

2,3-丁二醇代谢途径关键酶基因敲除对克雷伯氏菌发酵产 1,3-丙二醇的影响

郭欣坤^{1,2}, 方慧英^{1,2}, 诸葛斌^{1,2}, 宗红^{1,2}, 宋健³, 诸葛健^{1,2}

1 江南大学 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室, 江苏 无锡 214122

3 江南大学 化学与材料工程学院, 江苏 无锡 214122

郭欣坤, 方慧英, 诸葛斌, 等. 2,3-丁二醇代谢途径关键酶基因敲除对克雷伯氏菌发酵产 1,3-丙二醇的影响. 生物工程学报, 2013, 29(9): 1290-1300.

Guo XK, Fang HY, Zhu GB, et al. Influence of key enzyme gene knockout of 2,3-butanediol pathway to 1,3-propanediol fermentation in *Klebsiella pneumoniae*. Chin J Biotech, 2013, 29(9): 1290-1300.

摘 要: 2,3-丁二醇是克雷伯氏菌发酵产 1,3-丙二醇的主要副产物, 为减少 2,3-丁二醇的产生, 利用 Red 重组技术对克雷伯氏菌 2,3-丁二醇合成途径关键酶基因 *budC* 和 *budA* 进行了敲除。突变株发酵性能实验结果表明, 所获得的两株突变株生长性能受到不同程度的影响; *budC* 基因的缺失使菌株 1,3-丙二醇产量提高了 10%, 2,3-丁二醇降低为原来的 70%, 而 *budA* 基因缺失则使菌株无 2,3-丁二醇和 1,3-丙二醇的产生, 但乳酸、琥珀酸、乙醇和乙酸的产量较出发菌株都有明显增长。通过进一步对 *budC* 基因缺失菌株主要产物分析, 推测在该菌中存在 2,3-丁二醇回补途径, 这一结果为低副产物克雷伯氏菌的改造提供了新依据。

关键词: 1,3-丙二醇, 2,3-丁二醇, 基因敲除, 克雷伯氏菌, Red 重组技术

Received: January 29, 2013; **Accepted:** March 29, 2013

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2011AA02A207).

Corresponding author: Huiying Fang. Tel: +86-510-85918106; Fax: +86-510-85918150; E-mail: fanghuiying@126.com

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2011AA02A207) 资助。

网络出版时间: 2013-07-11

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20130711.1739.002.html>

Effects of knockout of 2,3-butanediol synthesis key enzyme genes on 1,3-propanediol production in *Klebsiella pneumoniae*

Xinkun Guo^{1,2}, Huiying Fang^{1,2}, Bin Zhuge^{1,2}, Hong Zong^{1,2}, Jian Song³, and Jian Zhuge^{1,2}

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

2 Laboratory of Industrial Microorganisms, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: 2,3-butanediol (2,3-BD) is a major byproduct of 1,3-propanediol (1,3-PDO) fermentation by *Klebsiella pneumoniae*. To decrease the formation of 2,3-BD, the *budC* and *budA* gene, coding two key enzymes of 2,3-BD synthetic pathway in *K. pneumoniae*, were knocked out using Red recombination technology. The growth of the two mutants were suppressed in different level. The *budC* deficient strain fermentation results showed that 1,3-PDO concentration increased to 110% and 2,3-butanediol concentration dropped to 70% of the parent strain. However, the *budA* deficient strain did not produce 1,3-PDO and 2,3-BD, and the final titer of lactic acid, succinic acid, ethanol and acetic acid increased remarkably compared with the parent strain. Further analysis of *budC* deficient strain fermentation inferred that *K. pneumoniae* possessed the 2,3-BD cycle as a replenishment pathway. The consequence provided a new evidence for reforming low-byproduct *K. pneumoniae*.

Keywords: 1,3-propanediol, 2,3-butanediol, gene knockout, *Klebsiella pneumoniae*, Red recombination technology

1,3-丙二醇是一种三碳平台化合物，是合成对苯二甲酸丙二醇酯、聚亚氨酯、聚醚、聚胺酯和芳香聚酯的重要单体^[1-4]。自然界中能够以甘油为底物生产 1,3-丙二醇的菌主要有克雷伯氏菌 *Klebsiella*、弗氏柠檬酸菌 *Citrobacter*、乳杆菌 *Lactobacilli*、梭菌 *Clostridia*^[5]等，其中克雷伯氏菌是生产强度和转化率较高的菌种之一，其甘油代谢途径分为还原途径和氧化途径：还原途径生产 1,3-丙二醇；氧化途径提供生物生长所需的能量 (ATP)、生物量、还原当量 (NADH)，并形成 2,3-丁二醇、乳酸、琥珀酸、乙酸、乙醇等副产物。

2,3-丁二醇与 1,3-丙二醇都含有两个羟基，具有高沸点和与水互溶的特点，在发酵液精馏分离过程中，随着 2,3-丁二醇在液相中含量的降低，

其在汽相中的摩尔分率越来越小，需要采用更大的回流比才能分离提纯 1,3-丙二醇，从而造成分离成本增高^[6]。此外，2,3-丁二醇的合成需要消耗大量碳源和还原力 NADH^[7]，致使依赖 NADH 合成的 1,3-丙二醇的转化率大大降低，所以降低发酵过程中 2,3-丁二醇的产量成为一个需要解决的问题^[8-9]。

利用基因敲除技术消除发酵过程中副产物产生是一种提高目的产物产量的有效策略^[10-14]。2,3-丁二醇合成途径中有 3 种酶： α -乙酰乳酸合成酶 (α -acetolactate synthetase, ALS)、 α -乙酰乳酸脱羧酶 (α -acetolactate decarboxylase, α -ALDC) 和 2,3-丁二醇脱氢酶 (2,3-BD dehydrogenase, BDH)^[15-16]。这三个酶的基因位于 *budABC* 操纵子上，其中 *budB* 编码 α -乙酰乳

酸合成酶, *budA* 编码 α -乙酰乳酸脱羧酶, *budC* 编码 2,3-丁二醇脱氢酶。在 2,3-丁二醇代谢途径中, α -乙酰乳酸合成酶可以催化丙酮酸形成 α -乙酰乳酸, α -乙酰乳酸在 α -乙酰乳酸脱羧酶作用下形成 3-羟基-2-丁酮, 2,3-丁二醇脱氢酶催化

3-羟基-2-丁酮形成 2,3-丁二醇 (图 1)。本研究利用 Red 同源重组技术^[17]分别构建了 *budC* 和 *budA* 基因缺陷株, 并通过发酵实验考察这两个基因的缺失对克雷伯氏菌发酵产 1,3-丙二醇的影响。

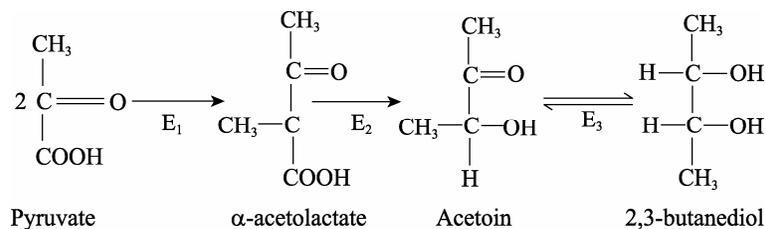


图 1 2,3-丁二醇的代谢途径及相关酶^[15]

Fig. 1 Metabolism pathway of 2,3-butanediol and related enzymes^[15]. E₁: α -acetolactate synthase; E₂: α -acetolactate decarboxylase; E₃: 2,3-butanediol dehydrogenase.

1 材料与方 法

1.1 菌株与质粒

克雷伯氏菌 *Klebsiella pneumoniae* ZG25 由本研究中心筛选并保藏。用于基因敲除所需要的工具质粒 pKD13、pKD46 和 pCP20 均购自美国耶鲁大学大肠杆菌菌株库。本研究中使用的引物见表 1。

1.2 工具酶及试剂

质粒小量提取试剂盒、细菌基因组 DNA 抽提试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒均购自北京博大泰克生物基因技术有限责任公司; *Taq* DNA 聚合酶、PrimeSTAR HS DNA 聚合酶购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 氨苄青霉素 (Amp)、卡那霉素 (Kan)、氯霉素 (Cm) 购自上海朝瑞生物技术有限公司, 2-乙酰氧基-2-甲基-乙酰乙酸乙酯购于 Sigma 公司; L-阿拉伯糖、monohydrate 2-(N-

吗啉代) 乙烷磺酸一水、Brij-35 聚环氧乙烯月桂酰醚购自生工生物工程 (上海) 有限公司; 其他试剂为国产分析纯。

1.3 培养基与培养方法

种子培养基 (g/L): 酵母提取物 5, 胰蛋白胍 10, NaCl 10。葡萄糖蛋白胍水培养基 (g/L): 胰蛋白胍 5, 葡萄糖 5, K₂HPO₄ 2。发酵培养基 (g/L): 甘油 40, 葡萄糖 5, 酵母膏 5, KH₂PO₄ 7.5, MgSO₄ 2, (NH₄)₂SO₄ 2, FeSO₄·7H₂O 0.005, VB₁₂ 0.015, 微量元素溶液 10 mL/L, KOH 调 pH 值至 8.5。微量元素溶液 (g/L): ZnCl₂ 0.07, MnCl₂·4H₂O 0.1, H₃BO₃ 0.06, CoCl₂·6H₂O 0.2, CuCl₂ 0.02, NiCl₂·6H₂O 0.025, Na₂MoO₄·2H₂O 0.035。需要时加入 Amp (100 μ g/mL)、Kan (50 μ g/mL)、Cm (34 μ g/mL)。

种子培养: 1% 接种量 (V/V)、37 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养 6~7 h。发酵培养: 250 mL 三角瓶、50 mL

表 1 本研究使用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'-3')
C1	<u>ACACTTACAAACCAAAAAAGCCCCTGCGCGAAAGCAGGGGCAAGCCATGTCAGAGCTTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG</u>
C2	<u>CAGCTGCATCTGAGTCAGATTCTGTAAGTCATCACAATAAGGAAAGGAAAATTCCGGGGATCCGT</u> CGACC
A1	<u>GTCAACATTTATTTAACCTTTCTTATATTTGTTGAACGAGGAAGTGGTATATTCCGGGGATCCGTCCG</u> ACC
A2	<u>GCGCCGTGCGCCCACTGGCGTACCGGATACTGTTTGTCCATGTGAACCCCTGTAGGCTGGAGCTGC</u> TTCG
K1	ATTCCGGGGATCCGTCGAC
K2	TGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
CJ1	TTCGTTTCCCCGGGATGCTT
CJ2	ATCGCGATAACCCGCTGCTGA
AJ1	GGCGTACCGGATACTGTT
AJ2	CCTGTCCGGTGCCCTGAAT
KZ1	ATTCAGGGCACCGGACAGG
KZ1'	CCTGTCCGGTGCCCTGAAT
KZ2	TTTCTCGGCAGGAGCAAGGTGAG
KZ2'	CTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAA

The underlines indicate about 50 bp homology extensions of a target knockout gene.

装液量, 4%接种量 (V/V), 37 °C、100 r/min 旋转式摇床振荡培养, 实验重复 3 次, 取平均值; 5 L 发酵罐 (韩国 BIOTRO 公司, 型号: BIOG-M), 装液量 2.5 L, 37 °C, 初始甘油浓度 20 g/L, 转速 200~250 r/min, 通气量 0.5 L/min。从 8 h 起流加甘油使其保持在 20 g/L 左右, 直至 22 h, 用 10 mol/L 的 KOH 控制 pH 保持在 7.5。

1.4 *budC* 和 *budA* 基因的敲除

提取 *K. pneumoniae* ZG25 全基因组, 根据 *Klebsiella pneumoniae* 342 (GenBank Accession No. NC011283) 分别设计 *budC* 和 *budA* 基因引物 CJ1、CJ2 和 AJ1、AJ2, 扩增 *budC* 和 *budA* 基因并连接 pMD18-T 测序。根据测序结果设计引物 C1、C2 和 A1、A2 (表 1), 其中下划线部分为目

标基因上下游约 50 bp 的同源臂序列, 以 pKD13 的 DNA 为模板, 分别扩增目标基因打靶 DNA 片段 $gene^{D50}$ -Kan- $gene^{D50}$ 。将 pKD46 质粒电转入 *K. pneumoniae* ZG25, 接种至含有 Amp (1.4 mg/mL) 的 LB 液体培养基中, 37 °C 培养至 8~10 h, 然后转移至含有 Amp (2.0 mg/mL) 的 LB 固体平板上 12~15 h, 筛选出含有 pKD46 质粒的菌体。将目标基因打靶 DNA 片段电转导入 *K. pneumoniae* ZG25 (pKD46), 在加入 Kan 的 LB 固体平板上筛选转化子, 升温至 42 °C 培养 12 h 以去除 pKD46 质粒, 将 pCP20 质粒电转导入菌体细胞, 30 °C 培养 2 h, 利用 pCP20 消除转化子中 Kan 抗性基因, 然后升温至 42 °C 培养 12~16 h 去除 pCP20 质粒^[18-19]。

1.5 转化子的验证

将打靶 DNA 片段电转后在 Kan 抗性平板上长出的转化子用鉴定引物 K1、K2; AJ1、AJ2; CJ1、CJ2; KZ1、KZ1'和 KZ2、KZ2'进行 PCR 验证。K1 和 K2 分别是 Kan 抗性基因的上游引物和下游引物, CJ1、CJ2 和 AJ1、AJ2 分别是基因 *budC* 和 *budA* 基因上游和下游片段。KZ1、KZ1'和 KZ2、KZ2'分别是 Kan 抗性基因中间某段基因序列及其反向互补序列。

1.6 测定方法

1.6.1 生物量及代谢产物测定

发酵液中的菌体密度以分光光度计吸光值 OD_{650} 表示。细胞干重根据经验公式 $1 OD = 0.25 \text{ g/L}$ 。发酵液中甘油、1,3-丙二醇、2,3-丁二醇、乙酸、乙醇、乳酸、琥珀酸的测定参考文献[10]。

1.6.2 酶活测定

α -乙酰乳酸脱羧酶的测定参考文献[15], 酶活单位定义为 37 °C 下每分钟由 α -乙酰乳酸脱羧酶脱羧 α -乙酰乳酸产生 1 μmol 3-羟基-2-丁酮的酶量。

2,3-丁二醇脱氢酶的测定参考文献[20], 酶活力定义为 37 °C 下每分钟转化 1 μmol NADH 成为 NAD^+ 的酶量。

1.6.3 蛋白质含量测定

粗酶液蛋白质含量采用 Bradford 法^[21]测定, 以 BSA 为标准蛋白。

2 结果

2.1 *budC* 和 *budA* 单基因缺失菌株的获得

以质粒 pKD13 NDA 为模板, 扩增出目标基因打靶 DNA 片段 *budC*^{D50}-Kan-*budC*^{D50} 和

budA^{D50}-Kan-*budA*^{D50}, 转化至含 pKD46 质粒的 *K. pneumoniae* ZG25 感受态中, 同源重组后在 Kan 平板上初步筛选 *budC* 和 *budA* 基因缺失突变株。

将含有 Kan 抗性基因的 *budC* 缺失菌株进行菌落 PCR 验证, 结果如图 2 所示。分别利用 4 对引物 K1、K2; CJ1、CJ2; CJ1、KZ2'和 KZ2、CJ2 对 *budC* 缺失菌进行菌落 PCR 鉴定, *budC* 基因缺失菌株可以得到 1 303 bp、1 394 bp、627 bp 和 790 bp 大小片段, 出发菌株仅 CJ1、CJ2 引物可扩增得到 862 bp 片段。含 Kan 抗性基因的 *budA* 缺失菌株的菌落 PCR 验证如图 3 所示。分别利用 4 对引物 K1、K2; AJ1、AJ2; AJ1、KZ1'和 AJ2、KZ1 进行菌落 PCR 鉴定, *budA* 基因缺失菌株可以得到 1 303 bp、1 600 bp、752 bp 和 742 bp 大小片段, 出发菌株仅 AJ1、AJ2 可得到 1 077 bp 片段。DNA 凝胶电泳的结果均与理论值相符, 表明 *budC* 和 *budA* 基因敲除成功, 将质粒 pCP20 转化至 *budC* 和 *budA* 基因缺失菌中, 将 Kan 抗性基因消除, 获得的 *budC* 基因缺失菌命名为 *K. pneumoniae* ZG38 (*budC* Δ), 获得的 *budA* 基因缺失菌命名为 *K. pneumoniae* ZG38 (*budA* Δ)。

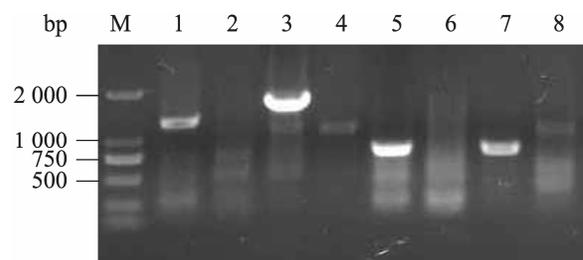


图 2 *budC* 基因缺失菌的菌落 PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of the *budC* knockout by colony PCR. M: DL2 000 DNA marker; 1, 3, 5, 7: mutant (*budC* Δ) containing Kan resistance gene; 2, 4, 6, 8: parent strain.

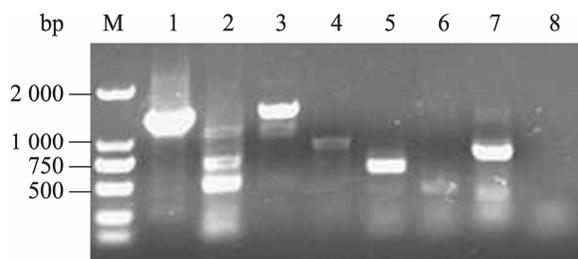


图3 *budA* 基因缺失菌的菌落 PCR 鉴定

Fig. 3 Identification of the *budA* knockout by colony PCR. M: DL2 000 DNA marker; 1, 3, 5, 7: mutant (*budAΔ*) containing Kan resistance gene; 2, 4, 6, 8: parent strain.

两株基因突变株的 2,3-丁二醇脱氢酶酶活如图 4A 所示, 出发菌株在整个发酵阶段都有酶活性。*K. pneumoniae* ZG38 (*budCΔ*) 没有检测出 2,3-丁二醇脱氢酶酶活, 说明 *K. pneumoniae* ZG38 (*budCΔ*) 的 *budC* 基因已经被成功敲除, 同时发现发酵过程中 3-羟基-2-丁酮大量积累 (数据未列出), 在发酵 5~15 h 时发酵液中 3-羟基-2-丁酮浓度约为出发菌株的 120%, 进一步说明因为 *budC* 基因的缺失, 造成了 3-羟基-2-丁酮在发酵液中大量积累。*K. pneumoniae* ZG3 (*budAΔ*) 没有检测出 2,3-丁二醇脱氢酶活性, 为 *budA* 基因的缺失提供了佐证。

两株基因突变株的 α -乙酰乳酸脱羧酶酶活如图 4B 所示, 出发菌株在整个过程中都保持 α -乙酰乳酸脱羧酶的活性。*K. pneumoniae* ZG38 (*budCΔ*) 的 *budC* 基因缺失造成 3-羟基-2-丁酮积累的同时, α -乙酰乳酸脱羧酶的活性相比出发菌株提高了约 20% (6~24 h), *K. pneumoniae* ZG38 (*budAΔ*) 没有检测出 α -乙酰乳酸脱羧酶活性, 说明 *K. pneumoniae* ZG38 (*budAΔ*) 的 *budA* 基因已经被敲除。

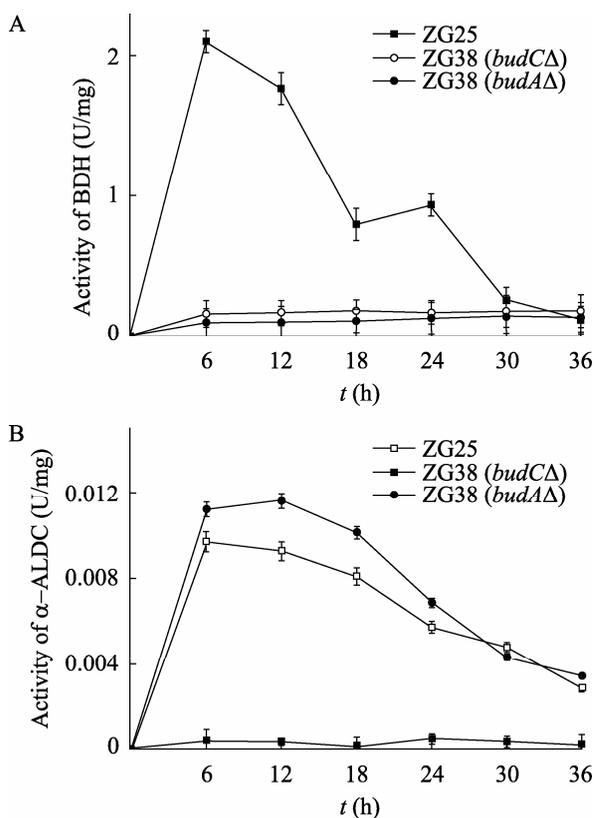


图4 *K. pneumoniae* ZG25、*K. pneumoniae* ZG38 (*budCΔ*)、*K. pneumoniae* ZG38 (*budAΔ*) 2,3-丁二醇脱氢酶 (A) 与 α -乙酰乳酸脱羧酶 (B) 比酶活曲线的测定

Fig. 4 Time course of specific activity of BDH (A) and α -ALDC (B) in *K. pneumoniae* ZG25, *K. pneumoniae* ZG38 (*budCΔ*) and *K. pneumoniae* ZG38 (*budAΔ*).

2.2 突变株的分批发酵性能

为了初步考察基因敲除对菌体生长和代谢产物的影响, 本研究对出发菌株 *K. pneumoniae* ZG25 及构建的基因缺失菌 *K. pneumoniae* ZG38 (*budCΔ*) 和 *K. pneumoniae* ZG38 (*budAΔ*) 进行了摇瓶发酵实验, 结果表明, *K. pneumoniae* ZG38 (*budCΔ*) 和 *K. pneumoniae* ZG38 (*budAΔ*) 的平均比生长速率 (2.07/h, 0.583/h) 和生长量 (图 5) 均低于出发菌株 (2.22/h), 说明 *budC* 和 *budA* 基因

的缺失抑制了菌体的生长, 相比之下, *budA* 基因的缺失对菌体的影响更加严重, 在整个发酵过程中, *K. pneumoniae* ZG38 (*budAΔ*) 的菌体量只有出发菌株的 25%~35%。*K. pneumoniae* ZG38 (*budAΔ*) 的发酵结果显示, 菌体不产生 1,3-丙二醇和 2,3-丁二醇, 而其他副产物的产量明显增加, 乳酸、琥珀酸、乙醇和乙酸的产量分别为出发菌株的 6.6、2.7、2.1 和 1.8 倍。

甘油测定结果表明 (图 6), *K. pneumoniae* ZG38 (*budCA*) 利用甘油的能力稍弱于出发菌株, 出发菌株 12 h 时已经消耗大部分甘油, 而 *K. pneumoniae* ZG38 (*budCAΔ*) 到 24 h 才消耗大部分甘油, 至发酵结束时残留甘油含量与出发菌株残留甘油含量都保持在相同的水平 (0.5~1 g/L), 而 *K. pneumoniae* ZG38 (*budAΔ*) 菌株利用甘油的能力降低, 直至发酵结束时, 发酵液中仍然残留约 30 g/L 的甘油。

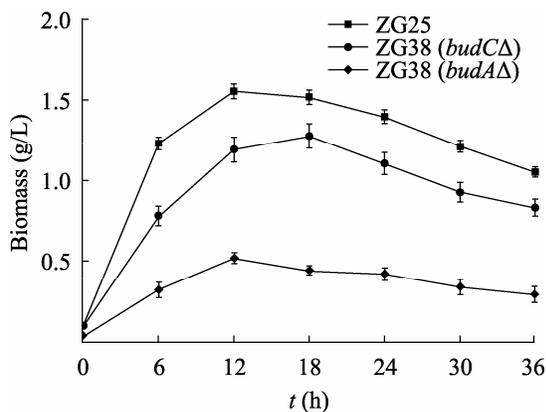


图 5 *K. pneumoniae* ZG25、*K. pneumoniae* ZG38 (*budCA*) 和 *K. pneumoniae* ZG38 (*budAΔ*) 的生长曲线

Fig. 5 Time course of cell growth of *K. pneumoniae* ZG25, *K. pneumoniae* ZG38 (*budCA*) and *K. pneumoniae* ZG38 (*budAΔ*).

发酵液代谢产物的分析结果如图 6 所示, *K. pneumoniae* ZG38 (*budCA*) 的 1,3-丙二醇和

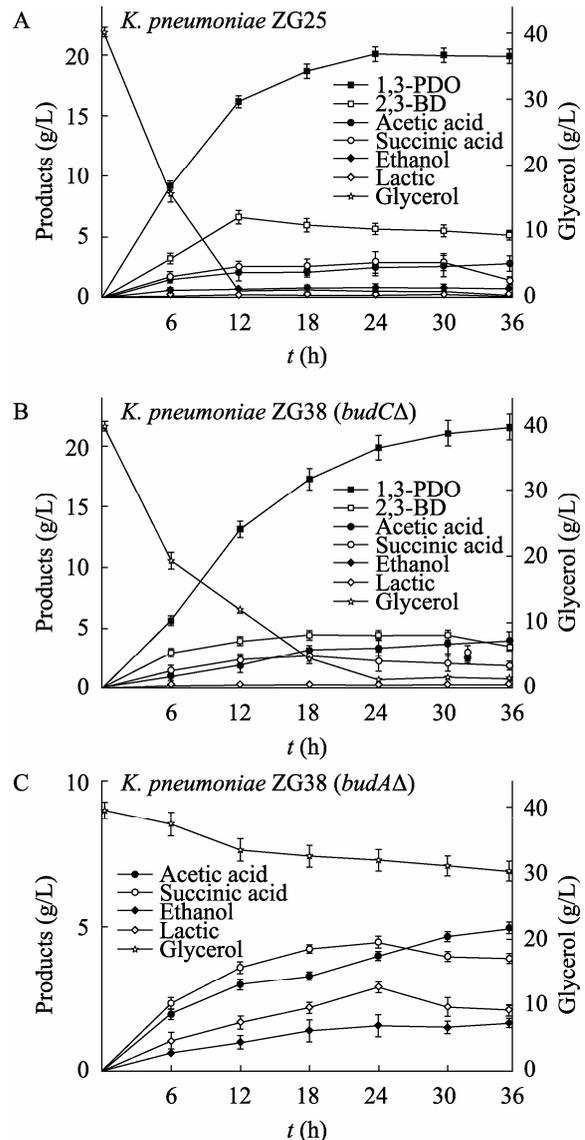


图 6 *K. pneumoniae* ZG25 (A)、*K. pneumoniae* ZG38 (*budCA*) (B) 和 *K. pneumoniae* ZG38 (*budAΔ*) (C) 的摇瓶发酵

Fig. 6 Shake-flask fermentations of *K. pneumoniae* ZG25 (A), *K. pneumoniae* ZG38 (*budCA*) (B) and *K. pneumoniae* ZG38 (*budAΔ*) (C). 1,3-PDO: 1,3-propanediol; 2,3-BD: 2,3-butanediol.

2,3-丁二醇产量分别达到 21.7 g/L 和 3.4 g/L, 为出发菌株的 111% 和 65.3%。与出发菌株相比, 2,3-丁二醇产量明显下降, 此外, *K. pneumoniae* ZG38 (*budCA*) 单位菌体的 1,3-丙二醇产率、摩尔转化率达到 0.603 g/(L·h) 和 0.682 mol/mol, 分别为出发菌株的 109% 和 112%。由此可知, *budC* 基因敲除造成的 2,3-丁二醇脱氢酶缺失降低了

2,3-丁二醇产量, 并提高了 1,3-丙二醇产量。

2.3 突变株的分批补料发酵

在摇瓶发酵实验的基础上进一步考察 *K. pneumoniae* ZG38 (*budCA*) 发酵生产 1,3-丙二醇的能力, 在 5 L 发酵罐中对出发菌株及 *K. pneumoniae* ZG38 (*budCA*) 进行了分批补料发酵实验, 发酵结果如表 2 所示。

表 2 *K. pneumoniae* ZG25 和 *K. pneumoniae* ZG38 (*budCA*) 的分批补料发酵结果

Table 2 Fermentation results of fed-batch fermentation of *K. pneumoniae* ZG25 and *K. pneumoniae* ZG38 (*budCA*)

Strains	<i>K. pneumoniae</i> ZG25	<i>K. pneumoniae</i> ZG38 (<i>budCA</i>)	Ratio of <i>K. pneumoniae</i> ZG38 (<i>budCA</i>) to <i>K. pneumoniae</i> ZG25
Fermentation time (h)	40.0	40.0	—
1,3-PDO (g/L)	61.00	66.90	110.00
2,3-BD (g/L)	8.81	6.18	70.00
Acetic acid (g/L)	5.95	7.86	132.00
Ethanol (g/L)	3.32	0.80	24.10
Lactic acid (g/L)	1.61	1.39	86.00
Succinic acid (g/L)	2.16	2.70	125.00
Productivity of 1,3-PDO (g/(L·h))	1.53	1.67	110.00
Conversion rate of 1,3-PDO (mol/mol)	0.630	0.701	111.000

由表 2 可以看出, *K. pneumoniae* ZG38 (*budCA*) 的 1,3-丙二醇浓度为 66.9 g/L, 相比于出发菌株提高了 10%, 1,3-丙二醇产率、对甘油的摩尔转化率也明显增加。正如所预测的, 2,3-丁二醇脱氢酶失活导致了 2,3-丁二醇和乙醇产量的降低, 分别降低了 30.0% 和 75.9%。然而 *budC* 基因缺失菌株却产生了更多的乙酸、琥珀酸, 表明 *budC* 基因的缺失可以导致流向 2,3-丁二醇途径的碳流转向乙酸和琥珀酸途径。

3 讨论

菌体代谢旁路途径基因敲除往往会在一定

程度上影响菌体的生长, 这在许多关于克雷伯氏菌基因敲除研究中已经得到证实^[10-11]。本研究中对 *budC* 基因和 *budA* 基因的敲除也得到了相同的结果。就发酵目的产物来说, *budC* 基因缺失菌株 2,3-丁二醇的产量只是比出发菌株降低了 30%, 并没有完全按照预测消除 2,3-丁二醇的产生, 表明克雷伯氏菌可能存在另一条 2,3-丁二醇途径, 即 2,3-丁二醇循环, 这条途径已经在枯草芽胞杆菌、蜡状芽胞杆菌和尿素微球菌^[22-23] 中被发现, 并且 2,3-丁二醇循环的生理机制还没有阐明, 至今尚无关于 *K. pneumoniae* 2,3-丁二醇回补途径的研究。

本研究利用基因敲除技术对 *K. pneumoniae* 2,3-丁二醇回补途径进行了探索,如图 7 所示,当 2,3-丁二醇途径因 *budC* 基因缺失而被阻断时,通向 2,3-丁二醇途径的碳流通过节点 3-羟基-2-丁酮转向 2,3-丁二醇的回补途径生成 2,3-丁二醇,在这个过程中,乙酸作为回补途径的中间代谢产物被大量形成,理论上 1 mol 2,3-丁二醇形成的同时也会形成 2 mol 乙酸,在分批补料发酵过程中,乙酸的产量约是 2,3-丁二醇产量的 1.88 倍(表 2),与理论预测值基本吻合,从而有力的证实了克雷伯氏菌中可能存在 2,3-丁二醇回补途径,并且当主要合成途径被阻断后会通过此回补途径合成 2,3-丁二醇。

budA 基因的缺失对菌体的生长和生理产生

了明显影响,2,3-丁二醇代谢途径在微生物胞内有着重要的生理功能,它维持着细胞内 NAD^+/NADH 平衡,3-羟基-2-丁酮和 2,3-丁二醇的转化是一个可逆的生化反应,故 2,3-丁二醇代谢途径是细胞的一个还原力库,它的存在可以自动调节胞内的氧化还原平衡,而 *budA* 基因的缺失则使其丧失了这一功能,使变异菌株在生长上受到抑制,代谢紊乱,甘油的还原途径被抑制,氧化途径中产生的 NADH 消耗在糖酵解到三羧酸循环途径的产物形成过程中,从而导致发酵过程中乳酸、琥珀酸、乙醇和乙酸的产量成倍增加。这与 Zhang 等^[24]报道的产酸克雷伯氏菌 *budA* 基因缺失菌株发酵结果相似,Zhang 等将 *budA* 基因敲除后虽然菌体生长受到抑制,但却提高了

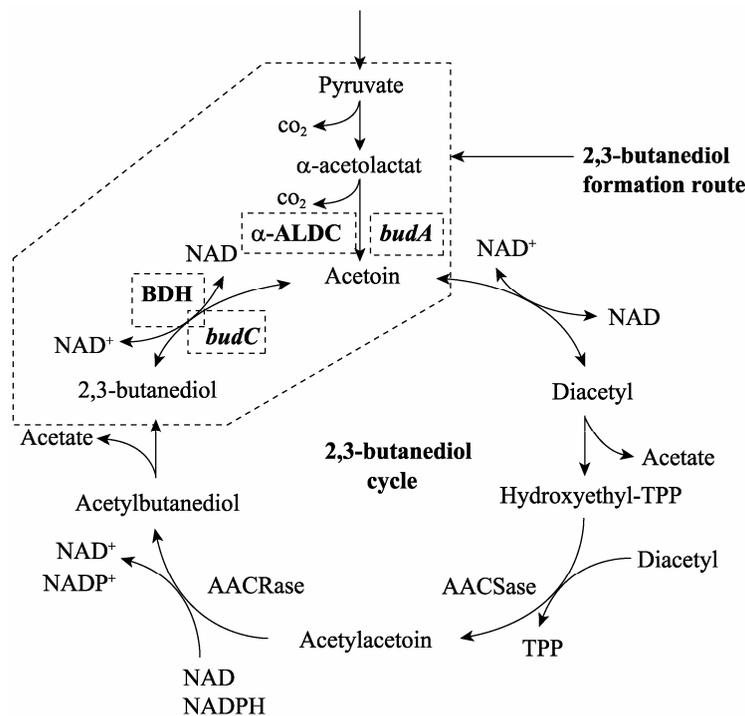


图 7 2,3-丁二醇代谢途径和 2,3-丁二醇循环^[22]

Fig. 7 Metabolic pathway of 2,3-BD and the 2,3-BD cycle^[22].

1,3-丙二醇的产量,说明 2,3-丁二醇合成途径对 1,3-丙二醇产量的影响在不同克雷伯氏菌中的表现是不同的。

根据枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis*、蜡状芽胞杆菌 *Bacillus cereus* 和尿素微球菌 *Micrococcus urea* 公布的 2,3-丁二醇循环途径^[22]推测,若 *budA* 基因被敲除则使得 α -乙酰乳酸脱羧酶缺失,从而使 3-羟基-2-丁酮完全无法合成,导致 2,3-丁二醇两条代谢途径都被阻断,最终无 2,3-丁二醇产生,这与本研究结果完全一致。基于本研究 *budC* 和 *budA* 基因敲除和代谢产物分析的结果,可以推断克雷伯氏菌中可能存在 2,3-丁二醇回补途径,且 2,3-丁二醇循环是以 3-羟基-2-丁酮为起点。有关 2,3-丁二醇循环的研究结果为以后更加深入的研究提供了基础。在以后的研究中,应该重点研究克雷伯氏菌的 2,3-丁二醇循环途径,找出该途径的关键酶基因并尝试敲除关键酶基因,以进一步降低 2,3-丁二醇和增加 1,3-丙二醇的产量。

REFERENCES

- [1] Liu HJ, Xu YZ, Zheng ZM, et al. 1,3-propanediol and its copolymers: research, development and industrialization. *Biotechnol J*, 2010, 5(11): 1137–1148.
- [2] Kurian JV. A new polymer platform for the future-Sorona from corn derived 1,3-propanediol. *J Polym Environ*, 2005, 13(2): 159–167.
- [3] Kaur G, Srivastava AK, Chand S. Advances in biotechnological production of 1,3-propanediol. *Biochem Eng J*, 2012, 64: 106–118.
- [4] Saxena RK, Anand P, Saran S, et al. Microbial production of 1,3-propanediol: recent developments and emerging opportunities. *Biotechnol Adv*, 2009, 27(6): 895–913.
- [5] Biebl H, Menzel K, Zeng AP, et al. Microbial production of 1,3-propanediol. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, 52(3): 289–297.
- [6] Gao SL, Fang YJ, Qi YW. Prediction of vapor-liquid equilibrium by ASPEN PLUS software for water-2,3-butanediol. *Zhejiang Chem Ind*, 2007, 138: 25–28 (in Chinese).
高山林, 方云进, 戚一文. 用 aspen plus 软件预测水-2,3-丁二醇汽液相平衡数据. *浙江化工*, 2007, 138: 25–28.
- [7] Converti A, Perego P, Del Borghi M. Effect of specific oxygen uptake rate on *Enterobacter aerogenes* energetics: carbon and reduction degree balances in batch cultivations. *Biotechnol Bioeng*, 2003, 82(3): 370–377.
- [8] Xiu ZL, Zeng AP. Present state and perspective of downstream processing of biologically produced 1,3-propanediol and 2,3-butanediol. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 78(6): 917–926.
- [9] Hao J, Xu F, Liu H, et al. Downstream processing of 1,3-propanediol fermentation broth. *J Chem Technol Biotechnol*, 2006, 81(1): 102–108.
- [10] Zhang YP, Li Y, Du CY, et al. Inactivation of aldehyde dehydrogenase: A key factor for engineering 1,3-propanediol production by *Klebsiella pneumoniae*. *Metab Eng*, 2006, 8(6): 578–586.
- [11] Yang G, Tian JS, Li JL. Fermentation of 1,3-propanediol by a lactate deficient mutant of *Klebsiella oxytoca* under microaerobic conditions. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 73(5): 1017–1024.
- [12] Xu YZ, Guo NN, Zheng ZM, et al. Metabolism in 1,3-propanediol fed-batch fermentation by a D-lactate deficient mutant of *Klebsiella pneumoniae*. *Biotechnol Bioeng*, 2009, 104(5): 965–972.
- [13] Seo MY, Seo JW, Heo SY, et al. Elimination of by-product formation during production of 1,3-propanediol in *Klebsiella pneumoniae* by inactivation of glycerol oxidative pathway. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 84(3): 527–534.
- [14] Guo NN, Zheng Z M, Mai YL, et al. Consequences

- of *cps* mutation of *Klebsiella pneumoniae* on 1,3-propanediol fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 86(2): 701–707.
- [15] Blomqvist K, Nikkola M, Lehtovaara P, et al. Characterization of the genes of the 2,3-butanediol operons from *Klebsiella terrigena* and *Enterobacter aerogenes*. *J Bacteriol*, 1993, 175(5): 1392–1404.
- [16] Mayer D, Schlensog V, Bock A. Identification of the transcriptional activator controlling the butanediol fermentation pathway in *Klebsiella terrigena*. *J Bacteriol*, 1995, 177(18): 5261–5269.
- [17] Wei D, Wang M, Shi JP, et al. Red recombinase assisted gene replacement in *Klebsiella pneumoniae*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2012, 39(8): 1219–1226.
- [18] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *PNAS*, 2000, 97(12): 6640–6645.
- [19] Baba T, Ara T, Hasegawa M, et al. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol*, 2006, 2(1): 1–11.
- [20] Wardwell SA, Yang YT, Chang HY, et al. Expression of the *Klebsiella pneumoniae* CG21 acetoin reductase gene in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J Ind Microbiol Biot*, 2001, 27(4): 220–227.
- [21] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72(1): 248–254.
- [22] Juni E, Heym GA. A cyclic pathway for the bacterial dissimilation of 2,3-butanediol, acetylmethylcarbinol, and diacetyl I. General aspects of the 2,3-butanediol cycle. *J Bacteriol*, 1956, 71(4): 425–432.
- [23] Ui S, Hosaka T, Mizutani K, et al. Acetylacetoin Synthase as a Marker Enzyme for Detecting the 2,3-Butanediol Cycle. *J Biosci Bioeng*, 2002, 93(2): 248–251.
- [24] Zhang G, Yang G, Wang X, et al. Influence of blocking of 2,3-butanediol pathway on glycerol metabolism for 1,3-propanediol production by *Klebsiella oxytoca*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2012, 168(1): 116–128.

(本文责编 郝丽芳)