

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (4) :398 - 407; 4 April 2014
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.04.006

光滑球拟酵母生产 2,3-丁二酮的系统代谢工程策略

高翔, 徐楠, 李树波, 刘立明*

江南大学, 食品科学与技术国家重点实验室, 工业生物技术教育部重点实验室, 食品微生物制造工程研究室, 江苏 无锡 214122

摘要: 【目的】调控丙酮酸工业生产菌株光滑球拟酵母 (*Torulopsis glabrata*) CCTCC M202019 碳代谢流分布促进 2,3-丁二酮积累。【方法】过量表达来源于枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的乙酰乳酸合成酶 (ALS); 在此基础上, 借助 *T. glabrata* 全基因组规模代谢网络模型 (GSMM) iNX804 解析敲除基因 *ILV5* 的必要性; 敲除基因 *BDH* 以阻断 2,3-丁二酮的降解。【结果】过量表达 ALS 将 ALS 活性提高了 4.6 倍, 发酵液中 2,3-丁二酮浓度从 0.01 g/L 提高至 0.57 g/L。敲除基因 *ILV5* 使 2,3-丁二酮浓度提高 28.1%。敲除基因 *BDH* 导致丁二酮还原酶和丁二醇脱氢酶活性分别降低 74.4%、76.1%, 同时 2,3-丁二酮进一步代谢产物 3-羟基丁酮和 2,3-丁二醇浓度则分别降低 52.2% 和 71.4%, 2,3-丁二酮浓度为 0.95 g/L。【结论】基于 GSMM 的系统代谢工程策略能够将碳代谢流从丙酮酸节点导向 2,3-丁二酮, 实现 2,3-丁二酮的有效积累。

关键词: 光滑球拟酵母, 2,3-丁二酮, 代谢流分布, 系统代谢工程

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2014) 04-0398-10

作为具有奶油香味的重要精细化学品^[1], 2,3-丁二酮广泛应用于食品 (GB23488-2009)、化妆品、烟草、医药等工业领域。2,3-丁二酮的生产方法包括化学合成、天然提取和微生物发酵。其中, 微生物发酵法具有安全性高、风味醇厚、成本低廉和环境友好等优点, 而逐渐成为研究热点。能大量积累 2,3-丁二酮的微生物包括: 产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*, 1.05 g/L)^[2]、乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*, 0.52 g/L)^[3]、干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*, 0.14 g/L)^[4] 等。为了进一步提高 2,3-丁二酮的生产效率, 研究人员通过过量表达乙酰乳酸合成酶 (ALS)^[5]、抑制乳酸脱氢酶 (LDH)^[6]、丙酮酸

甲酸裂解酶 (PFL)^[7] 或乙酰乳酸脱羧酶 (ALDB)^[8] 等代谢工程策略以进一步提高 2,3-丁二酮对底物转化率。然而, 由于无法大量提高 2,3-丁二酮重要前体—丙酮酸的胞内浓度, 导致上述代谢工程策略难以将 2,3-丁二酮浓度应用于规模化的工业生产。为此, 如能提高 2,3-丁二酮前体—丙酮酸的胞内浓度, 则有可能进一步提高 2,3-丁二酮的产量。光滑球拟酵母 (*Torulopsis glabrata*) CCTCC M202019 是一株用于发酵法生产丙酮酸的工业菌株, 能大量积累丙酮酸 (94.8 g/L)^[9], 其基因组中不存在编码 ALDB 的基因^[10], 因此可作为 2,3-丁二酮的潜在生产菌株。

基金项目: 中组部首批青年拔尖人才支持计划; 无锡市科技局项目 (CLE01N1111); 江苏省杰出青年基金项目 (BK2012002)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-510-85197875; E-mail: mingll@jiangnan.edu.cn

作者简介: 高翔 (1988 -), 男, 安徽淮北人, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物代谢功能的强化。E-mail: gaoliang0237@hotmail.com

收稿日期: 2013-08-30; **修回日期:** 2013-12-18

由前期构建的 *T. glabrata* 基因组规模代谢网络模型 *iNX804*^[10] 可知, 在 *T. glabrata* 中, 两分子的丙酮酸在 ALS 的作用下缩合成一分子的乙酰乳酸, 乙酰乳酸经过非酶氧化脱羧反应生成 2,3-丁二酮。其中: 乙酰乳酸可在己酮醇酸还原异构酶 (AHAIR) 的作用下进入 L-缬氨酸和 L-亮氨酸的合成途径; 2,3-丁二酮可在丁二酮还原酶 (DR)、丁二醇脱氢酶 (BDH) 的作用下降解为 3-羟基丁酮与 2,3-丁二醇。ALS 由基因 *ILV2*、*ILV6* 编码, AHAIR 由基因 *ILV5* 编码, DR 与 BDH 由同一基因 *BDH* 编码。

本研究首先将枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 中编码 ALS 的基因 *alsS* 过量表达于 *T. glabrata* 中, 考察胞内 ALS 酶活性的提高对乙酰乳酸代谢及 2,

3-丁二酮积累的影响。在此基础上借助系统代谢工程的研究策略, 解析乙酰乳酸支路代谢对 2,3-丁二酮积累的影响, 确定 *ILV5* 为敲除靶基因。同时敲除基因 *BDH* 以阻断 2,3-丁二酮的降解代谢, 实现 2,3-丁二酮的积累, 为 *T. glabrata* 发酵生产 2,3-丁二酮奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和引物: 本研究所涉及的菌株和质粒见表 1, 所使用的引物见表 2。

表 1. 本研究所使用的菌株与质粒

Table 1. The strains and plasmids used in this study

strain/plasmid	description	source
strain		
<i>T. glabrata</i>	CCTCC M202019	[11]
<i>T. glabrata</i> Δ <i>ura3</i> Δ <i>arg8</i>	derived from <i>T. glabrata</i> CCTCC M202019	[12]
DA-0	<i>T. glabrata</i> Δ <i>ura3</i> Δ <i>arg8</i> /pYES-PGK	this work
DA-1	<i>T. glabrata</i> Δ <i>ura3</i> Δ <i>arg8</i> /pYES-PGK-alsS	this work
DA-2	DA-1 Δ <i>ilv5</i>	this work
DA-3	DA-1 Δ <i>ilv5</i> Δ <i>bdh</i> : :ARG8	this work
plasmids		
pYES2	2 μ , <i>GAL1</i> promoter, <i>Ura3</i> , Amp ^R	Invitrogen
pYES-PGK	derivative of pYES2 with <i>PGK</i> 1 promoter	this work
pYES-PGK-alsS	derivative of pYES-PGK with <i>alsS</i>	this work

表 2. 本实验所使用的引物

Table 2. The oligonucleotide primers used in this study

primer name	sequence (5' → 3')	purpose
fl ori-f	GAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAG (<i>Nae</i> I)	fl ori PCR
fl ori-r	GGTGCAGGTGACTAGTGGATCATCCCCACGC	fl ori PCR
PGK-f	GGGATGATCCACTAGTCACCTGCACCAGCAACAAC	PGK PCR
PGK-r	CCCAGCTTTATCGAATAGATGTATGTATGCCGTCTTGC (<i>Hind</i> III)	PGK PCR
alsSf	CGGGATCCATGGACAAAAGCAACAAAAGAACAAA (<i>Bam</i> H I)	<i>alsS</i> PCR
alsSr	ACATGCATGCCTAGAGAGCTTTCGTTTTTCATGAG (<i>Sph</i> I)	<i>alsS</i> PCR
ilv5-left-f	GGACCACCTCTGTAAGTATGTTATGTCATACCG	<i>ILV5</i> deletion
ilv5-left-r	AATTCAGATTCTAGCAGTTGCTCTGTAAGTCTTTGAAATC	<i>ILV5</i> deletion
ilv5-right-f	CTACCAGGACAACCTGCTAGAATCTGAATTGCAAACC	<i>ILV5</i> deletion
ilv5-right-r	GCTCTACAGTTGCACTTTGCGTAATGCAGTTAG	<i>ILV5</i> deletion
bdh-left-f	AGCAGAGATAGCGGCGTTATGTAGTCGTGT	<i>BDH</i> deletion
bdh-left-r	TCTCTGTACATCTTGTAAATAGTTTGGAAGCTGGAAC	<i>BDH</i> deletion
arg8ORF-f	CCAAACTATTACAAGATGTACAAGAGATATTTCTCCAC	<i>BDH</i> deletion
arg8ORF-r	CGTCTAGAGACTTATTTTGAGAAGCGTCATTAAC	<i>BDH</i> deletion
bdh-right-f	CGTCTCTCAAATAAGTACTCTCTAGACGAAGTAATGATA	<i>BDH</i> deletion
bdh-right-r	AAGTTGACGATACCTATTGCGATGCGATG	<i>BDH</i> deletion

1.1.2 主要试剂和仪器: *Pyrobest* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶等分子常规试剂购自 TaKaRa 公司;质粒提取试剂盒, DNA 片段快速胶回收试剂盒等试剂盒购自上海生工生物工程服务有限公司。PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司, 型号 C1000);凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司, 型号 Gel Doc EZ);电泳仪(北京六一仪器厂, 型号 DYY-6D);紫外可见分光光度计(日本岛津公司, 型号 UV2450);高效液相色谱仪(美国赛默飞巴尔, 型号 Ultimate 3000);气相色谱仪(Shimadzu 公司, 型号 GC-2010)。

1.1.3 培养基: YPD 培养基、无氮源基础培养基(NFMM)、基础培养基(MM)和限制培养基(LM)组分参见文献[12];在 MM 中分别添加 80 mg/L 的尿嘧啶、40 mg/L 的精氨酸、80 mg/L 的支链氨基酸和 10 mg/L 的泛酸钙得到补充培养基 SM-U、SM-A、SM-B 和 SM-P, 用于重组菌株的构建与筛选。发酵培养基、微量元素和维生素液组分参见文献[11]。

1.2 代谢网络模型模拟与分析

模拟与分析所使用的模型为本实验室构建的 *T. glabrata* 模型 iNX804, 包含 804 个基因、1278 个反应及 1023 个代谢物^[10]。

利用 COBRA Toolbox 将包含生物量方程的 *T. glabrata* 模型 Excel 文件读入 MATLAB (R2010b) 中转换为系数矩阵 $S(m \times n)$, 并以 GLPK 作为线性规划器对模型进行流量平衡分析(FBA)^[13], 寻求约束条件下的目标方程的最优解(最大或最小)及由此得到的模型反应流量分布。为了考察 AHAIR 反应流量的大小对 2,3-丁二酮积累的影响, 以 2,3-丁二酮的比生成速率为目标方程, 将 AHAIR 反应的流量从最小值逐渐提高至最大值(葡萄糖的消耗速率设置为 5 mmol/g DCW/h), 并对模型进行 FBA, 获得 2,3-丁二酮比生成速率的变化趋势。模拟基因 *ilv5* 的敲除对 2,3-丁二酮积累的影响时, 模型 iNX804 的约束条件为重组菌株 DA-1 实验数据的拟合与转换^[10], AHAIR 流量值设置为 0。

1.3 ALS 的过量表达与验证

表达质粒 pYES-PGK-alsS 的结构如图 1 所示, 以酵母表达质粒 pYES2 为骨架, 将原有的 *GAL 1* 启动子替换为 *T. glabrata* 内源启动子 *PGK 1*, 在多克隆位点处插入编码源于 *B. subtilis* 乙酰乳酸合成酶的基因 *alsS*。具体构建过程为:使用引物 fl ori-f 和

fl ori-r 以 pYES2 为模板扩增片段 fl ori, 使用引物 PGK-f 和 PGK-r 以 *T. glabrata* 基因组为模板扩增片段 PGK, 将两片段 PCR 融合得到 fl ori-PGK; pYES2 与片段 fl ori-PGK 使用 *Nae I* 和 *Hind III* 酶切、纯化和连接获得表达质粒 pYES-PGK; 使用引物 alsS-f 和 alsS-r 以 *B. subtilis* 基因组为模板扩增片段 alsS, pYES-PGK 与片段 alsS 使用 *BamH I* 和 *Sph I* 酶切、纯化和连接获得表达质粒 pYES-PGK-alsS。重组质粒 pYES-PGK-alsS 经双酶切验证, 并送至上海生工生物工程服务有限公司测序。

将质粒 pYES-PGK-alsS 电击转化^[12]受体菌 *T. glabrata* $\Delta ura3 \Delta arg8$, 由于重组质粒上含有 *URA3* 基因, 能够回补尿嘧啶营养缺陷, 将转化子涂布于精氨酸补充培养基(SM-A)平板上, 获得一株能够正常生长的重组菌株 DA-1, 使用引物 alsS-f/alsS-r 进行菌落 PCR 验证。

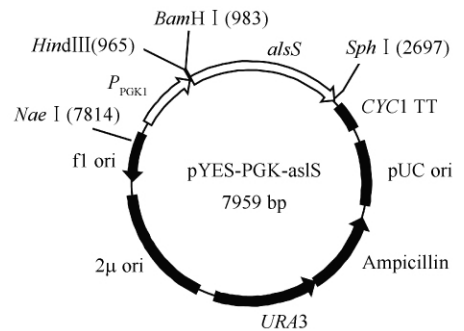


图 1. 重组质粒 pYES-PGK-alsS 的结构

Figure 1. The structure of expression plasmid pYES-PGK-alsS.

P_{PGK1} , the *PGK 1* promoter from *T. glabrata*.

1.4 基因 *ILV5* 的敲除与验证

基因 *ILV5* 的敲除使用文献[12]所述方法。以 *T. glabrata* 基因组为模板, 利用引物 *ilv5-left-f/ilv5-left-r* 和 *ilv5-right-f/ilv5-right-r* 分别获得 *ILV5* 左臂、*ILV5* 右臂。以等摩尔量的 *ILV5* 左右臂混合物为模板, 利用引物 *ilv5-left-f/ilv5-right-r* 进行 PCR 扩增得到敲除框 $\Delta ilv5$ (图 2-A)。将敲除框 $\Delta ilv5$ 电击转化受体菌 DA-1, 在 DA-1 基因组的 *ILV5* 位点处发生重组敲除基因 *ILV5* (图 2-B)。由于基因 *ILV5* 的缺失会导致菌株对支链氨基酸与泛酸营养缺陷, 转化子经制霉菌素富集和 LM 平板筛选后, 获得可能的营养缺陷突变株。使用支链氨基酸与泛酸营养缺陷平板进一步验证转化子。最后使用引物 *ilv5-left-f/ilv5-right-r* 进行菌落 PCR 验证。

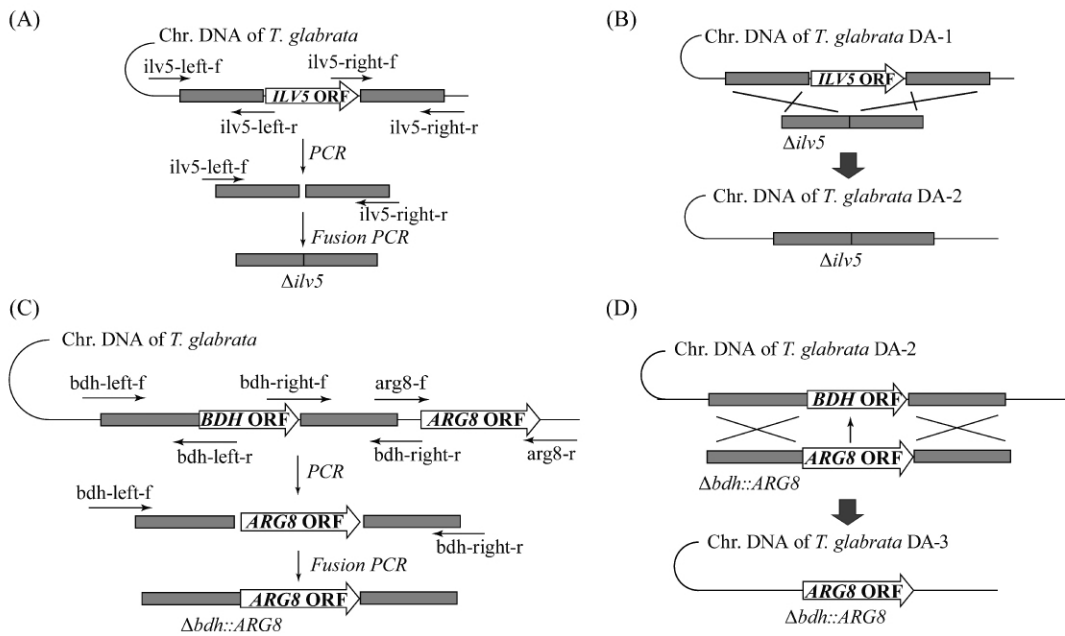
图 2. 利用同源重组敲除基因 *ILV5* 与 *BDH* 示意图

Figure 2. Knockout of *ILV5* and *BDH* genes using homologous recombination. A: The construction of *ILV5* knockout frame for *ILV5* inactivation. B: The schematic of *ILV5* gene knockout. C: The construction of *BDH* knockout frame for *BDH* inactivation. D: The schematic of *BDH* gene knockout.

1.5 基因 *BDH* 的敲除与验证

以 *ARG8* 作为遗传标记同源重组替代基因 *BDH*, 实现基因 *BDH* 的敲除。以 *T. glabrata* 基因组为模板, 利用引物 *bdh-left-f/bdh-left-r* 和 *bdh-right-f/bdh-right-r* 分别获得 *BDH* 左臂、*BDH* 右臂, 利用引物 *arg8ORF-f/arg8ORF-r* 获得 *ARG8* ORF。以等摩尔量的 *BDH* 左右臂及 *ARG8* ORF 的混合物为模板, 利用引物 *bdh-left-f/bdh-right-r* 进行 PCR 扩增得到敲除框 $\Delta bdh::ARG8$ (图 2-C)。将敲除框 $\Delta bdh::ARG8$ 电击转化受体菌 DA-2, 由于敲除框上含有基因 *ARG8*, 能够回补精氨酸营养缺陷 (图 2-D), 将转化子涂布于支链氨基酸和泛酸补充培养基 (SM-BP) 平板上, 获得能够正常生长的突变株。使用引物 *arg8ORF-f/arg8ORF-r* 进行菌落 PCR 验证。

1.6 发酵培养方法

从新鲜种子斜面上接一环菌至种子培养基 (25 mL/250 mL 锥形瓶), 于 30°C、200 r/min 下摇瓶培养 24 h 后, 以 10% 接种量 (V/V) 接入发酵培养基。摇瓶发酵: 50 mL/500 mL 锥形瓶, 30°C, 摇床转速 200 r/min。

1.7 参数测定

细胞浓度 (Dry Cell Weight, DCW) 与葡萄糖浓

度测定具体操作参见文献 [11]。丙酮酸、3-羟基丁酮和 2,3-丁二醇浓度使用高效液相色谱法 (HPLC) 测定。分析条件: 色谱柱为 Aminex[®] HPX-87H, BioRad; 流动相为 5 mM H₂SO₄, 流速 0.6 mL/min; 检测器为示差检测器, Agilent 1100; 柱温与检测器温度为 35°C。2,3-丁二酮及乙酰乳酸浓度测定采用顶空气相色谱-氢火焰离子化分析方法 (HS-GC-FID)。分析之前, 使用 4 mol/L 的 H₂SO₄ 将样品 pH 值调至低于 0.5, 抑制乙酰乳酸自发地氧化脱羧生成 2,3-丁二酮。分析条件: 顶空平衡温度和时间分别为 70°C、30 min; 进样口温度为 200°C; 分流比为 1:1; 色谱柱为 PEG-20M 30 m × 0.32 mm I. D.; 程序升温, 40°C (5 min) — 180°C (5 min) / 10°C; 检测器 (FID) 温度为 250°C; 载气 (N₂) 流速为 1.2 mL/min; 燃气 (H₂) 流速为 47 mL/min; 助燃气 (Air) 流速为 400 mL/min。在顶空平衡过程中, 乙酰乳酸在较低 pH 值及较高温度的条件下能够脱羧生成 3-羟基丁酮^[14], 因此乙酰乳酸的浓度为气相色谱与 HPLC 测定 3-羟基丁酮浓度的差值。

1.8 胞内酶活水平的测定

细胞破碎及粗酶液的抽提方法参见文献 [11]。对照菌株 DA-0 中 ALS 酶活测定方法参见文献

[15],重组菌株 DA-1 中 ALS 酶活测定方法参见文献 [16]。DR 及 BDH 分别以 2,3-丁二酮及 3-羟基丁酮为底物测定酶活,测定方法参见文献 [17]。蛋白质含量测定方法参见文献 [18]。

2 结果和分析

2.1 过量表达 ALS 对乙酰乳酸代谢及 2,3-丁二酮积累的影响

重组质粒 pYES-PGK-alsS 经双酶切分析(图 3-A,泳道 3-4),并进行 DNA 测序,结果证明 alsS 基因正确插入了质粒 pYES-PGK 中,并且在此过程中 alsS 基因没有产生突变。将质粒 pYES-PGK-alsS 电击转化受体菌 *T. glabrata* Δ ura3 Δ arg8,得到一株能在 SM-A 平板上正常生长的重组子,菌落 PCR 验证结果表明该重组子含有目的 alsS 基因(图 3-B,泳道 6);图 3-C 显示,过量表达 alsS 基因将 *T. glabrata* 胞内 ALS 酶活性提高了 4.6 倍,结果表明重组菌株 DA-1 构建成功。

如表 3 所示,与对照菌株 DA-0 相比,重组菌株 DA-1 的(1)菌体生长及丙酮酸的积累量无明显变化;(2)乙酰乳酸和 2,3-丁二酮的胞外积累量显著提高,分别为 0.61 g/L、0.57 g/L;(3)乙酰乳酸支路代谢产物 L-缬氨酸的积累量增加了 50%;(4)2,3-丁二酮降解产物 3-羟基丁酮和 2,3-丁二醇的积累量明显提高,胞外浓度分别为 0.21 g/L、0.23 g/L。上述结果表明:过量表达 ALS 能够显著提高 *T. glabrata* 合成乙酰乳酸的能力,将碳代谢流从丙酮

酸节点导入乙酰乳酸代谢途径,进而提高 2,3-丁二酮的积累能力;同时,乙酰乳酸支路代谢途径与 2,3-丁二酮降解代谢途径的碳代谢流量也有一定的上升。

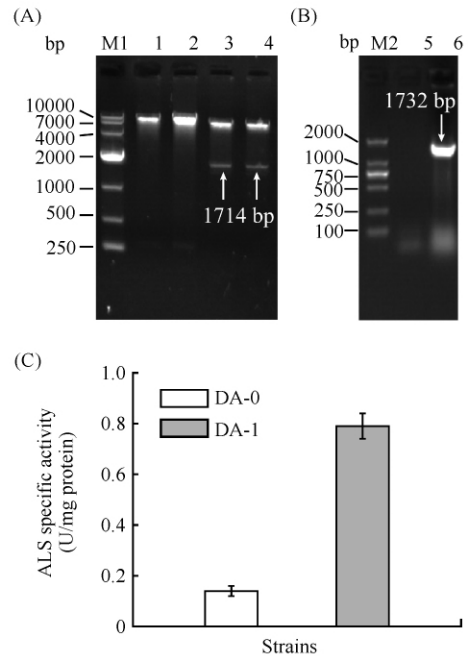


图 3. 重组菌株 DA-1 的构建和验证

Figure 3. Construction and confirmation of recombinant strain DA-1. A: Restriction analysis of expression plasmid pYES-PGK-alsS. Lane M1, 10 kb DNA Marker; Lane 1-2, pYES-PGK-alsS; Lane 3-4, pYES-PGK-alsS digested by *BamH* I and *Sph* I. B: Colony PCR of the DA-1 positive clones. Lane M2, 2000 bp DNA Marker; Lane 5, control stain DA-0; Lane 6, strain DA-1. C: The enzyme activity of ALS.

表 3. 重组菌株与对照菌株发酵参数的比较

Table 3. The comparison of fermentation parameters by different *T. glabrata* strains in batch culture

strain	μ_{\max} (h^{-1})	extracellular metabolites / (g/L)						
		pyruvate	acetolactate	2,3-butanediol	L-valine	L-leucine	3-hydroxybutanone	2,3-butanediol
DA-0	0.16	38.9 ± 0.7	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.01
DA-1	0.15	37.1 ± 1.0	0.61 ± 0.06	0.57 ± 0.07	0.03 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.21 ± 0.03	0.23 ± 0.04
DA-2	0.12	36.6 ± 1.2	0.83 ± 0.07	0.73 ± 0.05	-	-	0.23 ± 0.02	0.28 ± 0.02
DA-3	0.12	36.7 ± 1.5	0.86 ± 0.05	0.95 ± 0.07	-	-	0.11 ± 0.00	0.08 ± 0.00

2.2 GSMM 解析乙酰乳酸支路代谢对 2,3-丁二酮积累的影响

借助 *T. glabrata* 全基因组规模代谢网络模型 (GSMM) iNX804 考察 AHAIR 反应碳流量的大小对 2,3-丁二酮积累的影响。如图 4-A 所示,随着

AHAIR 反应碳流量的上升,2,3-丁二酮的生成速率逐渐降低。将重组菌株 DA-1 在最大比生长速率时的葡萄糖比消耗速率 (4.70 mmol/g DCW/h)、丙酮酸比生成速率 (3.75 mmol/g DCW/h)、2,3-丁二酮比生成速率 (0.17 mmol/g DCW/h)、L-缬

氨酸比生成速率 (2.18×10^{-4} mmol/g DCW/h)、L-亮氨酸比生成速率 (3.42×10^{-5} mmol/g DCW/h) 等生理参数作为模型 *iNX804* 的约束条件, 获得重组菌株 DA-1 的 2,3-丁二酮代谢途径中代谢流量分布, 如图 4-B 所示。在此基础上, 敲除 AHAIR

编码基因 *ilv5* 后, 乙酰乳酸向 L-缬氨酸与 L-亮氨酸的代谢被阻断, 2,3-丁二酮的生成速率提高了 22.9% (图 4-C)。上述模拟结果表明, 敲除基因 *ilv5* 能够阻断乙酰乳酸的支路代谢, 进一步提高 2,3-丁二酮的积累能力。

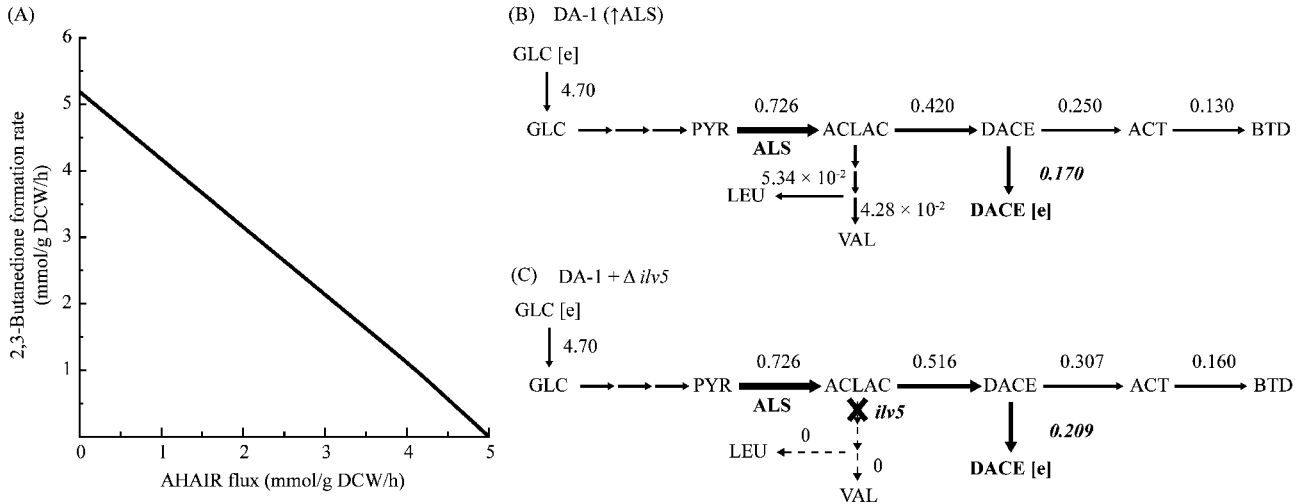


图 4. *in silico* 分析乙酰乳酸支路代谢对 2,3-丁二酮积累的影响

Figure 4. Analysis of the impact of acetolactate branched pathway to 2,3-butanedione production using the *in silico* genome-scale metabolic model. A: The response of 2,3-butanedione formation rate to varying AHAIR flux. B: Constraint-based flux solution of engineered strain DA-1. C: The flux solution of *ilv5* mutant strain. GLC [e], extracellular glucose; GLC, glucose; PYR, pyruvate; ACLAC, acetolactate; DACE, 2,3-butanedione; ACT, 3-hydroxybutanone; BTD, 2,3-butanediol; LEU, L-leucine; VAL, L-valine; DACE [e], extracellular 2,3-butanedione.

2.3 敲除基因 *ILV5* 对乙酰乳酸节点处代谢流分布的影响

以等摩尔量的 *ILV5* 左右臂混合物为模板, 利用引物 *ilv5-left-f/ilv5-right-r* 进行 PCR 扩增得到敲除框 $\Delta ilv5$ (图 5-A, 泳道 1); 使用引物 *ilv5-left-f/ilv5-right-r* 进行菌落 PCR 验证, 突变株 DA-2 获得 1.4 kb 左右的 $\Delta ilv5$ (图 5-B, 泳道 4-5), 菌株 DA-1 获得 2.5 kb 左右的 *ILV5* 基因及其左右臂 (图 5-B, 泳道 6), 表明基因 *ILV5* 缺失的重组菌株 DA-2 构建成功。

实验结果表明: 基因 *ILV5* 缺失菌株 DA-2 为支链氨基酸和泛酸营养缺陷型; 重组菌株 DA-2 的最大比生长速率及最大菌体浓度与 DA-1 相比分别下降了 20%、15.9% (表 3 及图 6)。如表 3 所示, 与重组菌株 DA-1 相比, 重组菌株 DA-2 的 (1) 乙酰乳酸和 2,3-丁二酮的胞外积累量分别增加了 36.1%、28.1%; (2) 2,3-丁二酮降解代谢产物 3-羟基丁酮和 2,3-丁二醇的胞外浓度增加了 9.5%、21.7%。上述结果表明, 敲除重组菌株 DA-1 的基因 *ILV5* 能够阻

断乙酰乳酸进入 L-缬氨酸与 L-亮氨酸合成途径, 进一步提高 2,3-丁二酮的积累量。

2.4 基因 *BDH* 敲除对 2,3-丁二酮积累的影响

以等摩尔量的 *BDH* 左右臂及 *ARG8* ORF 的混合物为模板, 利用引物 *bdh-left-f/bdh-right-r* 进行 PCR 扩增得到敲除框 $\Delta bdh :: ARG8$ (图 5-C, 泳道 7); 使用引物 *arg8ORF-f/arg8ORF-r* 进行菌落 PCR 验证, 菌株 DA-2 无明显条带, 突变菌株 DA-3 获得 1.3 kb 左右的条带 (图 5-D, 泳道 11-12), 表明基因 *BDH* 缺失的重组菌株 DA-3 构建成功。

如图 7 所示, 敲除基因 *BDH* 使 DR 和 BDH 酶活性与菌株 DA-2 比较, 分别下降了 74.4% 和 76.1%。从图 6 及表 3 可知, 基因 *BDH* 缺失对菌体生长和丙酮酸积累均无明显影响。与菌株 DA-2 相比, 重组菌株 DA-3 胞外 3-羟基丁酮和 2,3-丁二醇浓度分别降低了 52.2%、71.4%, 而发酵液中 2,3-丁二酮的浓度提高了 30.1%, 为 0.95 g/L (表 3)。这一结果表明, 敲除基因 *bdh* 能够降低 DR 和 BDH 酶活水

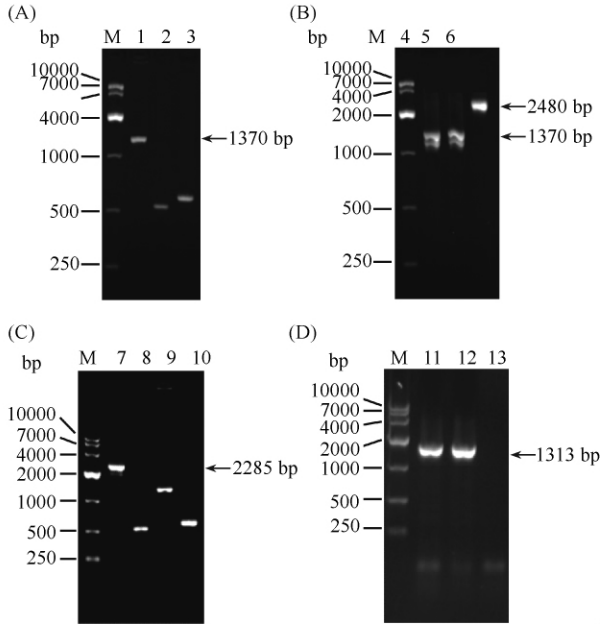


图 5. 基因 *ILV5* 与 *BDH* 的敲除与验证

Figure 5. Knockout and confirmation of *ILV5* and *BDH* gene. A: Purified PCR fragments used for *ILV5* inactivation. Lane M, 10 kb DNA Marker; Lane 1, *ILV5* knockout frame; Lane 2, *ILV5* left arm; Lane 3, *ILV5* right arm. B: Colony PCR of the DA-2 positive clones. Lane 4-5, strain DA-2; Lane 6, control strain DA-1. C: Purified PCR fragments used for *BDH* inactivation. Lane 7, $\Delta bdh::ARG8$; Lane 8, *BDH* left arm; Lane 8, *ARG8* ORF; Lane 9, *BDH* right arm. D: Colony PCR of the DA-3 positive clones. Lane 11-12, strain DA-3; Lane 13, control strain DA-2.

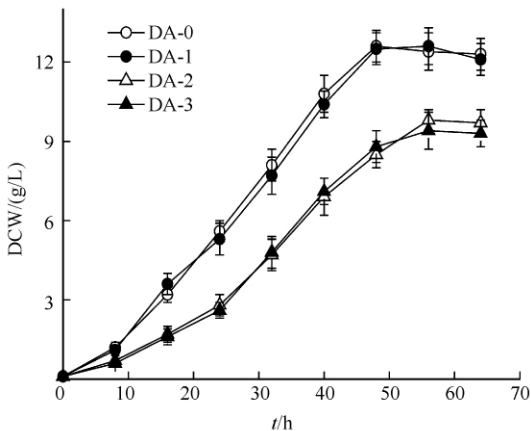


图 6. 重组菌株与对照菌株菌体生长的比较

Figure 6. Comparison of cell concentrations by different *T. glabrata* strains in batch culture.

平,限制 2,3-丁二酮的降解,进而促进 2,3-丁二酮的积累。

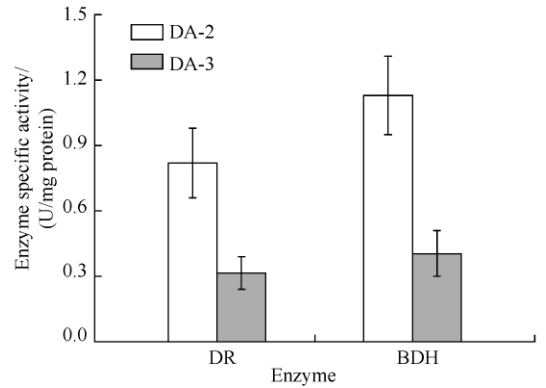


图 7. 敲除基因 *bdh* 对胞内丁二酮还原酶及丁二酮脱氢酶活性的影响

Figure 7. Effects of the *bdh* gene knockout on the specific activity of butanedione reductase (DR) and butanediol dehydrogenase (BDH).

3 讨论

本研究以发酵生产丙酮酸的工业菌株 *T. glabrata* 为底盘微生物,调控碳代谢流分布促进 2,3-丁二酮的积累;过量表达 ALS 能够强化 2,3-丁二酮前体一乙酰乳酸合成,将碳代谢流从丙酮酸节点导入乙酰乳酸代谢途径;借助基因组规模代谢网络模型 *iNX804* 及约束算法^[19],解析 *T. glabrata* 中乙酰乳酸支路代谢对 2,3-丁二酮积累的影响,鉴定出进一步提高 2,3-丁二酮积累能力的目标基因为 *ILV5*;敲除 2,3-丁二酮还原酶以阻断 2,3-丁二酮的降解途径。作者通过过量表达 ALS 及敲除基因 *ILV5*、*BDH* 的代谢工程策略,使 *T. glabrata* CCTCC M202019 从过量积累丙酮酸转向积累一定浓度的 2,3-丁二酮(0.95 g/L)。

长期以来,制约微生物高效生产目标代谢产物的关键瓶颈在于:如何有效地改造微生物菌种的生产性能,以扩大底物利用范围、提高细胞发酵生产能力、优化生理性能、合成新化合物等。代谢工程在理解细胞代谢功能的基础上,有目的地操纵细胞的酶、转运和调控,从而改善微生物细胞性能,能够克服传统育种手段的突变非定向性和设计非理性的缺点^[20]。而系统代谢工程提供了从全局规模上深刻认识微生物代谢特性和设计代谢途径的工具,如高通量组学技术和基因组规模代谢网络模型技术,使

提高微生物细胞性能变得更加有效^[21-22]。本文借助模型 *iNX804* 考察乙酰乳酸支路代谢关键反应—AHAIR 反应流量值的大小对 2,3-丁二酮生成速率的影响,并模拟 *ILV5* 敲除对 2,3-丁二酮积累的影响,进而确定敲除基因 *ILV5* 的必要性(图 4)。

与 *T. glabrata* 自身的 ALS 相比, *B. subtilis* 来源的 ALS 更偏好于丙酮酸作为底物,而不是合成 L-异亮氨酸的前体—2-酮基丁酸^[23]。过量表达 ALS, 重组菌株 DA-1 能在胞外积累一定浓度的乙酰乳酸和 2,3-丁二酮, L-缬氨酸和 L-亮氨酸的积累能力十分微弱(表 3), 原因有(1)真核微生物具有复杂的支链氨基酸代谢调控^[24]; (2)培养基中亚适量的吡哆醇限制了转氨酶的活性^[25]。但若敲除基因 *ILV5*, 则使乙酰乳酸和 2,3-丁二酮的胞外浓度分别提高了 36.1% 和 28.1% (表 3), 这一实验结果表明, 乙酰乳酸支路代谢是影响 2,3-丁二酮积累的关键因素之一。为进一步提高发酵液中 2,3-丁二酮的浓度, 一个重要策略是阻断 2,3-丁二酮进一步降解。然而, *BDH* 基因缺失菌株 DA-3 仍能检测出 DR 和 BDH 的活性, 出现这一状况的原因可能在于 *T. glabrata* 存在同工酶或等位基因所致^[26]。通过基于 GSMM 分析的代谢工程策略, 使 *T. glabrata* CCTCC M202019 能积累 0.95 g/L 2,3-丁二酮。然而, 本研究的缺陷在于 2,3-丁二酮浓度不具备工业化生产的前景。为此, 作者所在研究团队后续工作关注于: (1) 提高胞内 ALS 的酶活性^[16], 将更多的碳流从丙酮酸节点导向乙酰乳酸; (2) DR 同工酶的鉴定; (3) 如何采用生化工程等策略强化乙酰乳酸非酶促氧化脱羧反应^[14], 以期进一步提高 2,3-丁二酮浓度。

参考文献

[1] Suomalainen H, Ronkainen P. Mechanism of diacetyl formation in yeast fermentation. *Nature*, 1968, 220 (5169): 792-793.

[2] Zhao L, Bao YM, Wang JY, Liu BS, An LJ. Optimization and mechanism of diacetyl accumulation by *Enterobacter aerogenes* mutant UV-3. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 25 (1): 57-64.

[3] Monnet C, Aymes F, Corrieu G. Diacetyl and alpha-acetolactate overproduction by *Lactococcus lactis* subsp

lactis biovar *diacetylactis* mutants that are deficient in alpha-acetolactate decarboxylase and have a low lactate dehydrogenase activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66 (12): 5518-5520.

- [4] Nadal I, Rico J, Perez-Martinez G, Yebra MJ, Monedero V. Diacetyl and acetoin production from whey permeate using engineered *Lactobacillus casei*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2009, 36 (9): 1233-1237.
- [5] Benson KH, Godon JJ, Renault P, Griffin HG, Gasson MJ. Effect of *ilvBN*-encoded α -acetolactate synthase expression on diacetyl production in *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1996, 45 (1-2): 107-111.
- [6] Boumerdassi H, Monnet C, Desmazeaud M, Corrieu G. Isolation and properties of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CNRZ 483 mutants producing diacetyl and acetoin from glucose. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63 (6): 2293-2299.
- [7] Arnau J, Jorgensen F, Madsen SM, Vrang A, Israelsen H. Cloning, expression, and characterization of the *Lactococcus lactis pfl* gene, encoding pyruvate formate-lyase. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179 (18): 5884-5891.
- [8] Monnet C, Corrieu G. Selection and properties of alpha-acetolactate decarboxylase-deficient spontaneous mutants of *Streptococcus thermophilus*. *Food Microbiology*, 2007, 24 (6): 601-606.
- [9] Liu L, Xu Q, Li Y, Shi Z, Zhu Y, Du G, Chen J. Enhancement of pyruvate production by osmotic-tolerant mutant of *Torulopsis glabrata*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, 97 (4): 825-832.
- [10] Xu N, Liu L, Zou W, Liu J, Hua Q, Chen J. Reconstruction and analysis of the genome-scale metabolic network of *Candida glabrata*. *Molecular BioSystems*, 2013, 9 (2): 205-216.
- [11] Liu LM, Li Y, Li HZ, Chen J. Manipulating the pyruvate dehydrogenase bypass of a multi-vitamin auxotrophic yeast *Torulopsis glabrata* enhanced pyruvate production. *Letters in Applied Microbiology*, 2004, 39 (2): 199-206.
- [12] Zhou J, Dong Z, Liu L, Du G, Chen J. A reusable method for construction of non-marker large fragment deletion yeast auxotroph strains: A practice in *Torulopsis*

- glabrata*. *Journal of Microbiological Methods*, 2009, 76 (1) : 70-74.
- [13] Schellenberger J, Que R, Fleming RM, Thiele I, Orth JD, Feist AM, Zielinski DC, Bordbar A, Lewis NE, Rahmanian S, Kang J, Hyduke DR, Palsson BO. Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox v2.0. *Nature Protocols*, 2011, 6 (9) : 1290-1307.
- [14] Mohra B, Aymes F, Reaa MC, Monnet C, Cogana TM. A new method for the determination of 2-acetolactate in dairy products. *International Dairy Journal*, 1997, 7 (11) : 701-706.
- [15] Poulsen C, Stougaard P. Purification and properties of *Saccharomyces cerevisiae* acetolactate synthase from recombinant *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, 1989, 185 : 433-439.
- [16] Atsumi S, Li Z, Liao JC. Acetolactate synthase from *Bacillus subtilis* serves as a 2-ketoisovalerate decarboxylase for isobutanol biosynthesis in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75 (19) : 6306-6311.
- [17] Ehsani M, Fernandez MR, Biosca JA, Julien A, Dequin S. Engineering of 2,3-butanediol dehydrogenase to reduce acetoin formation by glycerol-overproducing, low-alcohol *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75 (10) : 3196-3205.
- [18] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 1951, 193 (1) : 265-275.
- [19] Liu L, Liu L, Zou W. Constraint-based algorithms for genome scale metabolic model—a review. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2012, 10 (6) : 70-77. (in Chinese)
- 刘立明, 刘婷, 邹伟. 基因组规模代谢网络模型的约束算法及其应用. *生物加工过程*, 2012, 10 (6) : 70-77.
- [20] Bailey JE. Toward a science of metabolic engineering. *Science*, 1991, 252 (5013) : 1668-1675.
- [21] Becker J, Zelder O, Hafner S, Schroder H, Wittmann C. From zero to hero—design-based systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-lysine production. *Metabolic Engineering*, 2011, 13 (2) : 159-168.
- [22] Lee SY, Mattanovich D, Villaverde A. Systems metabolic engineering, industrial biotechnology and microbial cell factories. *Microbial Cell Factories*, 2012, 11 : 156.
- [23] Gollop N, Damri B, Chipman DM, Barak Z. Physiological implications of the substrate specificities of acetohydroxy acid synthases from varied organisms. *Journal of Bacteriology*, 1990, 172 (6) : 3444-3449.
- [24] Szentirmai A, Horvath I. Regulation of branched-chain amino acid biosynthesis. *Acta Microbiologica Academiae Scientiarum Hungarica*, 1976, 23 (2) : 137-149.
- [25] Li Y, Chen J, Lun SY, Rui XS. Efficient pyruvate production by a multi-vitamin auxotroph of *Torulopsis glabrata*: key role and optimization of vitamin levels. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 55 (6) : 680-685.
- [26] Gonzalez E, Fernandez MR, Larroy C, Sola L, Pericas MA, Pares X, Biosca JA. Characterization of a (2R, 3R)-2,3-butanediol dehydrogenase as the *Saccharomyces cerevisiae* YAL060W gene product. Disruption and induction of the gene. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275 (46) : 35876-35885.

System metabolic engineering strategies for 2, 3-butandione production by *Torulopsis glabrata*

Xiang Gao, Nan Xu, Shubo Li, Liming Liu*

State Key Laboratory of Food Science and Technology; Key Laboratory of Industrial Biotechnology; The Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] We regulated the carbon flux distribution of *Torulopsis glabrata* CCTCC M202019, an efficient pyruvate-producing microorganism, for improved 2, 3-butandione production. [Methods] We overexpressed the acetolactate synthase (ALS) from *Bacillus subtilis* and then used the genome-scale metabolic model (GSMM) for *T. glabrata* (named iNX804) to evaluate the importance of deleting the *ILV5* gene. In addition, the *BDH* gene was deleted to restrict the degradation of 2,3-butandione. [Results] Overexpression of the ALS resulted in a 4.6-fold increase in ALS activity and increased the extracellular concentration of 2,3-butandione to 0.57 g/L from 0.01 g/L. The deletion of the *ILV5* gene was found to increase the 2,3-butandione accumulation level by 28.1%, attributed to the disruption of L-valine and L-leucine biosynthetic pathway. With the deletion of the *BDH* gene, the enzyme activity levels of butandione reductase and butanediol dehydrogenase were decreased by 74.4% and 76.1%, respectively. And the accumulations of 3-hydroxybutanone and 2,3-butandiol were decreased by 52.2% and 71.4%, respectively. The final 2,3-butandione concentration was 0.95 g/L, which was 30.1% higher than that of the control strain. [Conclusion] The GSMM based system metabolic engineering can be a functional strategy to redistribute the carbon flux from pyruvate node to 2,3-butandione and achieve efficient accumulation of 2,3-butandione.

Keywords: *Torulopsis glabrata*, 2,3-butandione, carbon flux distribution, system metabolic engineering

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Supporting Program for Outstanding National Young Talents, by the fund from Wuxi City (CLE01N1111) and by the Science Foundation for Distinguished Young Scholars of Jiangsu Province (BK2012002)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-510-85197875; E-mail: mingll@jiangnan.edu.cn

Received: 30 August 2013/Revised: 18 December 2013