

丁醇合成途径关键酶基因在大肠杆菌中的克隆和表达

张艳², 周鹏鹏², 王丕祥², 谢静莉^{1, 2*}, 叶勤¹

华东理工大学,¹ 生物反应器工程国家重点实验室,² 生物工程学院食品科学与工程系, 上海 200237

摘要:【目的】克隆丙酮丁醇梭状芽胞杆菌 (*Clostridium acetobutylicum*) ATCC824 丁醇合成途径关键酶基因, 构建产丁醇的工程大肠杆菌。【方法】以 *C. acetobutylicum* ATCC824 基因组为模板, 分别扩增丁醇合成途径关键酶基因 *thil*, *adhE2* 和 *BCS operon (crt-bcd-ctfB-ctfA-hbd)* 基因序列, 构建 *BCS operon-adhE2-thil/pTrc99a/MG1655* (pBAT)。重组菌 *E. coli* pBAT 采用 0.1 mmol 异丙基- β -硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导 5 h, 测定乙酰基转移酶 (THL)、3-羟基丁酰辅酶 A 脱氢酶 (HBD)、3-羟基丁酰辅酶 A 脱水酶 (CRT)、丁酰辅酶 A 脱氢酶 (BCD)、醛醇脱氢酶 (BYDH/BDH) 的酶活。并以该基因工程菌作为发酵菌种, 采用好氧、厌氧和微好氧三种培养方式, 检测丁醇产量。【结果】酶活测定结果显示: THL 酶活达到 0.160 U/mg protein, 酶活力提高了近 30 倍; HBD 酶活力提高了近 5 倍; CRT 酶活达到 1.53 U/mg protein, 野生菌株无此酶活; BCD 酶活力提高了 32 倍; BYDH/BDH 酶活力无显著提高。3 种发酵培养结果显示在微好氧和厌氧条件下, 均有丁醇产生, 且丁醇的最大产量约为 84 mg/L。【结论】本实验通过构建产丁醇基因工程大肠杆菌, 实现了丁醇关键酶基因在大肠杆菌中的活性表达以及发酵产丁醇, 为发酵法生产丁醇开辟了一条新的途径。

关键词: 丙酮丁醇梭状芽胞杆菌, 大肠杆菌, 正丁醇, 酶活, 厌氧发酵

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012) 05-0588-06

在石油资源日益匮乏以及全球气候变暖双重压力下, 生物能源和生物燃料引起人们广泛关注。丁醇作为一种新型生物燃料, 其热值和汽油相当 (丁醇燃烧值为 27 MJ/L; 汽油燃烧值为 32 MJ/L), 是乙醇的两倍; 丁醇能有效地与汽油融合, 对于丁醇的运输和储存不用改变现有的石油运输管道等基础设施以及传统的器械设备^[1]。丁醇的疏水性很强, 大约是乙醇的 12 倍, 对运输管道和机械设备无腐蚀性, 是一种理想的石油替代燃料。此外丁醇还是重要的有机化工原料, 可用作表面涂料、油漆的溶剂和各种橡胶制品、塑料的生产, 还可以生产丁醛、丁酸、乳酸丁酯、醋酸丁酯、丙烯酸丁酯和丁胺等化工产品。国

内外市场对丁醇的需求量呈现逐年上升的趋势^[2]。

生物法制备丁醇的传统发酵模式都是丙酮-丁醇-乙醇发酵 (ABE 发酵), 即以 6:3:1 的比例生产丁醇、丙酮和乙醇^[3], 发酵所用的菌种多为梭菌属的菌种且为严格厌氧菌, 属于厌氧发酵培养, 因此菌体生长速度较慢, 丁醇产量较低。到目前为止还没有文献报道产丁醇的野生好氧菌。此外, 在整个发酵过程中分为产酸和产溶剂两个过程, 产酸和产溶剂过程交替出现^[4-5]。最后, 梭菌属的菌种易产孢子, 一旦菌体进入产孢子阶段, 产溶剂过程即刻停止^[6-7], 这也从很大程度上影响了丁醇的产量, 这也使整个发酵培养过程变得更加复杂化。尽管对梭菌

* 通信作者。Tel/Fax: +86-21-64251803; E-mail: jlxie@ecust.edu.cn

作者简介: 张艳 (1984-), 女, 安徽黄山人, 硕士研究生, 食品科学专业。E-mail: zhynb.1124@163.com

收稿日期: 2011-11-07; 修回日期: 2012-02-02

进行基因操作后, 丁醇的产量和产率得到了很大的提高, 但是对溶剂产生的调控异常复杂, 很难实现一阶段发酵。在这种情况下, 大肠杆菌和酵母等成熟的工业微生物应用于丁醇生产开始被人们关注^[8]。

大肠杆菌作为工业微生物, 遗传背景清楚, 基因操作简单, 代谢过程被国内外学者广泛研究, 且菌体生长速率较快, 被广泛用来生产很多高附加值的代谢产物, 如抗生素、乙醇、琥珀酸、萜类, 丙酮酸等^[9-12]。因此, 采用大肠杆菌作为发酵菌种, 可以避免很多 ABE 发酵过程遇到的障碍, 有利于优化调控。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株: 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) MG1655 和原核表达载体 pTrc99a 为华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室发酵工程研究室提供; 丙酮丁醇梭状芽胞杆菌 ATCC824 (*Clostridium acetobutylicum* ATCC824) 基因组由中国科学院上海植物生理生化研究所微生物代谢调控与代谢工程研究组提供; 亚克隆 T 载体 pMDTM 19-T vector Simple 购自宝生物工程 (大连) 有限公司, pEASY-T1 Simple 购自北京全式金生物技术有限公司。

1.1.2 主要仪器和试剂: Veriti 梯度 PCR 仪 (ABI, 美国), 小型垂直电泳槽 (Bio-rad, 美国), 气相色谱仪 (上海精密科学仪器有限公司分析仪器总厂), 高效液相色谱仪 (岛津, 日本)。DNA 限制性内切酶、DNA marker、蛋白 marker、X-gal 等 (Takara); DNA 聚合酶 (Taqplus)、寡核苷酸 (dNTP) (上海博彩生物科技有限公司); T4 连接酶 (NEB); 少量琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒 (北京庄盟国际生物基因科技有限公司); 辅酶 A, 乙酰乙酰-CoA, 巴豆酰-CoA, 丁酰-CoA 和 NADH (Sigma, 美国)。

基因测序: 上海英骏生物技术有限公司

1.2 目的基因片段的 PCR 扩增

1.2.1 引物: 表 1 是本研究使用的引物, 由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2.2 PCR 扩增: 以 *C. acetobutylicum* ATCC824 基因组为模板, 分别扩增丁醇合成途径关键酶基因 *thil*、*adhE2* 和 *BCS operon*。采用 100 μ L 扩增体系,

扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 52 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2-5 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

Primer name	Primer sequence (5'→3')
thil-1	GGCGCCATGGACATGAGAGATGTAAGTAATA
thil-2	CGGCGTGGACTTACTCTCTTTCAACTACGA
adhE2-1	CGGCGCCATGGAAATGAAAGTTACAAATCA
adhE2-2	CCAGGGATCCGCTAATAATAATGAAGCAAAG
BCS operon-1	GAGCCCATGGTCATGGAACTAAACAATGTC
BCS operon-2	GTCGGAGCTCTGGGGATTCTTGTAAACTTA
Trc-thil-1	ACCTGGATCCGCTGTGCAGGTCGTAATCA
Trc-thil-2	CCGGTGGACTTACTCTCTTTCAACTACGAG
Trc-adhE2-1	TCTAGAGCTCGCTGTGCAGGTCGTAATCA
Trc-adhE2-2	CGCCGATCCGCTAATAATAATGAAGCAAAG

1.3 *BCS operon-adhE2-thil*/pTrc99a/MG1655 (pBAT) 的构建

胶回收纯化的 *thil* 基因经双酶切后插入到 pTrc99a 的 *Nco*I/*Sal*I 酶切位点上得表达质粒 pT; *adhE2* 和 *BCS operon* (*crt-bcd-etfB-etfA-hbd*) 基因分别插入到 pTrc99a 的 *Nco*I/*Bam*HI 和 *Nco*I/*Sac*I 酶切位点上得表达质粒 pA 和 pB。以 pT、pA 质粒为模板, 扩增带有 *trc* 启动子的 *trc-thil* 和 *trc-adhE2* 基因, 分别将两段基因插入到 pB 的 *Bam*HI/*Sal*I 和 *Sac*I/*Bam*HI 酶切位点上得表达质粒 pBT 和 pBA; 最后将 *trc-thil* 和 *trc-adhE2* 基因分别插入到 pBA 和 pBT 质粒中, 从而构建一个包含丁醇合成途径关键酶基因的重组质粒 pBAT (图 1)。双酶切采用 37 $^{\circ}$ C 水浴酶切 6-8 h, 连接条件为 16 $^{\circ}$ C 过夜。将连接产物转化至大肠杆菌 MG1655 感受态细胞中, 菌落经双酶切鉴定后挑取阳性重组子送样测序。

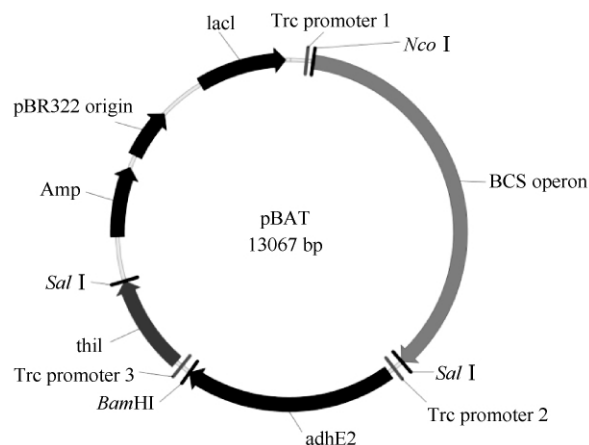


图 1 重组质粒 pBAT

Fig. 1 Recombinant plasmid pBAT.

1.4 重组菌 pT、pA 和 pB 的 IPTG 诱导和蛋白表达

重组菌 pT、pA、pB 在氨苄青霉素的终浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LB 液体培养基中 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 摇床培养 OD_{600} 到 0.4–0.6, 添加终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG 诱导 5 h, 以带有空质粒 pTrc99a 的 MG1655 作为空白对照。收集菌体提取蛋白, 采用 8% 和 12% 的 SDS-PAGE 分析蛋白表达量。总蛋白量浓度测定按照 Bradford 法, 以 BSA 为标准。

1.5 重组菌 pBAT 的关键酶活测定^[13]

重组菌厌氧诱导: 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养 OD_{600} 到 0.4–0.6, 添加终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG, 在厌氧条件下诱导 5 h, 收集菌体, 用缓冲液 (0.1 mol/L Tris-HCl, pH 7.5; 1 mmol/L DTT) 重悬, 采用冰浴超声破碎细胞, 收集上清液。

五个关键酶: 乙酰基转移酶 (THL)、3-羟基丁酰辅酶 A 脱氢酶 (HBD)、3-羟基丁酰辅酶 A 脱水酶 (CRT)、丁酰辅酶 A 脱氢酶 (BCD)、醛醇脱氢酶 (BYDH/BDH) 的酶活测定方法参照文献^[13]。

酶活单位 (U) 定义为: 在上述反应条件下, 每分钟形成 1 mol 产物所需要的酶量为 1 个单位。酶活计算公式: 酶活 (U) = $\frac{\Delta c \times V}{\Delta t} = \frac{\Delta A \times V \times 1000}{\epsilon \times d \times \Delta t}$

$$(1-1)$$

$$\frac{\Delta A}{\Delta t} = [\text{Rate}]_{\text{exp}} - [\text{Rate}]_{\text{con}} \quad (1-2)$$

V: 反应体积, L; ϵ : 摩尔吸光系数, $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; d: 光程, mm; t: 反应时间, min; Rate: 吸光度曲线斜率, min^{-1} ; exp: 实验组; con: 对照组。

本实验关于 5 个酶活测定所用到的摩尔消光系数依次为: 14000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; 6220 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; 6700 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; 6220 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 和 6220 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 。

1.6 重组菌 *E. coli* pBAT 发酵生产丁醇

以重组菌 pBAT 作为发酵菌株, LB 为发酵培养基, 采用好氧、厌氧和微好氧三种方式进行摇瓶发酵试验。

好氧培养: 种子培养基以 1:50 的比例接种到 250 mL 的锥形瓶中, 同时加入氨苄青霉素, 好氧条件摇床培养至 OD_{600} 达到 0.4–0.6, 加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG 诱导剂, 继续培养 30 h, 分析发酵液的成分以及丁醇的产量; 厌氧培养: 好氧阶段同上至 OD_{600} 达到 0.4–0.6, 将菌液转接到 50 mL 密

封的蓝盖瓶中, 加入 IPTG 诱导剂, 液面上方充满 N_2 , 以此建立厌氧环境培养 30 h; 微好氧培养法同前, 但培养体系中不充 N_2 , 建立微好氧环境培养 30 h。

分析方法: 本实验采用高效液相色谱法分析有机酸的含量。采用气相色谱法测定乙醇和丁醇的浓度。

2 结果和讨论

2.1 重组质粒 pBAT 的构建

转化成功的阳性重组子 pT、pA 和 pB 送往上海英骏生物技术有限公司测序, 其结果表明 *thil* 和 *adhE2* 基因序列与标准序列完全一致, *BCS operon* 测序结果与标准序列同源性达到 99.5%。可见克隆的基因片段为正确的目的基因片段。

阳性重组子 pBAT 采用限制性内切酶做酶切鉴定, 其结果如图 2 所示。图 2 中 1–6 号泳道均由 3 条大小约为 9.0 kb、2.8 kb 和 1.4 kb 的 DNA 片段, 分别与 pB 重组质粒、*trc-adhE2* 基因和 *trc-thil* 基因大小相符。表明这 6 株均为构建成功的阳性重组子 pBAT。

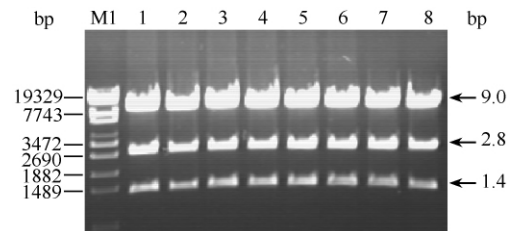


图 2 重组质粒 pBAT 的酶切鉴定

Fig. 2 The identification of pBAT. 1–6: pBAT *SacI* + *BamHI* + *SalI*; M1: λ -EcoT 14 I digest.

2.2 重组菌 pT、pA 和 pB 的蛋白表达

重组菌 pT、pA 和 pB 采用 0.1 mmol/L 的 IPTG、37 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 5 h, 经 SDS-PAGE 后结果如图 3 所示。根据文献报道可知 *thil* 基因编码的乙酰基转移酶 (THL) 有 392 个氨基酸残基, 其蛋白分子量为 44 kDa^[13]。从图 3-A 中可以看出, 1, 2 和 3 号泳道相对比 2 号泳在 44 kDa 处出现明显的蛋白特征带。

而 *adhE2* 基因编码的醛醇脱氢酶 (BYD/HBDH) 是一个双功能酶, 有 858 个氨基酸残基, 其蛋白分子量为 94.4 kDa^[14]。图 3-A 中的 3, 4 和 5 号泳道相对比 4 号泳道最上方有一条蛋白特带, 但分子量大小不明显; 但从图 3-B 可以看出在 97.2

kDa 处出现明显的蛋白特征带。

BCS operon 基因编码 3 个酶和两个电子转移蛋白, 他们分别是 β -羟基丁酰辅酶 A 脱氢酶 (HBD), 282 个氨基酸残基, 分子量为 30.5 kDa; 巴豆酸酶或 β -羟基丁酰辅酶 A 脱水酶 (CRT), 261 个氨基酸残基, 分子量为 28.2 kDa; 丁酰辅酶 A 脱氢酶 (BCD), 379 个氨基酸残基, 分子量约为 40.8 kDa; 电子转移蛋白 *etfA* 有 337 个氨基酸残基, 分子量为 36.1 kDa; 电子转移蛋白 *etfB* 有 260 个氨基酸残基, 分子量为 27.2 kDa^[15]。图 3-A 中 6, 7 和 8 号泳道相比较, 可以看出 6 号泳道在 40 kDa 和 29.0 kDa 两处有明显的不同于 7 和 8 号泳道的蛋白条带, 没有出现 5 处不同于 7 和 8 号泳道的条带, 其原因可能是由于 5 个蛋白分子量都与这两处蛋白分子量大小接近, 故只能看到 2 条明显的条带; 另一原因可能由于这是一个操纵子, 转录成一个多顺反子, 翻译过程中蛋白表达效果随着基因数的增加而减弱, 以致于很难从电泳条带上体现出来。

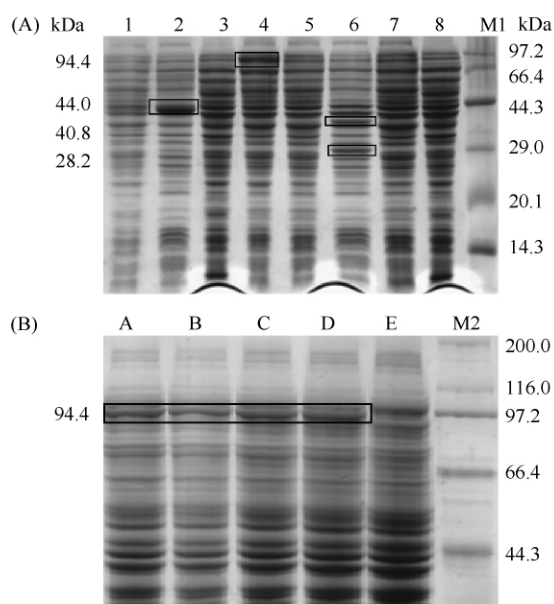


图 3 重组蛋白 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 3 SDS-PAGE electrophoresis. 1: pT-0 mmol IPTG; 2: pT-0.1 mmol IPTG; 3: pT-0.3 mmol IPTG; 4: pA-0.1 mmol IPTG; 5: pA-0 mmol IPTG; 6: pB-0.1 mmol IPTG; 7: pB-0 mmol IPTG; M1: Protein Molecular Weight Marker (low). A-E: pA-0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0 mmol IPTG; M2: Protein Molecular Weight Marker (high).

2.3 酶活测定结果

为了使分析更合理, 本实验采用比酶活 (U/mg protein)。THL、HBD、CRT、BCD、BYD/HBDH 的酶

活测定结果如图 4 所示。

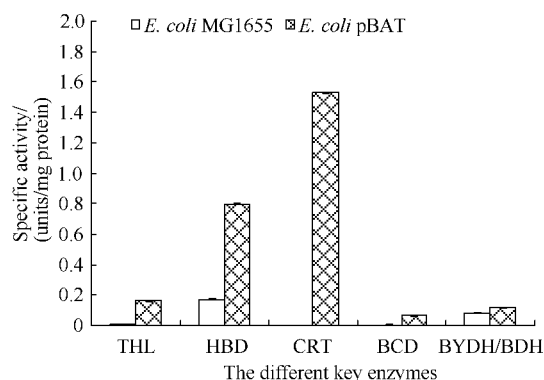


图 4 大肠杆菌 MG1655 和 pBAT 关键酶活

Fig. 4 The key enzyme activities of *E. coli* MG1655 and pBAT.

从图 4 得知, 重组菌中 THL 酶活力达到 0.160 U/mg protein, 与原始菌株相比, 酶活提高了近 30 倍, 乙酰基转移酶是丁醇合成途径的第一个关键酶, 其酶活力高低直接关系到乙酰-CoA 在整个代谢网络中的走向。HBD 酶活力提高了近 5 倍。在重组菌中该酶活没有得到显著提高, 其原因可能是 HBD 的编码基因是 *BCS operon* 上的最后一个基因, 多顺反子在转录翻译过程中随着基因数的增加, 表达效果会减弱。CRT 酶是一个脱水酶, 重组菌中该酶的酶活力达到 1.53 U/mg protein, 其酶活明显高于其他几个酶, 且在出发菌株 MG1655 中没有检测出相关酶的活力。BCD 的酶活力提高了 32 倍。但该检测结果不能反映真实酶活。其原因有以下两个方面: 一为测酶活的底物能被进一步氧化形成丁醛, 紧接着转变为丁醇, 因而 NADH 的损耗并不仅仅是 BCD 酶作用的结果; 二为该酶在空气中易于丧失酶活。重组菌 BYDH/BDH 的酶活力与原始菌株相比, 酶活力没有得到显著提高。

2.4 摇瓶发酵结果

本实验以 LB 培养基作为发酵培养基, 分别采用 3 种不同的培养方式连续培养 30 h, 其中菌体 OD_{600} 和各种发酵液成分如表 2 所示。

从表 2 可知, 以 LB 为发酵培养基, *E. coli* pBAT 在厌氧和微好氧发酵条件下生长速率缓慢, 菌体生长 30 h, OD_{600} 均低于 1.0, 这严重影响产物的生成。其原因可能是宿主菌本身在厌氧环境下生长速率较慢, 且菌体携带了一个较大的重组质粒, 使得菌体代谢负荷加重, 诱导剂的加入在一定程度上也会抑制菌体的生长。

表 2 不同培养方式对菌种在 LB 培养基中生产正丁醇的影响

Table 2 The effects of the different fermentation methods on n-butanol production in LB media.

Growth condition	Cell Density <i>OD</i> ₆₀₀	<i>c</i> (Ethanol) / (mg/L)	<i>c</i> (Butanol) / (mg/L)	<i>c</i> (Formate) / (mg/L)	<i>c</i> (Acetate) / (mg/L)	<i>c</i> (Lactate) / (mg/L)	<i>c</i> (Succinate) / (mg/L)
Aerobic	5.05	14.5	–	–	900.8	–	–
Mico-aerobic	0.85	22.6	84.5	–	729.1	–	527.8
Anaerobic	0.68	12.2	83.1	–	612.1	–	508.2

“–” indicate the amount is less than detectable.

在好氧发酵条件下,丁醇含量未检出,另2种发酵模式均可检测出丁醇的含量,且丁醇含量没有明显的差异,其最大含量为84 mg/L左右。由于丁醇代谢途径的醛醇脱氢酶和丁酰-CoA脱氢酶在好氧条件下会丧失酶活,故在好氧条件下不产生丁醇。此外发酵副产物主要是乙酸和琥珀酸,甲酸和乳酸在发酵过程几乎没有累积。

4 结论

本研究以产丁醇的野生菌株 *C. acetobutylicum* ATCC824 基因组为模板,成功构建了携带丁醇合成途径关键酶基因的重组表达载体 pBAT。并对重组菌进行了 IPTG 诱导和酶活测定,其结果显示各项酶活均有提高。此外以重组菌 *E. coli* pBAT 为发酵菌种,进行摇床培养。采用好氧、微好氧和厌氧三种培养模式,其结果显示好氧培养菌体繁殖较快,但不产丁醇;微好氧和厌氧培养菌体生长缓慢,均能产微量的丁醇,其最高产量约为84 mg/L,副产物主要是乙醇、乙酸和琥珀酸。在后续的工作中,还可进一步通过代谢工程,如敲除大肠杆菌副产物代谢途径,使碳源更多流向丁醇代谢途径;以及构建 NADH 再生途径,以及添加提供 NADH 的辅助碳源来缓解 NADH 供应不足的限制,实现丁醇产量的提高。或者在现有基因工程菌的基础上,对其进行发酵过程优化,实现丁醇高产。现在,合成生物学迅速发展,这也为生物丁醇的高产提供了新的机遇,如加州伯克利大学利用合成生物学的理念,构建出高效的丁醇合成新途径^[16],采用酶化学反应替代了原始的丁醇合成的步骤,达到了丁醇的高产。在上述菌种构建以及代谢工程的基础上,同时结合现代分离技术的应用,进一步实现生物丁醇的工业化。

参考文献

- [1] Ezeji TC, Qureshi N, Blaschek HP. Bioproduction of butanol from biomass: from genes to bioreactors. *Current Opinion in Biotechnology*, 2007, 18(3):220-227.
- [2] Qureshi N, Ezeji TC. Butanol, ‘a superior biofuel’ production from agricultural residues (renewable biomass): recent progress in technology. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2008, 2(4):319-330.
- [3] Mitchell WJ. Physiology of carbohydrate to solvent conversion by clostridia. *Advances in Microbial Physiology*, 1997, 39:31-130.
- [4] Bahl H, Andersch W, Braun K, Gottschalk G. Effect of pH and Butyrate Concentration on the Production of Acetone and Butanol by *Clostridium acetobutylicum* Grown in Continuous Culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1982, 14:17-20.
- [5] Haggstrom L. Acetone-butanol fermentation and its variants. *Biotechnology Advances*, 1985, 3(1):13-28.
- [6] Brown DP, Ganova-Raeva L, Green BD, Wilkinson SR, Young M, Youngman P. Characterization of spo0A homologues in diverse Bacillus and Clostridium species identifies a probable DNA-binding domain. *Molecular Microbiology*, 1994, 14(3):411-426.
- [7] Ravagnani A, Jennert KCB, Steiner E, Grünberg R, Jefferies JR, Wilkinson SR, Young DI, Tidswell EC, Brown DP, Youngman P, Gareth Morris J and Young M. Spo0A directly controls the switch from acid to solvent production in solvent-forming clostridia. *Molecular Microbiology*, 2002, 37(5):1172-1185.
- [8] Bond-Watts BB, Bellerose RJ, Chang MCY. Enzyme mechanism as a kinetic control element for designing synthetic biofuel pathways. *Nature Chemical Biology*, 2011, 7: 222-227.
- [9] Farmer WR, Liao JC. Improving lycopene production in *E. coli* by engineering metabolic control. *Nature Biotechnology*, 2000, 18:533-537.
- [10] Martin VJJ, Pitera DJ, Withers ST, Newman JD, Keasling JD. Engineering a mevalonate pathway in *E. coli* for production of terpenoids. *Nature Biotechnology*, 2003, 21:796-802.
- [11] Causey TB, Shanmugam KT, Yomano LP, Ingram LO. Engineering of *E. coli* for efficient conversion of glucose to pyruvate. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(8): 2235-2240.

- [12] Kim Y , Ingram LO , Shanmugam KT. Construction of an *E. coli* K-12 mutant for homoethanogenic fermentation of glucose or xylose without foreign genes. *Applied and Environmental Microbiology* , 2007 , 73 (6) :1766-1771.
- [13] Wiesenborn DP , Rudolph FB , Papoutsakis ET. Thiolase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and Its Role in the Synthesis of Acids and Solvents. *Applied and Environmental Microbiology* , 1988 , 54 (11) :2717-2722.
- [14] Fontaine L , Meynial-Salles I , Girbal L , Yang XH , Croux C , Soucaille P. Molecular Characterization and Transcriptional Analysis of *adhE2* , the Gene Encoding the NADH-Dependent Aldehyde/Alcohol Dehydrogenase Responsible for Butanol Production in Alcohologenic Cultures of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Journal of Bacteriology* , 2002 , 184 (3) :821-830.
- [15] Boynton ZL , Bennett GN , Rudolph FB. Cloning , Sequencing , and Expression of Clustered Genes Encoding β -Hydroxybutyryl-Coenzyme A (CoA) Dehydrogenase , Crotonase , and Butyryl-CoA Dehydrogenase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Journal of Bacteriology* , 1996 , 178 (11) :3015-3024.
- [16] Bond-Watts BB , Bellerose RJ , Michelle C , Chang Y. Enzyme mechanism as a kinetic control element for designing synthetic biofuels pathways. *Nature chemical biology* , 2011 , 7 : 222-227.

Cloning and expression of key genes of butanol synthetic pathway in *Escherichia coli*

Yan Zhang² , Pengpeng Zhou² , Pixiang Wang² , Jingli Xie^{1,2*} , Qin Ye¹

¹ State Key Laboratory of Bioreactor Engineering , ² Department of Food Science and Technology , School of Biotechnology , East China University of Science & Technology , Shanghai 200237 , China

Abstract: [Objective] We constructed a recombinant *Escherichia coli* strain for butanol production by cloning the cDNA sequence of the key butanol synthetic pathway genes from *Clostridium acetobutylicum* ATCC824. [Methods] We amplified the genes of *thil* , *adhE2* and *BCS operon* by PCR with *C. acetobutylicum* ATCC824 genome as a template. We constructed the recombinant strain *E. coli* pBAT (*BCS operon-adhE2-thil*/pTrc99a/MG1655). We used 0.1 mmol/l Isopropyl beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) to induce the recombinant *E. coli* pBAT for 5 h for recombinant protein expression. We measured acetyl-CoA acetyltransferase (THL) , β -hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase (HBD) , 3-hydroxybutyryl-CoA dehydratase (CRT) , butyryl-CoA dehydrogenase (BCD) and butyraldehyde dehydrogenase (BYDH)/butanol dehydrogenase (BDH) activities in *E. coli* MG1655 and *E. coli* pBAT. The fermentation of *E. coli* pBAT was done in flask in aerobic , micro-aerobic and anaerobic mode separately. [Results] In the recombinant *E. coli* pBAT , THL activity was 0.160 U/mg protein , about 30 times higher than that of *E. coli* MG1655. HBD activity was 5 times higher than that of *E. coli* MG1655. CRT activity was 1.53 U/mg protein whereas not detectable in *E. coli* MG1655. BCD activity was about 32 times higher than that of *E. coli* MG1655. In addition , the results show that n-butanol could be produced under anaerobic and micro-aerobic conditions. The maximum n-butanol concentration of 84 mg/l was detected in cultivation broth. [Conclusion] The key genes of butanol synthetic pathway were expressed in *E. coli* and the recombinant strains would offer an alternative strategy for butanol biosynthesis.

Keywords: *Clostridium acetobutylicum* , *Escherichia coli* , n-butanol , enzyme activities , anaerobic-fermentation

(本文责编:王晋芳)

Corresponding author. Tel/Fax: +86-21-64251803; E-mail: jlxie@ecust.edu.cn

Received: 7 November 2011 / Revised: 2 February 2012