

代谢工程改造热带假丝酵母生产 1,2,4-丁三醇

张琳, 夏媛媛*, 杨海泉, 陈献忠, 曹钰*

江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

张琳, 夏媛媛, 杨海泉, 陈献忠, 曹钰. 代谢工程改造热带假丝酵母生产 1,2,4-丁三醇[J]. 微生物学通报, 2022, 49(9): 3555-3566

Zhang Lin, Xia Yuanyuan, Yang Haiquan, Chen Xianzhong, Cao Yu. Metabolic engineering of *Candida tropicalis* for production of 1,2,4-butanetriol[J]. Microbiology China, 2022, 49(9): 3555-3566

摘要: 【背景】 1,2,4-丁三醇属于手性多羟基醇, 是一种重要的有机合成的化学中间体, 以木糖为原料经四步酶反应是目前研究最多的生物合成路线。然而大肠杆菌的鲁棒性较弱, 对发酵液中一些抑制剂的耐受性不是很好, 同时存在严重的碳代谢抑制。近年来, 鲁棒性较好的酵母菌成为更有吸引力的宿主, 其中热带假丝酵母具有天然的木糖代谢途径, 可以更好地利用木糖。【目的】在热带假丝酵母中构建从木糖到 1,2,4-丁三醇的代谢途径。【方法】在热带假丝酵母中敲除木糖还原酶基因 *GRE3*, 从而阻断自身的木糖代谢途径。将来源于 *Caulobacter crescentus* 的木糖脱氢酶基因(*xy1B*)和木糖酸脱水酶基因(*xy1D*)及来源于 *Lactococcus lactis* 的酮酸脱羧酶基因(*kdcA*)克隆至 *C. tropicalis* 207 中, 得到重组菌 *C. tropicalis* BT, 在此基础上考察重组菌代谢木糖合成 1,2,4-丁三醇的能力, 确定限速步骤, 并通过增加关键基因 *xy1D* 与 *kdcA* 的拷贝数提高 1,2,4-丁三醇产量。【结果】在 30 °C、200 r/min、接种量 1%、以 30 g/L 木糖为底物的情况下, 重组菌的 1,2,4-丁三醇的产量达到了 1.2 g/L, 在 5 L 发酵罐中的产量达到了 3.7 g/L。【结论】在热带假丝酵母中实现以木糖为底物的 1,2,4-丁三醇代谢途径, 并通过在基因组上增加关键基因 *xy1D* 与 *kdcA* 的拷贝数, 获得了一株高产 1,2,4-丁三醇的重组酵母菌株, 这为后续在热带假丝酵母中进一步提高 1,2,4-丁三醇产量奠定了基础。

关键词: 木糖; 1,2,4-丁三醇; 热带假丝酵母; 木糖酸脱水酶

基金项目: 国家重点研发计划(2021YFC2100102-03); 国家自然科学基金(32001064)

Supported by: Key Research and Development Program of China (2021YFC2100102-03); National Natural Science Foundation of China (32001064)

*Corresponding authors: E-mail: XIA Yuanyuan: yxyxia@jiangnan.edu.cn; CAO Yu: tsaoy5@jiangnan.edu.cn

Received: 2022-01-13; Accepted: 2022-03-28; Published online: 2022-04-26

Metabolic engineering of *Candida tropicalis* for production of 1,2,4-butanetriol

ZHANG Lin, XIA Yuanyuan*, YANG Haiquan, CHEN Xianzhong, CAO Yu*

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

Abstract: [Background] 1,2,4-butanetriol (BT), a chiral polyhydric alcohol, is an important chemical intermediate in organic synthesis. Among the biosynthesis routes, four-step enzymatic reaction with xylose as raw material is popular with scholars. However, *Escherichia coli* shows poor robustness, with low tolerance to some inhibitors in the fermentation broth and carbon catabolite repression. In recent years, the robust yeast has attracted the interest of researchers, particularly the *Candida tropicalis* which harbors the xylose transporter. [Objective] To develop the metabolic pathway from xylose to BT in *C. tropicalis*. [Methods] The xylose reductase gene *GRE3* in *C. tropicalis* was knocked out to block the innate xylose metabolic pathway. The genes encoding D-xylose dehydrogenase (*xylB*) and D-xylosonate dehydratase (*xylD*) from *Caulobacter crescentus* and the gene encoding the branched-chain α -keto acid decarboxylase (*kdcA*) from *Lactococcus lactis* were cloned into *C. tropicalis* 207, to yield the recombinant *C. tropicalis* BT. Then, the ability of the recombinant *C. tropicalis* to synthesize BT from xylose was investigated and the rate-limiting step was identified. The production of BT was improved by increasing the copy number of key genes *xylD* and *kdcA*. [Results] Under the conditions of 30 °C, 200 r/min, inoculum of 1%, and 30 g/L xylose, the yield of BT of the recombinant bacteria reached 1.2 g/L. In a 5 L fermenter, the yield was up to 3.7 g/L. [Conclusion] We developed a BT metabolic pathway in *C. tropicalis* with xylose as substrate, and a strain with high BT yield was constructed by increasing the copy number of key genes on the genome. The study lays a foundation for further improving the production of BT in *C. tropicalis*.

Keywords: xylose; 1,2,4-butanetriol; *Candida tropicalis*; D-xylosonate dehydratase

1,2,4-丁三醇(1,2,4-butanetriol, BT)是一种无色无味、透明的粘稠糖浆状液体,性质与甘油类似,可以与水和醇混溶^[1]。其属于手性多羟基醇,是一种重要的有机合成的化学中间体,在军工和民用上都具有重要的用途,军工上主要用于合成高能材料 1,2,4-丁三醇三硝酸酯。1,2,4-丁三醇三硝酸酯可用作飞机、火箭、导弹等军事武器的推进剂,比传统的硝化甘油具有冲击敏感性更低、热稳定性更好、挥发性更小和加工安全性更高等优点,是硝化甘油理想、

安全的替代品^[2]。但由于其在价格上难以与硝化甘油竞争,限制了这一产品的发展。此外,1,2,4-丁三醇还可用于制备生物活性剂、医药用缓释剂、卷烟添加剂、抗菌剂及彩色显影剂等^[3]。目前 1,2,4-丁三醇主要采用化学方法生产,化学合成方法主要以石油化工为原料,依靠化学反应在高温高压下催化产生。化学法生产不仅原料成本高、反应能耗大、生产危险性大,而且副产物多对环境污染性大^[2,4]。目前,利用廉价的可再生的生物原料,通过简单高效、

对环境友好的生物法来生产各种化合物越来越受到关注。木质纤维素材料是一种丰富、廉价且可再生的资源, 在生物经济前景中具有巨大潜力^[5]。因此, 利用木质纤维素材料生产生物燃料和化学品在经济上具有很大的吸引力。木糖是木质纤维素水解物中含量第二丰富的糖, 将木糖转化为有价值的化学品如植物天然产物, 是实现生物质材料生物精炼工业化的可行且可持续的途径^[6-8]。

2003年, 美国研究者首次报道了 BT 的生物合成方法, 该方法先在 *Pseudomonas fragi* 中以木糖和阿拉伯糖为原料生成木糖酸和阿拉伯糖酸, 然后在大肠杆菌中外源表达脱羧酶, 利用木糖酸和阿拉伯糖酸生成 1,2,4-丁三醇^[2]。之后, 有研究者将木糖生成 1,2,4-丁三醇途径的关键基因一起在大肠杆菌中表达, 获得了 1,2,4-丁三醇的一步法合成途径^[5]。截至目前, 许多研究团队对大肠杆菌合成 1,2,4-丁三醇进行了大量的研究来提高产量^[9-12], 但大肠杆菌存在明显的碳代谢抑制现象, 限制了混合糖条件下的菌株生长和产物合成。此外, 大肠杆菌鲁棒性较弱, 发酵液中一些抑制剂对其生长有较大影响^[3]。2019年, 研究者首次报道在酿酒酵母中成功构建了从木糖到 1,2,4-丁三醇的代谢途径, 这是生物法合成 1,2,4-丁三醇的一大突破^[3], 随后又通过调节细胞内的辅酶平衡而提高了 1,2,4-丁三醇的产量^[13]。

根据在酿酒酵母中构建 1,2,4-丁三醇合成途径的文献报道^[3], 热带假丝酵母是一种二倍体酵母菌株, 比原核生物具有更好的鲁棒性和更高的抗压性能^[14-15], 而且热带假丝酵母生长比酿酒酵母更好, 相同时间和碳源情况下热带假丝酵母生物量更高。热带假丝酵母作为一种新的 BT 生产菌株具有很大的潜力。本研究在热带假丝酵母中构建 BT 的合成途径, 以期为

利用热带假丝酵母生物合成 BT 奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

研究所用的菌株与质粒见表 1。

1.1.2 主要试剂和仪器

限制性核酸内切酶和 PCR 高保真酶, 宝生物工程(大连)有限公司; 一步法克隆所用到的酶, 南京诺唯赞生物科技有限公司; 氨苄青霉素、5-氟乳清酸(5-FOA)和酵母氮基(YNB), Bio Basic Inc 公司; 酵母粉和蛋白胨, OXOID 公司; 其他药品和生化试剂由国药化学试剂有限公司提供; 质粒小提试剂盒、PCR 产物清洗试剂盒和 DNA 凝胶回收试剂盒, AxyPrep 公司; 木糖标品、BT 标品和木糖酸等标品, 上海阿拉丁生物科技有限公司。高效液相色谱仪(high performance liquid chromatography, HPLC), 安捷伦科技有限公司。

1.1.3 培养基

LB 培养基(g/L): 酵母粉 5.0, 蛋白胨 10.0, 氯化钠 10.0, 琼脂粉 20.0 (固体培养基添加)。YPD 培养基(g/L): 酵母粉 10.0, 蛋白胨 20.0, 葡萄糖 20.0, 琼脂粉 20.0 (固体培养基添加)。MM 培养基(g/L): YNB 6.7, 硫酸铵 10.0, 葡萄糖 20.0, 琼脂粉 20.0 (固体培养基添加)。SM 培养基(g/L): MM 培养基中添加 60.0 mg/L 的尿嘧啶; 5-FOA 培养基(g/L): SM 培养基中添加 2.0 g/L 的 5-FOA; 发酵培养基(g/L): 葡萄糖 20.0, 木糖 30.0, 酵母粉 20.0, 蛋白胨 40.0, 柠檬酸铁铵 2.2, 0.143 MPa 灭菌 10 min。氨苄青霉素浓度: 100 mg/L。

1.1.4 引物

研究所用引物信息见表 2, 所有引物合成和测序均由苏州金唯智生物科技有限公司完成。

表 1 文中所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this work

菌株/质粒	相关特性	来源
Strains/Plasmids	Correlated characteristic	Sources
Strains		
<i>Escherichia coli</i> JM109	<i>E. coli</i> JM109 wild type	Our laboratory
<i>Candida tropicalis</i> 207	<i>C. tropicalis</i> wild type carrying <i>Pcas-cas9</i>	Our laboratory
<i>C. tropicalis</i> 207-1	<i>C. tropicalis</i> 207 Δ <i>GRE3</i>	This work
<i>C. tropicalis</i> BD	<i>C. tropicalis</i> 207-1:: <i>xyIB</i> :: <i>xyID</i>	This work
<i>C. tropicalis</i> BT	<i>C. tropicalis</i> BD:: <i>kdcA</i>	This work
<i>C. tropicalis</i> BT01	<i>C. tropicalis</i> BT:: <i>xyIB</i>	This work
<i>C. tropicalis</i> BT02	<i>C. tropicalis</i> BT:: <i>xyID</i>	This work
<i>C. tropicalis</i> BT03	<i>C. tropicalis</i> BT:: <i>kdcA</i>	This work
<i>C. tropicalis</i> BT04	<i>C. tropicalis</i> BT02:: <i>xyID</i>	This work
<i>C. tropicalis</i> BT05	<i>C. tropicalis</i> BT02:: <i>xyID</i> :: <i>kdcA</i>	This work
Plasmids		
pTargetF-PMB	pTarget added sgRNA	Our laboratory
PBRP01	GAPDH promote	Our laboratory
P _{GAPDH-xyIB} -P _{FBA1-xyID}	GAPDH promoter	This work
P _{GAPDH-xyIB}	GAPDH promoter	This work
P _{GAPDH-xyID}	GAPDH promoter	This work
P _{GAPDH-kdcA}	GAPDH promoter	This work
P _{GAPDH-kdcA} -P _{FBA1-xyID}	GAPDH promoter	This work

表 2 文中所用的引物

Table 2 Primers used in this work

引物名称	引物序列
Primer name	Primer sequence (5'→3')
GRE3-F2	<u>ACGCGT</u> CCCCAACTATCAAATTGAACTCC
GRE3-R2	<u>ACGCGT</u> ATGTCCAACCTGGCAATCTCG
rGRE3-F	AACTGCAGCCGTCTCCGCAGTAGAAGCC
rGRE3-R	GCTCTAGACCGGTGCATTGATCTACGACT
XYL2F	<u>ACGCGT</u> TAAATAGAACCCACGAATCCCT
XYL2R	<u>ACGCGT</u> TTTACTCGTACTATGCACTCC
rXYL2F	AACTGCAGAGTAGTGAATATCGGAACCACA
rXYL2R	GCTCTAGAAACTTCCCAATTTCCGACT
P _{GAPDH} -F1	gggttatctcgtgtcgggtcaaggtAACGTGGTATGGTTGTAAGA
P _{GAPDH} -R1	tagagatgaagaccagacgtgattagTCTGGTTTAGAAGTAGGGAC

注：下划线部分为酶切位点；小写字母表示同源臂序列

Note: The underlined are restriction enzyme cutting sites; The sequences of homologous arms are indicated with lowercase letters.

1.2 方法

1.2.1 基因敲除菌的构建

用玻璃珠破碎法提取热带假丝酵母基因组 DNA, 以基因组 DNA 为模板, 采用引物 GRE3-F2 和 GRE3-R2 (表 2) PCR 扩增 765 bp 左右的目的基因片段, 插入 pMD19-T Simper 载体中, 获得

重组质粒 *GRE3*-Ts。以此质粒为模板, 使用引物 rGRE3-F 和 rGRE3-R 反向 PCR 扩增获得含两端同源臂的线性化载体 *UDGRE3*-Ts-*UDGRE3*。PCR 反应体系: ddH₂O 38.7 μ L, 模板 0.2 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 5 μ L, 10 \times *Ex Taq* Buffer 5 μ L, 上、下游引物(25 μ mol/L)各 0.3 μ L, *Ex Taq* 酶

(5 U/ μ L) 0.5 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 kb/min, 30 次循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。通过 *Xba* I 与 *Pst* I 消化质粒 Ts-gda-*URA3* 回收 gda-*URA3* 片段, 然后与经过相同酶切处理的线性化载体 *UDGRE3*-Ts-*UDGRE3* 片段连接, 获得重组质粒 Ts-*UDGRE3*-gda-*URA3*-*UDGRE3*, 转化 *Escherichia coli* JM109, 涂布 LB+氨苄抗性平板, 筛选正确的阳性转化子进行菌落 PCR 及酶切测序验证, 获得正确的转化质粒。

1.2.2 表达质粒的构建

分别将来自 *Caulobacter crescentus* 的木糖脱氢酶基因(*xyiB*)、木糖酸脱水酶基因(*xyiD*)和来源于 *Lactococcus lactis* 的酮酸脱羧酶基因(*kdcA*)的序列进行优化^[16-18], 根据优化后的基因序列合成基因(由苏州金唯智生物科技有限公司合成)。目的基因质粒用 *Hind* III 和 *Sal* I 双酶切, 分别获得目的基因 *xyiB*、*xyiD* 和 *kdcA* 片段, 目的基因片段与经过相同酶切处理的线性化载体 PBRP01 连接, 转化 *E. coli* JM109, 涂布 LB+氨苄抗性平板, 筛选正确的阳性转化子进行菌落 PCR 及酶切测序验证, 获得正确的转化质粒 P_{GAPDH}-*xyiB*-P_{FBA1}-*xyiD* 和 P_{GAPDH}-*kdcA*-P_{FBA1}-*xyiD*。

以质粒 Ts-P-*xyiB*-T 为模板, 用引物 P_{GAPDH}-F1 与 P_{GAPDH}-R1 进行 PCR 扩增出目的基因 P-*xyiB*-T 片段(所用引物见表 2), 质粒 DLD1-gda-*URA3* 线性化, 使用一步法克隆试剂盒连接基因片段和线性化质粒(操作步骤见说明书), 连接产物转入 *E. coli* JM109 中, 在氨苄抗性 LB 平板上筛选正确的阳性转化子进行菌落 PCR 及酶切和基因测序验证, 获得正确的过表达 *xyiB* 表达质粒。以同样的方法获得外源目的基因 *xyiD* 和 *kdcA* 过表达质粒。

1.2.3 热带假丝酵母氯化锂转化

将宿主菌培养至 OD_{600} 为 1.0–1.5 时, 收集

菌体 5 000 r/min 离心 10 min, 用 TE 溶液 (10 mmol/L pH 7.4 的 Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA) 清洗菌体沉淀, 重悬在 1 mL 的 100 mmol/L LiCl 中, 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 孵育 1 h。取 90 μ L 细胞, 与 10 μ L DNA 片段及 2 μ L 鲑鱼精混匀, 30 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。再加入 900 μ L 的 PEG3350-氯化锂溶液(40% PEG3350 和 100 mmol/L 氯化锂), 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 孵育 1 h, 然后 42 $^{\circ}$ C 热激 5 min, 快速冷却至室温, 12 000 r/min 离心 1 min 收集细胞, 并用无菌水清洗 1 次, 涂布 MM 平板, 30 $^{\circ}$ C 培养 2–3 d^[14]。

1.2.4 补料分批发酵

根据摇瓶发酵实验, 突变菌株在 5 L 发酵罐中进行放大实验。首先, 菌株 *C. tropicalis* BT05 在 20 mL 的 YPD 一级种子液中培养 24 h, 之后接种到 500 mL YPD 二级种子液中, 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 24 h。将培养好的种子液接入到 5 L 发酵罐培养基中, 初始装液量为 2.5 L, 接种量为 10%。发酵过程中采用流加补料的方式添加葡萄糖与木糖。温度控制在 30 $^{\circ}$ C, pH 7.0, 20%溶解氧(dissolved oxygen, DO), 搅拌自动控制。在整个发酵过程中, 空气流量保持在每分钟液体体积 0.5 气量。每 24 h 取样一次, 测定产物。

1.2.5 测定方法

采用气相色谱-质谱联用(GC-MS)对发酵液中产生的 BT 进行定性分析^[9]。

发酵液中发酵产物采用高效液相色谱仪(HPLC)检测^[12]。流动相为 5 mmol/L 的 H₂SO₄, 色谱柱温度为 60 $^{\circ}$ C, 流速为 0.6 mL/min。使用示差折光及紫外检测器, 外标法定量。木糖酸的浓度用异羟肟酸法检测^[9]。样品在 0.7 mol/L HCl 中稀释, 在 100 $^{\circ}$ C 沸水中煮沸 15 min 将木糖酸转化为木糖酸内酯, 取 500 μ L 稀释的样品加入到 1 mL 的羟胺试剂(2 mol/L 盐酸羟胺与 2 mol/L

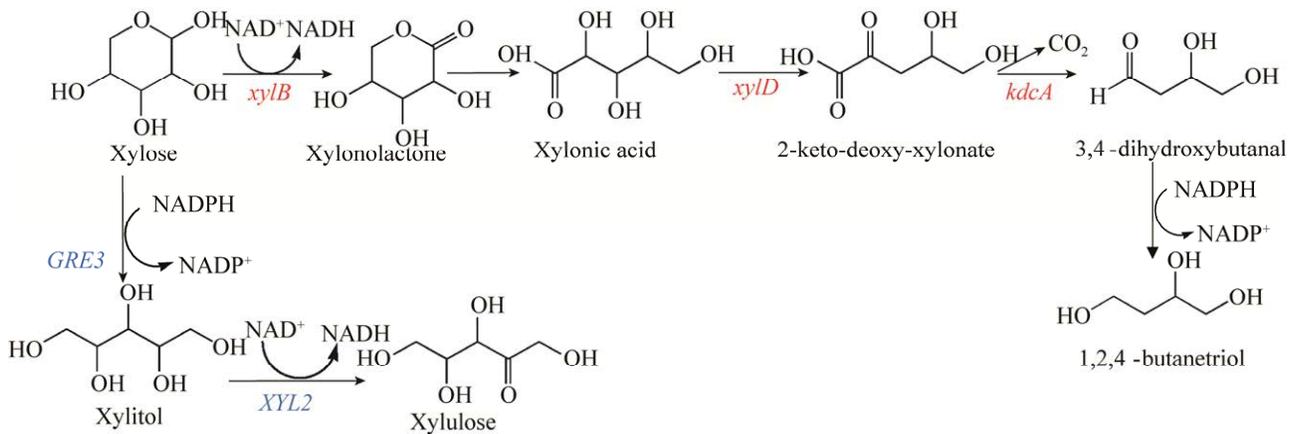


图 1 热带假丝酵母以木糖为底物合成 1,2,4-丁三醇的途径设计 *xylB*: 编码来自 *Caulobacter crescentus* 的木糖脱氢酶; *xylD*: 编码来自 *Caulobacter crescentus* 的木糖酸脱水酶; *kdcA*: 编码来自 *Lactococcus lactis* 的酮酸脱羧酶; *GRE3*: 编码来自 *C. tropicalis* 207 的木糖还原酶; *XYL2*: 编码来自 *C. tropicalis* 207 的木糖醇脱氢酶

Figure 1 The pathway design of *Candida tropicalis* to synthesize 1,2,4-butanetriol using xylose as a substrate. *xylB*: Encodes xylose dehydrogenase from *Caulobacter crescentus*; *xylD*: Encodes D-xylonate dehydratase from *Caulobacter crescentus*; *kdcA*: Encodes keto acid decarboxylase from *Lactococcus lactis*; *GRE3*: Encodes xylose reductase from *C. tropicalis* 207; *XYL2*: Encodes xylitol dehydrogenase from *C. tropicalis* 207.

氢氧化钠等比例混合)中。加入其他试剂如 HCl (650 μ L, 3.2 mol/L), 然后添加 500 μ L FeCl₃ (100 g/L 在 0.1 mol/L HCl 中)。使用 8453 安捷伦 UV-VIS 立即在 550 nm 处测定吸光度。

2 结果与分析

2.1 *C. tropicalis* 207 中 *GRE3* 敲除菌株的构建

在热带假丝酵母中,木糖被内源性的非特异性 *GRE3* 编码的木糖还原酶转化为木糖醇,如图 1 所示,木糖醇进一步代谢可以为细胞提供生长所需的能量。为了避免木糖还原酶基因(*GRE3*)与木糖脱氢酶基因(*xylB*)竞争底物,使木糖转化为 1,2,4-丁三醇,所以在 *C. tropicalis* 207 中敲除了木糖还原酶基因(*GRE3*),获得突变菌株 *C.*

tropicalis 207-1。在含有木糖作为唯一碳源的固体培养基上, *C. tropicalis* 207-1 不能生长,但是可以在含有葡萄糖作为唯一碳源的固体培养基上生长。表明在敲除了木糖还原酶基因(*GRE3*)之后,木糖不能进入细胞的主要代谢途径,给细胞提供生长所需的能量,虽然引入了异源的木糖脱氢酶基因(*xylB*),但是 *xylB* 主要利用木糖生产木糖酸,进一步生产 1,2,4-丁三醇,并不能提供细胞生长所需的能量。菌株 *C. tropicalis* 207-1 与对照菌株 *C. tropicalis* 207 在 YPD 培养基中培养,结果如图 2 所示, *C. tropicalis* 207-1 的生长比对照菌株 *C. tropicalis* 207 更好。结果表明,在热带假丝酵母中敲除木糖还原酶基因(*GRE3*)后,菌株不能利用木糖提供能量,反而能更好地利用葡萄糖,降低碳代谢抑制,生物量较高。

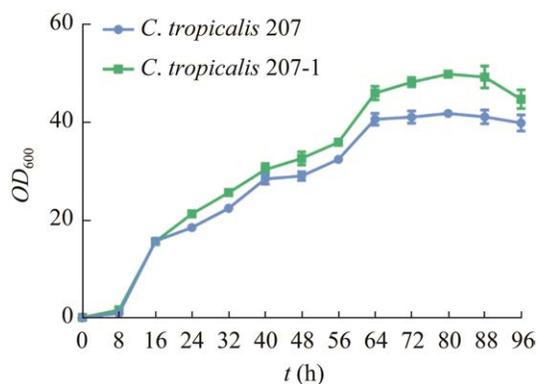


图 2 *C. tropicalis* 207 和 *C. tropicalis* 207-1 在 YPD 培养基中的生长曲线

Figure 2 Growth curve of *C. tropicalis* 207 and *C. tropicalis* 207-1 in YPD medium.

2.2 *C. tropicalis* BT 生产菌株的构建

为了在热带假丝酵母中构建产 BT 的代谢途径, 将木糖脱氢酶基因(*xylB*)、木糖酸脱水酶基因(*xylD*)和酮酸脱羧酶基因(*kdcA*)依次整合在热带假丝酵母的基因组上。首先, *xylB* 与 *xylD* 表达盒整合在 *C. tropicalis* 207 基因组上, 获得木糖脱氢酶基因(*xylB*)与木糖酸脱水酶基因(*xylD*)表达成功的重组菌株 *C. tropicalis* BD; 随后, *kdcA* 表达盒整合在菌株 *C. tropicalis* BD 基因组中, 获得酮酸脱羧酶基因(*kdcA*)表达成功的酵母菌株 *C. tropicalis* BT。在 *C. tropicalis* BT 的发酵液中通过 GC-MS 检测到 BT, 如图 3 所示, 但 HPLC 测定 BT 产量较低, 分析导致产量低的原因可能是前体物积累。

为了测定 BT 前体物木糖酸的积累, 将重组菌 *C. tropicalis* BD 与 *C. tropicalis* BT 在添加葡萄糖与木糖的发酵培养基中培养, 如图 4 结果显示, 菌株 *C. tropicalis* BD 木糖酸大量积累, 达到 6 g/L 左右, 菌株 *C. tropicalis* BT 木糖酸积累量较 BD 明显减少, 但在 96 h 仍然达到 3 g/L 的积累量。菌株 *C. tropicalis* BD 的细胞生物量较低, 可能是由于木糖酸过多积累对细胞生长

有一定的抑制作用。检测到 *C. tropicalis* BT 菌株产物的量较少, 说明在木糖酸的下流催化能力较弱。

2.3 外源基因 *xylB*、*xylD*、*kdcA* 分别过表达菌株对 BT 合成的影响

为了衡量 3 个外源基因对木糖酸积累和 BT 合成的影响, 在菌株 *C. tropicalis* BT 的基础上, 分别再整合表达了木糖脱氢酶基因(*xylB*)、木糖

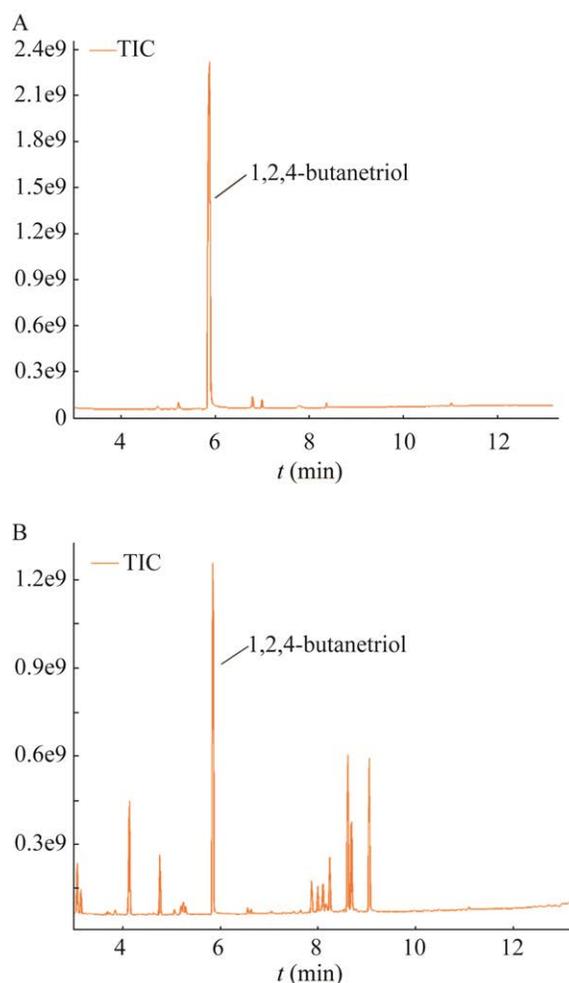


图 3 BT 标准样品(A)和发酵液(B)的 GC-MS 分析

Figure 3 The GC-MS analysis of BT standard (A) and fermentation broth (B).

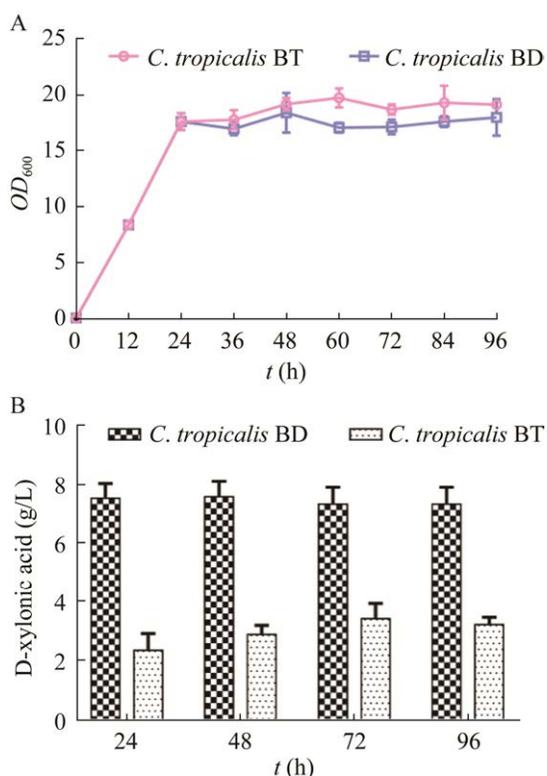


图4 菌株 *C. tropicalis* BD 与 *C. tropicalis* BT 在发酵培养基中的生长曲线(A)和发酵结果分析(B)
Figure 4 Growth curve of *C. tropicalis* BD and *C. tropicalis* BT in fermentation medium (A) and analysis of fermentation results (B).

酸脱水酶基因(*xyiD*)和酮酸脱羧酶基因(*kdcA*), 相应获得了菌株 *C. tropicalis* BT01、*C. tropicalis* BT02 和 *C. tropicalis* BT03。这3株菌的发酵结果如图5所示, 菌株 *C. tropicalis* BT01 中木糖酸量积累最多, BT 几乎没有, HPLC 基本检测不到, *C. tropicalis* BT02 和 *C. tropicalis* BT03 的木糖酸积累均较 *C. tropicalis* BT01 有所减少, 而 BT 的产量则相应地增加, 其中 *C. tropicalis* BT02 增幅最大, BT 产量达到 0.8 g/L 左右。说明在木糖到 1,2,4-丁三醇合成途径的3个重要的外源基因中, 木糖酸下游代谢的2个基因 *xyiD* 和 *kdcA* 更关键, 而 *xyiD* 对木糖酸的直接转化更具有决定性, 是一个关键限速酶,

理论上提高其表达量可以使 BT 产量获得明显的提高。菌株 *C. tropicalis* BT03 的 BT 产量也获得了提高, 木糖酸的积累减少, 虽然其产量比 *C. tropicalis* BT02 菌株产量低, 但相较于 *C. tropicalis* BT 菌株有了明显的提高, 所以在木糖到 BT 的合成途径中, 木糖酸的下流代谢是关键的限制步骤。

2.4 关键基因 *xyiD* 拷贝数倍增对 BT 合成的影响

以上结果证明, 木糖酸的转化是合成 BT 的关键步骤, 而催化木糖酸的 *xyiD* 是关键基因。显然 *xyiD* 过表达菌株 *C. tropicalis* BT02 的 BT 产量有了明显的提高, 为了进一步提高 BT 的产量, 在菌株 *C. tropicalis* BT02 的基础上, 继续增加木糖酸脱水酶基因(*xyiD*)的拷贝数, 提高其表达量, 获得 *C. tropicalis* BT04 菌株。发酵结果如图6所示, 菌株 *C. tropicalis* BT04 并未明显提高产量, BT 产量仅比 *C. tropicalis* BT02 提高了6%, 生物量也无明显变化, 木糖酸的积累量略微降低。说明木糖酸脱水酶下游也是重要的关键步骤, 仅仅增加 *xyiD* 拷贝数并不能继续提高产量。

2.5 关键基因 *xyiD* 和 *kdcA* 共同过表达菌株对 BT 合成的影响

上述结果表明 *xyiD* 和 *kdcA* 均为关键基因, 而单独过表达 *xyiD* 未显著提高 BT 产量, 所以通过共同表达关键基因以提高木糖酸的转化率, 从而提高 BT 产量。在 *C. tropicalis* BT02 的基础上, 组合过表达木糖酸脱水酶基因(*xyiD*)和酮酸脱羧酶基因(*kdcA*), 获得突变菌株 *C. tropicalis* BT05。发酵结果如图7所示, *C. tropicalis* BT05 的 BT 产量提高, 达到 1.2 g/L; 木糖酸的积累量也有所减少, 后续在此基础上进行研究。

2.6 在 5 L 发酵罐中放大培养结果分析

为了进一步提高 BT 的产量, *C. tropicalis* BT05 菌株在 5 L 发酵罐中进行扩大培养, 初始葡萄糖添加量为 20.0 g/L、木糖添加量为 30.0 g/L, 发酵过程中采用流加补料的方式添加葡萄糖与

木糖, 控制发酵液的 pH 值在 7.0 左右。发酵结果如图 8 所示, 生长到 32 h 时, 生长基本维持稳定, 即使再继续添加葡萄糖, 细胞生物量也不再提高, 葡萄糖不再被消耗; 72 h 时, BT 合成达到 3.7 g/L。

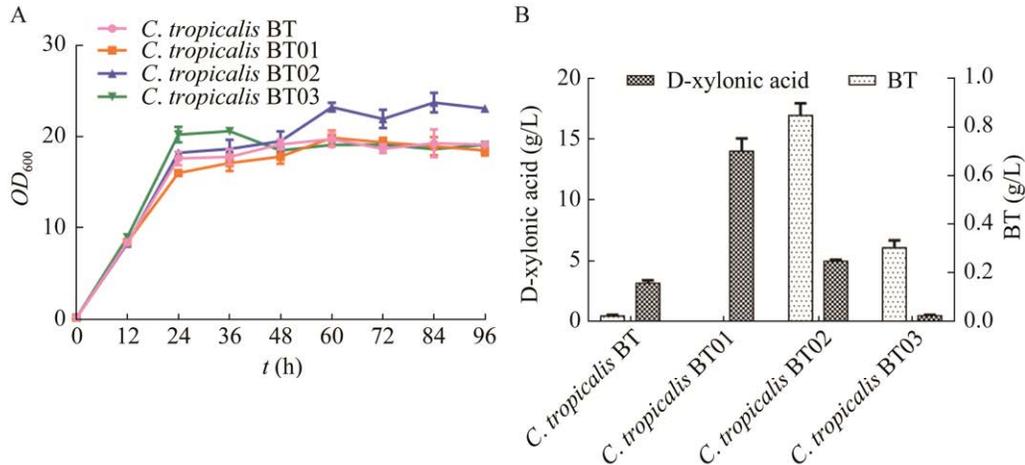


图 5 *C. tropicalis* BT、*C. tropicalis* BT01、*C. tropicalis* BT02 和 *C. tropicalis* BT03 在摇瓶发酵中的生长曲线(A)及发酵结果分析(B)

Figure 5 Growth curve of *C. tropicalis* BT, *C. tropicalis* BT01, *C. tropicalis* BT02 and *C. tropicalis* BT03 in shake flask fermentation (A) and analysis of fermentation results (B).

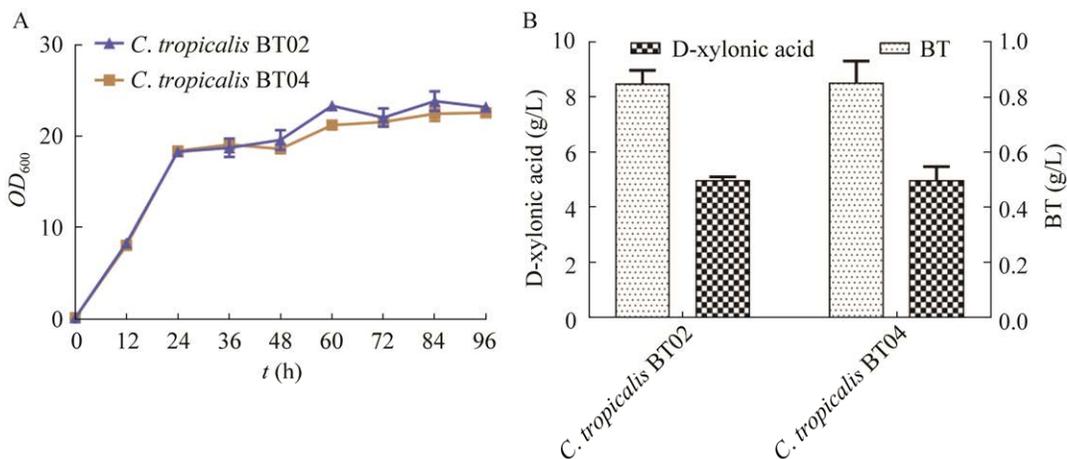


图 6 *C. tropicalis* BT02 与 *C. tropicalis* BT04 在摇瓶发酵中生长曲线(A)与发酵结果分析(B)

Figure 6 Growth curve of *C. tropicalis* BT02 and *C. tropicalis* BT04 in shake flask fermentation (A) and analysis of fermentation results (B).

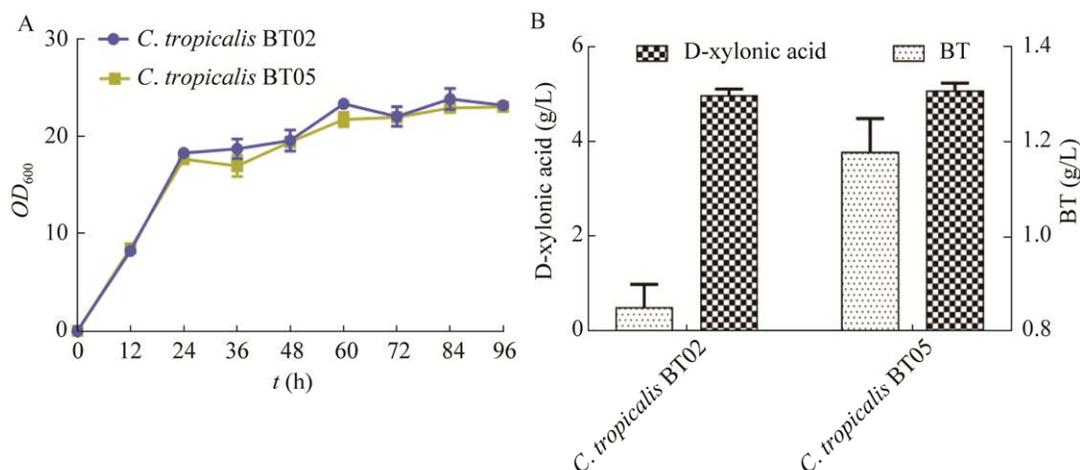


图7 *C. tropicalis* BT02 和 *C. tropicalis* BT05 在摇瓶发酵中的生长曲线(A)及发酵结果分析(B)

Figure 7 Growth curve of *C. tropicalis* BT02 and *C. tropicalis* BT05 in shake flask fermentation (A) and analysis of fermentation results (B).

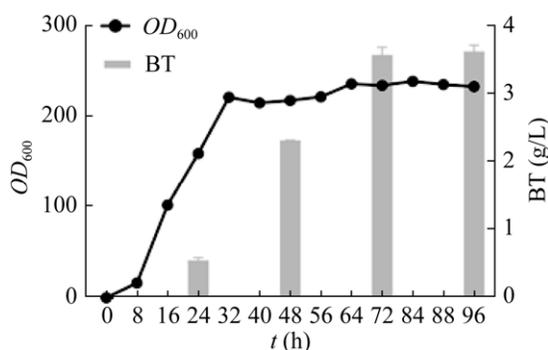


图8 *C. tropicalis* BT06 菌株在 5 L 发酵罐中的发酵结果分析

Figure 8 Fermentation result analysis of *C. tropicalis* BT06 strain in a 5 L fermenter.

3 讨论

1,2,4-丁三醇作为一种非天然化合物在生物体内尚未被发现,之前国内外对生物法合成1,2,4-丁三醇进行了大量的研究,然而由于未发现能够直接生成1,2,4-丁三醇的天然菌株,所以宿主的选择是一个问题。之前的研究选择的宿主大多是原核生物 *E. coli*,利用大肠杆菌生物合成 BT 取得了一定的进展,但是原核生物发酵过程中生物量较低、鲁棒性较差,发酵液中

存在的一些抑制剂对其生长有一定的影响。因此鲁棒性较好的酵母菌成为更有吸引力的宿主。2019年,有研究者首次报道在酿酒酵母中实现了以木糖为底物的1,2,4-丁三醇合成代谢途径,并通过提高木糖酸脱水酶的活性提高产量,最终的产量达到1.7 g/L^[3]。作者在酿酒酵母中成功构建了 BT 合成途径,并且从几个不同来源的木糖酸脱水酶基因和酮酸脱羧酶基因中筛选出较为合适的基因,在此基础上,作者又研究了来自 *C. crescentus* 的木糖酸脱水酶的催化活性,其催化活性中心含有铁硫蛋白,在真核生物中难以表达,具体的催化反应机制尚不明确。作者通过增加木糖酸脱水酶基因(*xylD*)拷贝数和铁调控来提高木糖酸脱水酶的活性,从而提高 BT 产量。

本研究选择了热带假丝酵母作为宿主来生产1,2,4-丁三醇,首先在热带假丝酵母中依次外源表达了 *xylB*、*xylD* 和 *kdcA* 这3个基因之后,在发酵液中检测到最终产物 BT 的产生,但其产量较低。3种酶均来源于原核生物,由于宿主差异,可能影响酶的表达活性。之后分别过

表达了 3 种酶, 发现过表达 *xy1D* 之后 1,2,4-丁三醇的产量有了明显的提高, 而过表达其他 2 种酶效果不太明显。虽然在 BT 合成途径中 3 种酶都很重要, 但来自 *C. crescentus* 的木糖酸脱水酶属于一种铁硫蛋白复合酶, 原核生物的铁硫蛋白在真核生物中难以表达^[19], 因此木糖酸脱水酶的催化能力较弱, 说明木糖酸的下游代谢是比较关键的反应步骤。另外, 实验也表明过表达木糖酸脱水酶基因(*xy1D*)之后木糖酸的积累降低, 1,2,4-丁三醇的产量明显增加。这说明在木糖生成 1,2,4-丁三醇的代谢途径中, 木糖酸脱水酶是一个比较关键的酶, 但是由于在其他文献中并未报道其催化机制, 所以提高木糖酸脱水酶的活性在 BT 合成途径中是一个关键的问题。

在 BT 的合成途径中, 中间产物木糖酸对细胞生长具有一定的抑制作用, 所以减少木糖酸的积累、提高木糖酸的下游代谢有利于产物的合成。增加 *xy1D* 拷贝数可以提高 BT 产量, 同时增加 *kdcA* 拷贝数, 产量可进一步得到提高。此外, 本研究中采用葡萄糖与木糖两种碳源混合发酵。初期, 酵母菌株利用葡萄糖进行生长, 当葡萄糖消耗完之后生长趋于稳定, 菌株开始利用木糖生产产物。葡萄糖为菌株的生长提供能量, 同时, 木糖代谢途径是一个氧化还原过程, 此过程中需要用到 NADPH 等辅因子, 从而造成了细胞内 NADPH 失衡, 而添加的葡萄糖可以供给能量, 提供细胞所需的辅因子。后期, 提高菌株生物量、维持细胞内辅酶的平衡也是重要的问题。

4 结论

本研究在 *C. tropicalis* 207 中成功构建了以木糖为底物的 BT 合成途径。外源表达了来自 *C. crescentus* 的木糖脱氢酶基因(*xy1B*)、木糖酸

脱水酶基因(*xy1D*)和来自 *L. lactis* 的酮酸脱羧酶基因(*kdcA*), 成功构建了从木糖到 BT 的合成代谢途径; 随后, 又在其基础上分别过表达了 3 个外源基因, 确定了木糖酸脱水酶的下游代谢是主要的限速步骤, 木糖酸脱水酶作为一个关键的限速酶, 其催化木糖酸的代谢、减少木糖酸的积累, 木糖酸对菌株的生长具有一定的抑制作用; 之后又在此基础上组合过表达了木糖酸脱水酶与酮酸脱羧酶, BT 的产量有一定的提高, 达到 1.2 g/L, 在 5 L 发酵罐中放大培养, 其产量达到 3.7 g/L。本研究探索了一种新的 1,2,4-丁三醇生产菌株, 进一步推动了生物法合成 1,2,4-丁三醇的研究进展。

REFERENCES

- [1] 孙文龙, 陆信曜, 宗红, 方慧英, 诸葛斌, 宋健. 代谢工程改造大肠杆菌合成 D-1,2,4-丁三醇[J]. 微生物学通报, 2014, 41(10): 1948-1954
Sun WL, Lu XY, Zong H, Fang HY, Zhuge B, Song J. Biosynthesis of D-1,2,4-butanetriol by an engineered *Escherichia coli*[J]. Microbiology China, 2014, 41(10): 1948-1954 (in Chinese)
- [2] Niu W, Molefe MN, Frost JW. Microbial synthesis of the energetic material precursor 1,2,4-butanetriol[J]. Journal of the American Chemical Society, 2003, 125(43): 12998-12999
- [3] Bamba T, Yukawa T, Guirimand G, Inokuma K, Sasaki K, Hasunuma T, Kondo A. Production of 1,2,4-butanetriol from xylose by *Saccharomyces cerevisiae* through Fe metabolic engineering[J]. Metabolic Engineering, 2019, 56: 17-27
- [4] Cao YJ, Niu W, Guo JT, Xian M, Liu HZ. Biotechnological production of 1,2,4-butanetriol: an efficient process to synthesize energetic material precursor from renewable biomass[J]. Scientific Reports, 2016, 5: 18149
- [5] Valdehuesa KNG, Liu HW, Ramos KRM, Park SJ, Nisola GM, Lee WK, Chung WJ. Direct bioconversion of D-xylose to 1,2,4-butanetriol in an engineered *Escherichia coli*[J]. Process Biochemistry, 2014, 49(1): 25-32
- [6] Isikgor FH, Becer CR. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based

- chemicals and polymers[J]. *Polymer Chemistry*, 2015, 6(25): 4497-4559
- [7] Wang X, Xu NN, Hu SW, Yang JM, Gao Q, Xu S, Chen KQ, Ouyang PK. D-1,2,4-butanetriol production from renewable biomass with optimization of synthetic pathway in engineered *Escherichia coli*[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 250: 406-412
- [8] Zhao Z, Xian M, Liu M, Zhao G. Biochemical routes for uptake and conversion of xylose by microorganisms[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2020, 13: 21
- [9] 孙雷, 杨帆, 朱泰承, 李兴华, 孙红兵, 李寅, 许正宏, 张延平. 大肠杆菌合成 1,2,4-丁三醇的途径优化[J]. *生物工程学报*, 2016, 32(1): 51-63
Sun L, Yang F, Zhu TC, Li XH, Sun HB, Li Y, Xu ZH, Zhang YP. Optimization of 1,2,4-butanetriol synthetic pathway in *Escherichia coli*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2016, 32(1): 51-63 (in Chinese)
- [10] 何姝颖. 重组大肠杆菌 D-1,2,4-丁三醇合成中副产物途径的敲除及关键酶的强化表达[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2017
He SY. Blocking by-product pathways and strengthening key enzymes expression of D-1,2,4-butanetriol synthesis in recombinant *Escherichia coli*[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2017 (in Chinese)
- [11] Zhang NN, Wang JB, Zhang Y, Gao HJ. Metabolic pathway optimization for biosynthesis of 1,2,4-butanetriol from xylose by engineered *Escherichia coli*[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2016, 93(94): 51-58
- [12] 李玉石, 刘郁青, 杨程雨, 陆信曜, 宗红, 诸葛斌. 代谢改造克雷伯氏菌合成 D-1,2,4-丁三醇[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(8): 2505-2515
Li YS, Liu YQ, Yang CY, Lu XY, Zong H, Zhuge B. Production of D-1,2,4-butanetriol by engineering *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(8): 2505-2515 (in Chinese)
- [13] Yukawa T, Bamba T, Guirimand G, Matsuda M, Hasunuma T, Kondo A. Optimization of 1,2,4-butanetriol production from xylose in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering of NADH/NADPH balance[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2021, 118(1): 175-185
- [14] 项峥, 陈献忠, 张利华, 沈微, 樊游, 陆茂林. 利用可重复使用的 *URA3* 标记基因建立热带假丝酵母基因敲除系统[J]. *遗传*, 2014, 36(10): 1053-1061
Xiang Z, Chen XZ, Zhang LH, Shen W, Fan Y, Lu ML. Development of a genetic transformation system for *Candida tropicalis* based on a reusable selection marker of *URA3* gene[J]. *Hereditas*, 2014, 36(10): 1053-1061 (in Chinese)
- [15] Zhang LH, Zhang HB, Liu YF, Zhou JY, Shen W, Liu LM, Li Q, Chen XZ. A CRISPR-Cas9 system for multiple genome editing and pathway assembly in *Candida tropicalis*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020, 117(2): 531-542
- [16] Lee CC, Jordan DB, Stoller JR, Kibblewhite RE, Wagschal K. Biochemical characterization of *Caulobacter crescentus* xylose dehydrogenase[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 118: 1362-1367
- [17] Li XW, Chen Y, Nielsen J. Harnessing xylose pathways for biofuels production[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2019, 57: 56-65
- [18] Smit BA, Van Hylckama Vlieg JET, Engels WJM, Meijer L, Wouters JTM, Smit G. Identification, cloning, and characterization of a *Lactococcus lactis* branched-chain α -keto acid decarboxylase involved in flavor formation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(1): 303-311
- [19] Andberg M, Aro-Kärkkäinen N, Carlson P, Oja M, Bozonnet S, Toivari M, Hakulinen N, O'Donohue M, Penttilä M, Koivula A. Characterization and mutagenesis of two novel iron-sulphur cluster pentonate dehydratases[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(17): 7549-7563