

• 合成生物技术 •

代谢工程改造大肠杆菌从头合成 1,4-丁二醇

姜君逸^{1,2}, 郭艺鸣^{1,2}, 杨套伟^{1,2*}, 饶志明^{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, 江苏 无锡 214122

姜君逸, 郭艺鸣, 杨套伟, 饶志明. 代谢工程改造大肠杆菌从头合成 1,4-丁二醇[J]. 生物工程学报, 2024, 40(9): 3142-3157.
JIANG Junyi, GUO Yiming, YANG Taowei, RAO Zhiming. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for *de novo* synthesis of 1,4-butanediol[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(9): 3142-3157.

摘要: 1,4-丁二醇是一种重要的中间体, 广泛应用于化工、农业、医药等领域。本研究将酶工程和代谢工程相结合, 构建了一条以葡萄糖为底物生产 1,4-丁二醇的新途径。首先, 通过数据库挖掘设计了一条包含 α -酮酸脱羧酶(α -ketoglutarate decarboxylase, SucA)、羧酸还原酶(carboxylate reductase, Car)、乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, YqhD)的新型催化途径, 引入底盘细胞 W3110 (K-12)后, 实现了 1,4-丁二醇的从头合成。为进一步提高该路径的合成效率, 敲除了乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase A, LdhA)、丙酮酸甲酸裂解酶(pyruvate formate lyase B, PflB)基因, 阻断旁路代谢途径; 强化表达柠檬酸合酶(citrate synthase, GltA^{R163L}), 增加 α -酮戊二酸代谢通量; 强化底盘细胞中关键辅酶 NADPH 合成量并替换强启动子强化 *sucA*、*car*、*yqhD* 基因表达量, 改善了 1,4-丁二醇合成前体的供给效率。最终, 重组菌株摇瓶发酵 48 h 最高合成 770 mg/L 的 1,4-丁二醇, 在 5 L 发酵罐上发酵 60 h, 1,4-丁二醇产量达 4.22 g/L, 得率为 12.46 mg/g 葡萄糖。本研究设计了一条新的 1,4-丁二醇从头合成路径, 与已报道的路径相比, 该路径无需乙酰辅酶 A 参与, 避免了副产物乙酸的积累, 同时避免了氨的添加, 为代谢工程改造生产 1,4-丁二醇及其高附加值衍生产品提供了一种新的思路。

关键词: 大肠杆菌; 代谢改造; 1,4-丁二醇; 路径优化

资助项目: 国家自然科学基金(32370040, 32100055); 江苏省自然科学基金(BK20221537); 江苏高校优势学科建设工程项目和江苏高校品牌专业建设工程项目

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32370040, 32100055), the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20221537), and the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions & Top-notch Academic Programs Project of Jiangsu Higher Education Institutions.

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

Received: 2024-01-03; Accepted: 2024-02-19

Metabolic engineering of *Escherichia coli* for *de novo* synthesis of 1,4-butanediol

JIANG Junyi^{1,2}, GUO Yiming^{1,2}, YANG Taowei^{1,2*}, RAO Zhiming^{1,2}

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

2 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: 1,4-butanediol is an important intermediate widely used in chemical, agricultural, and pharmaceutical industries. This study constructed a new short path for the production of 1,4-butanediol with glucose as the substrate by combining enzyme engineering and metabolic engineering. Firstly, a novel path catalyzed by α -ketoglutarate decarboxylase (SucA), carboxylate reductase (Car), and alcohol dehydrogenase (YqhD) was designed by database mining, and the *de novo* synthesis of 1,4-butanediol was achieved after introduction of the path into *Escherichia coli* W3110 (K-12) chassis cells. To further improve the synthesis efficiency of this path, we deleted the genes encoding lactate dehydrogenase A (LdhA) and pyruvate formate lyase B (PflB) to block the metabolic bypass. Furthermore, the expression of citrate synthase (GltA^{R163L}) was up-regulated to increase the α -ketoglutarate metabolic flux. In addition, we improved the synthesis of the key cofactor NADPH and up-regulated the expression of *sucA*, *car*, and *yqhD* by substituting with strong promoters to increase the efficiency of supplying precursors to 1,4-butanediol synthesis. Eventually, the recombinant strain produced up to 770 mg/L of 1,4-butanediol within 48 h in a shake flask, and 4.22 g/L of 1,4-butanediol within 60 h in a 5 L fermenter with a yield of 12.46 mg/g glucose. Compared with the previously reported method, the novel path designed in this study for the *de novo* synthesis of 1,4-butanediol does not need acetyl coenzyme A and avoids the byproduct acetate or the addition of ammonia. Therefore, the outcome is expected to provide a new idea for the metabolic engineering of microbial chassis for the production of 1,4-butanediol and its high-value derivatives.

Keywords: *Escherichia coli*; metabolic engineering; 1,4-butanediol; path optimization

1,4-丁二醇(1,4-butanediol, 1,4-BDO)是一种重要的精细化工原料,可生成多种衍生物,如:四氢呋喃(tetrahydrofuran, THF)、聚四亚甲基乙二醇醚(polytetramethylen ether glycol, PTMEG)和 γ -丁内酯(γ -butyrolactone, GBL)等^[1-2]。另外,1,4-丁二醇及其衍生物还可用于制造一系列必需化合物,包括聚酯、聚氨酯、氨纶以及可生物降解塑料^[3],到2025年其全球市场规模预计

将达到126亿美元,具有很高的经济价值和广阔的市场前景^[4-5]。

目前全球商品化的1,4-丁二醇生产几乎完全由乙炔、丁烷、丁二烯等不可再生的石油化石原料通过化学法制造,随着1,4-丁二醇的全球市场需求和应用日益增长,人们对化石资源短缺和严重环境问题的担忧逐步增加,研究人员的注意力转向了1,4-丁二醇的可持续性生物

生产。但是还尚未发现天然存在的微生物法合成 1,4-丁二醇的路径^[6-7], 研究人员通过代谢工程策略在微生物中成功建立了几种 1,4-丁二醇合成路径^[8]。2011 年, 研究人员通过官能团转化算法预测了使用可再生葡萄糖底物生物合成 1,4-丁二醇的多种潜在代谢途径^[9]。2015 年, Barton 等^[10]和 Lee 等^[11]通过提高工程菌株前体代谢、能量、还原当量的供应以及加强磷酸果糖激酶和三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)合酶活性等方法, 以葡萄糖为底物补料分批发酵得到了 18 g/L 的 1,4-丁二醇; 之后他们还以此为基础成功构建了第一株具备商业化生产 1,4-丁二醇前景的大肠杆菌菌株, 但该路径需要乙酰辅酶 A 参与, 并伴随着大量副产物乙酸的积累^[12]。随着用于生产 1,4-丁二醇的可再生碳水化合物原料范围的进一步扩大, 开发更经济的底物引起了科研人员的极大关注^[13]。Miklószy 等^[14]通过在大肠杆菌中构建 CoA 依赖的 1,4-丁二醇合成途径, 测试了以甘油为底物合成 1,4-丁二醇, 并得到了 0.89 mg/L 的 1,4-丁二醇。2016 年, Tai 等^[15]使用非磷酸化代谢途径将木质纤维素生物质转化为 1,4-丁二醇, 他们分别以 D-木糖、L-阿拉伯糖、D-半乳糖为底物生产 1,4-丁二醇。Wang 等^[16]通过在大肠杆菌中完整表达 1,4-丁二醇生物合成途径, 探索了一种以木糖为碳源的人工生物合成途径。2020 年, Wang 等^[17]以谷氨酸为底物利用生物转化法得到 1.41 g/L 的 1,4-丁二醇, 但是反应过程需要添加氨。

本研究利用数据库挖掘酶元件, 结合已报道的 1,4-丁二醇生物合成途径^[9,11,17], 提出了一条新的 1,4-丁二醇合成路径(图 1): 出发菌株大肠杆菌(*Escherichia coli*)以葡萄糖为底物经三羧酸(tricarboxylic acid, TCA)循环合成 α -酮戊二酸后, 首先通过 α -酮酸脱羧酶(α -ketoglutarate

decarboxylase, SucA)作用生成琥珀酸半醛, 接着通过乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, YqhD)作用生成 4-羟基丁酸, 再经羧酸还原酶(carboxylate reductase, Car)作用生成 4-羟基丁醛, 最后再由乙醇脱氢酶(YqhD)作用生成 1,4-丁二醇, 该路径无需乙酰辅酶 A 参与, 避免了副产物乙酸的积累, 同时反应过程中避免了外源氨的参与。本研究首先通过酶法转化验证了该途径的可行性, 接着将该路径引入 *E. coli* W3110 中, 通过发酵法生产 1,4-丁二醇。在此基础上, 本研究组合运用包括副产物支路阻断、启动子工程强化主代谢流、提升辅因子供应效率等代谢改造策略, 实现了在大肠杆菌中以葡萄糖为底物从头合成 1,4-丁二醇, 为改造微生物生产 1,4-丁二醇提供了新的研究思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

本研究所用菌株和质粒见表 1。

1.1.2 引物

本研究所用引物均由苏州金唯智生物科技有限公司合成(表 2)。

1.1.3 试剂和酶

PrimerSTAR MAX DNA 聚合酶、525 DNA 聚合酶、*Dpn* I 限制性内切酶和 $2\times$ Taq DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司; 同源重组酶、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、感受态制备试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 质粒快速提取试剂盒、细菌 DNA 基因组提取试剂盒购自上海捷瑞生物工程有限公司; 蛋白胨和酵母粉购自 OXOID 公司; 1,4-丁二醇购自上海麦克林生化科技有限公司; 氯化钠、其他各种无机盐试剂购自国药集团化学试剂有限公司。

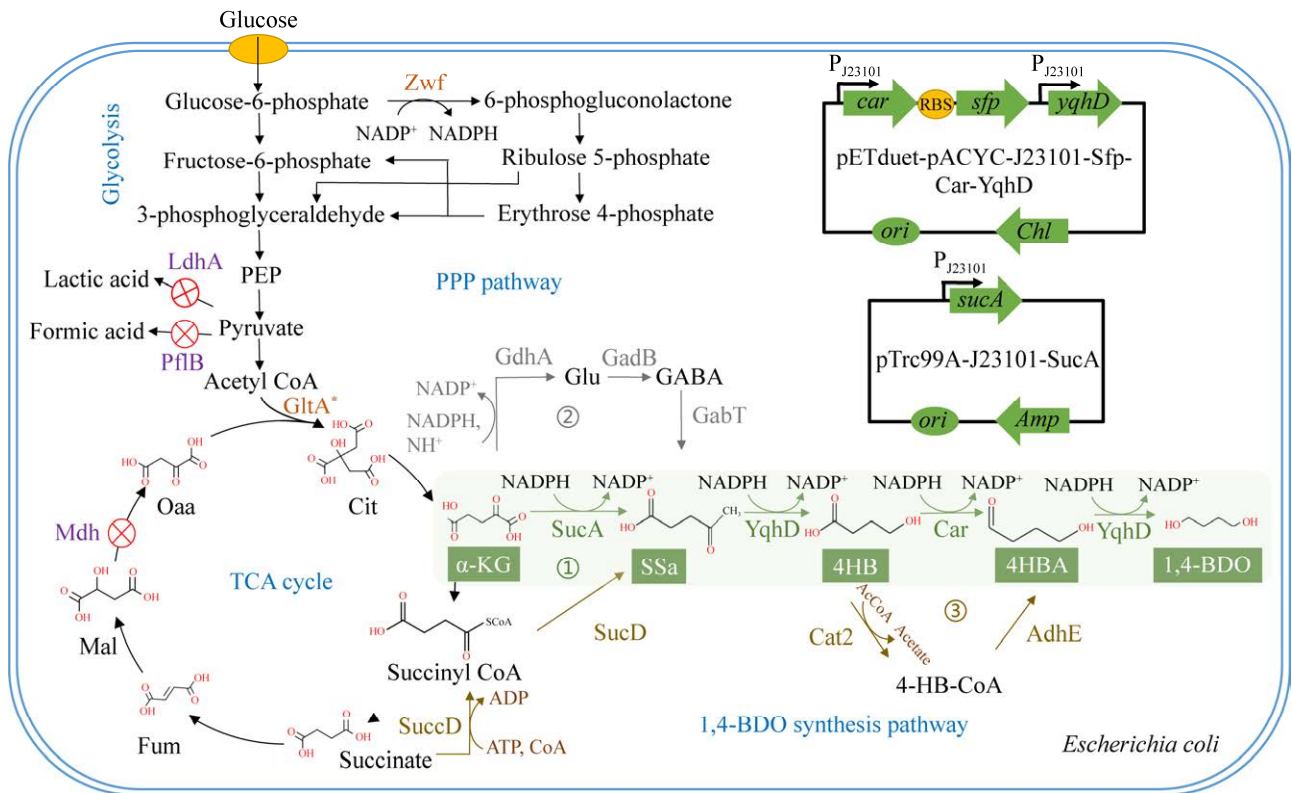


图 1 1,4-丁二醇合成路径 路径①: 本文构建的 1,4-丁二醇合成路径; 路径②、③: 文献报道的 1,4-丁

二醇合成路径. Glucose: 葡萄糖; Glucose-6-phosphate: 6-磷酸-葡萄糖; Fructose-6-phosphate: 6-磷酸-果糖; 3-phosphoglyceraldehyde: 3-磷酸甘油醛; 6-phosphogluconolactone: 6-磷酸葡萄糖酸内酯; Ribulose 5-phosphate: 5-磷酸核酮糖; Erythrose 4-phosphate: 赤藓糖-4-磷酸; PEP: 磷酸烯醇式丙酮酸; Pyruvate: 丙酮酸; Acetyl-CoA: 乙酰辅酶 A; Cit: 柠檬酸; Oaa: 草酰乙酸; Mal: 苹果酸; Fum: 富马酸; Succinate: 琥珀酸; Succinyl CoA: 琥珀酰辅酶 A; α -KG: α -酮戊二酸; SSa: 琥珀酸半醛; 4HB: 4-羟基丁酸; 4HBA: 4-羟基丁醛; 1,4-BDO: 1,4-丁二醇; Glu: 谷氨酸; GABA: γ -氨基丁酸; 4-HB-CoA: 4-羟基丁酰基辅酶 A; LdhA: 乳酸脱氢酶; PflB: 丙酮酸甲酸裂解酶; Mdh: 苹果酸脱氢酶; GltA: 柠檬酸合成酶; SucA: α -酮酸脱羧酶; YqhD: 乙醇脱氢酶; Car: 羧酸还原酶; GdhA: 谷氨酸脱氢酶; GadB: 谷氨酸脱羧酶; GabT: γ -氨基丁酸氨基转移酶; SuccD: 琥珀酰辅酶 A 合成酶; SuccD: 辅酶 A 依赖性琥珀酸半醛脱氢酶; Cat2: 4-羟基丁酰基辅酶 A 转移酶; AdhE: 4-羟基丁酰基-CoA 还原酶; Zwf: 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶.

表 1 本研究所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

<i>Escherichia coli</i> strains and plasmids	Characteristics	Sources
BL21(DE3)	For expressing genes	Lab store
W3110 (K-12)	For expressing genes	Lab store
BL21 (SucA)	BL21(DE3) carrying pET-28a-SucA	This study
BL21 (Car)	BL21(DE3) carrying pET-28a-Car-Sfp	This study
BL21 (YqhD)	BL21(DE3) carrying pET-28a-YqhD	This study
BDO-1	W3110 (K-12) knocking out <i>ldhA</i> gene integrating <i>yqhD</i> gene carrying pTrc99A-SucA-Car-Sfp	This study
BDO-1 ^Y	W3110 (K-12) knocking out <i>ldhA</i> gene integrating <i>yqhD</i> gene carrying pTrc99A-SucA-Car-Sfp-YqhD	This study
BDO-2	W3110 (K-12) knocking out <i>ldhA</i> and <i>pflB</i> gene integrating <i>yqhD</i> and <i>gltA</i> ^{R163L} gene carrying pTrc99A-SucA-Car-Sfp	This study
BDO-3	W3110 (K-12) knocking out <i>ldhA</i> and <i>pflB</i> and <i>mdh</i> gene integrating <i>yqhD</i> and <i>gltA</i> ^{R163L} gene carrying pTrc99A-SucA-Car-Sfp	This study
BDO-4	W3110 (K-12) knocking out <i>ldhA</i> and <i>pflB</i> and <i>mdh</i> gene integrating <i>yqhD</i> and <i>gltA</i> ^{R163L} and <i>zwf</i> gene carrying pTrc99A-SucA-Car-Sfp	This study
BDO-5	W3110 (K-12) knocking out <i>ldhA</i> and <i>pflB</i> gene integrating <i>yqhD</i> and <i>gltA</i> ^{R163L} and <i>zwf</i> gene carrying pTrc99A-SucA-Car-Sfp	This study
BDO-6	W3110 (K-12) knocking out <i>ldhA</i> and <i>pflB</i> gene integrating <i>yqhD</i> and <i>gltA</i> ^{R163L} and <i>zwf</i> gene carrying pTrc99A-J23101-SucA, pETduet-pACYC-J23101-Sfp-Car	This study
BDO-7	W3110 (K-12) knocking out <i>ldhA</i> and <i>pflB</i> gene integrating <i>yqhD</i> and <i>gltA</i> ^{R163L} and <i>zwf</i> gene carrying pTrc99A-J23101-SucA, pETduet-pACYC-J23101-Sfp-Car-YqhD	This study
pET-28a-SucA	pET-28a harboring the optimized gene <i>sucA</i> , Kan ^R	This study
pET-28a-Car-Sfp	pET-28a harboring the optimized gene <i>car</i> , Kan ^R	This study
pET-28a-YqhD	pET-28a harboring the optimized gene <i>yqhD</i> , Kan ^R	This study
pTrc99A-SucA-Car-Sfp	pTrc99A harboring the optimized gene <i>sucA</i> and <i>car</i> and <i>sfp</i> , Amp ^R	This study
pTrc99A-SucA-Car-Sfp-YqhD	pTrc99A harboring the optimized gene <i>sucA</i> , <i>car</i> , <i>sfp</i> , and <i>yqhD</i> , Amp ^R	This study
pTrc99A-J23101-SucA	pTrc99A harboring the optimized gene <i>sucA</i> replacing Trc promoter with J23101, Amp ^R	This study
pETduet-pACYC-J23101-Sfp-Car	pETduet-pACYC harboring the optimized gene <i>car</i> and <i>sfp</i> replacing T7 promoter with J23101, Chl ^R	This study
pETduet-pACYC-J23101-Sfp-Car-YqhD	pETduet-pACYC harboring the optimized gene <i>car</i> and <i>sfp</i> and <i>yqhD</i> replacing T7 promoter with J23101, Chl ^R	This study
pCas	pCas-cas9, Spe ^R	Lab store
pGRB	sgRNA, Amp ^R	Lab store
pGRB-ldhA	sgRNA-ldhA, Amp ^R	This study
pGRB-pflB	sgRNA-pflB, Amp ^R	This study
pGRB-mdh	sgRNA-mdh, Amp ^R	This study
pGRB-yqch	sgRNA-yqch, Amp ^R	This study

1.1.4 培养基

LB 培养基(g/L): NaCl 10.00, 蛋白胨 10.00, 酵母粉 5.00, 固体培养基则在其基础上添加 1.6%–1.8%的琼脂粉。

摇瓶发酵培养基(g/L): 葡萄糖 20.00, Na₂HPO₄ 6.78, NaCl 0.50, KH₂PO₄ 3.00, NH₄Cl 1.00, MgSO₄·7H₂O 0.25, CaCl₂·2H₂O 0.02, 蛋白胨 3.00, 酵母粉 5.00, FeSO₄·7H₂O

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primer name	Sequences (5'→3')
YqhD-F	TGGGTCGCGGATCCGAATTCATGAACAACCTTAATCTGCACACCC
YqhD-R	TCGAGTGC GGCCGCAAGCTTTTAGCGGGCGGCTTCG
SucA-F	CGAGCTCCGTCGACAAGCTTATGGCCAATATCAGCAGCC
SucA-R	TGGTGCTCGAGTGC GGCCGCTTAACCAAAGGCTTCATCCAGAATT
Car-Sfp-F	CGAGCTCCGTCGACAAGCTTATGAGCCCGATCACCCG
Car-Sfp-R	TGGTGCTCGAGTGC GGCCGCTTATAAAAGCTCTTCGTACGAGACCAT
pET-28a-F	GCGGCCGCACTCGAGCACCA
pET-28a-R	AAGCTTGTGACGGAGCTC
p-SucA-F	TATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGACCATGGCCAATATCAGCA GCC
p-SucA-R	TTAACCAAAGGCTTCATCCAGAATTC
p-Car-Sfp-F	CAGACCATGGAATTCGAGCTATGAGCCCGATCACCCG
p-Car-Sfp-R	TCACAATCCACACATTATACGAGCCGGATGATTAATTGTCAATTATAAAAGCTCTTCGTACGAGACC AT
p-YqhD-F	AAGCCTTTGGTTAAAAGGAGATGAACAACCTTAATCTGCACACCC
p-YqhD-R	GATCCCCGGGTACCGAGCTCTTAGCGGGCGGCTTCGTATA
pTrec99A-F	AAGCTTGGCTGTTTTGGCG
pTrec99A-R	AGCTCGAATTCATGGTCTGT
J-SucA-F	TGAAAGAGGAGAAATACTAGATGGCCAATATCAGCAGCC
J-SucA-R	TCTCATCCGCCAAAACAGCCTTAACCAAAGGCTTCATCCAGAATTC
JS-F	GGCTGTTTTGGCGGATGAGA
JS-R	CTAGTATTTCTCCTCTTTCCTACTAGGCTAG
JP-F	CCCTCGAGTCTGGTAAAGAAACC
JP-R	CTAGTATTTCTCCTCTTTCCTACTAGGCTAG
pTrec99A-J23101-F	CTAGCTCAGTCCTAGGTATTATGCTAGCCTAGTGAAAGAGGAGAAATACTAG
pTrec99A-J23101-R	AATACCTAGGACTGAGCTAGCTGTAACAGCTCATTTCAGAATATTTGCCA
pACYC-J23101-F	AGCTCAGTCCTAGGTATTATGCTAGCCTAGTGAAAGAGGAGAAATACTAG
pACYC-J23101-R	TACCTAGGACTGAGCTAGCTGTAAGATCCCGGACACCATCG
J23101-Sfp-Car-F	TGAAAGAGGAGAAATACTATGATGAGCCCGATCACCCG
J23101-Sfp-Car-R	TTCTTTACCAGACTCGAGGGTTATAAAAGCTTCTTCGTACGAGACCATTG
J23101-Sfp-Car-Y-F	TGAAAGAGGAGAAATACTATGATGAGCCCGATCACCCG
J23101-Sfp-Car-Y-R	TTCTTTACCAGACTCGAGGGTTAGCGGGCGGCTTCGTA
gltA-R163L-F	TTCCTGCTGCTGTCGAAAATGCC
gltA-R163L-R	ATTTTCGACAGCAGCAGGAACG
gltA-F	ATGGCTGATACAAAAGCAAACTCAC
gltA-R	TTAACGCTTGATATCGCTTTTAAAGTCG
ldhA-up-F	GTCATCAGCAGCGTCAACGG
ldhA-up-R	ATCCGCTCACAAATCCACACATTATACGAGCCGGATGATTAATTGTCAATGCTTTTTTCAGCTCTCCA GC
ldhA-down-F	GCGATCTATTCTTTGAAGATAAATCCAACG
ldhA-down-R	CGGAAATCATCATTTTTTCAACCAAAGCT
YqhD-up-F	GTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGACCATGAACAACCTTAATCTGCAC ACCC
YqhD-down-R	ATCTTCAAAGAATAGATCGCTTAGCGGGCGGCTTCGTATATA
ldhA-sgRNA-F	AGTCCTAGGTATAATACTAGTGCCGTTGCTGAACACGCCATGTTTTAGAGCTAGAA
ldhA-sgRNA-R	TTCTAGCTCTAAAAACATGGCGTGTTCAGCAACGGCACTAGTATTATACCTAGGACT
pflB-sgRNA-F	AGTCCTAGGTATAATACTAGTGCGTGTACCTCCACCTCCGTTTTAGAGCTAGAA
pflB-sgRNA-R	TTCTAGCTCTAAAAACGGAAGGTGGAGGTACGACCGACTAGTATTATACCTAGGACT
mdh-sgRNA-F	TTCTAGCTCTAAAAACGCGCTTCTGTTCAAATGCGACTAGTATTATACCTAGGACT
mdh-sgRNA-R	AGTCCTAGGTATAATACTAGTTCGATTTGAACAGAACGCGGTTTTAGAGCTAGAA
yqch-sgRNA-F	AGTCCTAGGTATAATACTAGTATCGTACGCTCGCAGTTAGTTTTAGAGCTAGAA
yqch-sgRNA-R	TTCTAGCTCTAAAACTAACTGCGAGACGTAGCGATACTAGTATTATACCTAGGACT

3 mg/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1 mg/L, 维生素 B1 75 mg/L; 再加入 0.1% 苯酚红溶液(显色剂, 变色范围为 6.8–8.4, 由黄到红), 用于 pH 调控。接种前培养基按需添加相应抗生素, 其中氨苄青霉素(ampicillin, Amp)质量浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 硫酸卡那霉素(kanamycin sulfate, Kan)质量浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 氯霉素(chloramphenicol, Chl)质量浓度为 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

5 L 发酵罐发酵培养基(g/L): 葡萄糖 20.00, Na_2HPO_4 6.78, NaCl 0.50, KH_2PO_4 3.00, NH_4Cl 1.00, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.02, 蛋白胨 3.00, 酵母粉 5.00, 玉米浆 10.00 mL/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3 mg/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1 mg/L, 维生素 B1 75 mg/L。

发酵罐补料培养基(g/L): 葡萄糖母液浓度 800.00。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒的构建

为了在大肠杆菌中构建 1,4-丁二醇生物合成途径, 本研究过表达了大肠杆菌(*E. coli*) K-12 MG1655 来源的乙醇脱氢酶(*yqhD*)基因。同时引入海洋分枝杆菌(*Mycobacterium marinum*)来源的羧酸还原酶(*car*)基因^[17]、谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)来源磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶(phosphopantetheinyl transferase, *sfp*)基因、牛分枝杆菌(*Mycobacterium bovis*)来源的 α -酮酸脱羧酶(*sucA*)基因^[9,11]。其中 *sfp* 基因能够表达为磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶, 负责通过将磷酸泛酰巯基乙胺基转移到酶蛋白的保守残基上, 从而激发羧酸还原酶的活性^[18-19]。以本实验室保存的 pET-28a、pETduet-pACYC、pTrc99A 质粒以及大肠杆菌的基因组为模板, 利用表 2 中的引物, 分别扩增获得基因片段以及上下游的同源臂序列。再采用同源重组的方法, 构建了 pET-28a-SucA、pET-28a-Car-Sfp、pET-28a-

YqhD、pTrc99A-SucA-Car-Sfp、pTrc99A-SucA-Car-Sfp-YqhD、pTrc99A-J23101-SucA、pETduet-pACYC-J23101-Sfp-Car 和 pETduet-pACYC-J23101-Sfp-Car-YqhD 表达质粒。

E. coli BL21 重组质粒的构建: 以构建 pET-28a-YqhD 重组质粒为例, 以大肠杆菌 *E. coli* K-12 MG1655 基因组为模板, 用引物 YqhD-F、YqhD-R 扩增乙醇脱氢酶(*yqhD*)基因。以实验室保存的 pET-28a 质粒为模板, 用引物 pET-28a-F、pET-28a-R 线性化质粒模板。再用同源重组酶将 *yqhD* 片段和 pET-28a 质粒同源重组, 将重组产物转入 *E. coli* BL21 感受态细胞中, 得到 pET-28a-YqhD 重组质粒。用同样的方法构建 pET-28a-SucA、pET-28a-Car-Sfp 重组质粒。其中 *sucA*、*car* 基因片段由苏州金唯智生物科技有限公司合成, *sfp* 和 *car* 基因之间添加核糖体结合位点(ribosome binding site, RBS)串联。

E. coli W3110 重组质粒的构建: 以 pET-28a-SucA、pET-28a-Car-Sfp 为模板, 用引物 p-SucA-F、p-SucA-R 扩增 α -酮酸脱羧酶基因(*sucA*); 引物 p-Car-Sfp-F、p-Car-Sfp-R 扩增羧酸还原酶基因(*car*)、磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶基因(*sfp*)。以 pTrc99A 质粒为模板, 用引物 pTrc99A-F、pTrc99A-R 线性化质粒模板。再用同源重组酶将 *sucA*、*car+sfp* 片段和 pTrc99A 线性化质粒同源重组, 将重组产物转入 *E. coli* BL21 感受态细胞中, 筛选获得 pTrc99A-SucA-Car-Sfp 重组质粒。用同样的方法构建 pTrc99A-SucA-Car-Sfp-YqhD 重组质粒, 用引物 p-YqhD-F、p-YqhD-R 扩增乙醇脱氢酶基因(*yqhD*), 与线性化重组质粒 pTrc99A-SucA-Car-Sfp 片段相连即可。两个质粒中 *car+sfp* 和 *sucA* 基因之间添加 Trc 启动子串联。

1.2.2 启动子替换与基因定点突变

重组质粒 pTrc99A-J23101-SucA 的构建:

先以 pTrc99A 质粒为模板,用引物 pTrc99A-J23101-F、pTrc99A-J23101-R (引物上含有 J23101 启动子序列)扩增整个 pTrc99A 质粒除 Trc 启动子的骨架,再加入 1 μ L *Dpn* I 限制性核酸内切酶于 PCR 产物中,37 $^{\circ}$ C 金属浴 1 h 以去除模板,将消化后的产物电击转入 *E. coli* BL21 感受态细胞中,挑取阳性克隆提取质粒并送至苏州金唯智生物科技有限公司测序验证。得到替换 Trc 启动子为 J23101 的质粒 pTrc99A-J23101。以 pET-28a-SucA 质粒为模板用引物 J-SucA-F、J-SucA-R 扩增 α -酮酸脱羧酶基因(*sucA*)。以 pTrc99A-J23101 质粒为模板,用引物 JS-F、JS-R 线性化质粒模板。再用同源重组酶将 *sucA* 片段和 pTrc99A-J23101 线性化质粒同源重组,将重组产物转入 *E. coli* BL21 感受态细胞中筛选获得 pTrc99A-J23101-SucA 重组质粒。用同样的方法替换 pETduet-pACYC 质粒中 T7 启动子,并构建 pETduet-pACYC-J23101-Sfp-Car、pETduet-pACYC-J23101-Sfp-Car-YqhD 重组质粒。其中 *car*+*sfp*、*yqhD* 基因之间添加 J23101 启动子串联。

gltA 基因 R163L 定点突变:首先以大肠杆菌 *E. coli* K-12 MG1655 基因组为模板,用引物 *gltA*-F、*gltA*-R 扩增乙醇脱氢酶(*gltA*)基因。以实验室保存的 pET-28a 质粒为模板,用引物 pET-28a-F、pET-28a-R 线性化质粒模板。再用同源重组酶将 *gltA* 片段和 pET-28a 质粒同源重组,将重组产物转入 *E. coli* BL21 感受态细胞中,得到 pET-28a-*gltA* 重组质粒。再以该质粒为模板,用引物 *gltA*-R163L-F、*gltA*-R163L-R (引物上含有 R163L 改变密码子的序列并设同源臂)扩增整个 pET-28a-*gltA* 质粒,再加入 1 μ L *Dpn* I 于 PCR 产物中,37 $^{\circ}$ C 金属浴 1 h 以去除模板,将消化后的产物电击转入 *E. coli* BL21 感受态细胞中,挑取阳性克隆提取质粒并送至

苏州金唯智生物科技有限公司测序验证得到正确 R163L 点突变的 pET-28a-*gltA*^{R163L} 重组质粒。

1.2.3 底盘细胞的基因敲除与整合

基因组敲除与整合基因采用 CRISPR-Cas9 系统,具体方法参照 Zhao 等^[20]的研究。以 *ldhA* 基因敲除与 *yqhD* 整合为例:用引物 *ldhA*-sgRNA-F、*ldhA*-sgRNA-R 全质粒 PCR 扩增 pGRB 质粒,引入 20 bp 的 sgRNA 序列,获得基因敲除质粒 pGRB-*ldhA*。用引物 *ldhA*-up-F、*ldhA*-up-R 扩增上游同源臂;用引物 *ldhA*-down-F、*ldhA*-down-R 扩增下游同源臂,同时用 *YqhD*-up-F、*YqhD*-down-R 引物扩增 *yqhD* 基因片段,利用融合 PCR 技术获得上下游同源臂片段与 *yqhD* 基因片段的融合片段。将 pCas 质粒、pGRB-*ldhA* 质粒、融合片段电击转入 W3110 (K-12)菌株中实现基因敲除,并用引物 *ldhA*-up-F、*ldhA*-down-R 进行菌落 PCR 验证,若敲除成功,则条带大小应为融合片段大小,将条带大小正确的扩增片段送苏州金唯智生物科技有限公司测序。测序结果与融合片段序列一致,证明 *ldhA* 基因敲除及 *yqhD* 整合成功。用同样的方法完成对 *pflB* 基因敲除与 *gltA*^{R163L} 基因整合、苹果酸脱氢酶(*malate dehydrogenase, mdh*)基因敲除(融合片段只为上下游同源臂)、假基因 *yqch* 敲除与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(*glucose-6-phosphate dehydrogenase, zwf*)基因整合。

1.2.4 重组菌株的构建与表达

将质粒 pET-28a-SucA、pET-28a-Car-Sfp、pET-28a-YqhD 分别电击转入 BL21(DE3)菌株中,获得重组菌株 BL21 (SucA)、BL21 (Car)、BL21 (YqhD)。将质粒 pTrc99A-SucA-Car-Sfp、pTrc99A-SucA-Car-Sfp-YqhD 分别电击转入至底盘细胞 W3110 Δ *ldhA* 中,获得产 1,4-丁二醇的重组菌株 BDO-1、BDO-1^Y。将质粒 pTrc99A-J23101-SucA、pETduet-pACYC-J23101-Sfp-Car

电击转入至 BDO-5 的底盘细胞中, 获得重组菌株 BDO-6。将质粒 pTrc99A-J23101-SucA、pETduet-pACYC-J23101-Sfp-Car-YqhD 电击转入至 BDO-5 底盘细胞中, 获得重组菌株 BDO-7。

重组菌接种至 10 mL 对应质粒抗性的 LB 液体培养基中培养 12 h。然后以 1% (体积分数) 接种至 50 mL 含对应质粒抗性的 LB 液体培养基中, 在 37 °C、180 r/min 条件下培养 4 h。之后加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 进行诱导, 诱导条件为 16 °C、160 r/min, 诱导时间为 16 h。离心收集细胞, 并用 PBS 缓冲液(pH 7.4, 浓度为 0.05 mol/L)洗涤 2 次后悬浮。然后使用超声破碎仪对细胞进行破碎, 温度控制在 4 °C。将破碎液在 4 °C、12 000 r/min 条件下离心 30 min 分离细胞破碎杂质取上清及沉淀, 分别进行 SDS-PAGE 验证。

1.2.5 重组菌株发酵

摇瓶发酵: 取-40 °C冻存菌液按 1%的体积比接种于 LB 培养基摇瓶中, 置于 37 °C、220 r/min 振荡培养 12 h, 用于种子液培养。移取 1 mL 种子液至含有 30 mL/500 mL 发酵培养基的摇瓶中并添加对应质粒的抗生素, 37 °C、220 r/min 发酵 48 h。 OD_{600} 测量值在 0.6-0.8 时, 加入 0.5 mmol/L IPTG 诱导。每隔 12 h 取样, 测定 OD_{600} 和 1,4-丁二醇积累量。

5 L 发酵罐发酵: 发酵罐的装液量为 2 L, 按 10%总体积的接种量将种子液接种至发酵罐, 菌体 OD_{600} 为 10 时, 加入 0.5 mmol/L IPTG 诱导。将发酵初始条件控制为: pH 为 7.0, 转速为 500 r/min, 通气量为 2.0 vvm, 温度控制在 37 °C。当发酵液溶氧值突然上升时开始补加葡萄糖, 全程控制 pH 为 7.0, 并发酵 48 h。当初始葡萄糖消耗完毕且溶解氧急剧增加时, 开始持续流加补料培养基, 并控制补料培养基流速与转速维持菌体溶氧(dissolved oxygen, DO)

在 30%左右至发酵结束。

1.2.6 相关参数测定

发酵过程菌体浓度 OD_{600} 通过 UV-VIS 分光光度计(上海元析仪器有限公司)测定; 葡萄糖通过生物传感分析仪 SBA-40E (深圳市西尔曼科技有限公司)测定; 1,4-丁二醇含量通过高效气相色谱测定^[21]: 样品经过离心过滤后用甲醇稀释, 经过气相色谱进行检测, 使用 HP-Innowax (60 m×0.25 mm×0.5 μ m)色谱柱。检测条件设置为: 初始柱温 70 °C, 保持 1 min, 以 20 °C/min 的速度升温至 220 °C, 保持 5 min。进样口温度: 230 °C。载气: 氦气(纯度 \geq 99.999%), 流速 1 mL/min。进样方式: 脉冲不分流进样; 进样脉冲压力: 30 psi; 时间: 0.5 min; 进样量: 1 μ L。

2 结果与分析

2.1 1,4-丁二醇下游合成路径的构建与优化

2.1.1 1,4-丁二醇下游酶催化合成路径的设计与构建

结合大肠杆菌合成 1,4-丁二醇途径和酶促反应, 设计了一条涉及 3 个酶催化 α -酮戊二酸合成 1,4-丁二醇的新路径。按照 1.2.1 所述方法构建了 3 个表达质粒 pET-28a-SucA、pET-28a-Car-sfp、pET-28a-YqhD, 分别转化至 BL21(DE3) 菌株中, 图 2A 表明 *sucA*、*car*、*yqhD* 基因被成功克隆, 随后通过 SDS-PAGE 验证了关键酶 SucA、Car、YqhD 的表达情况, 图 2B 结果显示 3 个蛋白均已成功表达, SucA、Car、YqhD 目的蛋白大小分别为 139、128、40 kDa。

2.1.2 1,4-丁二醇下游酶催化合成路径的验证与优化

将构建好的重组菌 BL21 (SucA)、BL21 (Car)、BL21 (YqhD) 分别培养并制备其粗酶液, 用于体外催化反应。在 20 mL 反应体系中添加 1 g/L α -酮戊二酸, 并加入 SucA:Car:YqhD 的比

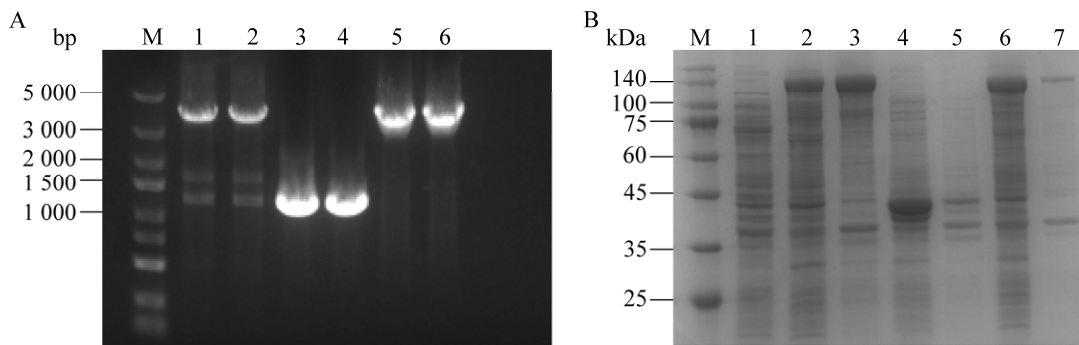


图 2 关键酶基因的克隆与表达 A: 关键酶基因的克隆. M: DL5000 DNA Marker; 1、2: α -酮酸脱羧酶基因; 3、4: 乙醇脱氢酶基因; 5、6: 羧酸还原酶基因. B: SDS-PAGE 分析关键酶蛋白在大肠杆菌中的表达. M: Protein marker; 1: *Escherichia coli* BL21/pET-28a 空载细胞破碎上清对照; 2: BL21 (SucA) 细胞破碎上清; 3: BL21 (SucA)细胞破碎沉淀; 4: BL21 (YqhD)细胞破碎上清; 5: BL21 (YqhD)细胞破碎沉淀; 6: BL21 (Car)细胞破碎上清; 7: BL21 (Car)细胞破碎沉淀

Figure 2 PCR and SDS-PAGE analysis of key enzyme genes. A: PCR of key enzyme genes. M: DL5000 DNA Marker; 1, 2: α -ketoglutarate decarboxylase gene; 3, 4: Alcohol dehydrogenase gene; 5, 6: Carboxylate reductase gene. B: SDS-PAGE analysis of the expression of key enzyme proteins in *Escherichia coli*. M: Protein marker; 1: *E. coli* BL21/pET-28a empty cell crushing supernatant control; 2: BL21 (SucA) cell disruption supernatant; 3: BL21 (SucA) cell disruption precipitation; 4: BL21 (YqhD) cell disruption supernatant; 5: BL21 (YqhD) cell disruption precipitation; 6: BL21 (Car) cell disruption supernatant; 7: BL21 (Car) cell disruption precipitation.

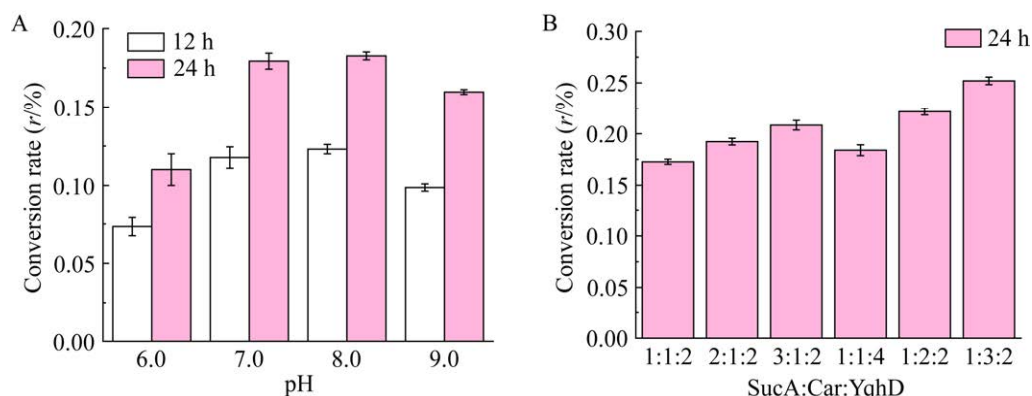


图 3 不同酶联反应条件对转化率的影响 A: 不同 pH 下酶联反应对转化率的影响. B: 酶添加比例变化对转化率的影响

Figure 3 Effect of different enzyme-linked reaction conditions on conversion rates. A: Effect of enzyme linked reaction on conversion rate at different pH. B: Effect of changes in enzyme addition ratio on conversion.

例如为 1:1:2 的酶液以及相关辅酶, 其中 *sfp* 的串联能一定程度上提升 Car 酶活, 接着分别控制 pH 至 6.0、7.0、8.0 和 9.0 进行多酶转化 24 h. 在 12 h 和 24 h 分别取适量转化液经离心过滤处

理后, 进行气相色谱检测. 如图 3A 所示, 在 12 h 和 24 h 反应体系中均检测到 1,4-丁二醇产生, 且在 pH 7.0、pH 8.0 时最佳, 这一结果表明 1,4-丁二醇酶催化合成新路径是可行的.

为了进一步提高 1,4-丁二醇下游酶催化合成效率,对各个酶的添加量比例进行了优化,以 1 g/L α -酮戊二酸为底物,控制反应体系 pH 为 7.0,添加不同酶量比的 SucA、Car、YqhD 酶液并加入相关辅酶进行多酶转化 24 h。结果如图 3B 所示,将 SucA、Car 的酶量分别提高 2 倍和 3 倍时,转化率相比于酶量比为 1:1:2 时有显著提升;相反提高 YqhD 的酶量则对转化率影响不大。因此可以证明 SucA、Car 为 1,4-丁二醇合成路径的关键限速步骤。

2.2 以葡萄糖为底物从头合成 1,4-丁二醇重组大肠杆菌的构建

在上述研究基础上,尝试将 1,4-丁二醇下游酶催化合成路径导入大肠杆菌中,以实现以葡萄糖为底物从头合成 1,4-丁二醇。首先将表达上述酶的基因全部构建到质粒 pTrc99A 上,获得了重组质粒 pTrc99A-SucA-Car-Sfp-YqhD。另外,考虑到 SucA 及 Car 基因碱基对较长(分别为 3 696 bp、3 525 bp),3 段基因同时在质粒 pTrc99A 上表达可能出现表达效率低等问题,因此又构建了重组质粒 pTrc99A-SucA-Car-Sfp。同时将乙醇脱氢酶(*yqhD*)基因整合到底盘细胞 W3110 (K-12)的乳酸脱氢酶(*ldhA*)基因上,构建了同时实现 *yqhD* 基因过表达和 *ldhA* 基因敲除的底盘细胞 W3110 Δ *ldhA*::*yqhD*,将构建好的 2 个表达质粒 pTrc99A-SucA-Car-Sfp、pTrc99A-SucA-Car-Sfp-YqhD 分别电击转入至底盘细胞 W3110 Δ *ldhA*::*yqhD* 中,构建了重组菌株 BDO-1、BDO-1^Y,并通过 SDS-PAGE 验证了 SucA、Car、YqhD 这 3 个关键酶的表达情况。图 4A 结果显示(图中红框部分),重组菌 BDO-1 的 3 个关键酶表达良好,SucA、Car、YqhD 目的蛋白大小分别为 139、128、40 kDa,而重组菌 BDO-1^Y 中 SucA 的表达不明显(图 4A 箭头指示位置),可能由于质粒上串联基因过多,质粒表达不完全。

接着对 BDO-1、BDO-1^Y 进行了摇瓶发酵实验,将经过活化的重组菌 BDO-1、BDO-1^Y 种子液分别接种至 30 mL 发酵培养基中,37 °C、220 r/min 摇瓶发酵 48 h,每 12 h 取样进行气相色谱检测。结果如图 4B 所示,与 SDS-PAGE 分析结果一致,虽然两种重组菌都能检测到 1,4-丁二醇的产生,但 BDO-1 合成 1,4-丁二醇的能力更强,48 h 积累量达到 310 mg/L。BDO-1^Y 只能产生少量 1,4-丁二醇,其原因可能是限速酶 SucA 表达不充分。上述结果表明,引入 1,4-丁二醇下游酶催化合成的路径后,工程菌株可以直接以葡萄糖为底物从头合成 1,4-丁二醇。

2.3 基于系统代谢改造强化 1,4-丁二醇从头合成效率

2.3.1 优化大肠杆菌代谢流强化 1,4-丁二醇从头合成效率

为了使大肠杆菌代谢的碳通量更多地流向 1,4-丁二醇合成路径(图 1),在重组菌株 BDO-1 基础上敲除了丙酮酸甲酸裂解酶(*pf1B*)基因,以阻断葡萄糖代谢支路,同时过表达了柠檬酸合成酶(*gltA*)基因,以加强氧化性 TCA 循环流量,此外,在 *gltA* 中引入了 R163L 突变,以减少 NADH 的抑制,改善 TCA 循环流动^[22],构建了重组菌株 BDO-2。为减少琥珀酸方向代谢流向,敲除了 BDO-2 的苹果酸脱氢酶(*mdh*)基因以阻断还原性 TCA 循环流量,构建了重组菌株 BDO-3。磷酸戊糖途径(pentose phosphate pathway, PPP)中的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(*Zwf*)是细胞产生 NADPH 的关键酶^[23-24]。由于 1,4-丁二醇合成路径的关键酶辅酶都为 NADPH,因此在 BDO-3 上整合表达 *zwf* 基因于假基因 *yqch* 上,以优化细胞内 NADPH 水平,构建了重组菌株 BDO-4。对上述重组菌进行了摇瓶发酵实验,结果如图 5 所示,BDO-2 的 1,4-丁二醇 48 h

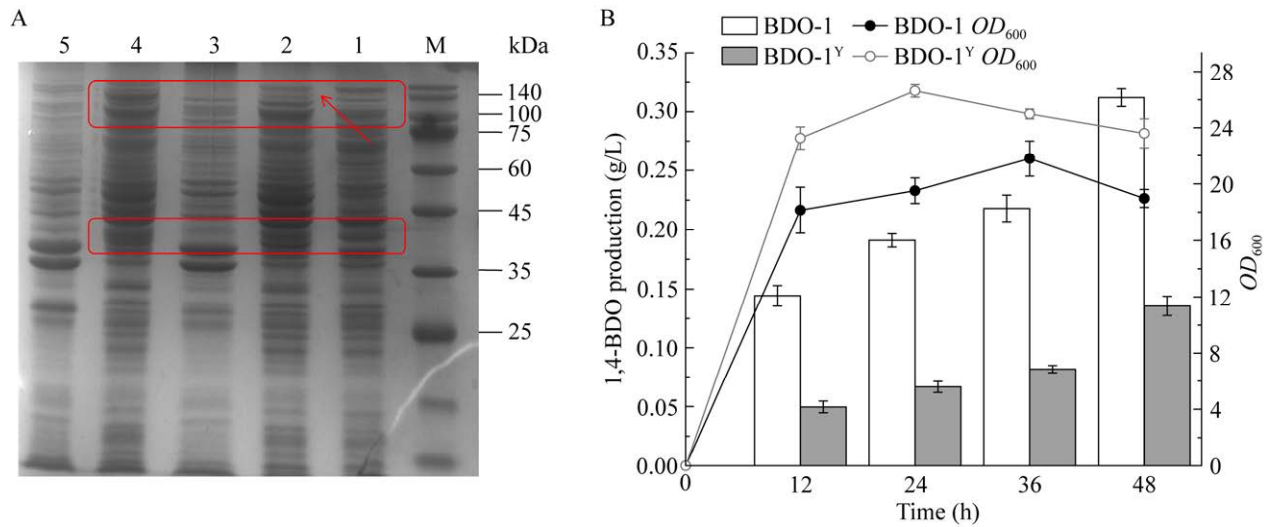


图 4 1,4-丁二醇通路关键酶蛋白表达和重组菌摇瓶发酵 A: SDS-PAGE 分析关键酶蛋白在大肠杆菌中的表达. M: Protein marker; 1: *E. coli* W3110/pTrc99A 空载细胞破碎上清对照; 2: BDO-1^Y 细胞破碎上清; 3: BDO-1^Y 细胞破碎沉淀; 4: BDO-1 细胞破碎上清; 5: BDO-1 细胞破碎沉淀. B: 重组菌摇瓶发酵结果

Figure 4 SDS-PAGE analysis of the expression of key enzyme proteins and recombinant strains cultured in shake flasks. A: SDS-PAGE analysis of the expression of key enzyme proteins. M: Protein marker; 1: *E. coli* W3110/pTrc99A empty cell crushing supernatant control; 2: BDO-1^Y cell disruption supernatant; 3: BDO-1^Y cell disruption precipitation; 4: BDO-1 cell disruption supernatant; 5: BDO-1 cell disruption precipitation. B: The result of the recombinant strains cultured in shake flasks.

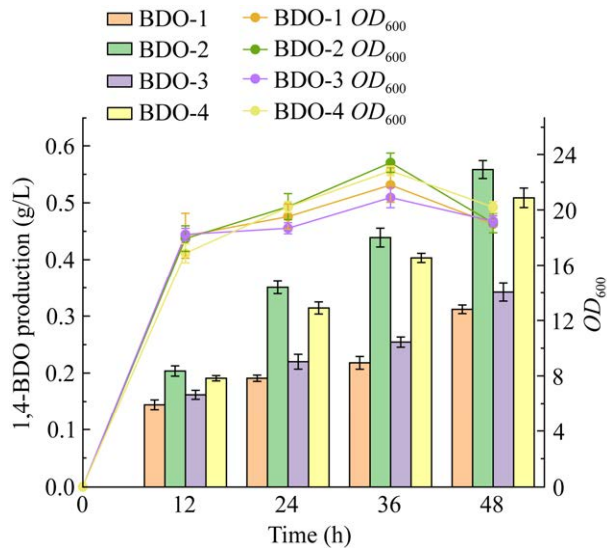


图 5 不同重组菌摇瓶发酵合成 1,4-丁二醇
Figure 5 Production of 1,4-BDO with the different recombinant strains cultured in shake flasks.

积累量最高, 为 550 mg/L, 相比于对照菌株 BDO-1 增加了 77%, 证明加强上游 TCA 循环通量对 1,4-丁二醇的积累有一定帮助。然而, 敲除 *mdh* 对 1,4-丁二醇的积累起着负效应, BDO-3 相对于 BDO-2 1,4-丁二醇 48 h 积累量降低了 38%, 这可能是由于 TCA 还原循环的阻断打乱了 α -酮戊二酸的积累与前体间的供给平衡, 从而导致 1,4-丁二醇积累量下降。最后, BDO-4 相对于 BDO-3 1,4-丁二醇 48 h 积累量有所上升, 说明 NADPH 表达水平的优化在一定程度上强化了 1,4-丁二醇的合成效率。

2.3.2 提高限速酶表达量强化 1,4-丁二醇从头合成效率

结合 BDO-2 和 BDO-4 的优势, 在 BDO-2 上整合表达了 *zwf* 基因, 构建了重组菌株

BDO-5。鉴于 1,4-丁二醇合成路径的关键限速酶为 SucA 和 Car, 因此, 通过增加 1,4-丁二醇通路关键酶的表达水平来进一步提升 1,4-丁二醇合成效率, 在 BDO-5 的基础上, 用表达水平更强的启动子 J23101^[25] 替换掉原本质粒的 Trc 启动子和 T7 启动子, 按照 1.2.4 所述方法, 构建重组菌株 BDO-6。考虑到加强 *yqhD* 表达水平也会影响 1,4-丁二醇的积累量, 将 *yqhD* 同步连接到 BDO-6 表达质粒上, 构建重组菌株 BDO-7。将上述重组菌进行摇瓶发酵实验, 结果如图 6 所示, 与对照菌株 BDO-2 相比, 重组菌株 BDO-5 1,4-丁二醇 48 h 积累量有所上升。同时, 强化了限速酶表达量的重组菌株 BDO-7 发酵 48 h 积累最高量为 770 mg/L 1,4-丁二醇, 相对于对照菌株 BDO-2 增加了 40%, 说明提高限速酶表达量能有效提高 1,4-丁二醇的合成效率, 同时, *yqhD* 表达水平的加强对 1,4-丁二醇的积累量也有一定帮助。不同重组菌合成 1,4-丁二醇与部分副产物浓度变化对比见表 3。摇瓶发酵 48 h 发现, 丙酮酸代谢支路的敲除使丙酮酸浓度得到一定的积累, 相比于 BDO-2, BDO-5 等丙酮酸浓度的下降, 其原因可能是 *zwf* 基因的过表达提升了胞内辅酶 NADPH 水平, 增强了目标产物 1,4-丁二醇的合成量。BDO-6 与 BDO-7 中 4-HBA 浓度的升高则证明了 1,4-丁二醇合成路径碳通量的增加。BDO-7 中 4-HBA 浓度低于 BDO-6, 其原因可能是 *yqhD* 的串联增加了细胞中 4-HBA 的转化率。这些副产物的浓度变化证明了细胞中 1,4-丁二醇代谢流量的增加。

表 3 不同重组菌生产 1,4-BDO 及部分副产物比较

Table 3 Comparison of 1,4-BDO production and some byproducts in different recombinant strains

Production	BDO-1	BDO-2	BDO-5	BDO-6	BDO-7
1,4-BDO (g/L)	0.31±0.02	0.55±0.02	0.57±0.01	0.74±0.02	0.77±0.02
4-HBA (g/L)	0.15±0.02	0.21±0.01	0.22±0.01	0.31±0.02	0.28±0.02
Pyruvate (g/L)	1.45±0.05	1.73±0.04	1.68±0.05	1.65±0.05	1.65±0.04

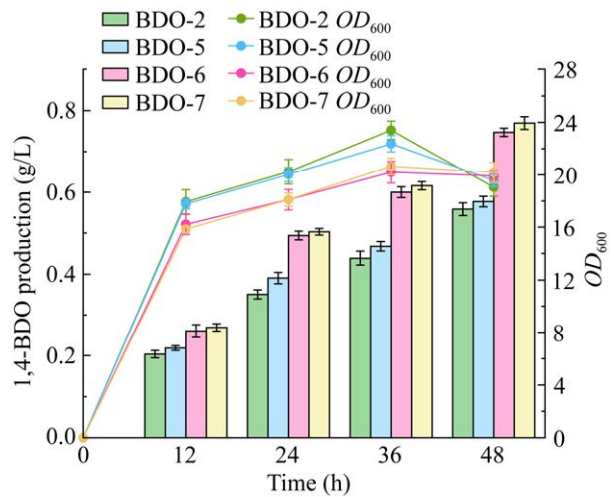


图 6 提高限速酶表达量对 1,4-丁二醇积累量的影响

Figure 6 Effect of increasing the expression of rate-limiting enzymes on the production of 1,4-BDO.

2.4 5 L 发酵罐分批补料发酵生产 1,4-丁二醇

为了进一步探究最优工程菌株 BDO-7 发酵合成 1,4-丁二醇的能力, 在 5 L 发酵罐水平进行了补料分批发酵。发酵罐的初始装液量为 2 L, 按 10% 总体积的接种量将种子液接种至发酵罐, 菌体 OD_{600} 为 10 时, 加入 0.5 mmol/L IPTG 诱导。将发酵初始条件控制为: pH 为 7.0, 转速为 500 r/min, 通气量为 2.0 vvm, 温度控制在 37 °C, 初始葡萄糖为 20 g/L, 全程控制 pH 为 7.0。当初始葡萄糖消耗将尽且溶解氧急剧增加时开始补料, 控制补料流速与转速, 使发酵罐中的 DO 维持在 30% 左右, 并使发酵液葡萄糖的含量控制在 5 g/L 以下直至发酵结束。发酵 48 h 时, 菌株 BDO-7 的 OD_{600} 为 65, 发酵上清

液中 1,4-丁二醇的产量为 3.83 g/L (图 7)。发酵 60 h 时, 1,4-丁二醇的产量最高达到 4.22 g/L, 前体物质 4-羟基丁醛积累量为 1.15 g/L, 此时, 1,4-丁二醇的得率只有 12.46 mg/g 葡萄糖, 而该途径的理论得率为 0.50 g/g 葡萄糖。其主要原因是 1,4-丁二醇合成路径中的外源酶 Car 催化效率较低, 导致其前体物质 α -酮戊二酸代谢流向被分流到其他路径, 没有被高效地转化为 1,4-丁二醇。后续研究中, 将重点挖掘更加高效的 Car 或对现有的 Car 进行分子改造, 或通过额外的代谢改造增强目标路径的 α -酮戊二酸通量, 以进一步提升 1,4-丁二醇合成效率。此外, YqhD 作为催化两个底物的关键酶, 其酶活力和稳定性对该路径合成效率也起到关键作用, 在重组菌株 BDO-7 中增加表达量后, 发现了 1,4-丁二醇积累量的上升, 后续计划针对 YqhD 酶活力和稳定性进行深入研究来进一步提高 1,4-丁二醇合成效率。1,4-丁二醇的合成是一个还原过程, 如果细胞内还原力不足或者氧气过量, 可能会导致 1,4-丁二醇产量的下降, 后续会继续进行相应改造来增强 1,4-丁二醇合成路径中的还原力供应效率, 并通过发酵优化寻找最

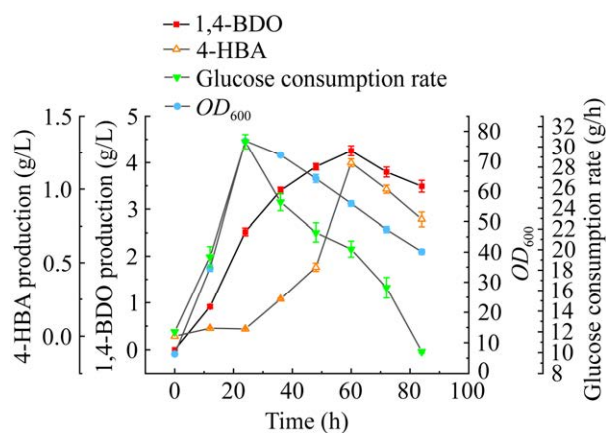


图 7 在 5 L 罐上分批补料发酵生产 1,4-丁二醇
Figure 7 1,4-BDO production by fed-batch fermentation in 5 L fermenter.

佳发酵条件等方法来不断提高 1,4-丁二醇合成效率。

3 讨论与结论

1,4-丁二醇作为一种重要的有机合成中间体, 可用于生产医药、农药、化妆品和合成革等领域的高附加值产品^[26]。1,4-丁二醇目前主要通过化石原料(煤炭、石油或天然气) 3 种工艺生产, 这些工艺能源消耗巨大, 并导致大量温室气体排放^[27]。因此生物法合成 1,4-丁二醇成为了近年来的研究热点, 对于构建基因工程菌实现 1,4-丁二醇的从头合成具有重要的意义。

本研究结合已报道的 1,4-丁二醇生物合成途径, 将 1,4-丁二醇生物合成分为 4 个步骤, 提出了一条 1,4-丁二醇合成新路径。首先以 BL21(DE3)作为表达宿主, 过表达 1,4-丁二醇合成路径关键酶 SucA、Car、YqhD, 并通过酶转化的方法初步验证路径产生 1,4-丁二醇的可行性, 接着将关键基因通过游离和整合的方式引入底盘菌株 W3110 (K-12)中, 构建了 1,4-丁二醇的合成路径。随后, 通过敲除 *ldhA*、*pflB* 阻断旁路代谢途径、强化表达 *gltA*^{R163L} 增加 α -酮戊二酸代谢通量、强化底盘细胞中关键辅酶 NADPH 的表达量, 以及替换强启动子强化 *sucA*、*car*、*yqhD* 基因表达量等系统代谢改造措施, 改善了 1,4-丁二醇合成前体的供给效率。最终最优菌株 BDO-7 在 5 L 发酵罐中发酵 60 h 时最高积累了 4.22 g/L 的 1,4-丁二醇。

与已报道的路径相比, 本研究获得的 1,4-丁二醇产量比较低, 且在 5 L 发酵罐连续补料发酵 60 h 的实际得率为 12.46 mg/g 葡萄糖, 与理论得率 0.50 g/g 葡萄糖有较大差距。但是, 本研究构建的 1,4-丁二醇合成路径具备两个优势: 一是无需额外的乙酰辅酶 A 参与, 二是避免了副产物乙酸的积累和反应过程中外源氨的

参与。本研究中 1,4-丁二醇实际得率低于理论得率的主要原因有:(1) 新构建的 1,4-丁二醇合成路径中限速酶 Car 催化效率不高,导致该路径对其前体物质 α -酮戊二酸竞争力较低;(2) 由于细胞自身生长代谢需求,其他路径与目标路径竞争大量前体物质 α -酮戊二酸;(3) YqhD 作为催化两个底物的关键酶,其酶活力和稳定性对于 1,4-丁二醇合成效率至关重要;另外,1,4-丁二醇的合成是一个还原过程,合成体系中还原力供应效率也是一个制约因素。后续将通过蛋白质工程改造的方式提升 SucA、Car、YqhD 等关键限速酶的催化效率,进一步提高目标代谢路径的通量;通过代谢调控策略增强宿主 α -酮戊二酸合成效率,同时削弱 α -酮戊二酸下游代谢路径的流量;基于辅因子工程调控策略,强化胞内还原力再生和供应效率,并通过发酵优化寻找最佳发酵条件等策略,持续提升 1,4-丁二醇的合成效率。

REFERENCES

- [1] LI KF, YANG JM, SONG TY, ZHU ZR, ZHAO C, WU P, LI XH. Synthesis of bio-derived 1,4-butanediol by succinic acid esterification and hydrogenation over CuFeAl catalysts[J]. *Green Chemistry*, 2023, 25(2): 627-638.
- [2] NORHAFINI H, THINAGARAN L, SHANTINI K, HUONG KH, SYAFIQ IM, BHUBALAN K, AMIRUL AA. Synthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) with high 4HB composition and PHA content using 1,4-butanediol and 1,6-hexanediol for medical application[J]. *Journal of Polymer Research*, 2017, 24(11): 189.
- [3] LIU HW, LU T. Autonomous production of 1,4-butanediol via a *de novo* biosynthesis pathway in engineered *Escherichia coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 29: 135-141.
- [4] LI WJ, NARANCIC T, KENNY ST, NIEHOFF PJ, O'CONNOR K, BLANK LM, WIERCKX N. Unraveling 1,4-butanediol metabolism in *Pseudomonas putida* KT2440[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 382.
- [5] MEHRABIAN M, KARGARI A. Bio-based nonporous membranes: evolution and benchmarking review[J]. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 2023, 124: 17-39.
- [6] CHENG J, FAN WX, ZHENG LG. Changes in biomass, photosynthetic efficiency, and total lipid content of *Nannochloropsis oculata* in response to metabolic intermediates and antioxidant[J]. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2023, 13(6): 5035-5042.
- [7] LI FB, LU T, CHEN BF, HUANG ZJ, YUAN GQ. Pt nanoparticles over TiO₂-ZrO₂ mixed oxide as multifunctional catalysts for an integrated conversion of furfural to 1,4-butanediol[J]. *Applied Catalysis A: General*, 2014, 478: 252-258.
- [8] CHENG J, LI J, ZHENG LG. Achievements and perspectives in 1,4-butanediol production from engineered microorganisms[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(36): 10480-10485.
- [9] YIM H, HASELBECK R, NIU W, PUJOL-BAXLEY C, BURGARD A, BOLDT J, KHANDURINA J, TRAWICK JD, OSTERHOUT RE, STEPHEN R, ESTADILLA J, TEISAN S, SCHREYER HB, ANDRAE S, YANG TH, LEE SY, BURK MJ, van DIEN S. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for direct production of 1,4-butanediol[J]. *Nature Chemical Biology*, 2011, 7: 445-452.
- [10] BARTON NR, BURGARD AP, BURK MJ, CRATER JS, OSTERHOUT RE, PHARKYA P, STEER BA, SUN J, TRAWICK JD, van DIEN SJ, YANG TH, YIM H. An integrated biotechnology platform for developing sustainable chemical processes[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2015, 42(3): 349-360.
- [11] LEE SY, KIM HU. Systems strategies for developing industrial microbial strains[J]. *Nature Biotechnology*, 2015, 33: 1061-1072.
- [12] BURGARD A, BURK MJ, OSTERHOUT R, van DIEN S, YIM H. Development of a commercial scale process for production of 1,4-butanediol from sugar[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2016, 42: 118-125.
- [13] AMARAL PFF, FERREIRA TF, FONTES GC, COELHO MAZ. Glycerol valorization: new biotechnological routes[J]. *Food and Bioproducts Processing*, 2009, 87(3): 179-186.
- [14] MIKLÓSSY I, BODOR Z, SINKLER R, ORBÁN KC, LÁNYI S, ALBERT B. *In silico* and *in vivo* stability analysis of a heterologous biosynthetic pathway for 1,4-butanediol production in metabolically engineered *E. coli*[J]. *Journal of Biomolecular Structure &*

- Dynamics, 2017, 35(9): 1874-1889.
- [15] 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.
- [16] WANG J, JAIN R, SHEN XL, SUN XX, CHENG MY, LIAO JC, YUAN QP, YAN YJ. Rational engineering of diol dehydratase enables 1,4-butanediol biosynthesis from xylose[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 40: 148-156.
- [17] WANG J, LI CY, ZOU YS, YAN YJ. Bacterial synthesis of C3-C5 diols *via* extending amino acid catabolism[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(32): 19159-19167.
- [18] KIM HS, KIM SB, PARK SH, OH HM, PARK YI, KIM CK, KATSURAGI T, TANI Y, YOON BD. Expression of *spf* gene and hydrocarbon degradation by *Bacillus subtilis*[J]. *Biotechnology Letters*, 2000, 22(18): 1431-1436.
- [19] 孟玲宁, 刘锦燕, 赵悦, 吕婕, 林伊静, 项明洁. 磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶在真菌和细菌的研究进展[J]. *中国真菌学杂志*, 2018, 13(5): 305-308.
- MENG LN, LIU JY, ZHAO Y, LV J, LIN YJ, XIANG MJ. Phosphopantetheinyl transferases in fungi and bacteria research[J]. *Chinese Journal of Mycology*, 2018, 13(5): 305-308 (in Chinese).
- [20] ZHAO M, HUANG DX, ZHANG XJ, KOFFAS MAG, ZHOU JW, DENG Y. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for producing adipic acid through the reverse adipate-degradation pathway[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 47: 254-262.
- [21] 殷志敏, 贾志奇, 赵永祥, 杨巧珍. 气相色谱法测定 1,4-丁二醇及其酯化产物含量[J]. *化学与生物工程*, 2014, 31(6): 70-72, 78.
- YIN ZM, JIA ZQ, ZHAO YX, YANG QZ. Determination of 1,4-butanediol and its esterification products by gas chromatography[J]. *Chemistry & Bioengineering*, 2014, 31(6): 70-72, 78 (in Chinese).
- [22] STOKELL D J, DONALD L J, MAURUS R. Probing the roles of key residues in the unique regulatory NADH binding site of type II citrate synthase of *Escherichia coli*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(37): 35435-35443.
- [23] LIM SJ, JUNG YM, SHIN HD. Amplification of the NADPH-related genes *zwf* and *gnd* for the oddball biosynthesis of PHB in an *E. coli* transformant harboring a cloned *phbCAB* operon[J]. *Bioscience and Bioengineering*, 2002, 93(6): 543-549.
- [24] CHOI JC, SHIN HD, LEE YH. Modulation of 3-hydroxyvalerate molar fraction in poly (3-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate) using *Ralstonia eutropha* transformant co-amplifying *phbC* and NADPH generation-related *zwf* genes[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 32(1): 178-185.
- [25] HE L, GROOM JD, LIDSTROM ME. The entner-doudoroff pathway is an essential metabolic route for *Methylovium burlingii* 5GB1C[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(3): e02481-20.
- [26] COK B, TSIROPOULOS I, ROES AL, PATEL MK. Succinic acid production derived from carbohydrates: an energy and greenhouse gas assessment of a platform chemical toward a bio-based economy[J]. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2014, 8(1): 16-29.
- [27] THAKUR S, CHAUDHARY J, SINGH P, ALSANIE WF, GRAMMATIKOS SA, THAKUR VK. Synthesis of bio-based monomers and polymers using microbes for a sustainable bioeconomy[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 344: 126156.

(本文责编 陈宏宇)