

大肠杆菌合成 1,2,4-丁三醇的途径优化

孙雷^{1*}, 杨帆^{2,3*}, 朱泰承², 李兴华², 孙红兵⁴, 李寅², 许正宏¹, 张延平²

1 江南大学药学院, 江苏 无锡 214122

2 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

3 中国科技大学生命科学院, 安徽 合肥 230022

4 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308

孙雷, 杨帆, 朱泰承, 等. 大肠杆菌合成 1,2,4-丁三醇的途径优化. 生物工程学报, 2016, 32(1): 51-63.

Sun L, Yang F, Zhu TC, et al. Optimization of 1,2,4-butanetriol synthetic pathway in *Escherichia coli*. Chin J Biotech, 2016, 32(1): 51-63.

摘要: 1,2,4-丁三醇 (BT) 是一种在工业中有多种用途的重要的非天然化合物。文中通过将外源基因 *xdh* 和 *mdlC* 导入大肠杆菌 BW25113 表达, 并敲除了 *xylA*、*xylB*、*yagE*、*yjhH*、*yiaE* 和 *ycdW* 等木糖和中间产物代谢旁路基因, 构建了能够将 D-木糖转化为 BT 的重组菌株。为优化 BT 合成途径, 针对 BT 合成途径中的限速步骤——3-脱氧-D-甘油-戊酮糖酸的脱羧反应, 进行了新酶的筛选和评价, 获得了可显著提高反应效率的新的 2-酮酸脱羧酶——KivD, 并构建了表达该酶的重组菌株 BW-025。在此基础上, 通过初步条件优化, 将 BT 产量提高至 2.38 g/L; 进一步调节途径中各个酶的表达量, 探究了它们对 BW-025 合成 BT 的影响, 最终获得了 BT 产量较 BW-025 提高了 48.62% 的重组菌株 BW-074。

关键词: D-木糖, 1,2,4-丁三醇, 大肠杆菌, 2-酮酸脱羧酶, 途径优化

Received: March 25, 2015; **Accepted:** May 4, 2015

Supported by: The Knowledge Innovation Project of the Chinese Academy of Sciences (No. KSCX2-EW-G-5), Beijing Municipal Natural Science Foundation (No. 31170039).

Corresponding authors: Zhenghong Xu. Tel/Fax: +86-510-85918206; E-mail: zhenghxu@jiangnan.edu.cn
Yanping Zhang. Tel/Fax: +86-10-64807351; E-mail: zhangyp@im.ac.cn

*These authors contributed equally to this study.

中国科学院知识创新工程重大项目 (No. KSCX2-EW-G-5), 北京市自然科学基金 (No. 31170039) 资助。

Optimization of 1,2,4-butanetriol synthetic pathway in *Escherichia coli*

Lei Sun^{1*}, Fan Yang^{2,3*}, Taicheng Zhu², Xinghua Li², Hongbing Sun⁴, Yin Li², Zhenghong Xu¹, and Yanping Zhang²

¹ Laboratory of Pharmaceutical Engineering, School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

² CAS Key Laboratory of Microbial Physiological and Metabolic Engineering, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

³ School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230022, Anhui, China

⁴ National Engineering Laboratory for Industrial Enzymes, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

Abstract: 1,2,4-Butanetriol (BT) is an important non-natural chemical with a variety of industrial applications. A recombinant *Escherichia coli* biosynthesizing BT from D-xylose was constructed by heterologously expressing *xdh* and *mdlC*, and knocking out competing pathway genes including *xylA*, *xylB*, *yjxE*, *yagH* and *ycdW*. To optimize BT synthesis pathway, the third catalytic step that catalyzes the decarboxylation reaction of 3-deoxy-D-glycero-pentulosonic acid was identified as a potential bottleneck. Consequently, 2-keto acid decarboxylases from three different microorganisms were screened, and the *kivD* gene from *Lactococcus lactis* was found to increase BT titer by 191%. The improved strain BW-025 reached a final BT titer of 2.38 g/L under optimized transformation conditions. Attempts on synthetic pathway optimization were also made by fine-tuning the expression levels of each enzyme involved in the whole pathway based on BW-025. As a result, an *xdh* overexpressed recombinant strain, BW-074 was finally generated, with 48.62% higher BT production than that of BW-025.

Keywords: D-xylose, 1,2,4-butanetriol, *Escherichia coli*, 2-keto acid decarboxylase, pathway optimization

1,2,4-丁三醇 (1,2,4-butanetriol, 简称 BT) 是一种重要的非天然多元醇, 在军工、医药等领域具有广泛的应用价值。BT 最有潜力的应用是作为 1,2,4-丁三醇三硝酸酯 (BTTN) 的合成前体, 后者可代替硝化甘油作为推进剂和含能增塑剂, 并具有更优的理化性质^[1]。医药方面, BT 可被用作阳离子脂质体和多种药物的合成前体^[2-4]。此外, BT 还可用于合成聚氨酯泡沫、卷烟添加剂和彩色显影剂等^[5-7]。

目前 BT 的商业生产多采用 NaBH₄ 催化的苹果酸二酯还原或 Ru-C 催化的苹果酸还原等化学合成法^[8-10]。这些合成工艺都存在反应条件苛

刻、环境污染严重、生产危险性大、副产物多等弊端。生物合成法具有原料成本低廉、反应条件温和、环境友好、安全高效等优点。2003 年, Niu 等首先提出了 BT 的生物合成法^[10]。该方法以 D-木糖或 L-阿拉伯糖为底物, 经过四步酶催化 (图 1) 实现。整个工艺使用了莓实假单胞菌 *Pseudomonas fragi* 和大肠杆菌 *Escherichia coli* 两种微生物作为催化剂。之后, 研究者将 BT 转化途径的四步酶都在 *E. coli* 中进行表达, 用 *E. coli* 即可完成整个 BT 的生物转化, 大大简化了转化工艺^[11]。但从目前已有报道来看, 用重组 *E. coli* 生产 BT 的催化效率较低, 导致 BT

产量无法满足工业生产的需求^[3,12-13]。如果要进一步提高 BT 的转化效率,首先必须对 BT 合成途径进行系统地优化,找出催化限速步骤,精确调节催化各个步骤酶的表达量,以实现最大的转化通量。

本文在构建 BT 合成工程菌的基础上,针对关键限速步骤进行了新酶的筛选,并分别调节了途径中各个酶的表达量,显著提高了重组菌株利用木糖合成 BT 的效率。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株及质粒

实验所用菌株及质粒见表 1。

1.2 酶与试剂

PrimeSTAR[®] HS DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶为 TaKaRa (大连) 公司产品。限制性内切酶购自 Fermentas 公司。2×Taq PCR StarMix with Loading Dye 购自北京康润诚业生物科技有限公司。各试剂盒购自 Omega Bio-tek 公司。1,2,4-丁三醇标准品购自 Sigma 公司。酵母提取物、胰蛋白胨为 Oxoid 公司产品。其余试剂如 D-木糖、异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG)、硫酸卡那霉素 (Kanamycin)、盐酸四环素 (Tetracycline hydrochloride)、NaCl 和 CaCO₃ 等均为国产。引物由英潍捷基 (上海) 公司合成。

1.3 遗传操作

DNA 的克隆、酶切、连接、感受态细胞制备和转化、质粒提取等基本基因操作技术参照《分子克隆实验指南》^[14]及试剂盒供应商提供的操作手册进行。文中所用引物见表 2。

1.3.1 重组质粒的构建

基因 *xdh* 由 Genewiz 公司进行密码子优化并

合成,然后被插入质粒 pET30a 的 *Nde* I 和 *Bgl* II 位点之间,从而获得 pET30a-*xdh*。基因 *adhP* 克隆自 *E. coli* BW25113 基因组,引物为 *adhP*-F-*Not* I 和 *adhP*-R-miniPtac-*Xho* I。通过 PCR 将引物中的组成型启动子序列 miniPtac (或诱导型启动子序列 Ptac) 与 *adhP* 序列融合。T1T2 终止子扩增自 pTAK117 载体,引物为 T1T2-F-*Bam*HI 和 T1T2-R-*Not* I。将两段基因片段分别插入 pET30a-*xdh*, 获得了重组质粒 pET30a-*xdh*-T1T2-*adhP*-miniPtac。以该质粒为模板扩增出 *xdh*-T1T2-*adhP*-miniPtac 片段 (引物为 expression cassette 1-F 和 expression cassette 1-R),并通过 PCR 与 *xylA* 的上游区域和 *xylB* 的下游区域融合,获得 *xylA* up-*xdh*-T1T2-*adhP*-miniPtac-*xylB* down 片段,然后将其插入载体 pKmTsSacB 的 *Xho* I 和 *Sal* I 位点,构建了 pKmTsSacB-*xdh*-*adhP*。

重组质粒 pET30a-miniPtac-*mdlC* 的基因合成、测序验证和质粒的亚克隆构建均委托 Genewiz 公司完成。其中 miniPtac 为启动子,并加入 AAGGAG 的 RBS 序列,*mdlC* 为根据大肠杆菌密码子的偏好性,在不改变 *MdlC* 氨基酸序列的前提下,对 *MdlC* 的编码序列进行密码子优化得到的核苷酸序列,将质粒 pET30a 的 *SgrA* I 和 *Nco* I 的之间的序列替换为商业合成的 miniPtac-*mdlC* 的 *SgrA* I 和 *Nco* I 的位点之间的序列,保持 pET30a 的其他序列不变,将序列正确的重组质粒命名为 pET30a-miniPtac-*mdlC*。pET30a-miniPtac-*kivD*、pET30a-miniPtac-*aepY* 和 pET30a-miniPtac-*ipdC* 等带有 2-酮酸脱羧酶的编码基因的重组质粒构建方法相同。pET30a-miniPtac-2*kivD* 是通过将另一拷贝的 *kivD* 基因插入 pET30a-miniPtac-*kivD* 而获得的。

表 1 本文所用的菌株及质粒

Table 1 Plasmids and strains used in this work

Plasmids or strains	Main characteristics	Reference or source
Plasmids		
pET30a	Skeleton plasmid for cloning, Kan ^r	Lab collection
pACYC184	Skeleton plasmid for cloning, Cm ^r , Tc ^r	Lab collection
pKmTsSacB	Skeleton plasmid for cloning, Kan ^r	Lab collection
pTAK117	Used for cloning T1T2 terminator	Lab collection
pET30a- <i>xdh</i> -T1T2- <i>adhP</i> -miniPtac	pET30a based vector, containing <i>xdh</i> -T1T2- <i>adhP</i> -miniPtac cassette, Kan ^r	This study
pET30a- <i>xdh</i> -T1T2- <i>adhP</i> -Ptac	pET30a based vector, containing <i>xdh</i> -T1T2- <i>adhP</i> -Ptac cassette, Kan ^r	This study
pKmTsSacB- <i>xdh</i> - <i>adhP</i>	pKmTsSacB based vector, containing <i>xylA</i> up- <i>xdh</i> -T1T2- <i>adhP</i> -miniPtac- <i>xylB</i> down cassette, Kan ^r	This study
pET30a-miniPtac- <i>mdlC</i>	pET30a based vector with miniPtac, carrying one copy of codon optimized <i>mdlC</i> gene, Kan ^r	This study
pET30a-miniPtac- <i>kivD</i>	pET30a based vector with miniPtac, carrying one copy of codon optimized <i>kivD</i> gene, Kan ^r	This study
pET30a-miniPtac- <i>aepY</i>	pET30a based vector with miniPtac, carrying one copy of codon optimized <i>aepY</i> gene, Kan ^r	This study
pET30a-miniPtac- <i>ipdC</i>	pET30a based vector with miniPtac, carrying one copy of codon optimized <i>ipdC</i> gene, Kan ^r	This study
pET30a-Ptac- <i>kivD</i>	pET30a based vector with Ptac, carrying one copy of codon optimized <i>kivD</i> gene, Kan ^r	This study
pET30a-miniPtac-2 <i>kivD</i>	pET30a based vector with miniPtac, carrying two copies of codon optimized <i>kivD</i> gene, Kan ^r	This study
pACYC184-Ptac- <i>xdh</i> -T1T2	pACYC184 based vector, containing Ptac- <i>xdh</i> -T1T2 cassette, Cm ^r , Tc ^r	This study
pACYC184-miniPtac- <i>xdh</i> -T1T2	pACYC184 based vector, containing miniPtac- <i>xdh</i> -T1T2 cassette, Cm ^r , Tc ^r	This study
pACYC184-Ptac- <i>adhP</i> -T1T2	pACYC184 based vector, containing Ptac- <i>adhP</i> -T1T2 cassette, Cm ^r , Tc ^r	This study
pACYC184-miniPtac- <i>adhP</i> -T1T2	pACYC184 based vector, containing miniPtac- <i>adhP</i> -T1T2 cassette, Cm ^r , Tc ^r	This study
pACYC184-Ptac- <i>yjhG</i>	pACYC184 based vector with Ptac, carrying one copy of codon optimized <i>yjhG</i> gene, Cm ^r , Tc ^r	This study
pACYC184-miniPtac- <i>yjhG</i>	pACYC184 based vector with miniPtac, carrying one copy of codon optimized <i>yjhG</i> gene, Cm ^r , Tc ^r	This study
Strains		
BW25113	Wild type, used as the host strain	Lab stock
DH5 α	Commercial transformation host for cloning	TaKaRa
BW-004	BW25113/ Δ <i>yjhH</i> ::FRT & Δ <i>yagE</i> ::FRT & Δ <i>yedW</i> ::FRT & Δ <i>yiaE</i> ::FRT	This study
BW-010	BW-004/ Δ <i>xylAB</i> :: <i>xdh</i> -T1T2- <i>adhP</i> -miniPtac	This study
BW-011	BW-010/pET30a-miniPtac- <i>mdlC</i>	This study

续表 1

BW-025	BW-010/pET30a-miniPtac- <i>kivD</i>	This study
BW-055	BW-010/pET30a-Ptac- <i>kivD</i>	This study
BW-056	BW-010/pET30a-Ptac- <i>kivD</i> & pACYC184-miniPtac- <i>yjhG</i>	This study
BW-058	BW-010/pET30a-Ptac- <i>kivD</i> & pACYC184-Ptac- <i>yjhG</i>	This study
BW-059	BW-010/pET30a-miniPtac-2 <i>kivD</i>	This study
BW-063	BW-010/pET30a-miniPtac- <i>aepY</i>	This study
BW-064	BW-010/pET30a-miniPtac- <i>ipdC</i>	This study
BW-066	BW-010/pET30a-Ptac- <i>kivD</i> & pACYC184-miniPtac- <i>adhP</i> -T1T2	This study
BW-067	BW-010/pET30a-Ptac- <i>kivD</i> & pACYC184-Ptac- <i>adhP</i> -T1T2	This study
BW-073	BW-010/pET30a-miniPtac- <i>kivD</i> & pACYC184-miniPtac- <i>xdh</i> -T1T2	This study
BW-074	BW-010/pET30a-miniPtac- <i>kivD</i> & pACYC184-Ptac- <i>xdh</i> -T1T2	This study

表 2 本文所用的引物

Table 2 Primers used in this work

Primers	Sequences (5'-3')/restriction sites ^a	Plasmid constructed or function
T1T2-F- <i>Bam</i> H I	TTAGGATCCAAAAGGCCATCCGTCAGGATG	
T1T2-R- <i>Not</i> I	ATAGCGGCCGCTTGGCTGTTTTGGCGGATG	
<i>adhP</i> -F- <i>Not</i> I	GGCGCGGCCGCTTAGTGACGGAAATCAATCACCATG	pET30a- <i>xdh</i> -T1T2- <i>adhP</i> -miniPtac & pET30a- <i>xdh</i> -T1T2- <i>adhP</i> -Ptac
<i>adhP</i> -R-miniPtac- <i>Xho</i> I	GGCCTCGAGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGG TCACACAGGAGATATCATATGAAGGCTGCAGTTGTTACGAAG GGCCTCGAGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGG	
<i>adhP</i> -R-Ptac- <i>Xho</i> I	AATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAGATATCATATGA AGGCTGCAGTTGTTACGAAG	
<i>xylA</i> up-F- <i>Sal</i> I	ATCCAGCTGATTTTGTATTATTGGCGGTTAGCG	pKmTsSacB- <i>xylA</i> up- <i>xdh</i> -T1T2- <i>adhP</i> -miniPtac- <i>xylB</i> down
<i>xylA</i> up-R	GAGACGGGTAGATAGCAGAAGACATATTGAACTCCATAATCA GGTAATGCC	
<i>xylB</i> down-F	CGAGCCGATGATTAATTGTCAACAGCTCACGTTATCCCCTGC	
<i>xylB</i> down-R- <i>Xho</i> I	TACGAGCTCACGTGAGTTATTCGCTGTATTCTTCC	
Expression cassette 1-F	GGCATTACCTGATTATGGAGTTCAATATGTCCTTCTGCTATCTAC CCGTCTC	
Expression cassette 1-R	GGTCAGGCAGGGGATAACGTGAGCTGTTGACAATTAATCATC GGCTCG	
<i>xdh</i> -F	CAGGAGATATCATATGTCTCTGCTATCTACCCGTCTC	
<i>xdh</i> -R- <i>Ahd</i> I	TTAGACTCTCAGTCTTGGCTGTTTTGGCGGATG	pACYC184-Ptac- <i>xdh</i> -T1T2 & pACYC184-miniPtac- <i>xdh</i> -T1T2
Ptac-F- <i>Ava</i> I	GACCTCGGGCCATCATCATCATCTTCTTCTGG	
miniPtac-R- <i>xdh</i>	GATAGCAGAAGACATATGATATCTCCTGTGTGACCACAC	
Ptac-R- <i>xdh</i>	GATAGCAGAAGACATATGATATCTCCTGTGTGAAATTGTTATCC	

续表 2

yjhG-F	CACACAGGAGATATCATATGTCTGTTCGCAATATTTTGCTGAC	
yjhG-R- <i>Drd</i> I	CCCG A CCCG G T C G T C A G T TTTTATTTCATAAAATCGCGC	
Ptac-F- <i>Ahd</i> I	GGCG A CTG A G A G T CCCATCATCATCATATTCTTCTGG	pACYC184-miniPtac- <i>yjhG</i> & pACYC184-Ptac- <i>yjhG</i>
miniPtac-R-yjhG	CGAACAGACATATGATATCTCCTGTGTGACCACAC	
Ptac-R-yjhG	CGAACAGACATATGATATCTCCTGTGTGAAATTGTTATCC	
kivD-F	GGATAACAATTTACACAGGAGATATCATATGTACACCGTTGG	pET30a-Ptac- <i>kivD</i>
kivD-R- <i>Nco</i> I	CCATGG TTAAGATTTGTTCTGTTTCAGCGAAC	
Ptac-F-SgrA I	TATCG CCGG TGCCATCATCATCATATTCTTCTGG	
Ptac-R-kivD	GTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAGATATC	
KivD-F- <i>Nco</i> I	ATT CCATG GAGGAGATATCATATGTACACCGTTGG	
KivD-R- <i>Bam</i> H I	TA AGGATC CTTAAGATTTGTTCTGTTTCAGCGAAC	pET30a-miniPtac-2 <i>kivD</i>
Ptac- <i>adhP</i> - <i>Ava</i> I	ATA CTCGG GAAGCAGCTCCAGCCTACACA	pACYC184-miniPtac- <i>adhP</i> - T1T2 & pACYC184-Ptac- <i>adhP</i> -T1T2
<i>adhP</i> -R- <i>Ahd</i> I	GAT GACTC T CAGT CTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATAC	

^a Bold fonts indicate restriction enzyme sites.

载体 pACYC184 用于基因 *xdh*、*yjhG* 和 *adhP* 的表达。将扩增自 pET30a-*xdh*-T1T2-*adhP*-miniPtac 的 *xdh*-T1T2 片段与 miniPtac 或 Ptac 融合后插入 pACYC184，便分别获得了重组质粒 pACYC184-miniPtac-*xdh*-T1T2 和 pACYC184-Ptac-*xdh*-T1T2。pACYC184-miniPtac-*adhP*-T1T2 和 pACYC184-Ptac-*adhP*-T1T2 的构建方法相同。将扩增自 *E. coli* BW25113 基因组的 *yjhG* 基因与 miniPtac 或 Ptac 融合后插入 pACYC184 的 *Ahd* I 和 *Drd* I 位点，则获得了重组质粒 pACYC184-miniPtac-*yjhG* 和 pACYC184-Ptac-*yjhG*。

1.3.2 基因敲除及验证

采用 λ Red 法^[15-17]敲除了已知的导致 D-木糖转用的 4 种旁路基因 *yagE*、*yjhH*、*yiaE* 和 *yedW*，获得菌株 BW-004。通过两轮重组的方法将基因 *xdh* 和 *adhP* 一起整合至宿主细胞的基因组中，置换木酮糖异构酶和木酮糖激酶的编码基因 *xylA* 和 *xylB*，以构建重组菌株 BW-010。具

体过程为：第一轮，通过将重组质粒 pKmTsSacB-*xdh*-*adhP* 转入 BW-004，并在卡那平板上筛选出整合至 *xylAB* 位点的单交换型；在第二轮中，在含蔗糖的琼脂平板上筛选出双交换的阳性转化株。最后通过菌落 PCR 进行相应的验证。

1.3.3 重组菌株的构建

将构建好的重组质粒以电击转化方法导入底盘细胞 BW-010，在质粒相应的抗性平板上进行阳性菌株的筛选，并通过菌落 PCR 加以验证。

1.4 培养基和转化条件

种子培养基为液体 LB 培养基（含 10 g/L 胰蛋白胨、5 g/L 酵母提取物和 10 g/L NaCl），培养条件为 37 °C、200 r/min。取 1 mL 过夜活化的种子培养物至 100 mL LB 液体培养基（装于 500 mL 三角摇瓶），37 °C、200 r/min 条件下预培养 10 h，带有诱导型表达基因（含 Ptac 启动子）的菌株还需指数生长中期（ $OD_{600}=0.4$ ）加

入 200 mmol/L IPTG 以诱导蛋白质表达。

之后对种子液 OD_{600} 进行测定和计算,取一定量的菌液离心后再以 20 mL 补加了 20 g/L D-木糖作为唯一碳源的 M9 培养基^[13](含 17.08 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、3.0 g/L KH_2PO_4 、0.5 g/L NaCl、1.0 g/L NH_4Cl 、1 mmol/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.1 mmol/L CaCl_2 、10 mmol/L NaHCO_3 和 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 微量金属离子溶液)重悬,然后在 30 °C/33.5 °C/37 °C、200 r/min 条件下转化 72 h。微量金属离子溶液包含:3.7 g/L $(\text{NH}_4)_6(\text{Mo}_7\text{O}_{24}) \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、2.9 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、15.8 g/L $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、24.7 g/L H_3BO_3 和 2.5 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 。另外可向培养基中加入 100 mmol/L MOPS 和 2.5 g/L CaCO_3 来控制 pH 的下降。每种设置 3 个平行。

在上述培养和转化过程中,视菌株所带质粒情况添加相应的抗生素。卡那霉素和盐酸四环素的工作浓度分别为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.5 胞外代谢物的检测

胞外底物、产物和副产物如木糖、木糖酸、乙酸、乳酸、BT 等物质的浓度测定采用高效液相色谱法。取 1 mL 菌液室温下 10 000 $\times g$ 离心 2 min,取上清用孔径为 0.22 μm 的无菌滤膜过滤,采用高效液相色谱法检测,具体设备与条件为:柱型 Bio-Rad Aminex[®] HPX-87H Ion Exclusion Column (300 mm \times 7.8 mm),流动相为 5 mmol/L H_2SO_4 ,流速 0.5 mL/min,柱温 15 °C,进样量 10 μL ,检测器为 Agilent Technologies 1260 RID (Refractive index detector)。

通过检测标准品的相应数值计算样品中各物质的含量。

2 结果与分析

2.1 大肠杆菌中丁三醇合成途径的构建

在构建 BT 的合成途径之前,我们首先对宿主细胞 *E. coli* BW25113 进行了必要的代谢工程改造。如图 1 所示,通过 λ Red 法敲除了已知 D-木糖竞争旁路基因 *yagE*、*yjhH*、*yiaE* 和 *ycdW*,获得菌株 BW-004。在此基础上,将新月柄杆菌 *Caulobacter crescentus* 的 D-木糖脱氢酶的编码基因 *xdh* 和大肠杆菌 *E. coli* 中的一个醇脱氢酶的编码基因 *adhP* 一起整合至宿主细胞的基因组中,置换木糖异构酶和木酮糖激酶的编码基因 *xylA* 和 *xylB*,成功构建了重组菌株 BW-010。在本研究中,BW-010 被用作构建利用 D-木糖合成 BT 的工程菌株的底盘细胞。

之后将 BT 合成途径中的另一个异源基因,来自恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* 的苯甲酸脱羧酶编码基因 *mdlC*,与组成型启动子 miniPtac 融合,并插入多拷贝质粒 pET30a。通过电击转化将构建的质粒 pET30a-miniPtac-*mdlC* 导入 BW-010,成功得到了 BT 合成途径组装完全的 *E. coli* 重组菌株 BW-011。该菌株中,BT 合成途径第 1 步和第 3 步的催化蛋白 Xdh 和 MdlC 为异源蛋白,前者的基因被插入到 *E. coli* 染色体上,后者通过表达载体引入细胞;催化第 2 步和第 4 步的蛋白 YjhG 和 AdhP 为 *E. coli* 内源蛋白,前者利用 *E. coli* 本身携带的基因进行表达,后者的基因被合成后插入到染色体上增加一个拷贝。该菌株在 20 g/L 木糖中转化 72 h,可成功地检测到 BT 的积累,产量为 0.3 g/L (图 2)。

2.2 2-酮酸脱羧酶的筛选

为了优化 BT 的合成途径,需要首先识别出

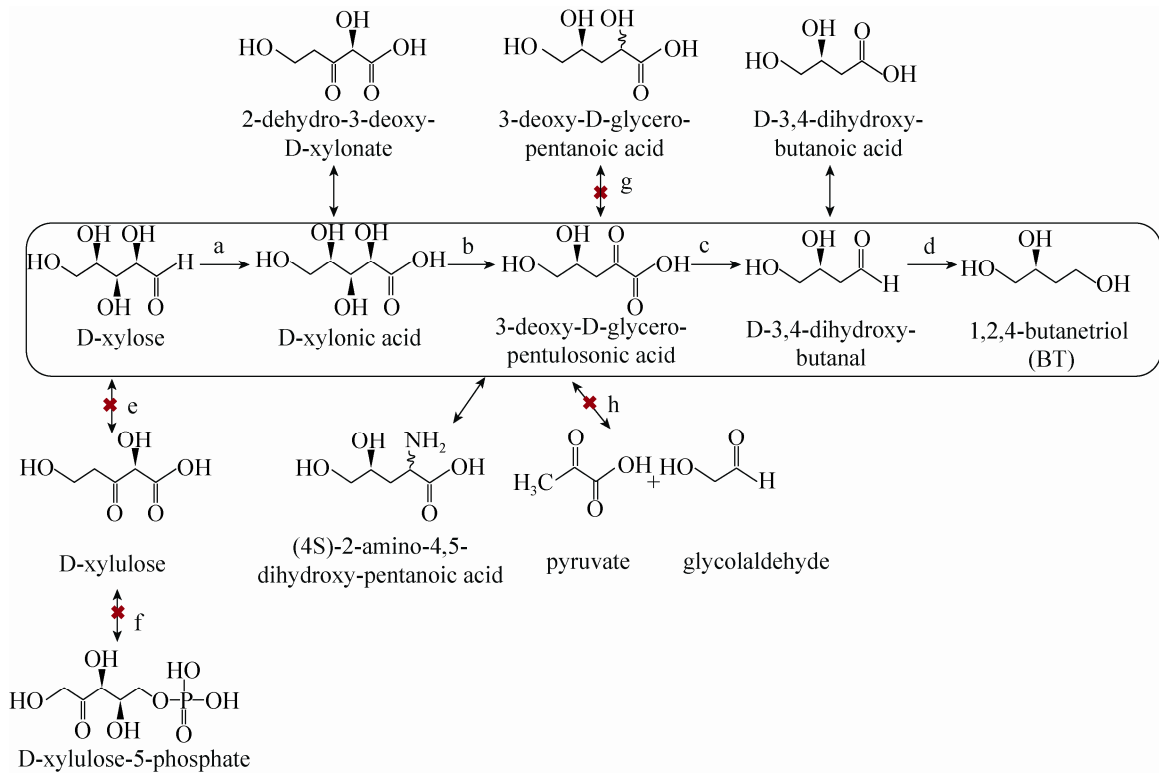


图 1 *E. coli* 重组细胞中 D-木糖合成 1,2,4-丁三醇的代谢途径

Fig. 1 The BT synthetic pathway from D-xylose in the recombinant *E. coli*. The BT synthetic pathway (in the box) and by-passes (outside the box). Enzymes (coding genes, source) involved: a: D-xylose dehydrogenase (*xdh*, *C. crescentus*); b: D-xylonic acid dehydratase (*yjhG* and *yagF*, *E. coli*); c: benzoylformate decarboxylase (*mlc*, *P. putida*); d: alcohol dehydrogenase (*adhP*, *E. coli*); e: xylose isomerase (*xylA*, *E. coli*); f: xyulokinase (*xylB*, *E. coli*); g: 2-Keto acid dehydrogenase (*viaE* and *yedW*, *E. coli*); h: 2-Keto-3-deoxy-D-xylonate aldolase (*yagE* and *yjhH*, *E. coli*). The × denotes gene disruption.

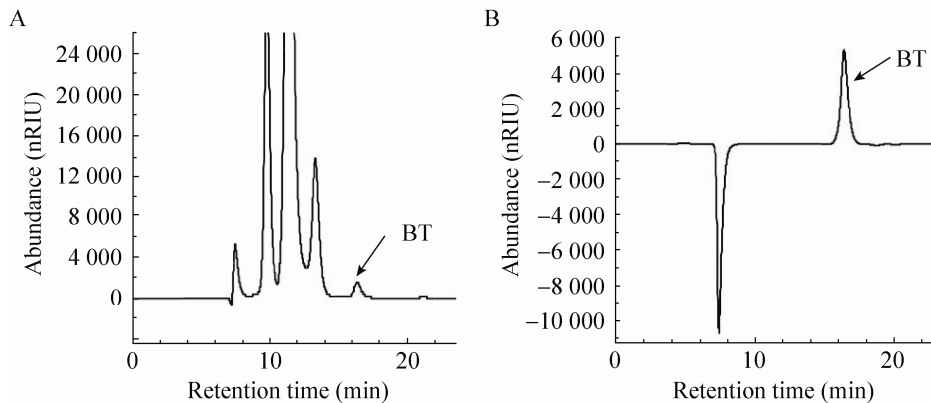


图 2 高效液相检测色谱图

Fig. 2 The HPLC analysis of BT conversion broth. (A) Supernatant from BW-011 broth. (B) Pure BT sample.

整个途径的限速步骤。由于自然界中尚未发现天然催化 3-脱氧-D-甘油-戊酮糖酸脱羧反应的酶,只能选择其他的 2-酮酸脱羧酶替代,因此第 3 步催化反应很可能是整个反应的限速步骤。在上述构建 BT 途径中,我们参考之前的报道^[10-11],选择了来自恶臭假单胞菌 *P. putida* 的苯甲酰甲酸脱羧酶。为进一步优化途径,我们通过 KEGG 等数据库中检索类似的基因反应,以期筛选出比 MdlC 更有效催化 3-脱氧-D-甘油-戊酮糖酸脱羧反应的 2-酮酸脱羧酶。

基于“倾向于选择能催化与 BT 合成途径中第 3 步反应相似基因反应,但与 MdlC 的亲缘关系较远的 2-酮酸脱羧酶”的思路,我们选择了 3 种可能可用的 2-酮酸脱羧酶(表 3),其中 IpdC 和 KivD 同属于吡啶丙酮酸脱羧酶, AepY 为磷酸烯醇丙酮酸脱羧酶。对上述 3 种 2-酮酸脱羧酶进行克隆,以 miniPtac 为启动子,连接到 pET30a 载体中。将构建成功的重组表达载体 pET30a-miniPtac-*kivD*、pET30a-miniPtac-*aepY* 和 pET30a-miniPtac-*ipdC* 分别转化 BW-010 感受态细胞,获得重组菌株 BW-025、BW-063 和 BW-064。

将重组菌株 BW-025、BW-063、BW-064 与 BW-011 一起进行摇瓶转化实验,比较其 BT 的合成能力(图 3)。与 BW-011 相比, BW-025 的 1,2,4-丁三醇产量提高了 191%,产量最高, BW-064 提高了 6.2%,而 BW-063 几乎不产 1,2,4-丁三醇,表明 *L. lactis* 的 α -酮异戊酸脱羧酶(KivD)比 MdlC 对 3-脱氧-D-甘油-戊酮糖酸的脱羧反应有更高的催化效率,能够提高整条途径的通量,从而提高重组菌株的 1,2,4-丁三醇产量;*E. cloacae* 的吡啶丙酮酸脱羧酶(IpdC)催

表 3 筛选获得的 2-酮酸脱羧酶

Table 3 2-Keto acid decarboxylase screened in this work

2-Keto acid decarboxylase (Enzyme, coding gene)	Source
α -Ketoisovalerate decarboxylase (KivD, <i>kivD</i>)	<i>Lactococcus lactis</i>
Phosphonopyruvate decarboxylase (AepY, <i>aepY</i>)	<i>Bacteroides fragilis</i>
Indole-3-pyruvate decarboxylase (IpdC, <i>ipdC</i>)	<i>Enterobacter cloacae</i>

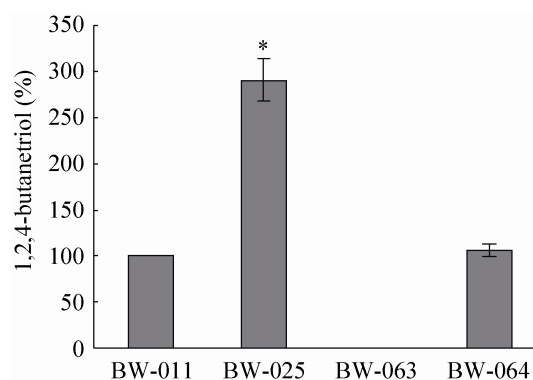


图 3 表达不同 2-酮酸脱羧酶的重组菌株的 1,2,4-丁三醇产量

Fig. 3 Effects of different 2-keto acid decarboxylases on BT production.

化 3-脱氧-D-甘油-戊酮糖酸脱羧反应的能力与 MdlC 相近;而 *B. fragilis* 的磷酸丙酮酸脱羧酶(AepY)不能催化该反应。

2.3 1,2,4-丁三醇转化条件的初步优化

主要考察了转化温度、初始细胞密度和控制转化 pH 对 BW-025 重组菌株合成 BT 的影响。如图 4 所示, BW-025 在 33.5 °C 下 72 h 合成的 BT 产量最高,分别比 30 °C 和 37 °C 高出 209.64% 和 16.57%。BT 产量随着初始菌量的增加而增加,在 OD_{600} 为 30 时达到最大,初始 OD_{600} 提升到 40 时, BT 产量反而有所下降。整个转化过程中,由于木糖酸和其他酸性中间产物的积

累, pH 值不断下降 (结果未显示)。通过向培养基中添加 100 mmol/L MOPS 与 0.05 g 轻质 CaCO_3 , 可有效减缓转化体系 pH 值的下降。BW-025 的 BT 产量也在 72 h 内提高了 41.57%。综合以上各最优条件, BW-025 在 72 h 最高可产 BT 2.38 g/L。

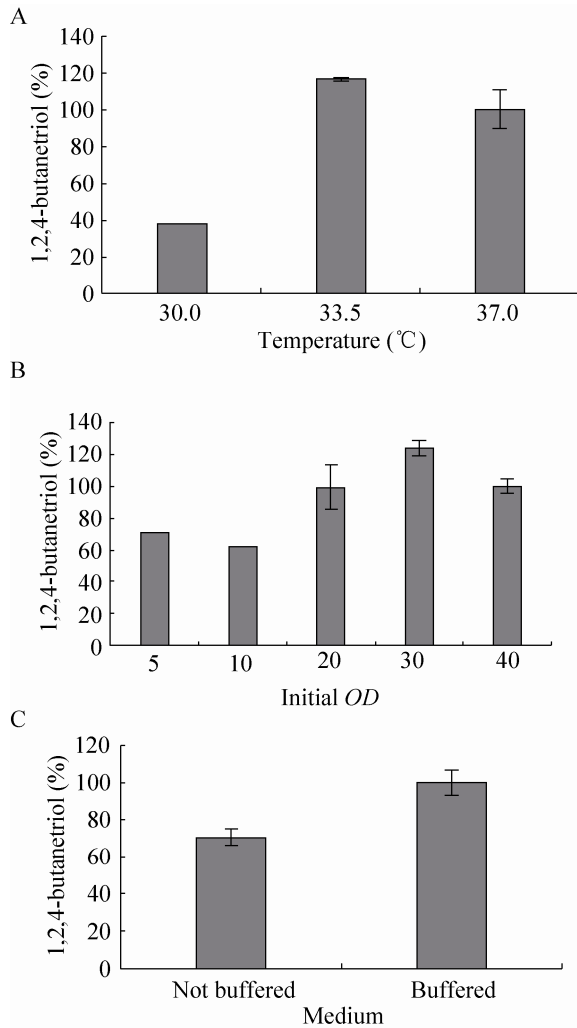


图 4 不同转化条件对 BW-025 合成 1,2,4-丁三醇的影响

Fig. 4 Comparison of BT production with different conversion conditions. BT production of BW-025 with different temperatures(A), initial cell densities (OD_{600}) (B) and pH control (C) were evaluated.

2.4 丁三醇合成途径中各步酶表达量的调节优化

在筛选到 KivD 后, 菌株的 BT 产量得到显著提高, 证明第 3 步酶确实是整个 BT 合成的限速步骤。为了考察继续提高 KivD 的表达量是否进一步增强 1,2,4-丁三醇的合成, 我们首先考察了提高 KivD 表达量对 BT 合成的影响。分别通过更换强启动子和增加拷贝数的方法, 将重组质粒 pET30a-Ptac-*kivD* 和 pET30a-miniPtac-2*kivD* 分别转化至 BW-010 中, 构建了重组菌株 BW-055 和 BW-059。两者与 BW-025 的摇瓶发酵 72 h 后的 1,2,4-丁三醇产量如图 5 所示, 与 BW-025 相比, BW-055 的丁三醇产量降低了 32.1%, BW-059 降低了 6.9%。可推测 KivD 不是现有 1,2,4-丁三醇合成途径的限速酶。

为了确定其他催化步骤是否限制了 BT 的合成, 将重组质粒 pACYC184-miniPtac-*yjhG* 和 pACYC184-Ptac-*yjhG* 分别与 pET30a-miniPtac-*kivD* 共同转入 BW-010 感受态细胞, 得到了催化第二步反应的酶 YjhG 过表达的重组菌株

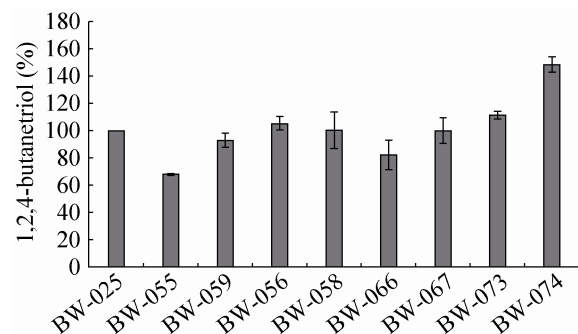


图 5 在 BW-025 基础上分别过表达编码途径中四种酶的基因对 1,2,4-丁三醇产量的影响

Fig. 5 Effects of expression levels of *kivD*, *yihG*, *adhP* and *xdh* on BT production of BW-025, respectively.

BW-056 和 BW-058 ; 将重组质粒 pACYC184-miniPtac-*adhP*-T1T2 和 pACYC184- Ptac-*adhP*-T1T2 分别与 pET30a-miniPtac-*kivD* 共同转入 BW-010 感受态细胞, 获得催化第四步反应的酶 AdhP 过表达的重组菌株 BW-066 和 BW-067 ; 通过将重组质粒 pACYC184-miniPtac-*xdh*-T1T2 和 pACYC184-Ptac-*xdh*-T1T2 分别与 pET30a-miniPtac-*kivD* 共同转入 BW-010 感受态细胞, 则构建了催化第一步反应的酶 Xdh 过表达的重组菌株 BW-073 和 BW-074。

将上述 6 种重组菌株与 BW-025 一起进行摇瓶转化实验, 比较其 BT 的合成能力 (图 5)。与 BW-025 相比, 过表达了 YjhG 的重组菌株 BW-056 和 BW-058 的 BT 产量略有提高, 但均不明显 ; BW-025 过表达 AdhP 后, BT 产量有所下降。而过表达 Xdh 的重组菌株 BW-073 和 BW-074 其 BT 产量较 BW-025 均有提高, 尤其是编码基因 *xdh* 诱导型表达的 BW-074 的 BT 产量, 提高了 48.62%。

3 讨论

丁三醇是一种具有重要应用前景的多元醇, 但作为一种非天然化合物, 其生物转化途径仍面临着途径效率低的问题, 因此对于 BT 合成途径的优化至关重要。为了实现此目的, 首先应当识别整个催化过程的限制性步骤。Cao 等利用重组 *E. coli* 转化木糖生产木糖酸可达到理论得率的近 88%^[18], Valdehuesa 等报道了用重组 *E. coli* 转化木糖生产 BT 时, 有 82.28% 的木糖转化为木糖酸, 但只有 10.25% 的木糖最终转化为 BT^[3,19], 这表明后三步酶催化可能是整个途径的限速步骤。

由于第三步脱羧反应是非天然催化反应,

同时脱羧反应又是不可逆反应, 可推测该步反应极有可能是整个反应的限制性步骤^[20], 因此选择从脱羧反应入手优化 BT 合成途径。之前所有的报道, 都沿用 Niu 等采用的来自恶臭假单胞菌的苯甲酰甲酸脱羧酶 MdlC^[3,10-12,21]。为了寻找与 3-脱氧-D-甘油-戊酮糖酸更加匹配的底物, 我们尝试了其他微生物来源的不同类型的脱羧酶: 吡啶丙酮酸脱羧酶 (IpdC 和 KivD), 磷酸烯醇丙酮酸脱羧酶 (AepY)。体内实验表明来自乳酸乳球菌 *L. lactis* 的 α -酮异戊酸脱羧酶 KivD 的催化活力比 MdlC 提高了 191%。因此, 通过对于新的 2-酮酸脱羧酶的筛选很大程度上解决了第三步酶对整个催化途径的限制。

在途径通量的优化过程中, 一个限速反应的解决通常会导致其他反应会成为新的限制步骤。在筛选到 KivD 的工作基础上, 我们通过对其他三步酶的表达量进行调节, 进一步考察了其他 3 个反应是否会成为新的限速步骤。研究表明, YjhG 的过表达对于 BT 产量的提升不明显, 表明此时 YjhG 的表达量并不构成对整个途径的限制。醇脱氢酶 AdhP 的过量表达对于 BT 产量有一定的副作用, 由于 *E. coli* 体内的 AdhP 具有多种功能, 具有较宽的底物范围^[22-25], 因此推测 AdhP 的过表达会对宿主的代谢造成较大的干扰。Xdh 的过表达使得整个途径的催化效率又提高了 48.62%, 这表明在 KivD 的限制性因素得到解决后, Xdh 的表达可能成为整个反应新的限速步骤。因此, 本研究为 BT 的合成途径优化提供了很好的参考, 后续工作可以在 Xdh 和 KivD 过表达菌株的基础上, 对合成途径进行新一轮的优化, 以进一步提高 BT 的产量。

除了对 BT 途径的优化外, 本文还对 BT 的转化条件进行了初步的探索。转化初始菌量的

提高可显著增加 BT 的转化效率,这是可以理解的。但当 OD_{600} 达到 40 时, BT 的产量却有所下降。我们推测,过高的菌量可能会造成溶氧不足,引起中间代谢产物的积累。我们在转化发酵液中确实检测到乙酸、乳酸和乙二醇等的积累(结果未显示),这些代谢副产物可能会对重组菌的生长和代谢造成不利影响,从而最终影响到 BT 的转化效率。

综上所述,本文首先成功构建了以 20 g/L D-木糖为底物合成 0.3 g/L BT 的 *E. coli* 工程菌株 BW-011。之后对 BT 合成途径中的瓶颈进行了分析,确定了 3-脱氧-D-甘油-戊酮糖酸的脱羧反应这一限速步骤,选出了几种可能催化该反应的 2-酮酸脱羧酶并在底盘细胞 BW-010 中表达,找出了催化效率更高的新酶 KivD,获得了 BT 产量更高的重组菌株 BW-025。探究了温度、初始细胞密度和 pH 等条件对 BW-025 合成 BT 的影响,转化条件优化(转化温度 33.5 °C、初始 OD_{600} 在 20–40、向培养基中添加缓冲剂)后 BW-025 在 72 h 内最高可合成 BT 2.38 g/L。与此同时,进一步对 BW-025 的 BT 合成途径中各个酶的表达量进行调节,评价了其对 BT 合成的影响,其中诱导型过表达 *xdh* 的重组菌株 BW-074 的 BT 得率较 BW-025 提高了 48.62%,表明通过此方法对 BT 合成途径进行优化的思路是可行的。

REFERENCES

- [1] Gouranlou F, Kohsary I. Synthesis and characterization of 1,2,4-butanetrioltrinitrate. *Asian J Chem*, 2010, 22(6): 4221–4228.
- [2] Ren T, Liu DX. Synthesis of cationic lipids from 1,2,4-butanetriol. *Tetrahedron Lett*, 1999, 40(2): 209–212.
- [3] Valdehuesa KNG, Liu HW, Ramos KRM, et al. Direct bioconversion of D-xylose to 1,2,4-butanetriol in an engineered *Escherichia coli*. *Process Biochem*, 2014, 49(1): 25–32.
- [4] Cai ZY, Wang ML. One-step synthesis of (S)-1,2,4-butanetriol via (S)-3-hydroxy- γ -butyrolactone. *J Hefei Univ Technol*, 2010, 33(6): 915–917 (in Chinese).
蔡征宇, 王明亮. (S)-3-羟基- γ -丁内酯一步法合成(S)-1,2,4-丁三醇的研究. *合肥工业大学学报(自然科学版)*, 2010, 33(6): 915–917.
- [5] Lau MK. Synthesis and downstream purification of 1,2,4-butanetriol. UMI Microform 3348145. Ann Arbor, MI, USA: Pro Quest LLC, 2006.
- [6] Pisacane FJ. 1,2,4-Butanetriol: analysis and Synthesis. Silver Spring: Naval Surface Weapons Center, 1982.
- [7] Luo AL, Qiao JJ, Song XC. Synthesis of 1,2,4-hydroxyl-butane. *Northwest Pharmaceut J*, 2007, 22(3): 144–145 (in Chinese).
罗阿利, 乔建军, 宋新潮. 1,2,4-丁三醇的合成工艺研究. *西北药学杂志*, 2007, 22(3): 144–145.
- [8] Tandon VK, Van Leusen AM, Wynberg H. Synthesis of enantiomerically pure (S)-(+)-3-hydroxytetrahydrofuran, and its (R)-enantiomer, from malic or tartaric acid. *J Org Chem*, 1983, 48(16): 2767–2769.
- [9] Hanessian S, Ugolini A, Dubé D, et al. Facile access to (S)-1,2,4-butanetriol and its derivatives. *Can J Chem*, 1984, 62(11): 2146–2147.
- [10] Niu W, Molefe MN, Frost JW. Microbial synthesis of the energetic material precursor 1,2,4-butanetriol. *J Am Chem Soc*, 2003, 125(43): 12998–12999.
- [11] Frost JW, Niu W. Microbial synthesis of D-1,2,4-butanetriol: US, WO 2008/091288 A2. 2008-07-31.
- [12] Sun WL, Lu XY, Zong H, et al. Biosynthesis of D-1,2,4-butanetriol by an engineered *Escherichia coli*. *Microbiol 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. 微生物学通报, 2014, 41(10): 1948–1954.
- [13] 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. *Sci Rep*, 2014, 4: 5541.
- [14] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [15] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(12): 6640–6645.
- [16] Han C, Zhang WC, You S. Advances in the red-mediated recombination. *China Biotechnol*, 2003, 23(12): 17–21 (in Chinese).
韩聪, 张惟材, 游松. Red 同源重组技术研究进展. *中国生物工程杂志*, 2003, 23(12): 17–21.
- [17] Yu HM, Ma YC. Gene knockout strategies for metabolic pathway regulation in industrial microbes. *Chin J Biotechnol*, 2010, 26(9): 1199–1208 (in Chinese).
于慧敏, 马玉超. 工业微生物代谢途径调控的基因敲除策略. *生物工程学报*, 2010, 26(9): 1199–1208.
- [18] Cao YJ, Xian M, Zou HB, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of xylonate. *PLoS ONE*, 2013, 8(7): e67305.
- [19] Liu HW, Valdehuesa KNG, Nisola GM, et al. High yield production of D-xylonic acid from D-xylose using engineered *Escherichia coli*. *Bioresour Technol*, 2012, 115: 244–248.
- [20] Yim H, Haselbeck R, Niu W, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for direct production of 1,4-butanediol. *Nat Chem Biol*, 2011, 7(7): 445–452.
- [21] Abdel-Ghany SE, Day I, Heuberger AL, et al. Metabolic engineering of arabidopsis for butanetriol production using bacterial genes. *Metab Eng*, 2013, 20: 109–120.
- [22] Reid MF, Fewson CA. Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases. *Crit Rev Microbiol*, 1994, 20(1): 13–56.
- [23] Shafqat J, Höög JO, Hjelmqvist L, et al. An ethanol-inducible MDR ethanol dehydrogenase/ acetaldehyde reductase in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem*, 1999, 263(2): 305–311.
- [24] Machielsen R, Uria AR, Kengen SWM, et al. Production and characterization of a thermostable alcohol dehydrogenase that belongs to the aldo-keto reductase superfamily. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(1): 233–238.
- [25] Thomas LM, Harper AR, Miner WA, et al. Structure of *Escherichia coli* AdhP (ethanol-inducible dehydrogenase) with bound NAD. *Acta Crystallogr Sect F: Struct Biol Cryst Commun*, 2013, 69(Pt 7): 730–732.

(本文责编 郝丽芳)