

酪丁酸梭菌代谢工程菌的构建及其发酵特性

杨贵清^{1,2}, 刘刚¹, 杨长得¹

1 深圳大学生命科学学院 深圳市微生物基因工程重点实验室, 深圳 518060

2 深圳市罗湖疾病预防控制中心, 深圳 518020

摘要: 酪丁酸梭菌 *Clostridium tyrobutyricum* 可以利用葡萄糖、木糖、纤维二糖、阿拉伯糖等多种底物进行产酸发酵, 主要发酵产物为丁酸和乙酸, 是一种适合于木质纤维素同步糖化发酵生产丁酸的菌种。将酪丁酸梭菌乙酸发酵关键基因取代为丁酸发酵关键基因来构建突变株, 可使突变株丁酸发酵量增多, 乙酸发酵量减少。分别获得来源于丙酮丁醇梭菌的丁酸代谢关键酶基因——乙酰乙酰辅酶 A 转移酶基因 (*thl*)、来源于酪丁酸梭菌本身的乙酸代谢关键酶基因片段——磷酸转乙酰基酶基因片段 (*pta*) 和来源于质粒 pIMP1 的红霉素抗性基因 (*em*)。将它们与质粒 pUC19 相连构建为非复制性质粒 pUC19-EPT。通过电转化将其导入酪丁酸梭菌中。利用红霉素抗性平板筛选获得转化子, 通过 PCR 验证发现, 获得的突变株染色体上 *pta* 被 *thl* 替换。在以葡萄糖为底物的发酵中, 突变株丁酸得率为 0.47, 较野生型增大了 34%, 乙酸得率为 0.05, 较野生型下降了 29%。

关键词: 酪丁酸梭菌, 丁酸, 乙酰乙酰辅酶 A 转移酶, 磷酸转乙酰基酶, 代谢工程

Engineering and metabolic characteristics of a *Clostridium tyrobutyricum* strain

Guiqing Yang^{1,2}, Gang Liu¹, and Changde Yang¹

1 Shenzhen Key Laboratory of Microbial Genetic Engineering, College of Life Sciences, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China

2 Shenzhen Luohu Center For Disease Control Prevention, Shenzhen 518020, China

Abstract: *Clostridium tyrobutyricum* is suitable for simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic. It can produce butyric acid, acetic acid as its main fermentation products from a wide variety of carbohydrates such as glucose, xylose, cellobiose and arabinose. In order to decrease acetic acid content and increase butyric acid content in *C. tyrobutyricum*, we replaced genes on the acetic acid fermentation pathway with genes on the butyric acid fermentation pathway. Three genes were selected. They were acetyl-CoA acetyltransferase gene (*thl*) which is the key enzyme gene associated with acetic acid fermentation pathway from *Clostridium acetobutylicum*, erythromycin gene (*em*) from plasmid pIMP1 and phosphotransacetylase gene (*pta*) which is the key enzyme gene associated with butyric acid fermentation pathway from *C. tyrobutyricum*. We fused these genes with pUC19 to construct nonreplicative integrated plasmids pUC19-EPT. Then we transformed pUC19-EPT into *C. tyrobutyricum* through electroporation. The recombinant transformants grown on plates containing erythromycin were validated by PCR. A mutant whose *pta* gene was displaced by *thl* gene on the chromosome was selected. In the fermentation from glucose, the mutant's yield of butyric acid is 0.47, increased by 34% compared with wild type; and the yield of acetic acid is 0.05, decreased by 29% compared with wild type.

Received: August 14, 2009; Accepted: December 24, 2009

Corresponding author: Guiqing Yang. Tel: +86-755-25508339; Fax: +86-755-25611283; E-mail: hawk80459@sohu.com

Keywords: *Clostridium tyrobutyricum*, butyric acid, acetyl coenzyme A acetyltransferase, phosphotransacetylase, metabolic engineering

正丁酸 (分子式 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$, 以下简称为丁酸) 是一种用途广泛的化工原料和医药原料, 可以用于各类丁酸酯类、丁酸纤维、清漆、香料等的生产制造, 也可以用作乳化剂、杀菌剂和萃取剂^[1], 还可作为组蛋白去乙酰化酶的抑制剂抑制多种肿瘤细胞的增殖, 诱导肿瘤细胞分化、衰老和凋亡^[2-4]。当前, 丁酸工业化生产属于石油加工行业, 随着石油资源的快速消耗, 通过石油加工获得丁酸必将受到原料来源的限制。通过微生物发酵生产丁酸的传统原料是富含淀粉的粮食, 随着全球可耕地的减少和人口的增长, 全球范围内的粮食短缺问题将不可避免, 将来利用粮食作为原料发酵生产丁酸的规模必然受到限制。在这种情况下, 利用木质纤维素为原料发酵生产丁酸将是可能的解决途径。

梭菌中酸产物的代谢途径已经得到了较广泛的研究, 例如丙酮丁醇梭菌 *Clostridium acetobutylicum* 和酪丁酸梭菌 *Clostridium tyrobutyricum*^[5-7]。乙酰辅酶 A (Acetyl-CoA) 是乙酸途径和丁酸途径的分支点, 它在磷酸转乙酰基酶的催化下形成磷酸乙酰开始乙酸代谢, 在乙酰乙酰 CoA 转移酶的催化下形成乙酰乙酰 CoA 开始丁酸代谢。研究也表明^[7], 在酪丁酸梭菌发酵中, 没有乙醇、丁醇等醇类物质出现。其代谢途径见图 1。

酪丁酸梭菌是主要的丁酸发酵菌之一, 研究表明酪丁酸梭菌可以利用纤维二糖、木糖、阿拉伯糖等多种碳源进行发酵^[8-9], 解决了木质纤维素同步糖化发酵中存在的五碳糖利用不足问题, 特别适合于进行木质纤维素的同步糖化发酵。然而, 酪丁酸梭菌的发酵产物不单一, 除丁酸外还产生部分乙酸, 杂酸的产生有可能降低整个发酵过程的效率。敲除突变可使宿主染色体中不受欢迎的基因失活, 已经成功地应用于构建梭菌属代谢工程突变菌^[10-11]。同样的代谢工程方法也能在酪丁酸梭菌中用于减少或消除乙酸产物^[12-13]。

本实验构建了非复制性重组质粒转入酪丁酸梭菌, 对其进行遗传改造, 敲除其乙酸代谢关键酶基因 *pta*, 取代上来自丙酮丁醇梭菌丁酸代谢关键酶基

因 *thl*, 获得的酪丁酸梭菌代谢工程菌发酵产物丁酸得率提高, 且产物较单一, 为丁酸的工业化生产以及利用木质纤维素同步糖化发酵生产丁酸提供了新的技术支撑, 具有较主要的社会、经济意义。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

表 1 列举了本研究所用到的菌株、质粒的来源及特点。野生株为酪丁酸梭菌 ATCC 25755, 在厌氧室中用加强型梭菌培养基(RCM)培养传代, 液体培养置于梭菌生长培养基 (CGM) 中, 37°C、厌氧环境中培养^[14]。在筛选突变株时, 这些培养基中都加入了 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的红霉素 (Erythromycin)。

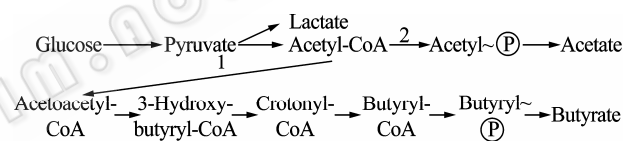


图 1 酪丁酸梭菌的代谢途径

Fig. 1 Metabolic pathway of *C. tyrobutyricum*. 1: acetyl-CoA acetyltransferase (*thl* gene); 2: phosphotransacetylase (*pta* gene).

表 1 菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids

Strains/plasmids	Characteristics	Sources/references
Strains		
<i>C. tyrobutyricum</i>		
ATCC 25755	Em ^s	ATCC
ME	<i>pta</i> ⁻ Em ^r	Mutant from gene disruption; this study
<i>C. acetobutylicum</i>		
ATCC 824		ATCC
<i>E. coli</i>		
Top10F [']	recA1 Ap ^r	Invitrogen
Plasmids		
pUC19	Ap ^r	Invitrogen
pIMP	Ap ^r Em ^r	Northwestern university ^[15]
pUC19-EPT	Ap ^r Em ^r	This study

pta⁻: phosphotransacetylase gene deleted; Ap^r: ampicillin resistant; Em^r: erythromycin resistant; recA1: homologous recombination abolished. pUC19-EPT are the nonreplicative integrational plasmids.

1.2 酪丁酸梭菌生长与发酵分析

挑取酪丁酸梭菌单菌落置于 CGM 液体培养基, 于 37°C 厌氧箱中静置培养 24 h 后, 按 5% 的接种量转接于新鲜的 CGM 液体培养基中, 于 37°C 厌氧箱中静置培养, 每隔 4 h 左右取样, 记录菌的生长情况、发酵液中残余葡萄糖含量以及发酵产物中有机酸含量。为确保实验数据准确可靠, 每次发酵均进行平行实验, 具体做法为: 分别挑取 3 个单菌落于等体积 CGM 液体培养基培养 24 h 制备种子培养液, 再各按 5% 的接种量将种子培养液转接于 10 份等体积新鲜的 CGM 液体培养基培养, 以平均数据作图。

生长情况用 600 nm 下菌液吸光值表示, 发酵液中残余葡萄糖含量通过 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 比色法测定, 有机酸含量采用气相色谱分析。发酵结束后计算有机酸得率, 其得率定义为发酵过程中每消耗 1 g 葡萄糖生成的有机酸量。气相色谱分析发酵产物方法如下:

色谱型号为 TRACE GC; 色谱柱为: Agilent DB-624 毛细管柱, 30 m×0.32 mm; 进样口为: S/SL 型; 检测器为 FID 检测器; 载气为: N₂。炉温程序: 初始温度 40°C, 2 min; 10°C/min 升温; 最终温度 210°C, 2 min。FID 温度: 220°C。载气恒流: 1.5 mL/s。载气 N₂ 流速为 30 mL/min, 氢气流速为 35 mL/min, 空气流速为 350 mL/min; 进样器: 自动进样, 不分流, 进样量为 0.5 μL。

1.3 基因替换载体的构建

1.3.1 基因的分离

以酪丁酸梭菌基因组 DNA 为模板, PCR 扩增与乙酸代谢途径关键酶——磷酸转乙酰基酶基因片段 *pta*; 以丙酮丁醇梭菌基因组 DNA 为模板, PCR 扩增与丁酸代谢途径关键酶——乙酰乙酰 *CoA* 转移酶基因 *thl*; 以 pIMP1 为模板, PCR 扩增红霉素基因 *em*。将获得的各基因片段连接 T 载体, 构建成 T-*pta*、T-*thl*、T-*em* 载体, 送英骏公司测序验证。本研究所用引物序列见表 2。

1.3.2 pUC19-EPT 的构建

首先用 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切重组载体 T-*pta*, 回收约 610 bp 的 DNA 片段, 纯化连接到经同样处

理的 pUC19 载体, 构建成 pUC19P; 接着用 *Sal* I 和 *Sph* I 双酶切重组载体 T-*thl*, 回收大小约 1880 bp 的 DNA 片段, 纯化后连接经同样处理的 pUC19P 载体, 构建成 pUC19PT; 最后分别用 *Sph* I 和 *Aat* II 分步单酶切重组载体 T-*em*, 回收大小约 1000 bp 的 DNA 片段, 纯化后连接经同样处理的 pUC19PT 载体, 构建成 pUC19-EPT。质粒物理图谱如图 2。

1.4 酪丁酸梭菌的电转

将酪丁酸梭菌接种于含 40 mmol/L DL-苏氨酸的 CGM 培养基中, 待其生长至 OD ≈ 1.2 时收集细胞。先用预先冰冷的无菌水洗涤 2 次, 再用预冰冷的 SMP

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'-3')	Purpose	Restriction enzyme sites
pta1	CAAGAATTCGACTCCTG ATAAGGCGAATAAGATA	Obtain <i>pta</i> gene	<i>EcoR</i> I
pta 2	GACTCTAGAGTCTATTG CTTCCGCTTTT'		<i>Xba</i> I
thl 1	TATGTCGACATGAGTAA GGCAATAAAATCC	Obtain <i>thl</i> gene	<i>Sal</i> I
thl 2	TCAGCATGCACTGCATT AGCCTCATAATC		<i>Sph</i> I
Em1	AAGGAATTCACCGTGTG CTCTACGACCA	Obtain <i>em</i> gene	<i>EcoR</i> I
Em2	GAGGACGTCACAAAA AATAGGTACACGAAAA		<i>Aat</i> II
P19THL1	AAGCGGAAGCAATAGGA CTC	Validate transform ants	
P19THL2	AGCTCACTCATTAGGCAC CC		

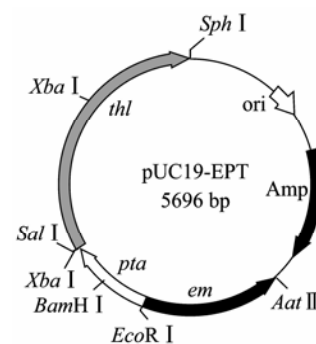


图 2 非复制性质粒 pUC19-EPT 的物理图谱

Fig. 2 Physical map of nonreplicative integrational plasmids pUC19-EPT. The directions of each gene are shown by arrows; *pta*: the middle sequence of *pta* gene; *thl*: the full *thl* gene; *amp*: ampicillin resistance gene; *em*: erythromycin resistance gene; *ori*: the origin of replication in *E. coli*.

电转缓冲液 (蔗糖 270 mmol/L, $MgCl_2$ 1 mmol/L, Na_3PO_4 7 mmol/L, pH 6.0) 洗涤 2 次后, 将细胞悬浮于预冰冷的电转缓冲液中。将处理好的细胞悬浮液放入预冰冷的直径为 4 mm 的电转杯中, 冰上放置 4~5 min 后加入 25 μg 非复制性质粒 pUC19-EPT 进行脉冲刺激 (2500 V)。电击后将转化细胞转入大概 5 mL 的 CGM (不带抗性) 中 37°C 温孵 2~4 h, 然后低速 (约 4000~6000 r/min) 离心使细胞沉降, 弃上清, 留 200 μL 左右涂板 (带 Em^+ 50 $\mu g/mL$ 的 RCM 固体培养基)。

1.5 重组酪丁酸梭菌的筛选与鉴定

目标菌应是在染色体上整合了来自丙酮丁醇梭菌的 *thl* 基因, 且原染色体上 *pta* 基因失活的重组菌株。因此, 在筛选鉴定时, 根据野生型酪丁酸梭菌无红霉素抗性, 利用重组质粒与酪丁酸梭菌染色体发生同源重组时, 重组质粒上附带的红霉素抗性基因整合在染色体上使重组酪丁酸梭菌带上红霉素抗性基因来进行初筛。然后提取所获得的转化子的基因组 DNA, 进行相关 PCR 验证。

1.6 重组酪丁酸梭菌的生理特性分析

重组酪丁酸梭菌生理特性分析主要包括 3 个方面, 即其生长情况、底物利用情况和发酵情况, 具体的分析与野生型酪丁酸梭菌分析方法相同。

2 结果与讨论

2.1 酪丁酸梭菌生长与发酵分析

以葡萄糖为唯一碳源, 于厌氧培养箱中 37°C 静置培养酪丁酸梭菌, 分析不同时相菌生长情况、底物利用情况以及发酵情况。结果见图 3。

结果表明, 有机酸的发酵开始于对数生长期的后半段, 在稳定期开始大幅度生产, 在稳定期后期达到最大, 发酵到 50 h 左右, 发酵产物几乎没有增加。丁酸最大发酵量约为 (5±0.09) g/L, 乙酸约为 (1±0.07) g/L。结合同期底物消耗, 计算得出: 酪丁酸梭菌发酵结束后, 丁酸得率为 (0.35±0.02) g/g, 乙酸得率为 (0.07±0.004) g/g。另外由于发酵产物主要是有机酸, 酸的积累使 pH 值下降, 菌体生长受到抑制, 从而导致残糖含量较高, 底物得不到完全利用。当在发酵培养基中加入 1% 固体碳酸钙来中和发酵

过程产生的有机酸时, 发现糖的利用和发酵产物量都有一定提高 (图 4)。发酵结束后, 发酵液中并无葡萄糖残余, 此时丁酸的产量约为 (6.56±0.1) g/L, 乙酸的产量约为 (1.34±0.06) g/L, 丁酸得率 (0.33±0.03) g/g, 乙酸得率 (0.07±0.005) g/g。

综合比较说明, 野生型酪丁酸梭菌在含 2% 葡萄糖的 CGM 培养基中主要发酵产物只有丁酸和乙酸, 无醇类, 就发酵产物得率来看, 酪丁酸梭菌是一种优良的丁酸发酵菌。采用固体碳酸钙来中和发酵过程产生的有机酸虽然有利于底物的充分利用, 但由于少量丁酸和碳酸钙生成固体络合物, 使丁酸得率有所下降, 不能很好地反应丁酸的实际得率, 因此后续发酵培养基中均未添加碳酸钙成份。

2.2 基因替换载体 pUC19-EPT 的构建与验证

分别提取酪丁酸梭菌和丙酮丁醇梭菌基因组 DNA 以及质粒 PIMP1, 并以酪丁酸梭菌基因组 DNA 为模板, 设计相应引物, 通过 PCR 扩增目的基因片段 *pta*, 使 *pta* 上游含 *EcoR* I 位点, 下游含 *Xba* I 位点; 以丙酮丁醇梭菌基因组 DNA 为模板, 设计相应引物, 通过 PCR 扩增目的基因 *thl*, 使 *thl* 上游含

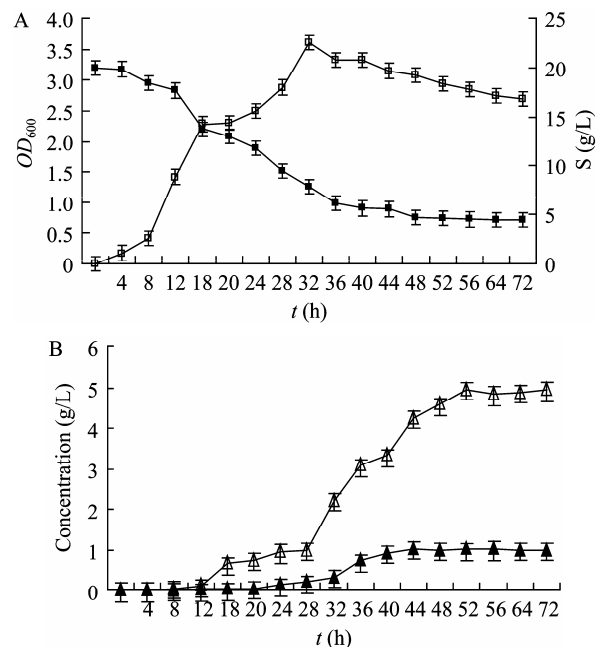


图 3 酪丁酸梭菌在 CGM 培养基中的发酵情况

Fig. 3 Fermentation of *C. tyrobutyricum* in CGM. (A) Growth and substrate consumption of *C. tyrobutyricum*. (B) Application of fermentation production of *C. tyrobutyricum*. □: growth curve; ■: substrate consumption curve; △: butyric acid; ▲: acetic acid.

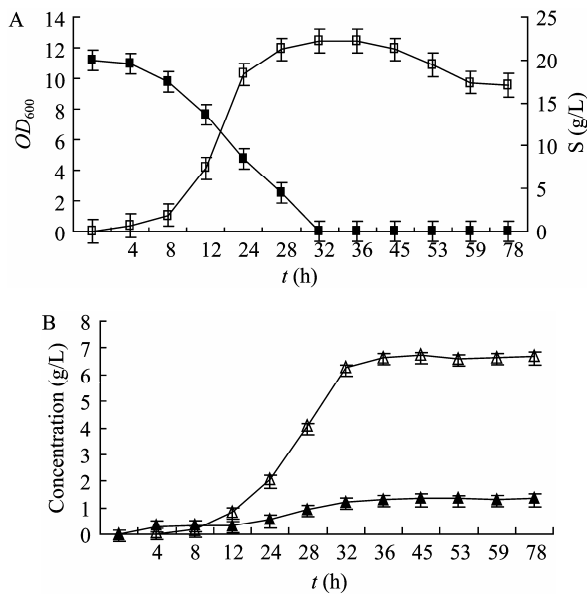


图4 酪丁酸梭菌在CGM-CaCO₃培养基中的发酵情况
Fig. 4 Fermentations of *C. tyrobutyricum* in CGM-CaCO₃. (A) Growth and substrate consumption of *C. tyrobutyricum*. (B) Application of fermentation production of *C. tyrobutyricum*. □: growth curve; ■: substrate consumption curve; △: butyric acid; ▲: acetic acid.

Sal I 位点, 下游含 Sph I 位点; 以质粒 PIMP1 为模板, 设计相应引物, 通过 PCR 扩增目的基因 *em1* 使 *em1* 上游含 EcoR I 位点, 下游含 Aat II 位点。测序证实所获得片段的正确性。

对基因片段 *pta* 进行 EcoR I、Xba I 双酶切处理, 纯化后与经同样处理的 pUC19 相连, 构建为重组质粒 pUC19P; 然后对基因片段 *thl* 进行 Sal I、Sph I 双酶切, 纯化后与经同样处理的 pUC19P 相连, 构建为重组质粒 pUC19PT; 对基因片段 *em* 进行 EcoR I、Aat II 分步单切处理, 纯化后与经同样处理的 pUC19PT 相连, 构建为重组质粒 pUC19-EPT。

提取重组质粒 pUC19-EPT, 以其为模板, 用相应引物对进行 PCR 扩增, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离。*pta* 基因片段的 PCR 产物约为 600 bp, *thl* 约为 1880 bp, *em* 约为 1000 bp, 与预期的大小一致 (图 5)。测序证明其序列正确。

2.3 重组菌株的筛选与鉴定

从红霉素抗性平板上挑出单克隆到 CGM Em⁺ 进行液体培养, 提重组菌的基因组 DNA。以基因组 DNA 为模板, 根据质粒 pUC19-EPT 中 *thl* 基因两翼

设计引物进行 PCR 扩增, 获得大小为 2 kb 的片段 (图 6)。对 PCR 产物进行测序证明, 2 kb 大小片段中包含完整的 *thl* 基因(1880 bp)。说明 *thl* 基因随 *pta* 片段与染色体同源区域发生重组而整合到染色体上, 其重组方式为单交换 (图 7)。将该转化子命名为酪丁酸梭菌 ME。

2.4 重组菌的生理生化分析

将重组菌与野生型同时按 5% 的接种量接种于含 2% 的葡萄糖的 CGM 中, 厌氧摇瓶培养, 定期取样, 检测同时相的菌的生长、发酵液残糖含量和发酵产物含量。结果见图 8。

结果表明, 与野生菌相比, 重组菌进入对数生长期、稳定期的时间与野生菌类似, 但由于丁酸产率提高其生长更快进入衰亡期; 丁酸、乙酸等发酵产物均是在对数生长期后期开始出现, 稳定期开始大量生成, 丁酸发酵量均是在 40 h 左右停止增加,

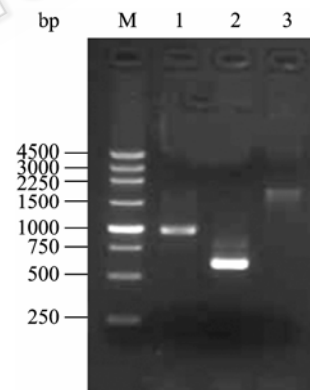


图5 重组质粒 pUC19-EPT 的 PCR 验证
Fig. 5 Identification of recombinational plasmid pUC19-EPT by PCR. M: DNA marker; 1-3: PCR products of plasmid pUC19-EPT; 1: *em*; 2: *pta*; 3: *thl*.

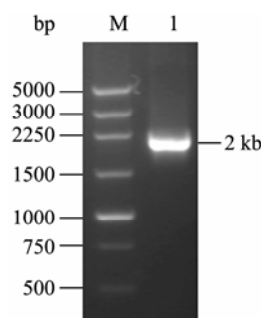


图6 pUC19-EPT 电转获得的转化子验证
Fig. 6 Identification of the transformant obtained by transfer pUC19-EPT into *C. tyrobutyricum* through electroporation. M: DNA marker; 1: PCR products.

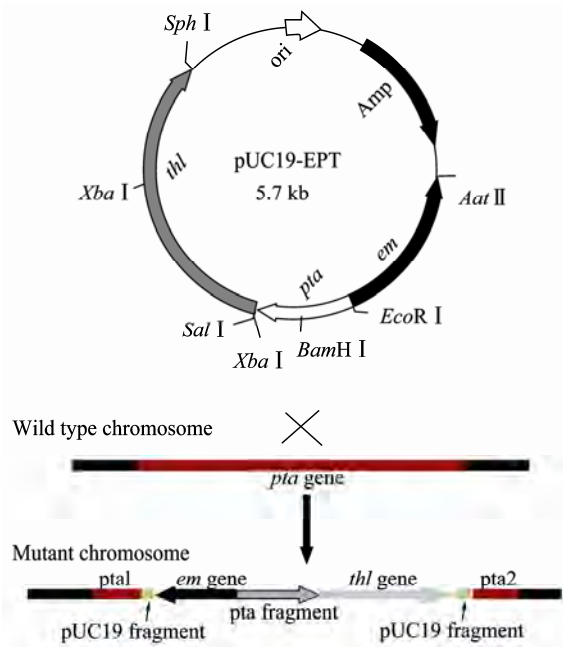


图7 pUC19-EPT 转入酪丁酸梭菌发生的单交换
 Fig. 7 Single crossover of plasmid pUC19-EPT containing *pta* gene with the chromosome.

乙酸发酵量在 50 h 左右停止增加。在发酵终液中, 野生菌、重组菌丁酸发酵量分别为: (4.7 ± 0.31) g/L、 (5.8 ± 0.17) g/L, 丁酸得率分别为: (0.352 ± 0.013) g/g、 (0.471 ± 0.021) g/g; 乙酸发酵量分别为: (0.97 ± 0.08) g/L、 (0.63 ± 0.06) g/L, 乙酸得率分别为: (0.072 ± 0.003) g/g、 (0.051 ± 0.004) g/g。重组菌与野生型相比, 丁酸得率增长 34%, 乙酸得率下降 29%。同时比较野生菌摇瓶发酵与野生菌静置培养, 结果发现摇瓶发酵菌的生长较迅猛, 使发酵丁酸速度加快, 导致 pH 值下降更快, 最终丁酸发酵量有所下降。

本研究在 Zhu 等^[13]的研究基础上, 用丁酸关键酶基因 *thl* 取代了乙酸关键酶基因 *pta*, 使发酵产物中丁酸得率进一步提高, 而乙酸得率下降 (表 3)。说明以 *thl* 基因取代 *pta* 基因, 使细胞在关闭磷酸转乙酰基酶的表达的同时提高了乙酰乙酰辅酶 A 转移酶的表达量, 从而使更多的底物流向丁酸发酵。另外乙酸发酵并未完全停止也表明细胞乙酸代谢途径并非仅通过磷酸转乙酰基酶催化一条途径。

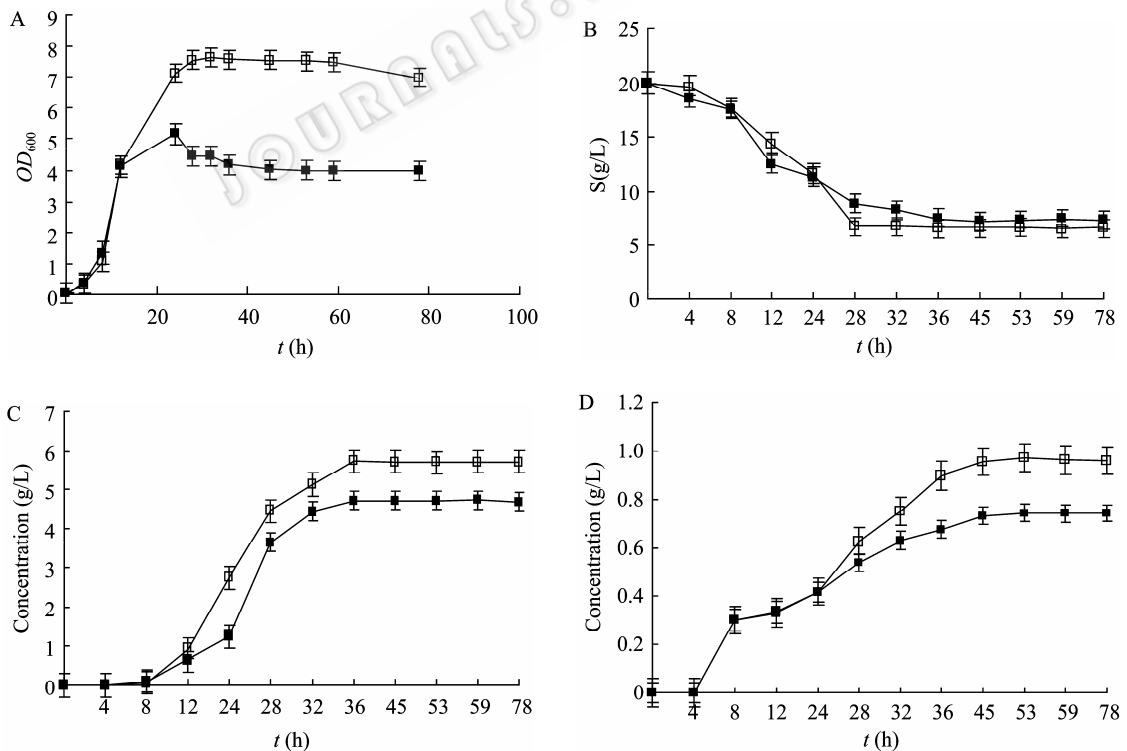


图8 野生型酪丁酸梭菌与重组菌的发酵情况
 Fig. 8 Fermentations of wild type and recombination *C. tyrobutyricum*. (A) Growth curves of wild type and recombination *C. tyrobutyricum*. (B) Utilization of carbon sources by wild type and recombination *C. tyrobutyricum*. (C) Butyric acid output of wild type and recombination *C. tyrobutyricum*. (D) Acetic acid output of wild type and recombination *C. tyrobutyricum*. □: wild type; ■: ME.

表3 不同菌株有机酸得率的比较

Table 3 Comparison of organic acid yield from different strains

Strains	Butyrate yield (g/g)	Acetate yield (g/g)	Sources
Wild type	0.352±0.013	0.072±0.003	ATCC 25755
ME	0.471±0.021	0.051±0.004	This study
PTA-Em	0.38±0.03	0.058±0.004	Zhu ^[13]

3 结论

作为重要的化工原料,全世界对丁酸的需求量非常大,2006年全球丁酸产量达到30 000吨,依然供不应求^[1]。而石油资源匮乏进一步导致丁酸生产跟不上需求,利用生物发酵木质纤维素生产丁酸将是可能的解决途径。

酪丁酸梭菌可以利用葡萄糖、木糖、纤维二糖、阿拉伯糖等多种底物进行产酸发酵,这在一定程度上解决了木质纤维素同步糖化发酵过程中五碳糖利用不充分的问题。但酪丁酸梭菌发酵过程也因副产物乙酸的出现而减少丁酸产量提高了产品纯化费用。

本工作分析了酪丁酸梭菌生理生化特点,并在此基础上构建了非复制性替换载体pUC19-EPT,电转进入酪丁酸梭菌,通过同源重组将酪丁酸梭菌染色体上*pta*基因替换为来自丙酮丁醇梭菌的*thl*基因,关闭乙酸代谢途径中关键酶磷酸转乙酰基酶基因(*pta*)的表达,并提高丁酸代谢过程中关键酶基因(*thl*)的表达量。同时对野生菌和重组菌进行发酵分析,发现所获得的重组菌,其丁酸得率为0.47 g/g,与野生菌相比,增加了34%,乙酸得率为0.05 g/g,与野生菌相比,下降了29%。基因替换突变株的获得为丁酸的化工生产转型为木质纤维素同步糖化发酵提供了新的研究思路。

REFERENCES

- [1] Gao F, Liu JQ. The preparation technology and application for n-butyric acid at home and abroad. *Tianjin Chem Ind*, 2006, **20**(6): 42–44.
高飞, 刘继泉. 正丁酸的生产技术及应用状况. 天津化工, 2006, **20**(6): 42–44.
- [2] Wakabayashi K, Saito H, Kaneko F, *et al.* Gene expression associated with the decrease in malignant phenotype of human liver cancer cells following stimulation with a histone deacetylase inhibitor. *Int J Oncol*, 2005, **26**(1): 233–239.
- [3] Ruemmele EM, Sclavartz S, Seidman EG, *et al.* Butyrate induced Caco-2 cell apoptosis is mediated via the mitochondrial pathway. *Gut*, 2003, **52**(1): 94–100.
- [4] Nakano K, Mizuno T, Sowa Y, *et al.* Butyrate activates the WAF1/Cip1 gene promoter through Sp1 sites in a p53-negative human colon cancer cell line. *J Biol Chem*, 1997, **272**(35): 22199–22206.
- [5] Rogers P, Gottschalk G. Biochemistry and regulation of acid and solvent production in Clostridia//Woods DR, ed. *The Clostridia and Biotechnology*. Boston: Butterworth-Heinemann, 1993: 25–50.
- [6] Zhu Y, Yang ST. Adaptation of *Clostridium tyrobutyricum* for enhanced tolerance to butyric acid in a fibrous-bed bioreactor. *Biotechnol Prog*, 2003, **19**(2): 365–372.
- [7] Liu X, Yang ST. Kinetics of butyric acid fermentation of glucose and xylose by *Clostridium tyrobutyricum* wild type and mutant. *Process Biochem*, 2006, **41**(4): 801–808.
- [8] Michel-Savin D, Marchal R, Vandecasteele JP. Control of the selectivity of butyric acid production and improvement of fermentation performance with *Clostridium tyrobutyricum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1990, **32**(4): 387–392.
- [9] Michel-Savin D, Marchal R, Vandecasteele JP. Butyrate production in continuous culture of *Clostridium tyrobutyricum*: effect of end product inhibition. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1990, **33**(2): 127–131.
- [10] Green EM, Boynton ZL, Harris LM, *et al.* Genetic manipulation of acid formation pathways by gene inactivation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Microbiol*, 1996, **142**(8): 2079–2086.
- [11] Green EM, Bennett GN. Genetic manipulation of acid and solvent formation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Biotechnol Bioeng*, 1998, **58**(2/3): 215–221.
- [12] Liu X, Zhu Y, Yang ST. Construction and characterization of ack eleted mutant of *Clostridium tyrobutyricum* for enhanced butyric acid and hydrogen production. *Biotechnol Prog*, 2006, **22**(5): 1265–1275.
- [13] Zhu Y, Liu X, Yang ST. Construction and characterization of *pta* gene deleted mutant of *Clostridium tyrobutyricum* for enhanced butyric acid fermentation. *Biotechnol Bioeng*, 2005, **90**(2): 154–166.
- [14] Huang YL, Mann K, Novak JM, *et al.* Acetic acid production from fructose by *Clostridium formicoaceticum* immobilized in a fibrous-bed bioreactor. *Biotechnol Prog*, 1998, **14**(5): 800–806.
- [15] Mermelstein LD, Papoutsakis ET. *In vivo* methylation in *Escherichia coli* by the *Bacillus subtilis* phage ϕ 3T methyltransferase to protect plasmids from restriction upon transformation of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**(4): 1077–1081.