

研究报告

代谢工程改造热带假丝酵母高效合成 1,2,4-丁三醇

李静芸, 夏媛媛, 沈微, 杨海泉, 陈献忠*

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

李静芸, 夏媛媛, 沈微, 杨海泉, 陈献忠. 代谢工程改造热带假丝酵母高效合成 1,2,4-丁三醇[J]. 微生物学通报, 2024, 51(10): 3897-3909.

LI Jingyun, XIA Yuanyuan, SHEN Wei, YANG Haiquan, CHEN Xianzhong. Metabolic engineering of *Candida tropicalis* for efficient production of 1,2,4-butanetriol[J]. Microbiology China, 2024, 51(10): 3897-3909.

摘要:【背景】1,2,4-丁三醇是一种手性多羟基醇, 作为一种关键的平台化合物, 主要用于合成高能材料 1,2,4-三硝酸酯丁三醇, 这种材料可作为飞机、火箭和导弹等武器的推进剂。随着合成生物学的快速发展, 利用微生物细胞工厂生产 1,2,4-丁三醇受到越来越多的关注。【目的】以前期构建的产 1,2,4-丁三醇的热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)工程菌为出发菌株, 通过代谢工程策略进一步优化人工途径, 降低中间产物积累, 提高 1,2,4-丁三醇的发酵水平, 评价工程菌利用廉价的玉米芯水解液发酵生产 1,2,4-丁三醇的能力。【方法】通过启动子工程优化木糖脱氢酶基因的表达水平, 减少木糖酸中间产物的积累。利用碳酸钙作为中和剂调节发酵过程的 pH, 通过发酵培养基离子浓度优化等策略提高热带假丝酵母细胞工厂发酵生产 1,2,4-丁三醇的能力。【结果】相较于出发菌株, 构建的工程菌发酵生产 1,2,4-丁三醇的产量提高了 42%, 5 L 发酵罐中产量达到 6.20 g/L。同时, 工程菌以玉米芯水解液作为原料能够生产出 2.60 g/L 的 1,2,4-丁三醇。【结论】通过代谢工厂策略和发酵过程优化, 提高了热带假丝酵母合成 1,2,4-丁三醇的能力, 还首次评价热带假丝酵母细胞工厂利用玉米芯水解液合成 1,2,4-丁三醇的可行性, 为大规模地利用生物质原料发酵生产 1,2,4-丁三醇挖掘出一个有潜力的宿主。

关键词: 1,2,4-丁三醇; 木糖酸积累; 热带假丝酵母; 生物质原料; 发酵优化

资助项目: 国家自然科学基金(32271533)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32271533).

*Corresponding author. E-mail: xzchen@jiangnan.edu.cn

Received: 2024-02-08; Accepted: 2024-03-28; Published online: 2024-05-08

Metabolic engineering of *Candida tropicalis* for efficient production of 1,2,4-butanetriol

LI Jingyun, XIA Yuanyuan, SHEN Wei, YANG Haiquan, CHEN Xianzhong*

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

Abstract: **[Background]** 1,2,4-butanetriol (BT), a chiral polyol, plays a role as a platform chemical in the synthesis of energetic materials such as 1,2,4-butanetriol trinitrate, which is used as a propellant in a variety of military applications, including aircraft, rockets, and missiles. With the rapid development of synthetic biology, building microbial cell factories for the production of 1,2,4-butanetriol has received increasing attention. **[Objective]** In this study, we employed metabolic engineering to optimize the exogenous 1,2,4-butanetriol synthesis pathway in a pre-constructed strain of *Candida tropicalis*, aiming to reduce the accumulation of intermediates and increase the production of 1,2,4-butanetriol. Furthermore, we evaluated the ability of the engineered strain to produce 1,2,4-butanetriol by fermentation with inexpensive corncob hydrolysate. **[Methods]** We employed promoter engineering to optimize the expression level of the xylose dehydrogenase gene and reduce the accumulation of xylonate. Furthermore, we enhanced the production of 1,2,4-butanetriol in *C. tropicalis* by using calcium carbonate as a neutralizer to regulate the pH and optimizing the concentration of iron ions in the fermentation medium. **[Results]** Through the combined efforts of metabolic engineering and fermentation process optimization, the final yield was increased by 42%, reaching 6.20 g/L in a 5 L fermenter. In addition, the engineered strain was capable of producing 2.60 g/L 1,2,4-butanetriol by using corncob hydrolysate as the substrate. **[Conclusion]** We improve the ability of *C. tropicalis* to synthesize 1,2,4-butanetriol by metabolic engineering and fermentation process optimization. Moreover, we for the first time evaluate the feasibility of *C. tropicalis* cell factories for the synthesis of 1,2,4-butanetriol with corncob hydrolysate, which provides support the large-scale production of 1,2,4-butanetriol by fermentation with biomass feedstocks.

Keywords: 1,2,4-butanetriol; xylonate accumulation; *Candida tropicalis*; biomass feedstock; fermentation process optimization

木质纤维素是一种资源丰富且潜力巨大的生物质原料，富含戊糖与己糖^[1]。作为木质纤维素水解物中含量第二多的糖^[2]，D-木糖是一种关键成分。目前已经分离野生型或者构建代谢工程菌株发酵木糖生产木糖酸^[3]、1,4-丁二醇^[4]、乙二醇^[5]和1,2,4-丁三醇(1,2,4-butanetriol, BT)^[6]等重要产物。BT 是一种手性多羟基醇，

它主要用来合成 1,2,4-三硝酸酯丁三醇(1,2,4-Butanetriol trinitrate, BTTN)，并经常被用作飞机、火箭和导弹等的推进剂^[7]。然而，由于成本较高并不能与硝酸甘油竞争，这限制了它的进一步发展。此外，BT 也被用来制备生物活性剂、医药缓释剂、烟草添加剂、抗菌剂及彩色显影剂等^[8]。

目前, BT 化学合成的主流方法是在 NaBH_4 催化剂的存在下通过高温高压还原苹果酸^[6]。但是, 这种方法存在很高的危险性, 并且生产过程中会产生大量的硼酸盐, 导致严重的环境污染。与之相比, 使用生物质衍生的木糖进行 BT 的生物合成反应条件更为温和且安全。2003 年, 有研究者在莓实假单胞菌(*Pseudomonas fragi*) 中利用木糖和阿拉伯糖为原料生产木糖酸和阿拉伯糖酸, 再经大肠杆菌(*Escherichia coli*) 转化为 BT^[9]。随后, 有研究者在大肠杆菌中通过引入关键酶直接将木糖转化为 BT, 但是大肠杆菌对于生物质原料预处理过程中产生的弱酸和呋喃衍生物等抑制剂缺乏耐受性, 这限制了大肠杆菌工程菌株在利用生物质原料生产的过程中生物量的积累, 进而影响 BT 的产量^[10]。因此, 研究人员正在试图在真核生物体系中构建 BT 的合成途径, 来实现其稳定和大规模生产。

2019 年, 研究人员成功在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) 中构建了木糖到 BT 的代谢途径, 其反应步骤如下: 木糖首先在木糖脱氢酶作用下脱氢形成木糖内酯, 随后自发转化成木糖酸, 木糖酸接着脱水并脱羧生成 3,4-二羟基丁醛, 最后由内源乙醇脱氢酶脱氢合成 BT^[6]。后续研究者还通过筛选关键酶等代谢工程策略, 利用木糖生产出 2.2 g/L 的 BT^[11]。除酿酒酵母这类模式菌株外, 张琳等^[12]在二倍体热带假丝酵母(*Candida tropicalis*) 中整合了 BT 的合成途径, 并通过敲除木糖还原酶基因 *GRE3* 阻断竞争途径, 过表达关键基因提高代谢流量, 利用木糖为原料生产出 1.9 g/L BT。此外, Li 等^[13]还通过调节细胞内铁离子浓度将外源木糖酸脱水酶活性提高了 2.2 倍, 同时为了提高 BT 合成过程中 NADPH 的供应, 选择单敲除 6-磷酸葡萄糖异构酶基因 *pgi*, 来减弱 6-磷酸葡萄糖进入糖酵解途径的流量, 并过表达 6-磷

酸葡萄糖酸脱氢酶基因 *gnd1* 加大磷酸戊糖途径的流量, 最终将 BT 产量进一步提高到了 3.2 g/L (图 1)。热带假丝酵母作为非常规二倍体酵母, 可以利用包括玉米芯水解液和木糖母液在内的多种生物质原料, 在相同的时间和碳源条件下, 其生长表现优于酿酒酵母^[14]。

然而, 利用热带假丝酵母为宿主生产 BT 的过程中依然存在问题, 中间产物木糖酸的过量积累对细胞生理和产物合成不可忽视。该代谢中间产物在细胞质内会产生质子和阴离子, 随之细胞内质子浓度增加导致细胞质酸化, 并降低至不利于细胞生长的 pH 值, 这同时还会扰乱细胞膜的电势并妨碍电子传递链生成 ATP^[15]。阴离子积累也可能在多个层面影响细胞代谢, 损害细胞生长, 进而降低酶的活性及目标产品的生成。本研究通过更换启动子来调整木糖脱氢酶的表达水平, 旨在缓解木糖酸的积累, 并通过优化发酵条件来减轻培养基 pH 以降低对 BT 生产的不良影响, 最后评价了工程菌利用玉米芯水解液生产 BT 的能力, 为利用廉价生物质生产高值化学品提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

本研究所用菌株和质粒见表 1。

1.1.2 主要试剂和仪器

限制性核酸内切酶如 *Pst* I、*Xba* I、高保真酶, 以及实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, RT-qPCR) 试剂盒 Yeast RNAiso Kit、PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser 和 SYBR[®] Premix *Ex Taq*TM Kit, 宝生物工程(大连)有限公司; $2\times$ *Taq* Master Mix 和一步法克隆试剂盒, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司。酵母粉和蛋白胨, OXOID 公司; 质粒小提试剂盒、PCR

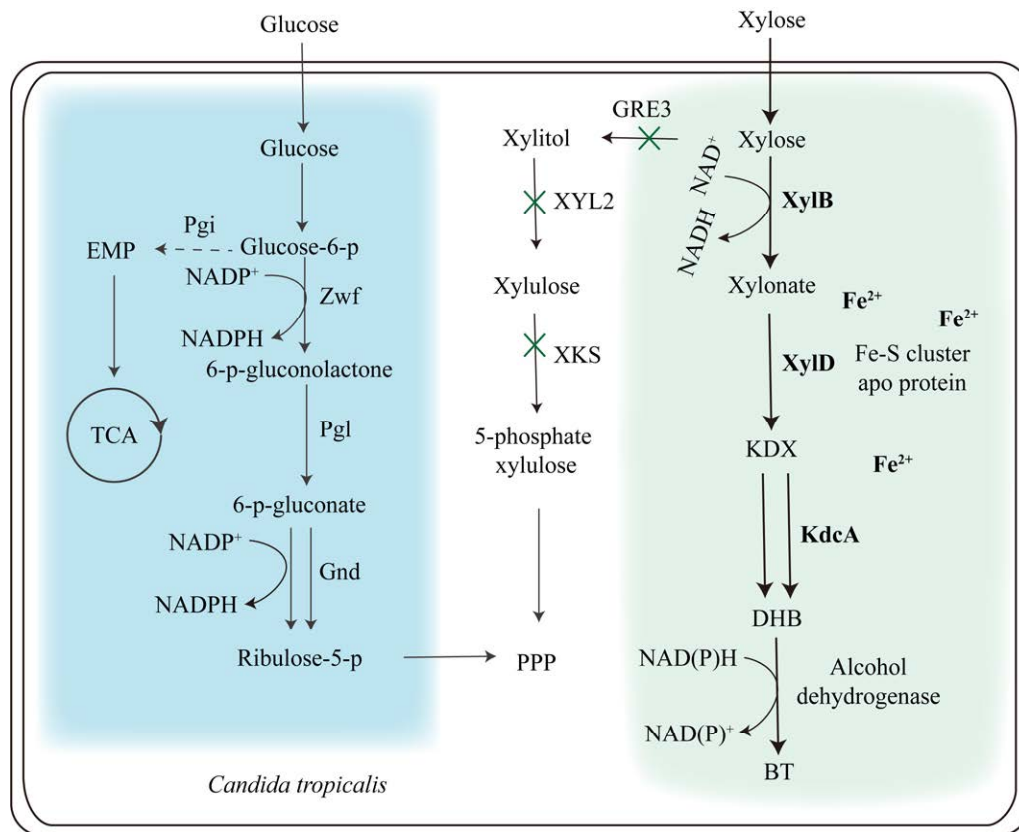


图1 改造热带假丝酵母生产1,2,4-丁三醇的代谢工程策略 ×代表基因被双敲除,虚线代表基因被单敲除,双箭头该关键酶的基因被过表达,加粗字体代表外源基因;GRE3:木糖还原酶;XYL2:木糖醇脱氢酶;XKS:木酮糖激酶;XYLB:木糖脱氢酶;XYLD:木糖酸脱水酶;KDC:酮酸脱羧酶;KDX:2-酮-3-脱氧-木糖酸;DHB:3,4-二羟基丁醛;ZWF:6-磷酸葡萄糖脱氢酶;PGL:6-磷酸葡萄糖糖酸内酯酶;GND:6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶;PGI:6-磷酸葡萄糖异构酶

Figure 1 Metabolic engineering strategy for producing 1,2,4-butanetriol in *Candida tropicalis*. × represents genes in metabolic pathways knocked out; Dashed lines represent genes that were single knocked out; The double arrows represent overexpression of the key enzyme gene that catalyzes the reaction; Bold font represents the insertion of the exogenous genes. GRE3: Xylose reductase; XYL2: Xylitol dehydrogenase; XKS: Xylulose kinase; XYL B: Xylose dehydrogenase; XYLD: Xylonate dehydrogenase; KDCA: Ketoacid decarboxylase; KDX: 2-keto-3-deoxy-xylonic acid; DHB: 3,4-dihydroxybutanal; ZWF: Glucose-6-phosphate dehydrogenase; PGL: 6-phosphogluconolactonase; GND: 6-phosphogluconate dehydrogenase; PGI: 6-phosphoglucose isomerase.

产物清洁试剂盒及DNA凝胶回收试剂盒, AxyPrep公司;木糖、BT和木糖酸标准品,上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

恒温金属浴和干燥箱,杭州博日科技股份有限公司;自动高压蒸汽灭菌锅, SANYO公司;PCR扩增仪, Biometra公司;琼脂糖凝胶水平

电泳系统,北京市六一仪器厂;紫外分光光度计, UNICO公司;实时荧光定量基因扩增仪,伯乐公司。

1.1.3 培养基

LB、YPD、MM及SM培养基详细信息均参考文献[11]。

玉米芯水解液培养基(g/L): 不同稀释倍数的玉米芯水解液, 酵母粉 10.0, 蛋白胨 20.0, 柠檬酸铁铵 0.5。

发酵培养基(g/L): 葡萄糖 20.0, 木糖 30.0,

酵母粉 10.0, 蛋白胨 20.0, 柠檬酸铁铵 0.5。

1.1.4 引物

本研究所用引物信息见表 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 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	相关特性	来源
Strain/Plasmid name	Characteristic	Source
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 20336	<i>URA3/URA3, GRE3/GRE3, XYL2/XYL2, DPP3/DPP3, DLD35/DLD35, XKS/XKS</i>	ATCC
<i>C. tropicalis</i> CU-206	<i>C. tropicalis</i> ATCC 20336, <i>ura3/ura3</i>	Our laboratory
<i>C. tropicalis</i> CU-207	<i>C. tropicalis</i> CU-206, <i>CAT/cat::gda-URA3-P_{GAP1}-Cas9-3×SV40-T_{ENO1}</i>	Our laboratory
BT06	<i>C. tropicalis</i> CU-207, <i>ura3/ura3, gre3/gre3, XYL2/xy12::gda324-URA3-P_{GAP1}-kdcA-T_{GAP1}-P_{GAP1}-xylD-T_{ENO1}</i>	Our laboratory
BT19	BT06, <i>DPP3/dpp3, GRX3/grx3, xks/xks, PGI/pgi, dld35::gda-URA3-P_{GAP1}-gnd1-T_{ENO1}/dld35::gda-URA3-P_{GAP1}-gnd1-T_{ENO1}</i>	Our laboratory
BT20	BT19, <i>gpp1::gda-URA3-P_{FBA1}-xylB-T_{ENO1}/gpp1::gda-URA3-P_{FBA1}-xylB-T_{ENO1}</i>	This work
BT21	BT19, <i>gpp1::gda-URA3-P_{ADH2}-xylB-T_{ENO1}/gpp1::gda-URA3-P_{ADH2}-xylB-T_{ENO1}</i>	This work
Plasmids		
Ts-GPP1-gda324-URA3-P _{FBA1} -xylB-T	FBA1 promoter	This work
Ts-GPP1-gda324-URA3-P _{ADH2} -xylB-T	ADH2 promoter	This work

表 2 文中所用的引物

Table 2 Primers used in this work

引物名称	引物序列	酶切位点
Primer name	Primer sequence (5'→3')	Restriction site
H-GPP1-F	<u>ACGCGTATGACTAAGACTCAACAACCAGC</u>	<i>Mlu</i> I
H-GPP1-R	<u>ACGCGTAAAATTCGTCATCGGCGTAG</u>	<i>Mlu</i> I
IP-GPP1-R	<u>AACTGCAGGCCCATCTTTGCTTACCG</u>	<i>Pst</i> I
IP-GPP1-F	<u>GCTCTAGATCACCGCCGAAAAGGTCA</u>	<i>Xba</i> I
GPP1-sgrna-F	AGATGGGCTGTTGTCACCTTCGTTTGTAGAGCTAGAAATAGC	
GPP1-sgrna-R	GAAGTGACAACAGCCCATCTTGCAAGAACC GGGAATCGAA	
P _{ADH2} -xylB-F	TTTGAAATCGGGTTATCTCGTTGTCGGTGTCAAGGTAACCTGCAGTGACCCACGGA	
P _{ADH2} -xylB-R	GGGTAAATAGCAGAGGACATTTACCTTTAGACATGTTTGGAAGTTGTTATAAGTAG	
P _{ADH2} -xylB-t-F	CAAACATGTCTAAAGGTGAAATGTCCTCTGCTATTTACCCATCCT	
P _{ADH2} -xylB-t-R	TTTCGGCGGTGATCTAGAGATGAAGACCAGACGTGATTAGGAAGACCAGACGTGATTAGGTTGG	
P _{FBA1} -xylB-F	AATCGGGTTATCTCGTTGTCGGTGTCAAGGTTACGATAACCCATTGATTTCTCTTATTA GACTCAT	
P _{FBA1} -xylB-R	ATGGGTAAATAGCAGAGGACATAGCTCCGGAATTCCTGTTGGATGATTTGTAGATAAG	
P _{FBA1} -xylB-t-F	CTTATCTACAAATCATCCAACAGGAATTCGGAGCTATGTCCTCTGCTATTTACCCAT	
P _{FBA1} -xylB-t-R	CCGGAATTCCTGTTGGACCTTTAGACATGTTTGGGTGTCAAGGTTACGATAACCCAC	

下划线表示对应的酶切位点

The underline represents the corresponding enzyme cleavage site.

1.2 热带假丝酵母基因组的提取

将待提基因组的热带假丝酵母单菌落划线在 YPD 固体培养基的 1/8 位置上, 于 30 °C 培养 2–3 d。取一个 1.5 mL EP 管, 加入 200 μ L 含 1% SDS 的 CH₃COOLi 溶液。将平板上生长的菌体用接种环刮下, 放入上述溶液中混匀, 70 °C 金属浴中处理 15 min。向混合物中加入 70% 终浓度的乙醇, 12 000 r/min 离心 3 min。弃上清液, 将 EP 管放入 37 °C 培养箱中, 烘干乙醇。添加 100 μ L 无菌水悬浮沉淀, 12 000 r/min 离心 3 min 后, 将上清液转移到新的 EP 管中, 上清液中就是提取出的热带假丝酵母工程菌的基因组。

1.3 分子生物学鉴定

(1) PrimeSTAR 是一种高保真酶, 在本研究中用于目的基因 *xylB*、*P_{FBA1}*、*P_{ADH2}* 等的扩增, 其扩增时的 PCR 反应体系: PrimeSTAR 1 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 2 μ L, 模板(100 ng/ μ L) 1 μ L, ddH₂O 补足 50 μ L。PCR 反应条件: 98 °C 3 min; 98 °C 10 s, 55 °C 15 s, 72 °C 10 min, 1 kb/min, 30 个循环, PCR 产物于 4 °C 保存。

(2) 2 \times Taq Master Mix 是一种快速、便捷的预混酶, 本研究多在菌落 PCR 时使用。使用该酶进行热带假丝酵母菌落 PCR 的具体操作如下: 用牙签挑取平板上的热带假丝酵母的单菌落到 200 μ L 离心管中, 微波炉加热 5 min 破壁。然后向离心管中加入配好的酶反应体系, 进行 PCR 扩增即可。具体的反应体系及 PCR 反应条件参考 2 \times Taq Master Mix 说明书。

(3) PCR 扩增结束后, 利用琼脂糖凝胶电泳观察是否成功得到目的片段及得到的是否为单个片段。如果得到的是单个片段, 直接使用试剂盒进行 PCR 产物纯化; 如果得到的片段不纯, 根据片段大小进行胶回收目的片段。具体操作

均参考试剂盒说明书。

1.4 表达质粒的构建

以 Ts-GPP1-gda324-URA3-*P_{ADH2}*-*xylB*-T 为例, 首先构建 GPP1 敲除框。使用引物 H-GPP1-F 和 H-GPP1-R 对 *C. tropicalis* ATCC 20336 的基因组 DNA (基因组提取方法见 1.2) 进行 PCR 扩增(体系和扩增方法见 1.3), 并将产物连接到质粒载体 pMD19-T (Simple) 中, 构建得到 Ts-GPP1 质粒。然后, 使用引物 IP-GPP1-F 和 IP-GPP1-R 进行反向 PCR (扩增方法见 1.3), 以去除 GPP1 的中间区域。所得到的 PCR 产物(GPP1-Ts-GPP1) 经 *Pst* I 和 *Xba* I 双酶切后, 连接到 gda324-URA3 基因片段上, 生成了 Ts-GPP1-gda324-URA3 质粒。接下来从 BT19 基因组上用引物 *P_{ADH2}*-*xylB*-F、*P_{ADH2}*-*xylB*-R 扩增出 ADH2 启动子片段, 然后再用 *P_{ADH2}*-*xylB*-t-F、*P_{ADH2}*-*xylB*-t-R 从 BT19 基因组上扩增出 *xylB*-T 片段, 将这两个目的片段用一步连接试剂盒连接到敲除框的 *Eco*R I 位点, 获得质粒 Ts-GPP1-gda324-URA3-*P_{ADH2}*-*xylB*-T。用相同的方法构建质粒 Ts-GPP1-gda324-URA3-*P_{FBA1}*-*xylB*-T。

1.5 热带假丝酵母转化方法

本次研究所使用的热带假丝酵母氯化锂转化方法详见参考文献[11]。

1.6 5 L 发酵罐补料分批发酵

在 5 L 发酵罐进行 BT 生产的放大实验中, 首先在 YPD 固体培养基上划线接种以活化菌株, 30 °C 条件下培养 2–3 d, 以得到单菌落。然后将单菌落接种于 20 mL YPD 液体培养基中培养 24 h, 再以 1% 的接种量接种到 50 mL 的发酵培养基中, 30 °C、200 r/min 培养至 OD₆₀₀ 达到 12–15。以 10% 的接种量将其转移到 5 L 发酵罐中, 发酵罐的最终装液量是 2 L。在整个发酵过程中, 自动流加葡萄糖和木糖。保持

发酵温度在 30 °C，同时发酵罐中 pH 值用氨水控制在 5.5，通过自动搅拌控制发酵液中溶解氧维持在 15%左右。发酵前期，当发酵液中葡萄糖浓度低于 5 g/L 开始流加 800 g/L 的葡萄糖补充液，48 h 后保持培养基中葡萄糖浓度低于 5 g/L。48 h 后开始慢速流加浓度为 100 g/L 的木糖补充液。发酵过程每隔 12 h 取样 1 次，用于测定发酵液中葡萄糖和 BT 浓度。

1.7 代谢物测定方法

发酵液中 BT 浓度采用高效液相色谱(HPLC)检测^[16]。木糖酸的浓度用异羟肟酸法检测^[17]。

1.8 热带假丝酵母细胞中总 RNA 的提取及荧光定量 PCR

热带假丝酵母细胞中总 RNA 的提取及荧光定量 PCR 方法参考文献[18]。

1.9 玉米芯水解液制作

首先在 70 °C 的条件下，利用 1%氢氧化钠溶液对玉米芯样品进行了 12 h 的碱液预处理，紧接着使用自来水对其进行全面清洗，直至 pH 值达到中性状态，然后进行风干处理，最后在常温条件下将其存放在密封的容器里^[19]。将经过预处理的玉米芯加入至 pH 为 4.8 的柠檬酸缓冲液中，设定固液比为 1:5，同时加入 0.1%的纤维素酶和木聚糖酶。在 50 °C、150 r/min 条件下对混合物进行 60 h 的水解。水解结束后过滤混合物以获得玉米芯水解液。

2 结果与分析

2.1 木糖脱氢酶基因的转录水平对 BT 生产的影响

本实验室前期构建了合成 BT 的热带假丝酵母工程菌 BT19^[12] (图 2A)，在该菌株中由启动子 P_{GAP1} 调控木糖脱氢酶基因的表达。然而，工程菌 BT19 在 BT 发酵过程中有较高的木糖酸

中间产物积累。为了降低中间产物积累，本研究以 BT19 为出发菌株考察了不同启动子调控木糖脱氢酶对木糖酸积累的影响。有研究^[20]表明 P_{FBA1} 的活性是 P_{GAP1} 的 1/3， P_{ADH2} 的活性受到葡萄糖的抑制，在葡萄糖浓度较低的情况下 P_{ADH2} 的活性可以达到 P_{GAP1} 的 1/3。为评价木糖脱氢酶基因表达水平对木糖酸积累和 BT 合成的影响，通过 CRISPR-Cas9 基因编辑技术将工程菌 BT19 中木糖脱氢酶基因的启动子由 P_{GAP1} 更换成 P_{FBA1} 和 P_{ADH2} ，分别获得菌株 BT20 和 BT21。利用 RT-qPCR 技术分别考察了出发菌株和工程菌 BT20、BT21 的木糖脱氢酶基因转录水平，结果如图 2B 所示。相较于对照菌株 BT19，菌株 BT20 中由 P_{FBA1} 启动子调控的木糖脱氢酶基因转录水平降低了 21%，菌株 BT21 中由 P_{ADH2} 启动子调控的木糖脱氢酶基因转录水平降低了 56%。考虑到菌株 BT21 中 P_{ADH2} 的活性受发酵培养基中起始葡萄糖的抑制，进一步延迟培养时间，木糖脱氢酶基因表达水平可能会有上升趋势。

进一步评价了工程菌 BT20、BT21 的细胞生长、木糖酸积累和 BT 合成能力，结果如图 3 所示。相较于出发菌株，菌株 BT20 和 BT21 的生长速率和最大生物量基本一致(图 3A)。相较于对照菌株 BT19，菌株 BT20 积累的木糖酸无明显变化，而菌株 BT21 的木糖酸从 4.10 g/L 降低到 3.40 g/L，降低 17%。菌株 BT21 的 BT 产量从 3.10 g/L 升高到 3.45 g/L，提高了 11%。相较于对照菌株 BT19，菌株 BT21 中木糖酸积累减少的同时 BT 的产量也有提高。可能是因为培养基中的木糖酸积累减少，改变了 BT 生产过程中的酸性环境，从而更加适宜关键酶发挥作用，BT 生产效率也就随之提高，说明木糖酸积累不利于 BT 的生产。

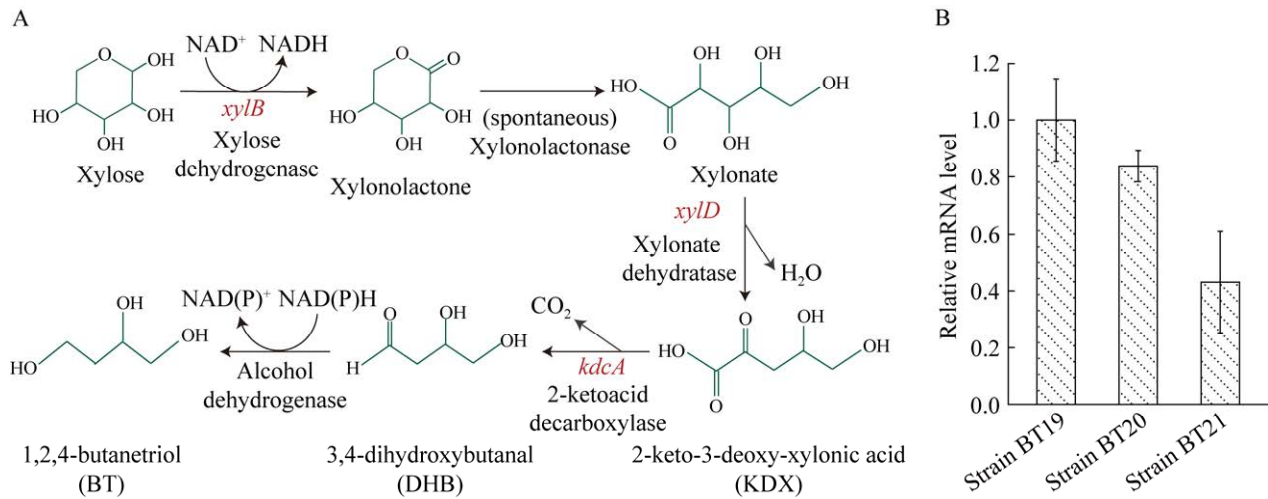


图 2 热带假丝酵母中合成 1,2,4-丁三醇的代谢途径(A)及出发菌株与工程菌中木糖脱氢酶基因的转录水平(B) *xylB*: 来自新月柄杆菌的木糖脱氢酶编码基因; *xylD*: 来自新月柄杆菌的木糖酸脱水酶编码基因; *kdcA*: 来自乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)的酮酸脱羧酶编码基因

Figure 2 Metabolic pathway of 1,2,4-butanetriol synthesis in *Candida tropicalis* (A) and transcriptional level of xylose dehydrogenase gene in starting strain and engineered strain (B). *xylB*: Encodes xylose dehydrogenase from *Caulobacter crescentus*; *xylD*: Encodes xylonate dehydratase from *Caulobacter crescentus*; *kdcA*: Encodes ketoacid decarboxylase from *Lactococcus lactis*.

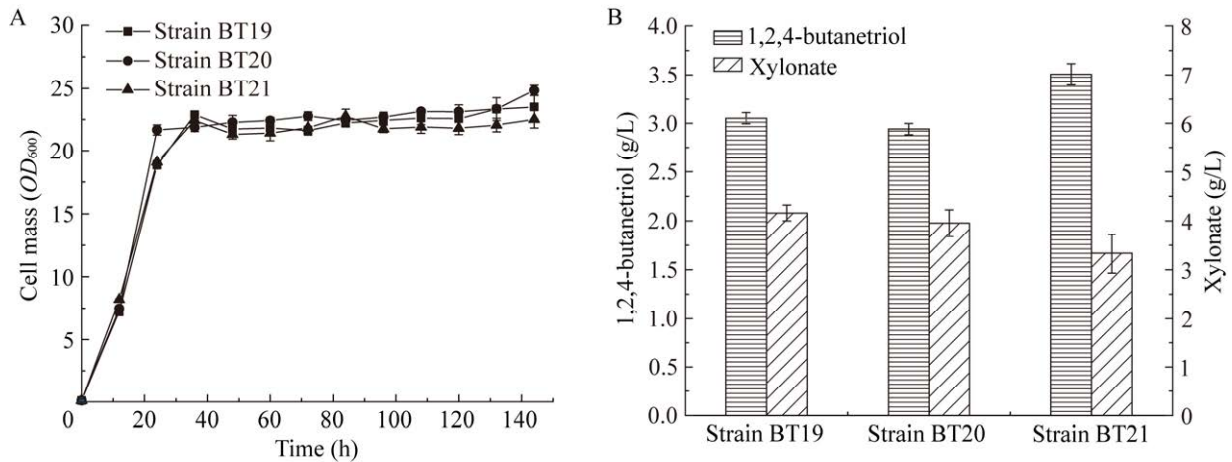


图 3 工程菌在摇瓶发酵中的生长曲线(A)与发酵结果(B)

Figure 3 Growth curve (A) and fermentation results (B) of engineering bacteria in shake flask fermentation.

2.2 优化发酵条件提高工程菌的 BT 产量

BT 合成过程中由于木糖酸等酸性物质积累, pH 不断下降。菌株 BT21 发酵结束后发酵液 pH 值维持在 3.7 左右。研究报道称, 这种酸

性环境不利于 BT 的生产^[14], 本研究通过向发酵培养基中添加碳酸钙来改变培养基中的 pH, 探究其对 BT 生产的影响。

工程菌 BT21 在额外添加不同浓度碳酸钙

的发酵培养基中进行摇瓶实验,如图 4 所示,添加碳酸钙之后菌体最终积累的生物量较对照组降低 10%左右。同时,培养基中添加不同浓度碳酸钙对 BT 合成均有积极影响。在添加 9 g/L 碳酸钙的培养基中, pH 值从 3.7 提高到 5.0, BT 产量也达到最高,为 4.40 g/L,较对照(未添加碳酸钙的培养基)提高 29%。但是,随着培养基中碳酸钙浓度的增加, pH 不再变化,同时 BT 的积累量不再增加。后续摇瓶发酵实验均在培养基中添加 9 g/L 的碳酸钙。

本课题组前期研究发现^[12],发酵过程中木糖酸过量积累主要是因为催化木糖酸脱水的木糖酸脱水酶活性不足。工程菌 BT21 中使用的是新月柄杆菌(*Caulobacter crescentus*)来源的木糖酸脱水酶,属于 IlvD/EDD 家族,其活性中心包含了 Fe-S 簇。酿酒酵母中 Fe-S 簇的生成受到细胞质中铁离子浓度的制约^[6,21]。因此,本研究尝试在培养基中添加柠檬酸铁铵,以期提高胞内铁离子的浓度,增加 Fe-S 簇的数量,进而增强 BT 合成。

接下来向发酵培养基添加不同浓度柠檬酸铁铵,观察对 BT 生产的影响。如图 5 所示,在含有不同浓度的柠檬酸铁铵发酵培养基中,工程菌 BT21 的生长情况无显著差异。在未加柠檬酸铁铵的培养基中木糖酸的积累量是 4.00 g/L 左右, BT 的产量最低。当培养基中柠檬酸铁铵浓度为 1 mmol/L 时, BT 的产量达到最高,同时木糖酸积累量显著降低。随着柠檬酸铁铵浓度的增加, BT 产量没有提高,反而木糖酸积累增加。推测培养基中高浓度的铁离子对木糖酸脱水酶活性可能有抑制作用。综上,后续均在添加 1 mmol/L 柠檬酸铁铵的培养基中进行 BT 的发酵生产。

2.3 工程菌 BT21 在 5 L 发酵罐中生产 BT

工程菌 BT21 在 5 L 发酵罐中扩大培养,发酵结果如图 6 所示。发酵 24 h 后,发酵罐里的葡萄糖浓度降至 5 g/L 以下,开始流加 800 g/L 的葡萄糖补充液,控制葡萄糖浓度在 5 g/L 左右,48 h 后控制葡萄糖浓度低于 5 g/L。48 h 开始慢速流加木糖,用来生产 BT。96 h 后,菌体生长

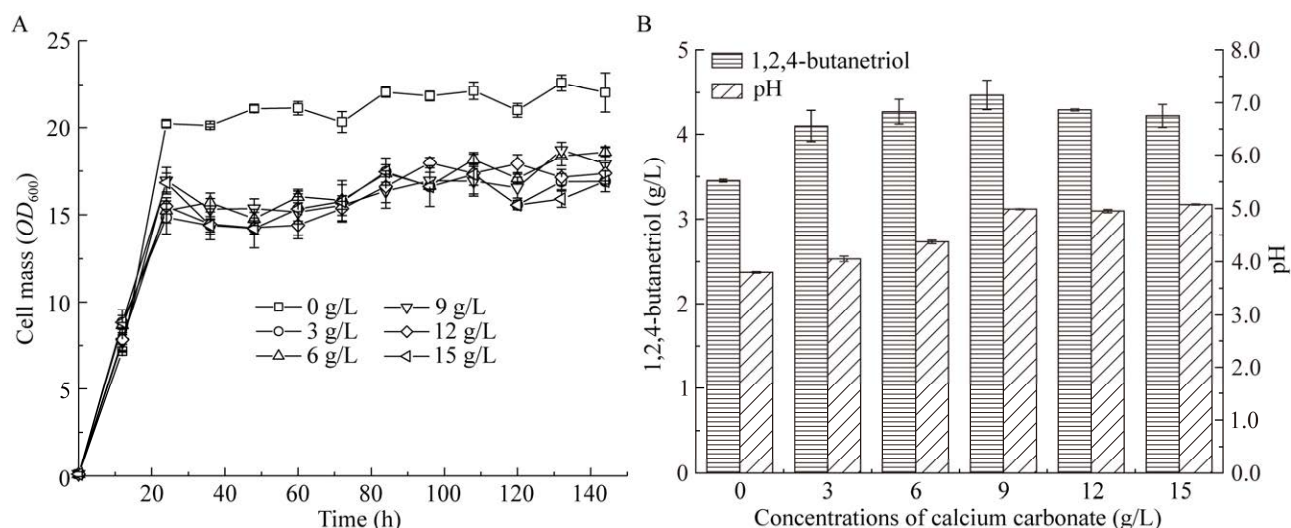


图 4 菌株 BT21 在不同浓度的碳酸钙培养基中的生长曲线(A)与发酵结果(B)

Figure 4 The growth curve (A) and fermentation results (B) of the strain BT21 in different concentrations of calcium carbonate medium.

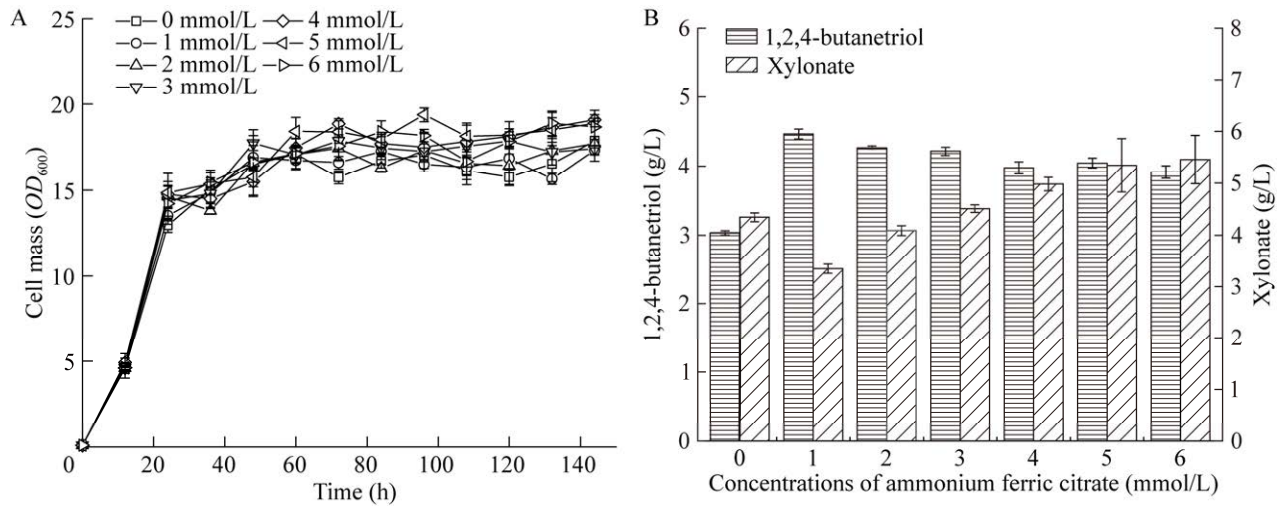


图 5 菌株 BT21 在不同浓度的柠檬酸铁铵培养基中的生长曲线(A)与发酵结果(B)

Figure 5 The growth curve (A) and fermentation results (B) of the strain BT21 in different concentrations of ammonium ferric citrate medium.

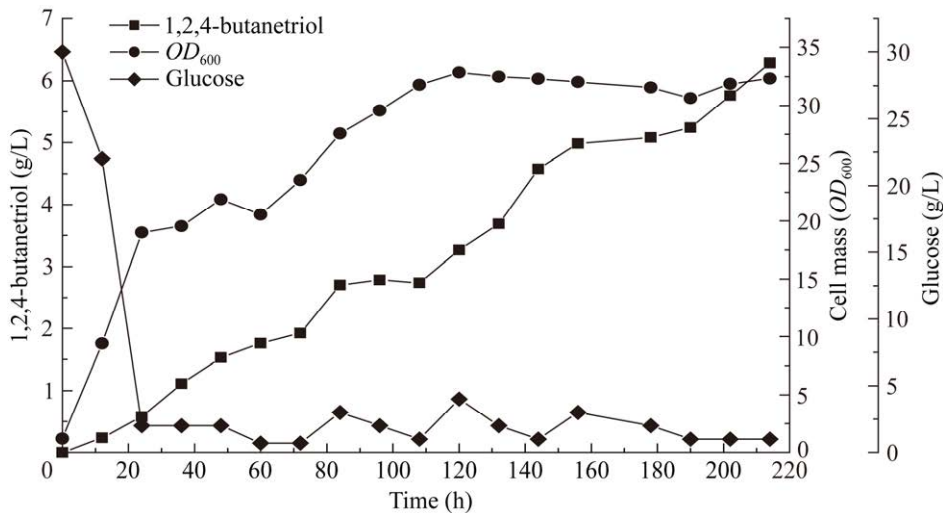


图 6 菌株 BT21 在 5 L 发酵罐中发酵生产 BT 的过程

Figure 6 The process of fermenting BT with strain BT21 in a 5 L fermenter.

开始趋于稳定, 并且细胞的生物量不再因添加葡萄糖而继续增长。发酵过程中 BT 产量稳步增加, 216 h 发酵结束, BT 产量达到 6.20 g/L。

2.4 工程菌 BT21 利用玉米芯水解液生产 BT

将玉米芯经碱热预处理, 再经一系列水解反应, 最终得到含有 60 g/L 的葡萄糖和 37 g/L 的木糖的玉米芯水解液。向水解液中添加酵母

粉、蛋白胨制成玉米芯水解液培养基。工程菌 BT21 利用玉米芯水解液培养基发酵生产 BT, 发酵结果如图 7 所示。当使用 2 倍稀释水解液和 3 倍玉米芯水解液发酵时, 工程菌 BT21 生长速度和最终积累的生物量与使用正常发酵培养基大致相同。但是使用未稀释玉米芯水解液发酵时, 生长速度缓慢, 48 h 才到达稳定期。从

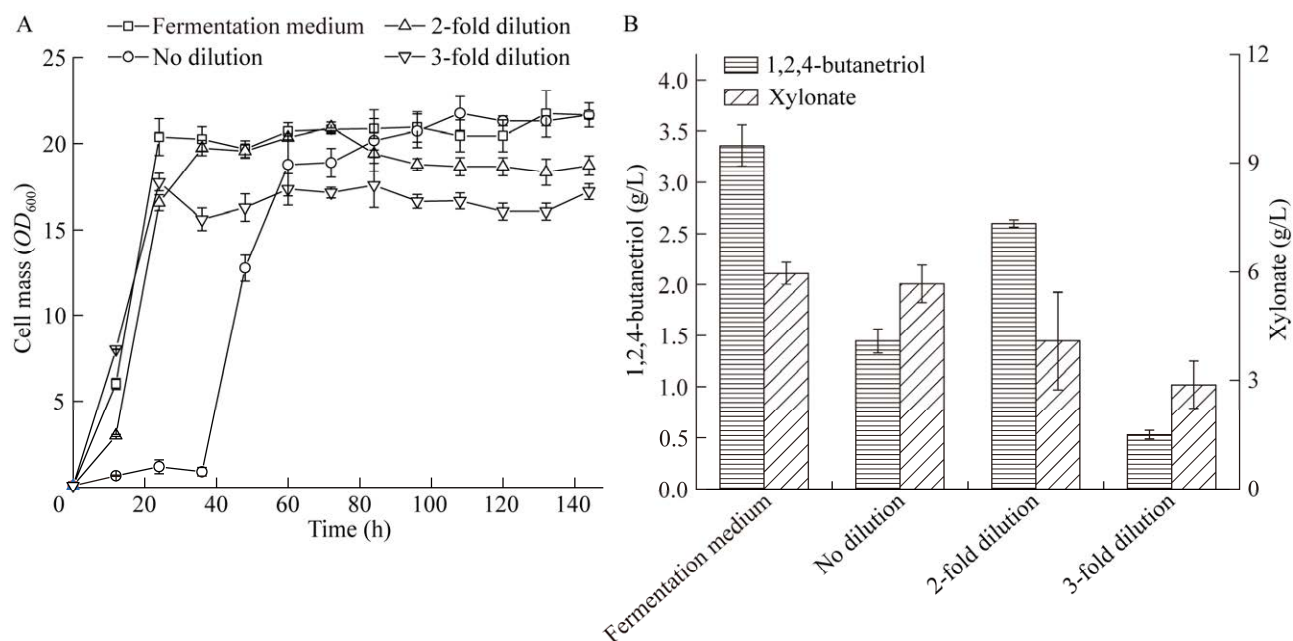


图 7 菌株 BT21 在不同浓度的玉米芯水解液中的生长曲线(A)和发酵结果(B)

Figure 7 The growth curve (A) and fermentation results (B) of the strain BT21 in corn cob hydrolysate solutions of various concentrations.

生产情况来看,使用含有 60 g/L 葡萄糖和 37 g/L 木糖的未稀释玉米芯水解液进行发酵时,分别产生 1.44 g/L 和 5.66 g/L 的 BT 和木糖酸,摩尔转化率是 5.6%。当 2 倍稀释的玉米芯水解液用于底物发酵的时候,相同时间生产 2.60 g/L 的 BT 和 4.80 g/L 的木糖酸,摩尔转化率是 20.0%。而使用 3 倍稀释水解液为底物发酵时,144 h 后生产出 0.50 g/L 的 BT 和 2.80 g/L 的木糖酸,摩尔转化率是 7.6%。

木质纤维素在水解过程中,由于预处理的时间、温度、pH 不同,通常都会产生不同浓度的抑制剂,有报道称糠醛、呋喃糠醛等会严重抑制一些微生物的生长^[22]。本研究中,使用未稀释水解液进行发酵时,虽然热带假丝酵母的生长速度缓慢,但最终生物量未受影响。这说明热带假丝酵母对抑制剂具有一定的耐受性。使用 2 倍稀释和 3 倍稀释的水解液发酵时,

工程菌 BT21 的生长基本不受影响。并且,使用 2 倍稀释水解液作为发酵培养基时,摩尔转化率最高。以上结果表明,热带假丝酵母是利用玉米芯水解液高效合成 BT 的潜在宿主。

3 讨论与结论

本研究以拥有 BT 生物合成途径的热带假丝酵母工程菌-BT19 为起始菌株,将其中木糖脱氢酶基因的启动子从 P_{GAP1} 更换为较弱的 P_{ADH2} 启动子,这不仅减弱了木糖脱氢酶基因的表达水平,减少了木糖酸的积累,并成功提高了 BT 的产量。这表明木糖脱氢酶表达水平的适当降低虽然在一定程度上牺牲了产物合成的代谢通量,但是关键中间产物木糖酸积累的减少可能有利于产物合成。然而,工程菌 BT21 中依然存在较高浓度的木糖酸积累,后续可以考虑增强下游木糖酸脱水酶催化能力进而提高

BT 生产效率。通过向培养基中添加 9 g/L 的碳酸钙, 缓解木糖酸积累造成的酸性环境, 将 pH 值从 3.7 调整至 5.0。通过 144 h 的摇瓶发酵, BT 最终产量达到了 4.40 g/L, 比起始菌株提高了 42%。说明较低 pH 环境不利于热带假丝酵母生产 BT, 添加中和剂调节培养基 pH 能显著提高工程菌株 BT21 的 BT 合成能力。在 5 L 的发酵罐中, 产量进一步上升至 6.20 g/L, 这是迄今为止热带假丝酵母中已报道的最高产量。并且以热带假丝酵母为宿主成功利用玉米芯水解液生产出 BT。但是, 在玉米芯水解液的制作过程中, 需要外源添加商品酶。未来可以尝试在热带假丝酵母细胞表面表达半纤维素酶, 在不添加商品酶的条件下, 菌株可以在水解纤维素的同时利用其水解产物合成 BT。

本研究以非传统二倍体酵母——热带假丝酵母作为宿主, 通过更换木糖脱氢酶基因启动子, 成功减少木糖酸积累, BT 的产量因此提高了 11%。后续向发酵培养基额外添加碳酸钙缓解了木糖酸积累带来的酸性环境, BT 产量进一步提高到 4.40 g/L。在 5 L 的发酵罐中, BT 产量达 6.20g/L。另外, 工程菌 BT21 利用两倍稀释的玉米芯水解液成功生产出 2.60 g/L 的 BT, 摩尔产率达 20%。本研究为大规模利用生物质原料发酵生产 BT 挖掘出了一个潜力宿主。

REFERENCES

- [1] FRANCOIS JM, ALKIM C, MORIN N. Engineering microbial pathways for production of bio-based chemicals from lignocellulosic sugars: current status and perspectives[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2020, 13: 118.
- [2] LI CL, CHENG G, BALAN V, KENT MS, ONG M, CHUNDAWAT SPS, SOUSA LD, MELNICHENKO YB, DALE BE, SIMMONS BA, SINGH S. Influence of physico-chemical changes on enzymatic digestibility of ionic liquid and AFEX pretreated corn stover[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(13): 6928-6936.
- [3] TOIVARI M, NYGÅRD Y, KUMPULA EP, VEHKOMÄKI ML, BENČINA M, VALKONEN M, MAAHEIMO H, ANDBERG M, KOIVULA A, RUOHONEN L, PENTTILÄ M, WIEBE MG. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of D-xylose to D-xylonate[J]. *Metabolic Engineering*, 2012, 14(4): 427-436.
- [4] TAI YS, XIONG MY, JAMBUNATHAN P, WANG JY, WANG JL, STAPLETON C, ZHANG KC. Engineering nonphosphorylative metabolism to generate lignocellulose-derived products[J]. *Nature Chemical Biology*, 2016, 12: 247-253.
- [5] SALUSJÄRVI L, TOIVARI M, VEHKOMÄKI ML, KOIVISTOINEN O, MOJZITA D, NIEMELÄ K, PENTTILÄ M, RUOHONEN L. Production of ethylene glycol or glycolic acid from D-xylose in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(22): 8151-8163.
- [6] BAMBA T, YUKAWA T, GUIRIMAND G, INOKUMA K, SASAKI K, HASUNUMA T, KONDO A. Production of 1,2,4-butanetriol from xylose by *Saccharomyces cerevisiae* through Fe metabolic engineering[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 56: 17-27.
- [7] GOURANLOU F, KOHSARY I. Synthesis and characterization of 1,2,4-butanetrioltrinitrate[J]. *Asian Journal of Chemistry*, 2010: 4221-4228.
- [8] CAO YJ, NIU W, GUO JT, XIAN M, LIU HZ. Biotechnological production of 1,2,4-butanetriol: an efficient process to synthesize energetic material precursor from renewable biomass[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 18149.
- [9] 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.
- [10] WANG X, XU NN, HU SW, YANG JM, GAO Q, XU S, CHEN KQ, OUYANG PK. 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] YUKAWA T, BAMBA T, GUIRIMAND G, MATSUDA M, HASUNUMA T, KONDO A. Optimization of 1,2,4-butanetriol production from xylose in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering of NADH/NADPH balance[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2021, 118(1): 175-185.

- [12] 张琳, 夏媛媛, 杨海泉, 陈献忠, 曹钰. 代谢工程改造热带假丝酵母生产 1,2,4-丁三醇[J]. 微生物学通报, 2022, 49(9): 3555-3566.
ZHANG L, XIA YY, YANG HQ, CHEN XZ, CAO Y. Metabolic engineering of *Candida tropicalis* for production of 1,2,4-butanetriol[J]. Microbiology China, 2022, 49(9): 3555-3566 (in Chinese).
- [13] LI JY, XIA YY, WEI B, SHEN W, YANG HQ, CHEN XZ. Metabolic engineering of *Candida tropicalis* for efficient 1,2,4-butanetriol production[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2024, 710: 149876.
- [14] MISHRA S, LIN ZQ, PANG SM, ZHANG YM, BHATT P, CHEN SH. Biosurfactant is a powerful tool for the bioremediation of heavy metals from contaminated soils[J]. Journal of Hazardous Materials, 2021, 418: 126253.
- [15] 郭超. 代谢改造大肠杆菌强化 1,2,4-丁三醇合成[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2022.
GUO C. Improved 1,2,4-butanetriol biosynthesis by metabolic modification in *Escherichia coli*[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2022 (in Chinese).
- [16] TIZAZU BZ, ROY K, MOHOLKAR VS. Ultrasonic enhancement of xylitol production from sugarcane bagasse using immobilized *Candida tropicalis* MTCC 184[J]. Bioresource Technology, 2018, 268: 247-258.
- [17] LIU HW, VALDEHUESA KNG, NISOLA GM, RAMOS KRM, CHUNG WJ. High yield production of D-xylonic acid from D-xylose using engineered *Escherichia coli*[J]. Bioresource Technology, 2012, 115: 244-248.
- [18] SILVA S, HOOPER SJ, HENRIQUES M, OLIVEIRA R, AZEREDO J, WILLIAMS DW. The role of secreted aspartyl proteinases in *Candida tropicalis* invasion and damage of oral mucosa[J]. Clinical Microbiology and Infection: the Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2011, 17(2): 264-272.
- [19] YU H, GUO J, CHEN YF, FU GX, LI BZ, GUO XW, XIAO DG. Efficient utilization of hemicellulose and cellulose in alkali liquor-pretreated corncob for bioethanol production at high solid loading by *Spathaspora passalidarum* U1-58[J]. Bioresource Technology, 2017, 232: 168-175.
- [20] ZHANG LH, ZHANG HB, LIU YF, ZHOU JY, SHEN W, LIU LM, LI Q, CHEN XZ. A CRISPR-Cas9 system for multiple genome editing and pathway assembly in *Candida tropicalis*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2020, 117(2): 531-542.
- [21] ANDBERG M, ARO-KÄRKKÄINEN N, CARLSON P, OJA M, BOZONNET S, TOIVARI M, HAKULINEN N, O'DONOHUE M, PENTTILÄ M, KOIVULA A. Characterization and mutagenesis of two novel iron-sulphur cluster pentonate dehydratases[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(17): 7549-7563.
- [22] PING Y, LING HZ, SONG G, GE JP. Xylitol production from non-detoxified corncob hemicellulose acid hydrolysate by *Candida tropicalis*[J]. Biochemical Engineering Journal, 2013, 75: 86-91.