代谢方面, pH 控制策略下 BT 积累趋势与之前基本相同(图 6B), 但由于发酵环境更有利于 BT 合成途径中的酶发挥作用, 强化该途径效率, 木糖酸积累量显著下降(图 6C), BT 终产量也有了不同程度的提高, 重组菌 *E. coli* W003/(BT) 在 48 h 时 BT 产量可达 3.11 g/L, 相较于 pH 非控制条件提高了 27%。

3 结论

本研究通过对大肠杆菌中利用木糖合成 BT 的途径进行分析, 敲除木糖及 2-酮-3-脱氧-木糖酸的分支代谢途径相关基因(*xylAB*, *yagE*, *yjhH*), 考察对菌体生长及产物合成的影响。研究结果表明, 单独敲除 *xylAB* 基因, 有利于强化 BT 途径效率, 但不利于菌体生长和 BT 积累。*yagE* 或 *yjhH* 单独缺失时, 由于剩下一个基因的补偿作用, 重组菌 BT 生产能力提高不明显; 但两基因共同缺失后, BT 合成效率有显著提升, 最高产量达 2.44 g/L, 高于国内外其它敲除副产物途径的报道。两途径共缺失重组菌 *E. coli* W004/(BT) 的单位菌体产量最高, 但由于 *xylAB* 基因的缺失导致菌体量明显降低, 不利于高产 BT。pH 控制下, 重组菌合成 BT 能力有所提升, 但对副产物途径相关基因的作用效果影响不大, BT 产量最高菌株仍为 *E. coli* W003/(BT), 达 3.11 g/L。因此, 维持生长及 BT 途径中碳流平衡是提高 BT 产量的关键, 后续研究可以尝试对 *xylAB* 的表达量进行调控, 实现菌体生长、BT 途径效率间的平衡和产物合成的最大化。

参 考 文 献

- [1] Tan R, Liu DX. Synthesis of cationic lipids from 1,2,4-butanetriol[J]. Tetrahedron Letters, 1999, 40(2): 209-212
- [2] Yamaguchi A, Hiyoshi N, Sato O, et al. Enhancement of cyclic ether formation from polyalcohol compounds in high temperature liquid water by high pressure carbon dioxide[J]. Green Chemistry, 2009, 11(1): 48-52
- [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] 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
- [5] Furukawa Y, Ho S, Ikai K, et al. Process for producing 1,2,4-butanetriol: Europe, EP 1061060 B1[P]. 2005-01-12
- [6] 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
- [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] Li XH, Cai Z, Li Y, et al. Design and construction of a non-natural malate to 1,2,4-butanetriol pathway creates possibility to produce 1,2,4-butanetriol from glucose[J]. Scientific Reports, 2014, 4: 5541
- [9] Valdehuesa KNG, Lee WK, Ramos KRM, et al. Identification of aldehyde reductase catalyzing the terminal step for conversion of xylose to butanetriol in engineered *Escherichia coli*[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2015, 38(9): 1761-1772
- [10] Liu HW, Ramos KRM, Valdehuesa KNG, et al. Biosynthesis of ethylene glycol in *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(8): 3409-3417
- [11] 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]. 微生物学报, 2014, 41(10): 1948-1954
- [12] Li ZF, Gu ZB, Wang M, et al. Delayed supplementation of glycine enhances extracellular secretion of the recombinant α -cyclodextrin glycosyltransferase in *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 85(3): 553-561
- [13] Lien OG. Determination of gluconolactone, galactonolactone, and their free acids by hydroxamate method[J]. Analytical Chemistry, 1959, 31(8): 1363-1366
- [14] Liu HW, Valdehuesa KNG, Nisola GM, et al. High yield production of D-xyloic acid from D-xylose using engineered *Escherichia coli*[J]. Bioresource Technology, 2012, 115: 244-248
- [15] 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
- [16] 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
- [17] Yep A, Kenyon GL, McLeish MJ. Saturation mutagenesis of putative catalytic residues of benzoylformate decarboxylase provides a challenge to the accepted mechanism[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(15): 5733-5738
- [18] Sun L, Yang F, Sun HB, et al. Synthetic pathway optimization for improved 1,2,4-butanetriol production[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2015, 43(1): 67-78