

研究报告

## 乙酸合成途径阻断及 NADH 氧化酶表达对于谷氨酸棒杆菌生产乙偶姻的影响

陶然<sup>1,2</sup> 毛雨丰<sup>1,2</sup> 付晶<sup>1,2</sup> 黄灿<sup>1,2</sup> 王智文<sup>1,2</sup> 陈涛<sup>1,2\*</sup>

(1. 天津大学化工学院 教育部系统生物工程重点实验室 天津 300072)

(2. 天津化学化工协同创新中心 天津 300072)

**摘要:**【目的】研究乙酸合成途径阻断及 NADH 氧化酶表达对于谷氨酸棒杆菌生产乙偶姻的影响。【方法】在谷氨酸棒杆菌 CGF2 中异源表达 *alsSD* 操纵子构建乙偶姻生产菌株 CGT1, 考察敲除乙酸生成途径 *cat* 和 *pqo* 对乙偶姻的影响。然后引入短乳杆菌的 NADH 氧化酶, 在优化的溶氧条件下研究其对乙偶姻产量的影响。【结果】CGT1 在摇瓶发酵中可积累 6.27 g/L 乙偶姻, 敲除 *cat* 使乙偶姻产量显著提高 30.94%, 达到 8.21 g/L; 双敲除 *cat* 和 *pqo* 没有进一步提高产量。通过优化发酵的溶氧水平, 乙偶姻产量达到 10.06 g/L。在高溶氧水平下引入 NADH 氧化酶导致菌株的生长和糖代谢速率提高, 但乙偶姻产量略有降低。在分批补料发酵中, 重组菌株乙偶姻产量达到 40.51 g/L, 产率为 0.51 g/(L·h)。【结论】在谷氨酸棒杆菌中阻断乙酸合成途径 *cat* 能够有效提高乙偶姻产量, NADH 氧化酶在高溶氧水平下表达不利于乙偶姻的合成, 需要进一步调节表达水平以确定其效果。

**关键词:** 代谢工程, 辅因子工程, 乙偶姻, 谷氨酸棒杆菌, 乙酸生成途径, NADH 氧化酶

## Effects of inactivation of acetate synthetic pathway genes and overexpression of NADH oxidase on acetoin production in *Corynebacterium glutamicum*

TAO Ran<sup>1,2</sup> MAO Yu-Feng<sup>1,2</sup> FU Jing<sup>1,2</sup> HUANG Can<sup>1,2</sup>  
WANG Zhi-Wen<sup>1,2</sup> CHEN Tao<sup>1,2\*</sup>

(1. Key Laboratory of Systems Bioengineering, Ministry of Education, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

(2. Collaborative Innovation Center of Chemical Science and Engineering, Tianjin 300072, China)

**Abstract:** [Objective] We researched the effects of inactivation of acetate synthetic pathway and expression of NADH oxidase on acetoin production in *Corynebacterium glutamicum*. [Methods]

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 21576191, 21390201, 21621004)

\*Corresponding author: Tel: 86-22-27406770; E-mail: chentao@tju.edu.cn

Received: January 28, 2017; Accepted: March 31, 2017; Published online (www.cnki.net): March 31, 2017  
基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 21576191, 21390201, 21621004)

\*通讯作者: Tel: 86-22-27406770; E-mail: chentao@tju.edu.cn

收稿日期: 2017-01-28; 接受日期: 2017-03-31; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-03-31

Heterologous expression of *alsSD* operon in *C. glutamicum* CGF2 resulted in acetoin production strain CGT1, and disruption of acetate synthetic pathway gene *cat* and *pqo* was investigated. Subsequently, NADH oxidase from *Lactobacillus brevis* was developed for acetoin production under optimal oxygen condition. **[Results]** CGT1 accumulated 6.27 g/L acetoin in flask cultivation. Deletion of *cat* increased acetoin production by 30.94% compared with CGT1, which was 8.21 g/L. Deletion of *cat* and *pqo* had no improvement on production. Moreover, the production of acetoin enhanced 10.06 g/L by optimizing the concentration of dissolved oxygen. Under high dissolved oxygen, expression of NADH oxidase contributed to an increase in biomass and glucose consumption rate, but the titer of acetoin decreased slightly. In intermittent fed-batch fermentation, recombination strain produced 40.51 g/L acetoin with a productivity of 0.51 g/(L·h). **[Conclusion]** The inactivation of acetate synthetic pathway gene *cat* could efficiently increase the production of acetoin in *C. glutamicum*. However, expression of NADH oxidase had disadvantage of acetoin, and its expression level required more regulation to confirm the effect.

**Keywords:** Metabolic engineering, Cofactor engineering, Acetoin, *Corynebacterium glutamicum*, Acetate synthetic pathway, NADH oxidase

乙偶姻( $\text{CH}_3\text{COCHOHCH}_3$ ), 作为美国能源部 30 种优先开发的平台化合物之一<sup>[1]</sup>, 广泛应用于食品、农业、医药和化工领域<sup>[2-3]</sup>。目前, 乙偶姻的工业化生产主要依赖于化学合成法<sup>[4-5]</sup>。由于能源和环境的恶化以及化学合成的乙偶姻作为食品添加剂存在健康隐患, 越来越多的研究者致力于通过微生物发酵法制备天然乙偶姻。

自然界中能够合成乙偶姻的微生物包括芽孢杆菌属、乳酸生产菌株和肠杆菌科<sup>[6]</sup>。早期关于乙偶姻生物合成的研究多集中于上述菌株<sup>[6-8]</sup>, 但是这些生产菌株工业化应用前景并不明朗。因为上述菌株目前产量还不理想, 而且多为潜在致病菌, 无法满足安全生产要求。近年来通过代谢工程改造 GRAS 微生物生产乙偶姻取得了突破性进展<sup>[9-13]</sup>。Bae 等<sup>[14]</sup>对酿酒酵母进行代谢工程改造, 合成乙偶姻 100.1 g/L, 其产量是目前此领域的最高水平, 但该菌株生长较为缓慢, 流加发酵初始接种量的  $OD_{600}$  高达 9.5, 不利于后续的工业化生产。

谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)广泛应用于 L-谷氨酸和 L-赖氨酸的商业化生产<sup>[15]</sup>, 具有悠久的食品工业发酵历史, 底物利用范围广, 十分适合乙偶姻的工业化生产。同时, 谷氨酸棒杆菌耐受性强, 有利于抵抗乙偶姻作为有机溶剂产生的毒性<sup>[16]</sup>。此外, 该菌株也是重要的模式菌株, 遗

传改造工具丰富且方便快捷, 有利于进一步进行代谢工程改造。但是目前鲜有相关研究, 仅本课题组先前研究中在谷氨酸棒杆菌中引入枯草芽孢杆菌乙偶姻合成基因, 其摇瓶产量为 8.33 g/L, 显示了谷氨酸棒杆菌在乙偶姻生产方面的应用潜力<sup>[17]</sup>。

本研究以谷氨酸棒杆菌 CGF2 为出发菌株, 详细考察副产物乙酸相关基因的敲除对乙偶姻产量的影响, 并通过调节溶氧和辅因子水平, 进一步研究影响乙偶姻合成的因素。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 菌株、质粒和引物

本实验所用菌株和质粒列于表 1, 引物列于表 2。

### 1.2 培养基、试剂和仪器

LB 培养基和 BHI 培养基参照文献<sup>[17]</sup>配制。CGXIIY 培养基(g/L): 葡萄糖 30.0, Yeast extract 5.0,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5.0, Urea 5.0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.0,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.3,  $\text{CaCl}_2$   $1.0 \times 10^{-2}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $1.0 \times 10^{-2}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$   $1.0 \times 10^{-4}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $1.0 \times 10^{-3}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$   $2.0 \times 10^{-4}$ ,  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$   $2.0 \times 10^{-5}$ , Biotin  $4.0 \times 10^{-4}$ , pH 7.0。分批补料发酵培养基(g/L): 酵母粉 50.0, 玉米浆干粉 10.0, Urea 1.0,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5, pH 7.0。

质粒提取试剂盒、SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒及胶回收试剂盒、抗生素、PCR 引物, 生工

表 1 本研究所用菌株与质粒  
Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株和质粒 Strains and plasmids	相关特性 Relevant characteristics	来源 Sources
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	Host for plasmid construction	Lab stock
CGF2	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 $\Delta$ ldhA $\Delta$ pta $\Delta$ ack $\Delta$ butA	Unpublished work
CGT1	CGF2; pEC-XK99E-SD	This study
CGT2	CGF2 $\Delta$ cat; pEC-XK99E-SD	This study
CGT3	CGF2 $\Delta$ cat $\Delta$ pqo; pEC-XK99E-SD	This study
CGT4	CGF2 $\Delta$ cat; pEC-XK99E-NSD	This study
pDsacB	Kan <sup>R</sup> ; vector for allelic exchange in <i>C. glutamicum</i>	Lab stock
pDsacB- $\Delta$ cat	pDsacB carrying a truncated cat gene	[18]
pDsacB- $\Delta$ pqo	pDsacB carrying a truncated pqo gene	This study
pEC-XK99E-alsSD	pEC-XK99E, Ptrc::alsSD	[17]
pEC-XK99E-NSD	pEC-XK99E, Ptrc::alsSD, nox	This study

表 2 本研究所用引物  
Table 2 Primers used in this study

Primer	Primer sequence (5'→3')	Restriction site
pqo-FU	GGAGTCTAGATAACGAATGGTCCGTCACAGTTACAA	<i>Xba</i> I
pqo-FL	CAGGTCCAGGATATGCCGCACCGGCTGCAAACGCCGCCCTTCCTCATTTCGA	
pqo-BU	GCGTTTGCAGCCGGTGCGGCATATCCTGGACCTGTACTGATCGATAT	
pqo-BL	CCGGAAGCTTCTCACCATTTCCCGGGCCATAAGAAT	<i>Hind</i> III
cat-U	AAGGAATCGCAGAACCGCCA	
cat-L	GCTGCGGCTGATTTTGCTGA	
nox-U	AGACGAGCTCAAAGGAGGACAACCATGAAAGTCACAGTTGTTGGTTG	<i>Sac</i> I
nox-L	AGACGAGCTCTATCCCGGGCGCCTGCAGGTTAAGCGTAACTGATTGGGCAAC	<i>Sac</i> I

生物工程(上海)股份有限公司; IPTG, Sigma 公司; PCR 相关酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶, Thermo 公司; 其他试剂为国产或进口的分析纯产品。

PCR 仪, Bio-Rad 公司; 移液枪、电转仪, Eppendorf 公司; 5 L 发酵罐, 上海百仑生物工程有 限公司; 高效液相色谱, Agilent 公司。

### 1.3 敲除载体 pDsacB- $\Delta$ pqo 的构建

以野生型谷氨酸棒杆菌基因组为模板, 分别使用引物 pqo-FU、pqo-FL 和 pqo-BU、pqo-BL, 进行 PCR 扩增得到 pqo 上下游同源臂 pqo-F 和 pqo-B 片段。PCR 反应体系(50  $\mu$ L): 无菌水 29  $\mu$ L, 5 $\times$ Buffer 10  $\mu$ L, dNTPs (2 mmol/L) 5  $\mu$ L, 基因组模板 1  $\mu$ L, 上下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 2  $\mu$ L, *Pfu* 聚合酶(5 U/ $\mu$ L)

1  $\mu$ L。PCR 反应条件: 96  $^{\circ}$ C 5 min; 96  $^{\circ}$ C 30 s, 56  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 32 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。以纯化后的 pqo-F 和 pqo-B 片段为模板, 使用引物 pqo-FU 和 pqo-BL 进行融合 PCR 得到拼接产物 pqo-FB。PCR 反应体系(50  $\mu$ L): 无菌水 28  $\mu$ L, 5 $\times$ Buffer 10  $\mu$ L, dNTPs (2 mmol/L) 5  $\mu$ L, 上下游同源臂模板各 1  $\mu$ L, 上下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 2  $\mu$ L, *Pfu* 聚合酶(5 U/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L。PCR 反应条件同上。

将 pqo-FB 片段纯化后使用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Hind* III 酶切连接到载体 pDsacB 上, 转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态中, 在添加 25 mg/L 卡那霉素的 LB 培养基上培养, 挑取阳性转化子, LB 培养提取质粒, 酶切验证正确后进行测序, 得到 pqo 基因敲

除质粒 pDsacB- $\Delta$ pqo。

#### 1.4 目的基因的敲除

参照 Wieschalka 等<sup>[19]</sup>的方法利用负筛选标记通过两次同源重组进行目的基因的无痕敲除。以敲除 *cat* 为例, 将 pDsacB- $\Delta$ cat 质粒通过电转入谷氨酸棒杆菌感受态细胞中, 电转化条件: 100  $\Omega$ , 50  $\mu$ F, 1.8 kV, 5 ms。然后用含有卡那霉素的 BHI 固体培养基在 30  $^{\circ}$ C 恒温培养, 挑取第一次同源重组的转化子, 使用引物 *cat*-U 和 *cat*-L 进行菌落 PCR 验证, 筛选出在染色体上成功整合了 pDsacB- $\Delta$ cat 的阳性克隆。菌落 PCR 反应体系(25  $\mu$ L): 无菌水 10.5  $\mu$ L, 2 $\times$ Taq PCR Master Mix 12.5  $\mu$ L, 引物 (10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L, 挑取少量单菌落作为反应模板。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 10 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 55  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 32 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。再将其转接到 BHI 液体培养基中, 于 30  $^{\circ}$ C、220 r/min 振荡培养 12 h, 涂布于含有 10%蔗糖的 BHI 固体培养基上, 通过蔗糖致死基因 *sacB* 负筛选出第二次同源重组的转化子, 将其在分别含有 10%蔗糖和 25 mg/L 卡那霉素的 BHI 固体培养基上进行对照点板。最后挑取在蔗糖板上生长而卡那霉素板上不长的菌落, 再次使用引物 *cat*-U 和 *cat*-L 进行菌落 PCR 验证, 筛选出 *cat* 敲除菌株。pqo 的敲除按照上述方法进行。

#### 1.5 NADH 氧化酶表达载体 pEC-XK99E-NSD 的构建

以短乳杆菌基因组为模板, 使用引物 *nox*-U 和 *nox*-L 进行 PCR 扩增得到 *nox* 片段(PCR 反应体系和条件同 1.3), 纯化后使用限制性内切酶 *Sac* I 单酶切连接到载体 pEC-XK99E-SD 上, 转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态中, 在添加 25 mg/L 卡那霉素的 LB 固体培养基上培养, 挑取阳性转化子, LB 培养提取质粒, 酶切验证正确后进行测序, 得到 NADH 氧化酶表达载体 pEC-XK99E-NSD。

#### 1.6 培养方法

一级种子培养: 从平板上挑取单菌落接种至装有 5 mL BHI 培养基的试管中, 30  $^{\circ}$ C、220 r/min 培养 12 h。

二级种子培养: 将一级种子全部接入 42 mL/250 mL 锥形瓶 CGXIIY 培养基中, 添加终浓

度为 25 mg/L 的卡那霉素和 20 g/L 的葡萄糖, 30  $^{\circ}$ C、220 r/min 振荡培养至  $OD_{600}$  为 10 左右。

摇瓶发酵: 转接二级种子液 5 mL 至 42 mL/250 mL 锥形瓶 CGXIIY 培养基中, 添加终浓度为 25 mg/L 的卡那霉素和 30 g/L 的葡萄糖, 同时于发酵初始添加 1 mmol/L IPTG 诱导 *alsSD* 操纵子表达, 30  $^{\circ}$ C、150 r/min 振荡培养。进行溶氧水平优化后, 振荡培养条件为 30  $^{\circ}$ C、220 r/min。

分批补料发酵: 在 5 L 发酵罐进行, 装液量 2 L, 接种量 10%, 温度 30  $^{\circ}$ C, 通气量 2.5 L/min, 转速恒定 500 r/min, 待 pH 降至 5.5 后流加 25%氨水控制为 6.0。初始葡萄糖为 50 g/L, 当糖浓度低于 10 g/L 时补加 800 g/L 的葡萄糖恢复到初始水平。

#### 1.7 发酵产物分析方法

生物量测定: 菌体浓度采用紫外可见分光光度计波长 600 nm 处的吸光值  $OD_{600}$  表示。

葡萄糖测定: 葡萄糖浓度采用生物传感仪 SBA-40C 测定。

乙偶姻及其副产物测定: 采用高效液相色谱系统, 色谱柱型号为 Bio-Rad HPX 87H (9  $\mu$ m, 300 mm $\times$ 7.8 mm), 流动相为 5 mmol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 流速 0.4 mL/min, 柱温 65  $^{\circ}$ C, 使用紫外 VWD 和示差 RID 检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 pDsacB- $\Delta$ pqo 和 pEC-XK99E-NSD 的构建及鉴定

根据 1.3 所述方法和条件构建质粒 pDsacB- $\Delta$ pqo, PCR 扩增得到的 *pqo* 上下游同源臂 *pqo*-F 和 *pqo*-B 片段大小分别为 621 bp 和 690 bp (图 1A), 二者的融合片段 *pqo*-FB 大小为 1 311 bp (图 1B)。重组质粒经 *Xba* I 和 *Hind* III 双酶切产生大小为 1 311 bp 和 4 426 bp 的两个目的片段(图 1C), 表明 pDsacB- $\Delta$ pqo 构建成功。

根据 1.5 所述方法和条件构建质粒 pEC-XK99E-NSD, PCR 扩增得到的 *nox* 片段大小为 1 380 bp (图 2A)。重组质粒经 *Sac* I 酶切产生大小为 1 380 bp 和 9 505 bp 的两个目的片段(图 2B), 表明 pEC-XK99E-NSD 构建成功。

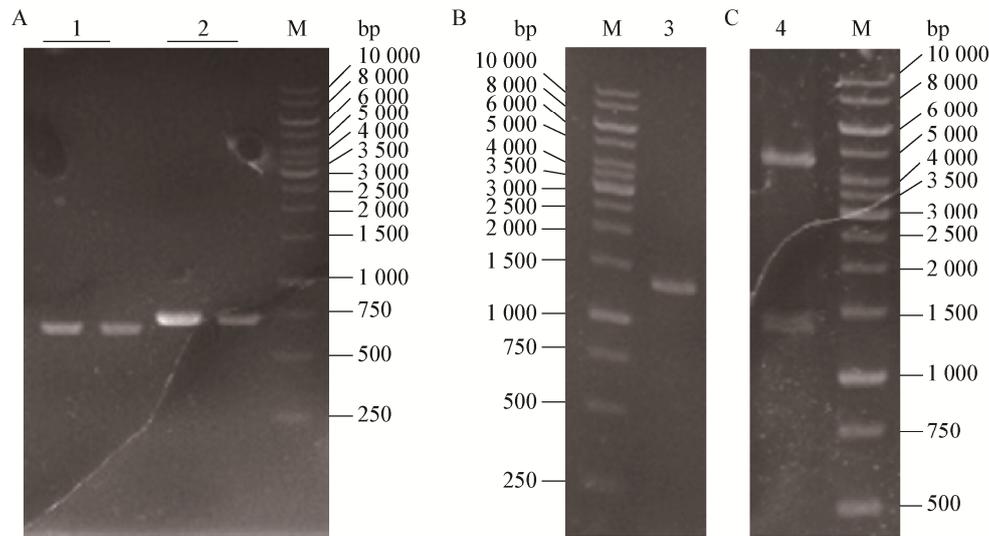


图 1 *pgo* 片段(A、B)及 *pDsacB-Δpgo* 酶切验证(C)电泳图

Figure 1 The agarose gel electrophoresis of *pgo* (A, B) and enzymatic digestion (C) of *pDsacB-Δpgo*

注: M: 1 kb DNA marker; 1: PCR 产物 *pgo*-F; 2: PCR 产物 *pgo*-B; 3: PCR 产物 *pgo*-FB; 4: *pDsacB-Δpgo* 经 *Xba* I 和 *Hind* III 酶切的产物.

Note: M: 1 kb DNA marker; 1: PCR product of *pgo*-F; 2: PCR product of *pgo*-B; 3: PCR product of *pgo*-FB; 4: Digestion products of *pDsacB-Δpgo* by *Xba* I and *Hind* III.

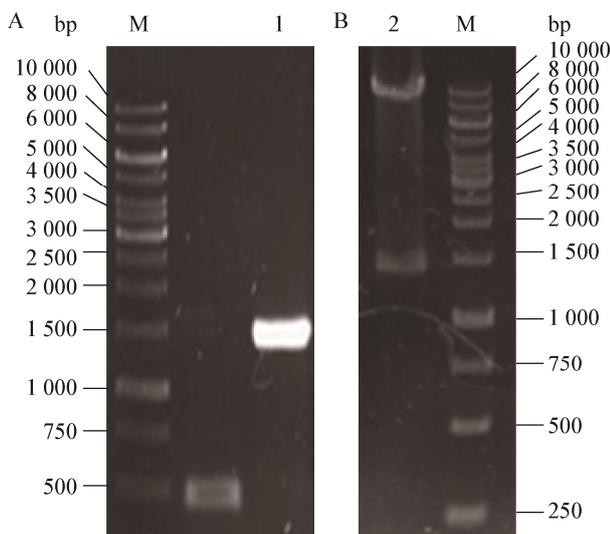


图 2 *nox* 片段(A)及 *pEC-XK99E-NSD* 酶切验证(B)电泳图

Figure 2 The agarose gel electrophoresis of *nox* (A) and enzymatic digestion (B) of *pEC-XK99E-NSD*

注: M: 1 kb DNA marker; 1: PCR 产物 *nox*; 2: *pEC-XK99E-NSD* 经 *Sac* I 酶切的产物.

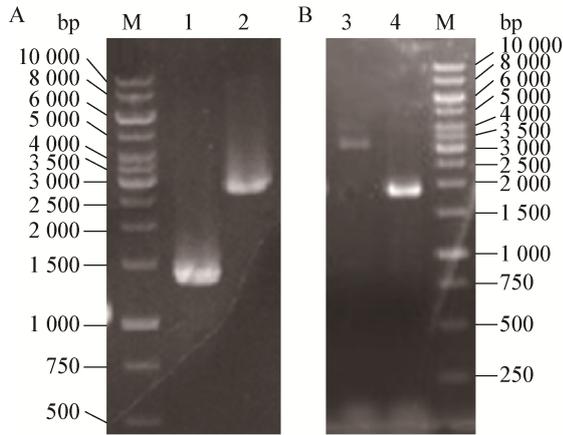
Note: M: 1 kb DNA marker; 1: PCR product of *nox*; 2: Digestion products of *pEC-XK99E-NSD* by *Sac* I.

## 2.2 敲除 *cat* 和 *pgo* 基因的鉴定

根据 1.4 所述方法和条件敲除 *cat* 和 *pgo* 基因。分别以 *pgo* 突变株和野生型谷氨酸棒杆菌基因组为模板, 使用引物 *pgo*-FU 和 *pgo*-BL 进行 PCR 验证。*pgo* 突变株和野生型的 PCR 产物分别为 1 311 bp 和 2 691 bp (图 3A), 表明 *pgo* 基因被成功敲除。分别以 *cat* 突变株和野生型谷氨酸棒杆菌基因组为模板, 使用引物 *cat*-U 和 *cat*-L 进行 PCR 验证。*cat* 突变株和野生型的 PCR 产物分别为 1 877 bp 和 3 251 bp (图 3B), 表明 *cat* 基因被成功敲除。

## 2.3 乙偶姻分解途径的阻断与生成途径的构建

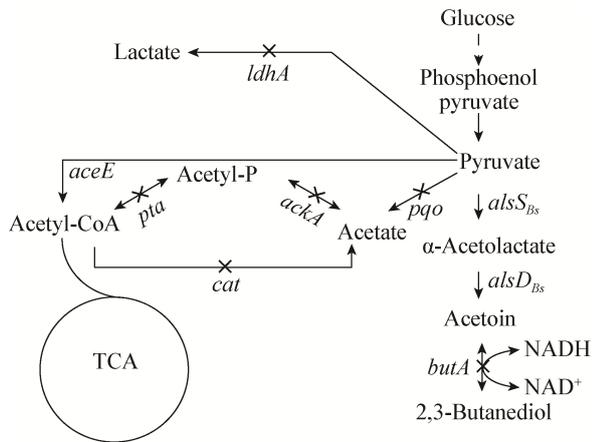
根据研究报道, 微生物可以利用糖类物质经 EMP 途径生成丙酮酸, 两分子丙酮酸在  $\alpha$ -乙酰乳酸合成酶的作用下合成乙酰乳酸和二氧化碳, 随后乙酰乳酸在  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶的作用下转化为一分子乙偶姻。生成的乙偶姻会在 2,3-丁二醇脱氢酶的催化下变为 2,3-丁二醇<sup>[1]</sup>。以上途径广泛存在于各类乙偶姻生产菌株中。将枯草芽孢杆菌乙偶姻合成关键酶编码基因 *alsS* 和 *alsD* 引入谷氨酸棒杆菌, 其中葡萄糖到乙偶姻的代谢途径如图 4 所示。



**图3 *pgo* (A)及 *cat* (B)缺失的 PCR 验证琼脂糖凝胶电泳**  
**Figure 3 The agarose gel electrophoresis of identification the mutation of *pgo* (A) and *cat* (B) by PCR**

注: M: 1 kb DNA marker; 1: *pgo* 突变株的 PCR 产物; 2: *pgo* 野生型的 PCR 产物; 3: *cat* 野生型的 PCR 产物; 4: *cat* 突变株的 PCR 产物。

Note: M: 1 kb DNA marker; 1: PCR product of *pgo* mutation; 2: PCR product of *pgo* wild type; 3: PCR product of *cat* wild type; 4: PCR product of *cat* mutation.



**图4 谷氨酸棒杆菌合成乙偶姻的代谢途径**  
**Figure 4 Metabolic pathway for acetoin synthesis in *C. glutamicum***

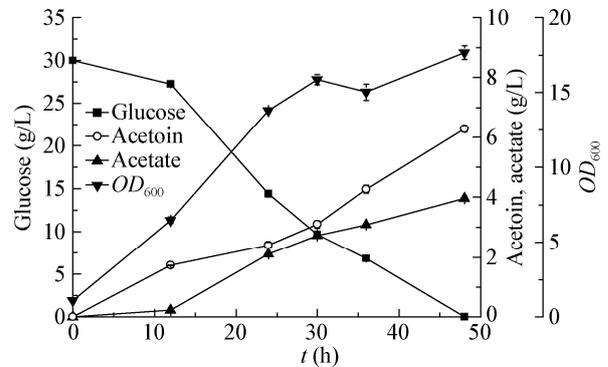
注: *alsS<sub>Bs</sub>*: 枯草芽孢杆菌 α-乙酰乳酸合成酶基因; *alsD<sub>Bs</sub>*: 枯草芽孢杆菌 α-乙酰乳酸脱羧酶基因; *butA*: 2,3-丁二醇脱氢酶基因; *ldhA*: 乳酸脱氢酶基因; *pgo*: 丙酮酸氧化还原酶基因; *pta*: 磷酸转乙酰酶基因; *ackA*: 乙酸激酶基因; *cat*: 乙酰辅酶 A 转移酶基因; *aceE*: 丙酮酸脱氢酶 E1 亚基基因。

Note: *alsS<sub>Bs</sub>*: α-Acetolactate synthase gene from *B. subtilis*; *alsD<sub>Bs</sub>*: α-Acetolactate decarboxylase gene from *B. subtilis*; *butA*: 2,3-Butanediol dehydrogenase gene; *ldhA*: Lactate dehydrogenase gene; *pgo*: Pyruvate:quinone oxidoreductase gene; *pta*: Phosphotransacetylase gene; *ackA*: Acetate kinase gene; *cat*: Acetyl-CoA transferase gene; *aceE*: Pyruvate dehydrogenase E1 component gene.

出发菌株 CGF2 为 *ldhA*、*pta-ackA* 和 *butA* 的敲除株, 阻断了乳酸、乙酸、2,3-丁二醇合成途径, 有利于乙偶姻的积累。在此基础上将质粒 pEC-XK99E-*alsSD* 导入 CGF2 构建含有乙偶姻合成途径的重组菌株 CGT1。摇瓶发酵显示, CGT1 合成乙偶姻 6.27 g/L, 同时积累了 3.96 g/L 乙酸(图 5)。实验结果表明异源的 *alsSD* 在谷氨酸棒杆菌中成功进行了表达, 在发酵过程中没有检测到乳酸以及 2,3-丁二醇, 说明 *ldhA* 和 *butA* 的敲除可有效阻断乳酸的生成以及防止乙偶姻向 2,3-丁二醇转化。虽然菌株 CGT1 中的主要乙酸生成途径被阻断, 但仍积累了大量乙酸, 因此有必要进一步阻断其他乙酸合成途径, 以提高乙偶姻产量。

**2.4 敲除乙酸生成途径相关基因对乙偶姻积累的影响**

目前谷氨酸棒杆菌中涉及乙酸合成的已知基因包括 *pta-ackA*、*cat*、*pgo* 和 *aceE* (图 4)<sup>[20]</sup>。CGT1 中的 *pta-ackA* 已经被敲除, 而失活 *aceE* 会极大阻碍乙酰辅酶 A 的合成造成菌体生长困难, 需要额外添加适量乙酸盐才能正常生长<sup>[21]</sup>, 从而增加发酵成本, 因此选择 *cat* 和 *pgo* 进行敲除。首先敲除 CGT1 中的 *cat* 构建重组菌株 CGT2, 其在摇瓶发酵中可积累乙偶姻 8.21 g/L, 比 CGT1 提高了 30.94%。同时, 乙酸显著降低了 86.86%, 而最高生物量则提高 9.91% (图 6)。实验结果表明, 敲除 *cat* 高效阻断了胞内乙酰辅酶 A 向乙酸的转化, 将更多碳通量导向生物量和乙偶姻的合成, 相应地也提高了糖耗速率和乙偶姻的产率。



**图5 CGT1 发酵曲线**  
**Figure 5 Fermentation curve of CGT1**

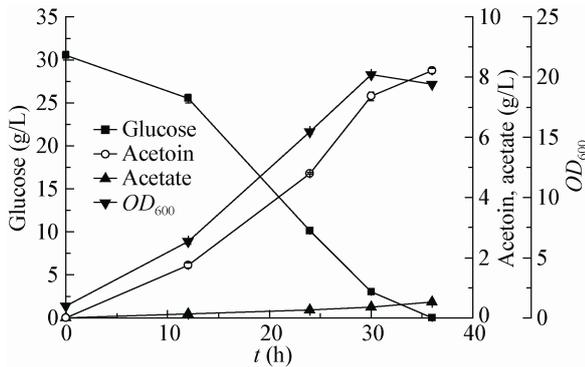


图6 CGT2 发酵曲线

Figure 6 Fermentation curve of CGT2

为了进一步减少乙酸生成,敲除 CGT2 中的 *pqo* 得到菌株 CGT3。然而 CGT3 的发酵情况和 CGT2 差异不大(数据未显示),失活 *pqo* 对乙酸和乙偶姻的生成以及菌体生长都没有产生明显影响。这可能是由以下几点原因造成的:(1) 虽然丙酮酸氧化还原酶 PQO 在体外反应中被证实能够以丙酮酸为底物生成乙酸,但相较于丙酮酸脱氢酶复合体 PDHC,其对丙酮酸的亲和力远高于前者(PDHC、PQO 的  $K_m$  分别为 0.8 mmol/L 和 30 mmol/L)<sup>[22]</sup>。(2) Schreiner 等发现 PDHC 的降低或缺失可能激活 *pqo*,但即使在敲除 PDHC E1 编码基因 *aceE* 的菌株中过表达 *pqo* (酶活提高 15 倍)也只有少量碳通量经过该途径生成乙酸<sup>[23]</sup>。因此,在 PDHC 存在的情况下 *pqo* 可能处于抑制状态。(3) 添加葡萄糖会使 PQO 的活性降低 3 倍<sup>[23]</sup>,在非葡萄糖限制的培养过程中该酶的活性可能进一步被抑制。鉴于上述结果,后续选择菌株 CGT2 进行优化。

## 2.5 溶氧水平对乙偶姻积累的影响

乙偶姻与 2,3-丁二醇的相互转化可平衡胞内  $NAD^+/NADH$  (图 4),阻断该通路会造成  $NADH$  过

剩从而影响菌体生长。 $NADH$  可通过呼吸链被消耗而实现平衡<sup>[24]</sup>,因此溶氧水平对乙偶姻积累有着重要影响。将 CGT2 在不同转速下进行摇瓶发酵,结果表明当转速从 150 r/min 提高到 180 r/min,乙偶姻得率、产率均明显增加,而继续增大至 220 r/min,得率无明显变化,产率进一步提升(表 3)。因此,后续研究采用 220 r/min 进行发酵培养。

先前的研究中 150 r/min 为生产乙偶姻的最佳转速<sup>[17]</sup>,与本文结果不一致,一方面是菌株基因型存在差异,马红武等<sup>[17]</sup>构建的菌株敲除 *aceE* 后丙酮酸不能生成乙酰辅酶 A,阻断了该途径  $NADH$  的产生, $NADH$  的过剩程度较低,因此不需要太多氧气平衡胞内还原力;另一方面可能是 *aceE* 敲除后需要添加乙酸盐造成。

## 2.6 有氧条件下表达 $NADH$ 氧化酶对乙偶姻积累的影响

应用辅因子工程策略,表达  $NADH$  氧化酶也可以消耗过剩的  $NADH$ 。将短乳杆菌的  $NADH$  氧化酶编码基因 *nox* 引入 CGT2 中得到菌株 CGT4。摇瓶发酵显示(图 7),表达  $NADH$  氧化酶能够显著提高菌株的生长速率及糖耗速率,但乙偶姻的产量反而有所降低。同时 CGT4 的生物量较 CGT2 增加了 20.93%。实验结果表明,高溶氧条件下在谷氨酸棒杆菌中表达  $NADH$  氧化酶并不能提高乙偶姻的得率。

在同类研究中,均是通过该酶的适度表达消耗胞内过量的  $NADH$ 。Zhang 等<sup>[25]</sup>在枯草芽孢杆菌中表达  $NADH$  氧化酶,发现酶活提高 20–30 倍时的乙偶姻产量只有酶活提高 5 倍时的 67%。在 CGT4 中,*nox* 的表达使用了中等拷贝数质粒作为载体且

表3 摇床转速对 CGT2 生产乙偶姻的影响

Table 3 Effect of rotation speed on acetoin production of CGT2

转速 Rotation speed (r/min)	葡萄糖消耗 Glucose consumed (g/L)	乙偶姻 Acetoin (g/L)	得率 Yield on glucose (g/g)	产率 Productivity (g/L·h)	乙酸 Acetate (g/L)
150	30.50±0.50	8.21±0.10	0.27±0.01	0.23±0.01	0.52±0.01
180	30.75±0.85	9.68±0.15	0.31±0.01	0.27±0.01	0.48±0.09
220	31.10±0.60	10.06±0.20	0.32±0.01	0.34±0.01	0.38±0.02

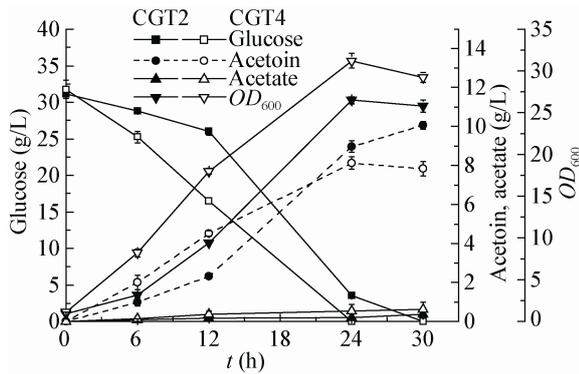


图 7 CGT2 和 CGT4 在 220 r/min 下的发酵曲线  
Figure 7 Fermentation curve of CGT2 and CGT4 at 220 r/min

携带强启动子 *trc*, 可能造成 NADH 氧化酶表达量过高。而且优化后的溶氧水平有效改善了 NADH 过剩的问题, 胞内  $\text{NAD}^+$  的再生可能不再是合成乙偶姻的限制因素, 在该条件下表达 NADH 氧化酶反而与呼吸链竞争 NADH, 造成了能量的浪费, 细胞可能需要更多的碳通量进入 TCA 循环以补充流失的 NADH, 从而致使乙偶姻产量降低, 同时碳源的快速消耗也导致了细胞生长加快、生物量增加的现象。

### 2.7 菌株 CGT2 的分批补料发酵实验

为探究谷氨酸棒杆菌在乙偶姻工业生产方面的潜力, 菌株 CGT2 在 5 L 发酵罐中进行了分批补料发酵。结果表明乙偶姻的产量达到 40.51 g/L, 得率为 0.24 g/g 葡萄糖, 产率为 0.51 g/(L·h) (图 8)。补料发酵的乙偶姻得率相比摇瓶发酵有所下降, 但其产量和产率却显著提高。得率下降的原因一方面在于分批补料发酵中氮源丰富、溶氧优于摇瓶, 快速积累了过高的生物量, 大量碳源用于菌体生长造成了浪费; 另一方面, 发酵周期较长, 后期存在质粒丢失现象, 而且随着乙偶姻浓度的增加其对细胞的抑制作用也加强。

在补料发酵中 CGT2 还积累了 2.13 g/L 琥珀酸和 3.32 g/L 乙酸, 其对葡萄糖的得率分别为 0.013 g/g 和 0.019 g/g, 与摇瓶发酵的结果较为接近(分别为 0.016 g/g 和 0.012 g/g)。但甘油的积累却显著提高到 5.83 g/L (摇瓶中小于 1 g/L)。在发酵前期(36 h)琥珀

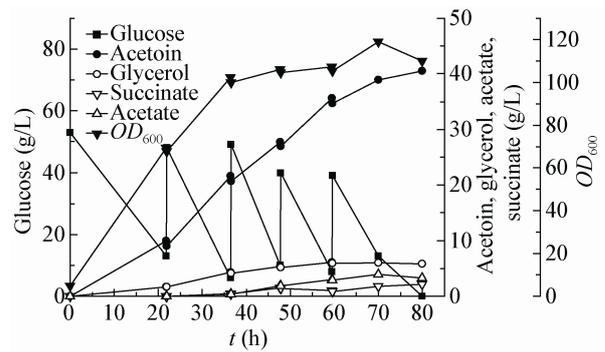


图 8 CGT2 分批补料发酵生产乙偶姻  
Figure 8 Fed-batch fermentation of CGT2 for acetoin production

酸、乙酸几乎没有生成, 然而随着生物量的不断积累, 发酵罐中溶氧水平逐渐降低, 二者的含量才出现明显的增加。当氧供给不足时, 谷氨酸棒杆菌会分泌诸如乳酸、琥珀酸、乙酸等有机酸以及甘油<sup>[26]</sup>。此外, 造成甘油增加的原因可能是发酵培养基的改变。在补料发酵培养基中使用了更为廉价、高效的有机氮源玉米浆, 其成分十分复杂<sup>[27]</sup>, 可能激活了甘油生成途径的相关酶。

### 3 讨论

本研究构建的工程菌株 CGT2 在 5 L 发酵罐中积累了较高浓度的乙偶姻, 在生产菌株中具有一定竞争力, 但是其得率和产率还有很大的提升空间。其中, 表达 NADH 氧化酶提高菌株生产乙偶姻的能力在粘质沙雷氏菌<sup>[8]</sup>、枯草芽孢杆菌<sup>[25]</sup>、酿酒酵母<sup>[14]</sup>、大肠杆菌<sup>[9]</sup>、阴沟肠杆菌<sup>[28]</sup>中已有报道。但是, 高溶氧条件下在谷氨酸棒杆菌中使用该策略并没有提高乙偶姻的得率, 还需要对该酶的表达水平进一步优化。对于分批补料发酵中积累的琥珀酸、甘油, 后期实验可以对相关途径进行代谢工程改造, 同时引入外源的乙酰辅酶 A 合成酶将发酵过程中产生的乙酸转化为乙酰辅酶 A, 进一步减少各类副产物生成以提高乙偶姻的产量和得率。此外, 培养基和发酵工艺的优化可以有效提高乙偶姻的产量和产率, 在今后的研究中需要详细研究培养基成分及转速、通气量、pH 值等发酵条件对乙偶姻生产的影响。

## 参考文献

- [1] Xiao ZJ, Xu P. Acetoin metabolism in bacteria[J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2007, 33(2): 127-140
- [2] Chen RZ, Li Y. A novel plant volatile attractant scheme to protect corn in China from the white-spotted flower chafer (Coleoptera: Scarabaeidae: Cetoniinae)[J]. *Journal of Pest Science*, 2011, 84(3): 327-335
- [3] Yu CM, Lei M, Su WK, et al. Europium Triflate-catalyzed one-pot synthesis of 2,4,5-Trisubstituted-1H-imidazoles via a Three-component Condensation[J]. *Synthetic Communications*, 2007, 37(19): 3301-3309
- [4] Hilmi A, Belgsir EM, Léger JM, et al. Electrocatalytic oxidation of aliphatic diols Part V. Electro-oxidation of butanediols on platinum based electrodes[J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1997, 435(1/2): 69-75
- [5] Studer M, Blaser HU, Studer M, et al. Hydrogenation of butane-2,3-dione with heterogeneous cinchona modified platinum catalysts: a combination of an enantioselective reaction and kinetic resolution[J]. *Chemical Communications*, 1998(9): 1053-1054
- [6] Xiao ZJ, Lu JR. Strategies for enhancing fermentative production of acetoin: a review[J]. *Biotechnology Advances*, 2014, 32(2): 492-503
- [7] Dai JY, Cheng L, He QF, et al. High acetoin production by a newly isolated marine *Bacillus subtilis* strain with low requirement of oxygen supply[J]. *Process Biochemistry*, 2015, 50(11): 1730-1734
- [8] Sun JA, Zhang LY, Rao B, et al. Enhanced acetoin production by *Serratia marcescens* H32 with expression of a water-forming NADH oxidase[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 119: 94-98
- [9] Xu QM, Xie LX, Li YY, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for efficient production of (3R)-acetoin[J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2015, 90(1): 93-100
- [10] Zhang B, Li XL, Fu J, et al. Production of acetoin through simultaneous utilization of glucose, xylose, and arabinose by engineered *Bacillus subtilis*[J]. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0159298
- [11] Luo QL, Wu J, Wu MC. Enhanced acetoin production by *Bacillus amyloliquefaciens* through improved acetoin tolerance[J]. *Process Biochemistry*, 2014, 49(8): 1223-1230
- [12] Zhang X, Bao T, Rao ZM, et al. Two-stage pH control strategy based on the pH preference of acetoin reductase regulates acetoin and 2,3-butanediol distribution in *Bacillus subtilis*[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e91187
- [13] Zhang LY, Chen S, Xie HB, et al. Efficient acetoin production by optimization of medium components and oxygen supply control using a newly isolated *Paenibacillus polymyxa* CS107[J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2012, 87(11): 1551-1557
- [14] Bae SJ, Kim S, Hahn JS. Efficient production of acetoin in *Saccharomyces cerevisiae* by disruption of 2,3-butanediol dehydrogenase and expression of NADH oxidase[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 27667
- [15] Yang J, Kim B, Kim H, et al. Industrial production of 2,3-butanediol from the engineered *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015, 176(8): 2303-2313
- [16] Luo QL, Wu J, Wu MC. Effects of acetoin on *Bacillus amyloliquefaciens* cell physiology[J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2015, 13(6): 49-54 (in Chinese)  
罗秋玲, 吴静, 邬敏辰. 乙偶姻对解淀粉芽胞杆菌细胞生理的影响[J]. *生物加工过程*, 2015, 13(6): 49-54
- [17] Ma HW, Liu HJ, Zhu NQ, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for acetoin production[J]. *Journal of Tianjin University (Science and Technology)*, 2014, 47(11): 967-972 (in Chinese)  
马红武, 刘会娟, 朱年青, 等. 代谢工程方法改造谷氨酸棒状杆菌生产乙偶姻[J]. *天津大学学报: 自然科学与工程技术版*, 2014, 47(11): 967-972
- [18] Zhu NQ. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for high-level production of succinate[D]. Tianjin: Doctoral Dissertation of Tianjin University, 2013 (in Chinese)  
朱年青. 谷氨酸棒状杆菌高产琥珀酸的代谢工程改造[D]. 天津: 天津大学博士学位论文, 2013
- [19] Wieschalka S, Blombach B, Eikmanns BJ. Engineering *Corynebacterium glutamicum* for the production of pyruvate[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 94(2): 449-459
- [20] Litsanov B, Kabus A, Brocker M, et al. Efficient aerobic succinate production from glucose in minimal medium with *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Microbial Biotechnology*, 2012, 5(1): 116-128
- [21] Schreiner ME, Fiur D, Holátko J, et al. E1 enzyme of the pyruvate dehydrogenase complex in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the gene and phylogenetic aspects[J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(17): 6005-6018
- [22] Schreiner ME, Eikmanns BJ. Pyruvate: quinone oxidoreductase from *Corynebacterium glutamicum*: purification and biochemical characterization[J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(3): 862-871
- [23] Schreiner ME, Riedel C, Holátko J, et al. Pyruvate: quinone oxidoreductase in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the *pqo* gene, significance of the enzyme, and phylogenetic aspects[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(4): 1341-1350
- [24] Radoš D, Carvalho AL, Wieschalka S, et al. Engineering *Corynebacterium glutamicum* for the production of 2,3-butanediol[J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14: 171
- [25] Zhang X, Zhang RZ, Bao T, et al. The rebalanced pathway significantly enhances acetoin production by disruption of acetoin reductase gene and moderate-expression of a new water-forming NADH oxidase in *Bacillus subtilis*[J]. *Metabolic Engineering*, 2014, 23: 34-41
- [26] Jojima T, Igari T, Moteki Y, et al. Promiscuous activity of (S, S)-butanediol dehydrogenase is responsible for glycerol production from 1,3-dihydroxyacetone in *Corynebacterium glutamicum* under oxygen-deprived conditions[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(3): 1427-1433
- [27] Yang TW, Rao ZM, Zhang X, et al. Effects of corn steep liquor on production of 2,3-butanediol and acetoin by *Bacillus subtilis*[J]. *Process Biochemistry*, 2013, 48(11): 1610-1617
- [28] Zhang LJ, Liu QY, Ge YS, et al. Biotechnological production of acetoin, a bio-based platform chemical, from a lignocellulosic resource by metabolically engineered *Enterobacter cloacae*[J]. *Green Chemistry*, 2016, 18(6): 1560-1570