

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55(11):1427-1436; 4 November 2015
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20150118

糖丁基梭菌产丁醇途径在大肠杆菌中的构建及发酵

李金^{1,2}, 韩瑞枝^{1,2}, 许国超^{1,2}, 董晋军^{1,2}, 倪晔^{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

摘要:【目的】通过克隆来源于糖丁基梭菌(*Clostridium saccharobutylicum* DSM13864)丁醇合成途径的关键酶基因(*thlA*, *bcs*-operon 和 *adhE*), 构建产丁醇大肠杆菌。【方法】以 *Clostridium saccharobutylicum* DSM13864 的基因组为模板, 分别扩增丁醇途径关键酶基因 *thlA*, *bcs*-operon(*crt-bcd1-etfB2-fixB2-hbd*) 和 *adhE*, 构建了两个重组质粒 pETDuet-*bcs* 和 pRSFDuet-*thlA-adhE*, 并成功转入 *E. coli* JM109 (DE3) 实现异源表达, 使大肠杆菌具备产丁醇能力。在半厌氧条件下进行重组菌的发酵, 并研究不同培养基对产丁醇的影响。【结果】该重组菌在半厌氧条件下经摇瓶发酵丁醇产量达到 25.4 mg/L, 通过优化培养基后, 在 TB 发酵培养基中丁醇产量可达到 34.1 mg/L。【结论】通过构建重组共表达质粒, 将糖丁基梭菌来源的丁醇途径关键酶基因在大肠杆菌中表达, 成功构建产丁醇大肠杆菌。该研究提供了一株易于操作的丁醇发酵重组大肠杆菌, 避免了传统梭菌发酵丁醇生产中苛刻的厌氧条件、易产孢子等限制问题。

关键词:糖丁基梭菌, 大肠杆菌, 丁醇, 半厌氧发酵

中图分类号: Q935 **文章编号:** 0001-6209(2015)11-1427-10

丁醇(又称正丁醇, *n*-butanol), 是一种无色液体, 能与乙醇、乙醚及其他多种有机溶剂混溶。丁醇是一种重要的大宗化工原料, 用途广泛, 可用于制备多种化工产品前体和酯类衍生物, 也可经氧化生产丁醛和丁酸。此外, 丁醇也是一种新型的可再生能源。近年来, 能源危机和环境问题日益凸显, 寻找可再生能源取代汽油逐渐成为人们关注的焦点。与乙醇相比, 丁醇具备高能量、低挥发性、低污染性以及可混合性等优点, 成为备受关注的新型可再生燃料添加剂。丁醇主要有化学合成和生物发酵两种生产

方法, 其中化学合成法需要以石油来源的丙烯为原料。然而, 随着石油资源逐渐枯竭以及环境问题日益严重, 微生物发酵法越来越受到人们的青睐。传统的发酵法产丁醇主要是运用梭菌属如丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)^[1]、拜氏梭菌(*Clostridium beijerinckii*)^[2]和糖丁基梭菌(*Clostridium saccharobutylicum*)^[3]等微生物自身存在的丙酮-丁醇-乙醇发酵途径(ABE发酵)。但是, 天然产丁醇的梭菌存在如下缺陷: 厌氧培养条件苛刻, 基因操作难度大, 以及发酵后期会出现产孢子现

基金项目:国家自然科学基金(21276112, 31401634); 江苏省自然科学基金(BK20140135, BK20150003)

* 通信作者。Tel: +86-510-85329265; E-mail: yni@jiangnan.edu.cn

作者简介:李金(1989-), 男, 江苏连云港人, 硕士研究生, 发酵工程专业, E-mail: yichengshangjn@126.com

收稿日期:2015-03-19; **修回日期:**2015-04-30

象而终止产丁醇过程^[4]。为此,在遗传背景明确,基因工具成熟的大肠杆菌和酿酒酵母等常用的模式菌株中构建丁醇生产途径逐渐成为人们研究的热点^[5-7]。Inui 等^[8]构建的大肠杆菌重组菌,携带以双 tac 启动子调控表达丙酮丁醇梭菌中丁醇途径相关基因的重组质粒,调整初始菌浓度 OD_{660} 为 20 时进行发酵,其丁醇最高产量达到 1.2 g/L。Nielsen 等^[9]将丙酮丁醇梭菌来源的丁醇途径直接克隆至大肠杆菌中,以多顺反子形式表达后,初始丁醇产量为 34 mg/L,而把途径中各个基因进行单独表达后,丁醇产量达到 200 mg/L,通过引入 NADH 再生途径后,代谢过程的还原力增强,丁醇产量达到 580 mg/L。Shen 等^[10]在构建产丁醇重组大肠杆菌时,也通过提供 NADH 和乙酰辅酶 A 驱动力结合反式-烯酰辅酶 A 还原酶的方法来强化丁醇的生产,最终丁醇产量能达到 30 g/L。Atsumi 等^[11]利用宿主菌大肠杆菌本身的氨基酸合成途径,将其产生的 2-酮酸中间体用于醇类的生产,可以获得 0.016 g/L 丁醇。Bond-Watts 等^[12]引入来自 *R. eutropha* 的外源基因 *phaA* 在大肠杆菌中成功构建了高效的产丁醇系统,能获得 4650 mg/L 的丁醇。国内也有课题组对重组大肠杆菌产丁醇进行了研究^[13-14],张秋妍等^[15]构建的产丁醇重组大肠杆菌,经过 IPTG 浓度优化和支路途径相关基因敲除后,罐上发酵丁醇产量为 1.07 g/L。但这些重组大肠杆菌丁醇产量绝大多数均远低于天然产丁醇梭菌(12 g/L 左右)^[1-3]。目前已报道的产丁醇大肠杆菌或其他产丁醇异源菌的丁醇途径中相关基因均是丙酮丁醇梭菌来源的,因为针对丙酮丁醇梭菌的研究和全基因组测序完成的时间都相对较早,遗传操作系统建立后在分子层面的研究也更加深入。

糖丁基梭菌能利用多种糖质原料如糖蜜,葡萄糖,果糖,木糖等发酵产丁醇,溶剂产量为 20 g/L 左

右,与丙酮丁醇梭菌的产丁醇能力相当。相比于丙酮丁醇梭菌,糖丁基梭菌以前没有进行全基因组测序的研究,遗传信息相对缺乏,因此前期研究主要集中在发酵方式和条件的优化等方面。在本研究室前期工作中,已经完成糖丁基梭菌(*Clostridium saccharobutylicum* DSM13864)的全基因组测序,并提交 GenBank 数据库(登录号:AYXL00000000)。本文主要采用合成生物学的方法,将糖丁基梭菌中产丁醇途径的关键酶基因—硫解酶基因(*thlA*),丁酰辅酶 A 合成操纵子(*bcs-operon*)基因(*crt*, *bcd1*, *etfB2*, *fixB2*, *hbd*)和醛/醇脱氢酶基因(*adhE*)通过 Duet 系列质粒转入 *Escherichia coli* JM109 (DE3) 中异源表达,使大肠杆菌能够生产丁醇,本研究首次将来源于糖丁基梭菌(*Clostridium saccharobutylicum* DSM13864)的丁醇途径在大肠杆菌中成功构建,重组大肠杆菌中丁醇代谢途径如图 1 所示。与丙酮丁醇梭菌内源的丁醇合成途径相比,糖丁基内源的丁醇代谢路径是基本相同的,但是在涉及的几个关键酶上存在一些不同。研究显示醛醇脱氢酶是丁醇合成途径的限速酶,所以在丁醇生产中的作用至关重要^[5]。丙酮丁醇梭菌中存在两个醛醇脱氢酶,分别利用这两个酶参与丁醇合成时丁醇产量有明显不同^[8]。而糖丁基梭菌中只存在一种醛醇脱氢酶,而这种单一酶在丁醇合成途径中作用可能更加专一,更加有利于丁醇的生产。其次,另一个限速酶丁酰 CoA 脱氢酶是厌氧酶,需要两个氧化还原黄素蛋白共同作用。目前已报道的研究中显示丙酮丁醇梭菌中的丁酰 CoA 脱氢酶酶活均较低,糖丁基梭菌内源的丁酰 CoA 脱氢酶的两个氧化还原黄素蛋白与丙酮丁醇梭菌内源的不同,所以本研究拟进一步研究其在丁醇途径中是否能增加丁醇的产量。通过对糖丁基内源的丁醇途径转入大肠杆菌的研究尝试,希望获得一株产丁醇能力更强的重组大肠杆菌。

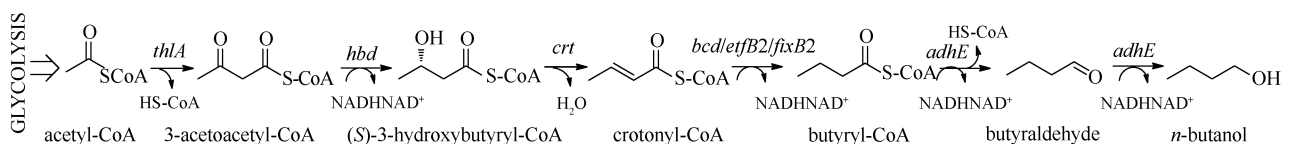


图 1. 重组大肠杆菌中丁醇代谢途径

Figure 1. The butanol-producing metabolic pathway of reconstructed *Escherichia coli*. *thl*: thiolase, *hbd*: 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase, *crt*: crotonase, *bcd*: butyryl-CoA dehydrogenase, *adhE*: butyraldehyde-butanol dehydrogenase.

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

克隆宿主 *E. coli* JM109 和表达宿主 *E. coli* JM109 (DE3) 由本研究室保藏, 糖丁基梭菌 (*Clostridium saccharobutylicum* DSM13864) 购于德国微生物菌种保藏中心, pETDuet-1 和 pRSFDuet-1 质粒购自 Novagen 公司(德国)。

1.2 酶和试剂

限制性内切酶、高保真 DNA 聚合酶 PrimerSTAR[®] HS 和 T4 连接酶等均购自大连宝生物公司, PCR 产物纯化试剂盒和 DNA 胶回收试剂盒购自上海生工生物工程有限公司。其他相关试剂和材料均为国产分析纯。

1.3 培养基和培养条件

1.3.1 大肠杆菌种子培养基: LB 培养基(1 L) (10 g 胰蛋白胨、5 g 酵母提取物、10 g NaCl, 固体培养基则添加 1.5% 琼脂粉)。

1.3.2 发酵培养基: LBG 培养基(1 L) (10 g 胰蛋白胨、5 g 酵母提取物、10 g NaCl、20 g 葡萄糖); TB 培养基(1 L) (12 g 胰蛋白胨、24 g 酵母提取物、2.31 g KH_2PO_4 、12.54 g K_2HPO_4 、20 g 甘油); M9 培养基(1 L)^[7] (6 g Na_2HPO_4 、3 g KH_2PO_4 、0.5 g

NaCl、1 g NH_4Cl 、1 mmol MgSO_4 、10 mg vitamin B1、0.1 mmol CaCl_2 、20 g 葡萄糖、0.027 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.002 g $\text{ZnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、0.15 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.25 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、1.25 mg H_3BO_3)。

1.3.3 培养条件: 将大肠杆菌接种于装有 10 mL LB 液体培养基的 250 mL 三角瓶中, 37 °C, 120 r/min 过夜培养。将培养后的种子液以 1% 的接种量转接 30 mL LB 培养基, 待菌体培养至 OD_{600} 为 1.2–1.5 时, 4 °C、4000 r/min 离心 10 min 收集菌体。然后将收集的菌体重悬于 60 mL 新鲜的 M9 培养基中, 调节 OD_{600} 为 0.8 左右, 再将重悬菌液转移至 100 mL 厌氧培养瓶中, 加入 0.3 mmol/L IPTG (终浓度) 诱导, 30 °C, 90 r/min 进行半厌氧发酵(半厌氧发酵即将培养基转移至厌氧瓶后, 盖上丁基胶塞密封, 厌氧瓶内不用抽真空, 存在一定量的氧气)。各培养基使用前添加相应的抗生素终浓度分别为氨苄青霉素 (Amp, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 卡那霉素 (Kan, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。

1.4 分子生物学操作

实验中采用 BIO-RAD 公司的 PCR 仪进行 PCR 反应。实验中所设计的引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成, 实验中所用到的引物见表 1。基因测序由赛音生物技术(上海)有限公司完成。

表 1. 实验中所用的引物

Table 1. Primers used in this study

Primers	Primer sequences (5'→3')
<i>thlA</i> -BamH I	CGGATCCA ATGAGAGATGTAGTTATTG
<i>thlA</i> -Not I	AAGGAAAAA AGCGGCCG CCTTCTATTTAAACTCTTTCAAC
<i>adhE</i> -Bgl II	GAAGATCTT AAAGAAATGAGAGTTAC
<i>adhE</i> -Xho I	CC CTCGAG CCTGACTTTTATTC
<i>crt</i> -BamH I	CGGATCC AGCAAGTTTAAGGGAG
<i>hbd</i> -Not I	AAGGAAAAA AGCGGCCG TCACATGTACCTTAAGC
<i>crt</i> -Pst I	AA CTGCAG GCAAGTTTAAGGGAGGATCTTAATATG
<i>crt</i> -BamH I	CG GGATCC TTATTTATTTTGGAAATTCCTTTTCGTTC
<i>bcd1</i> -BamH I	CG GGATCC AGGGATTTATATAGTTTTGTTTTATCAATAGGT
<i>bcd1</i> -EcoR I	GGAATTC TCTATTATAAAAATCCTCCCTATCTTAAAATG
<i>etfB2</i> -Hind III	CC AAGCTT CATTTTAAAGATAGGGAGGATTTTATAATG
<i>etfB2</i> -EcoR I	GGAATTC CCCTCTATTATCTTAGATGTAGTGTTTTT
<i>fixB2</i> -Hind III	CC AAGCTT GAAAAACACTACATCTAAGATAATAGGAGG
<i>fixB2</i> -EcoR I	GGAATTC TCTGAAATTATTCAGCACTTATTATTTCTTTAG
<i>hbd</i> -BamH I	CG GGATCC TCTATGGAAAAGATTTTGTACTTGGAG
<i>hbd</i> -EcoR I	GGAATTC TCACATGTACCTTAAGCAATCATATAATT

Underlined bold nucleotides; restriction enzyme recognition sites.

1.5 质粒构建

共表达载体 pETDute-1 和 pRSFDute-1 均携带两个 T7 启动子, 并且分别携带 Amp 和 Kan 抗性。

以 *Clostridium saccharobutylicum* DSM13864 的基因组为模板, 分别 PCR 扩增获得大小为 1.2 kb 的 *thlA* 基因片段 (扩增引物为 *thlA-BamH I* 和 *thlA-Not I*)、大小为 2.6 kb 的 *adhE* (引物为 *adhE-Bgl II* 和 *adhE-Xho I*) 和 4.9 kb 大小的 *bcs*-operon (*crt-bcd1-etfB2-fixB2-hbd*, 扩增引物为 *crt-BamH I* 和 *hbd-Not I*)。

将 *BamH I* 和 *Not I* 双酶切后的 *thlA* 基因片段与同样双酶切后的 pRSFDute-1 质粒通过 T4 连

接酶连接, 构建质粒 pRSFDute-*thlA*。将 *Bgl II* 和 *Xho I* 双酶切后的 *adhE* 基因片段连接至同样双酶切后的重组质粒 pRSFDute-*thlA* 上, 构建质粒 pRSFDute-*thlA-adhE* (p-T-A) (图 2)。将 *BamH I* 和 *Not I* 双酶切后的 *bcs*-operon (*crt-bcd1-etfB2-fixB2-hbd*) 连接至同样双酶切的载体 pETDuet-1 上构建重组质粒 pETDuet-*bcs* (p-C) (图 2)。双酶切反应条件为 37 °C 反应 6–8 h, T4 连接酶条件为 16 °C 过夜连接。连接产物通过热转化法转入大肠杆菌 JM109 感受态细胞, 并涂布于含有相应抗生素的平板上获取转化子, 菌落 PCR 后将阳性转化子测序验证。

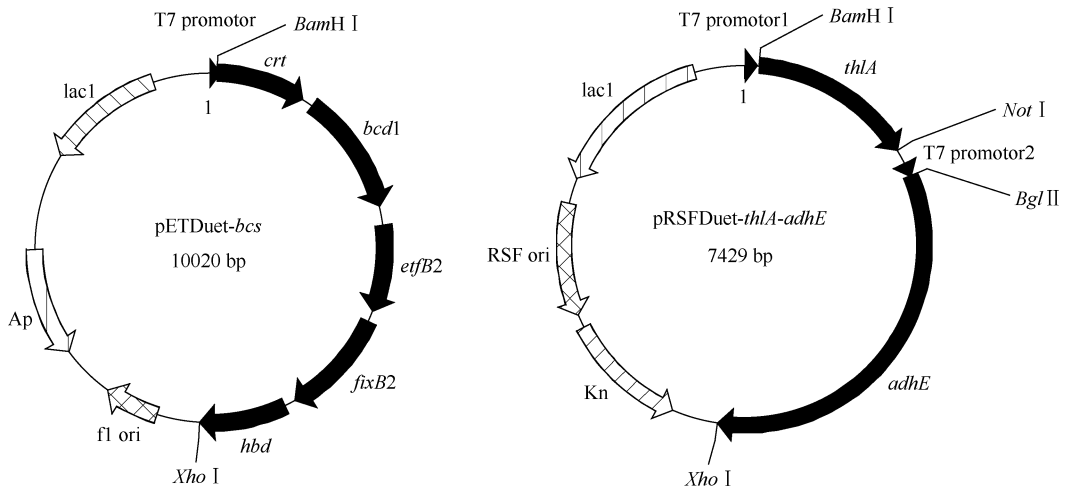


图 2. 重组质粒 pETDuet-*bcs* 和 pRSFDuet-*thlA-adhE* 示意图

Figure 2. Scheme of recombinant plasmids pETDuet-*bcs* and pRSFDuet-*thlA-adhE*.

1.6 分析检测方法

菌体密度采用紫外可见分光光度计 (OD_{600}) 检测。发酵产物采用气相色谱仪 (Varian cp 3900, USA), 色谱柱为 PEG-20M, 检测条件为: 60 °C 保温 0.5 min, 然后以 10 °C/min 的增速至 120 °C 后, 保温 0.5 min, 再 15 °C/min 的增速至 190 °C 后, 保温 1 min。进样器和检测器的温度分别维持在 180 °C 和 210 °C, 进样的体积为 2 μ L。

2 结果和讨论

2.1 质粒的构建

分别将重组质粒 pETDuet-*bcs*, pRSFDuet-*thlA* 和 pRSFDuet-*thlA-adhE* 热转化法转入 *E. coli* JM109, 菌落 PCR 验证后, 挑取阳性转化子提取质粒进行酶

切验证。如图 3-A 所示, 质粒 pRSFDuet-*thlA-adhE* 用内切酶 *BamH I*、*Not I*、*Bgl II* 和 *Xho I* 酶切后分别出现 3.8、2.6 和 1.2 kb 大小的片段 (分别与载体 pRSFDuet-1、*thlA* 和 *adhE* 基因大小相符, 表明重组质粒 pRSFDuet-*thlA-adhE* 构建成功。质粒 pETDuet-*bcs* 分别用 *BamH I* 单酶切和 *BamH I*、*Xho I* 进行双酶切验证, 结果如图 3-B 所示。单酶切结果为一条大小 10 kb 左右的条带, 因为载体 pETDuet-1 (5.1 kb) 和丁酰辅酶 A 合成操纵子基因簇 (4.9 kb) 大小相近, 所以双酶切后其核酸电泳图显示为 2 个基因片段重叠在一起 (图 3-B)。为了验证基因簇中各基因的存在, 以基因簇中单个基因的扩增引物进行 PCR 验证, 由图 3-B 所示, 分别获得大小相符的目的条带 *crt* (810 bp, 扩增引物 *crt-Pst I*, *crt-BamH I*)、*bcd1* (1212 bp, 扩增引物 *bcd1-BamH I*, *bcd1-EcoR I*)、*etfB2*

(818 bp, 扩增引物 *etfB2-Hind III*, *etfB2-EcoR I*)、*fixB2* (1053 bp, 扩增引物 *fixB2-Hind III*, *fixB2-*

EcoR I)、*hbd* (879 bp, 扩增引物 *hbd-BamH I*, *hbd-EcoR I*)。

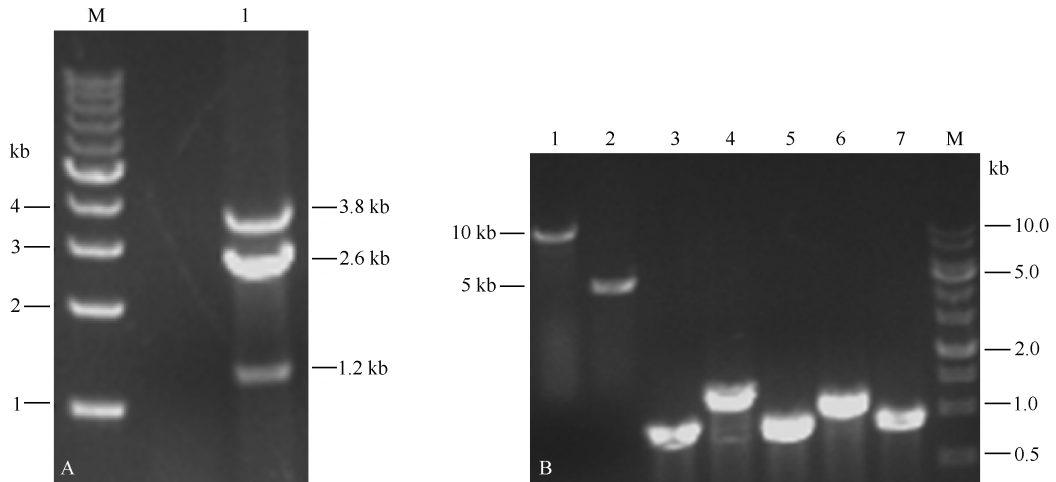


图3. 重组质粒 pRSFDuet-*thlA-adhE* 和 pETDuet-*bcs* 酶切及 PCR 验证图

Figure 3. Verification of the recombinant pRSFDuet-*thlA-adhE* and pETDuet-*bcs* by enzymatic digestion and PCR. A: pRSFDuet-*thlA-adhE* digested by *BamH I*, *Not I*, *Bgl II* and *Xho I*, M: Marker; lane 1: fragments of digested pRSFDuet-*thlA-adhE*; B: Verification of pETDuet-*bcs* by enzymes digestion and PCR identification of each gene in *bcs*-operon, lane 1: plasmid digested by *BamH I*; lane 2: plasmid digested by *BamH I* and *Xho I*; lanes 3-7: PCR products of *crt*, *bcd1*, *etfB2*, *fixB2*, *hbd*; M: Marker.

对酶切验证正确的转化子进行测序,测序结果显示基因 *thlA*、*adhE* 和 *bcs*-operon 的序列与标准基因的核酸序列完全一致,表明扩增连接的基因片段为正确的目的片段。

在选择如何构建重组质粒时,研究者们尝试了不同的构建策略,Inui 等^[8]将丁醇途径相关基因构建于一个质粒上,采用3个 *tac* 启动子,质粒大小为15 kb 左右,Atsumi 等^[7]采用两个携带不同复制起始的质粒,共表达丁醇途径的相关基因。考虑到本研究涉及的基因较多,若将所有基因构建于同一质粒上,重组质粒将会达到14 kb 之多,造成质粒负担过大,且会影响各个基因的表达。所以本研究使用2个共表达质粒 pETDute-1 和 pRSFDute-1 分别表达上述基因,这两个质粒分别含有不同的复制子,都带有两个 T7 强启动子。质粒构建图谱如图2所示,将 *bcs*-operon (5000 bp 左右) 克隆至质粒 pETDute-1 上,将 *thlA* 和 *adhE* 两个基因分别克隆至质粒 pRSFDute-1 的两个 T7 启动子后面。因为醛醇脱氢酶(编码基因为 *adhE*)是丁醇途径的限速酶^[17],所以将 *adhE* 克隆在拷贝数更高的 pRSFDute-1 质粒上,这样更有利于丁醇的生产。

2.2 重组菌的构建

将构建成功的质粒 pRSFDuet-*thlA-adhE* 和 pETDuet-*bcs* 同时热转化至大肠杆菌 JM109 (DE3),涂布于双抗性平板(Amp, Kan),并对长出的转化子进行菌落 PCR 验证,分别获得相应大小的目的条带,成功构建携带 pRSFDuet-*thlA-adhE* 和 pETDuet-*bcs* 质粒的大肠杆菌 JM109 (DE3) (命名为 *E. coli* BUT1)。到目前为止,在非丁醇生产菌株中构建的丁醇途径均为来源于丙酮丁醇梭菌 (*Clostridium acetobutylicum* ATCC824),而本研究是首次将来源于糖丁基梭菌 (*Clostridium saccharobutylicum* DSM13864) 的丁醇途径在大肠杆菌中的成功构建。

2.3 重组 *E. coli* BUT1 发酵产丁醇

以 M9 为发酵培养基,发酵方式采用先好氧发酵培养菌体,然后收集菌体后添加诱导剂进行半厌氧发酵。其中好氧发酵过程中未检测到丁醇产量,而重组菌在半厌氧发酵过程中开始生产丁醇。如图4所示,在发酵初期(15 h 内),丁醇产生速率较慢, *E. coli* BUT1 主要进行生长和丁醇合成酶的表达,随着半厌氧发酵进入中期(15-25 h),丁醇生产速率增快,发酵25 h 后丁醇产量达到约17 mg/L。之

后丁醇生产速率开始减缓,在 65 h 时达到最高产量(约 25.4 mg/L),继续延长发酵时间丁醇产量不再增加。

由于重组质粒和发酵方式的不同,最终获得的丁醇产量也不同。与本研究采用类似质粒构建方法和发酵方式的丙酮丁醇梭菌来源丁醇途径在大肠杆菌中的丁醇产量为 18.5 – 30.0 mg/L^[9,16],本实验中糖丁基梭菌内源的丁醇途径导入未修饰的大肠杆菌后丁醇产量为 25.4 mg/L,与已报道的 Inui 等^[8]获得的最高产量为 1.2 g/L 还有一定的差距,该报道中,Inui 等构建的大肠杆菌重组菌,携带以双 tac 启动子调控表达丙酮丁醇梭菌中丁醇途径相关基因的重组质粒,调整初始菌浓度 OD_{660} 为 20 时进行类似于高浓度发酵的方式发酵,最终获得 1.2 g/L 的丁醇。分析丁醇产量较低的原因可能是由于大肠杆菌中支路途经的干扰和发酵方式的原因导致丁醇产量低,因此通过后后期实验进行代谢支路敲除可以避免碳源的消耗,同时因为丁醇合成途径中涉及到的关键酶均为辅酶,反应需要大量的还原力,所以在丁醇合成体系中构建 NADH 回补途径等方法,可以为反应提供所需还原力,能进一步提高最终大肠杆菌中丁醇的产量。

对发酵产物进行气相色谱分析,结果如图 5 所示,发现 *E. coli* BUT1 的发酵产物中除丁醇(出峰时间 2.49 min)外,还有乙醇(1.44 min)、乙酸

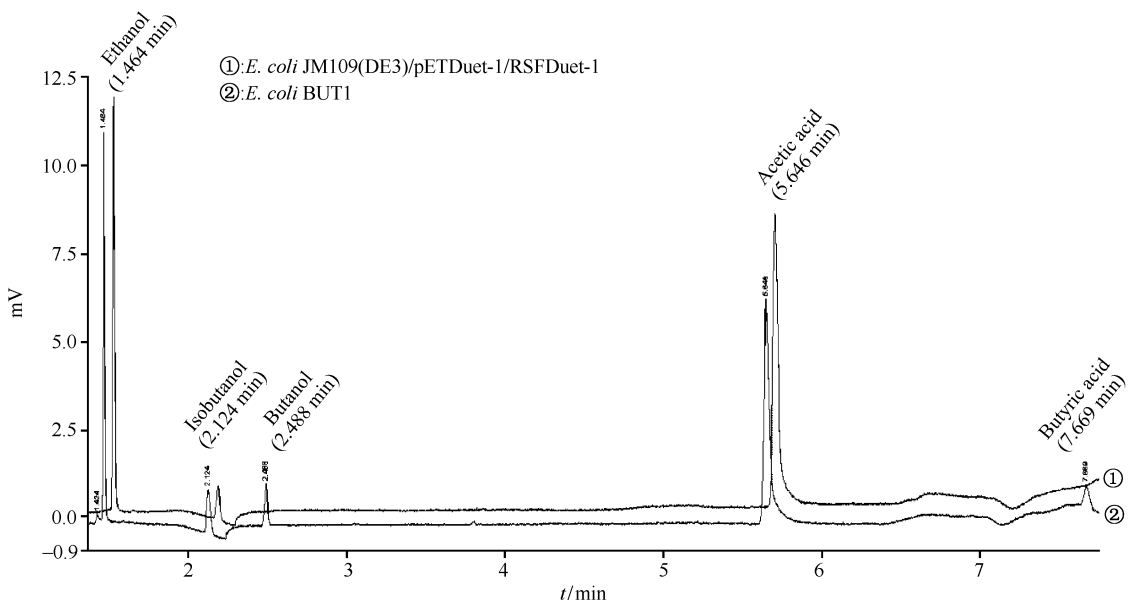


图 5. 发酵产物气相色谱检测图

Figure 5. GC spectra of the fermentation broth of *E. coli* BUT1 and *E. coli* JM109(DE3)/pETDuet-1/pRFSFDuet-1.

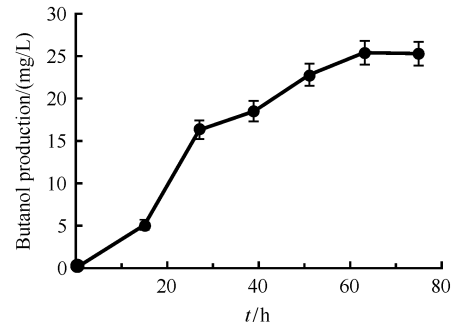


图 4. *E. coli* BUT1 半厌氧发酵产丁醇

Figure 4. Curve of the butanol production by *E. coli* BUT1 in semi-anaerobic fermentation.

(5.65 min) 和丁酸(7.67 min)等物质的生成,各产物浓度如表 2 所示,含有空质粒的空白对照组(*E. coli* JM109(DE3)/pETDuet-1/pRFSFDuet-1)中也存在乙醇、乙酸的生成,说明该重组菌在生产丁醇的同时,还伴随着其他副产物的生成,这些物质主要来源于 *E. coli* JM109(DE3)自身代谢产物。空白对照组在 2.49 min 和 7.67 min 处没有丁醇峰和丁酸峰被检出,说明 *E. coli* JM109(DE3)自身并不能进行丁醇的生产,而将丁醇途径引入后产生了一定量的丁醇,同时也有一些丁酸生成,这与文献^[7-8]报道相符,而有的研究报道中存在的丁二酸等副产物在本研究中没有检测到。

2.4 培养基对 *E. coli* BUT1 发酵产丁醇的影响

为了提高 *E. coli* BUT1 发酵生产丁醇的产量,

本文对发酵培养基进行了优化。以重组 *E. coli* BUT1 为发酵菌株, 分别使用 LBG、TB 和 M9 3 种培养基进行丁醇发酵实验, 发酵结果如图 6 所示。分别以 LBG、TB 和 M9 3 种培养基作为发酵培养基, 半厌氧发酵 60 h 后, 丁醇产量分别达到 19.8、34.1 和 25.4 mg/L。比较 LBG 和 TB 及 M9 培养基的发酵结果可知, 甘油比葡萄糖更有利于 *E. coli* BUT1 生

产丁醇。因为相比于甘油, 葡萄糖更容易被其他代谢途径利用, 会导致碳源的流失^[7]。与 M9 相比, TB 培养基中具有更加丰富的有机氮源, 而丁醇产量也由 25.4 mg/L 提高至 34.1 mg/L, 说明有机氮源更容易被菌体利用, 在一定程度上有利于丁醇的生产。由此可见采用 TB 培养基更有利于 *E. coli* BUT1 发酵生产丁醇。

表 2. 大肠杆菌 BUT1 和对照菌的发酵产物浓度

Table 2. Concentration of fermentates of BUT1 and control strain

Fermentation strain	<i>c</i> (Ethanol)/(mg/L)	<i>c</i> (Acetic acid)/(mg/L)	<i>c</i> (Butanol)/(mg/L)	<i>c</i> (Butyric acid)/(mg/L)	<i>c</i> (Succinic acid)/(mg/L)
<i>E. coli</i> BUT1	43.5 ± 1.2	501.1 ± 2.5	25.4 ± 0.8	20.5 ± 0.7	-
Control	42.5 ± 1.4	523.6 ± 2.3	-	-	-

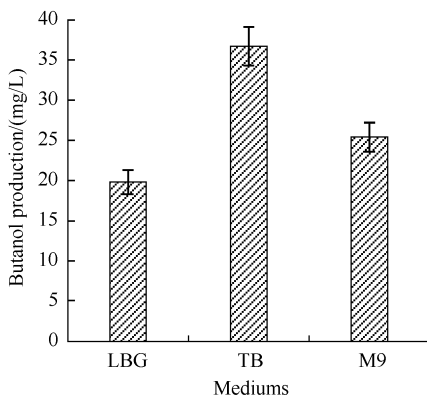


图 6. *E. coli* BUT1 在不同发酵培养基中的丁醇的产量

Figure 6. Butanol production of *E. coli* BUT1 in three different fermentation media.

为了进一步研究发酵过程中重组菌的生长情况, 实验中检测了采用不同培养基和不同发酵方式

时生物量的积累情况, 具体结果如表 3 所示。

如表 3 所示, 在好氧条件下, 目的菌大肠杆菌 BUT1 和宿主菌大肠杆菌 JM109 (DE3) 的生长相比有差异, 其中目的菌达到稳定期的时间更晚且菌浓更低, 原因是目的菌中携带 2 个质粒, 菌体负担比较大, 且培养基中两种抗生素 (Amp, Kan) 也对菌体的生长有影响。而在半厌氧条件下, 不管是宿主菌还是目的菌, 因为氧气的不足, 菌体都只是有少量的生长, 目的菌和宿主菌的生长差异不大, 但是菌浓度和达到稳定期的时间与好氧状态下相比都明显受到不利影响。而半厌氧条件下, 目的菌在三种培养基中的生长没有太大明显的差异, 菌浓度 OD_{600} 从初始的 0.8 左右经过 25 h 左右半厌氧培养达到 1.6 左右, 这也说明 TB 培养基中丁醇产量更高的原因更主要是由于碳源和氮源的影响, 而不是因为在 TB 培养基中生物量积累的更多造成的。

表 3. 大肠杆菌 BUT1 和 JM109 (DE3) 在不同发酵培养基和发酵方式下的菌体浓度

Table 3. Cell density of *E. coli* BUT1 and JM109 (DE3) in different media and fermentation methods

Fermentation condition	<i>E. coli</i>	Initial OD_{600}	Max OD_{600}	<i>t</i> /h*
Aerobic	JM109 (DE3)	0	5.34 ± 0.09	8
	BUT1	0	3.84 ± 0.11	10
Semi-anaerobic	JM109 (DE3)	0.75	2.01 ± 0.05	18
	BUT1 (LB)	0.79	1.56 ± 0.04	26
	BUT1 (M9)	0.81	1.61 ± 0.04	26
	BUT1 (TB)	0.78	1.58 ± 0.06	24

*: Time required from inoculation to stationary phase.

2.5 半厌氧和严格厌氧的发酵比较

通过在半厌氧发酵的基础上, 将密封的厌氧瓶

上部空气抽真空, 并通入二氧化碳, 使发酵条件达到严格的厌氧条件, 以 TB 为培养基, 比较两种发酵方

式下的丁醇生产能力,结果如图7所示。重组菌在半厌氧和严格厌氧状态下丁醇的最终产量几乎没有差距,都是24 g/L左右,这也与已报道的文献中结果一致^[13],因为严格厌氧对操作条件要求更加高,而产量却和半厌氧条件下的相当,所以后期实验都是在半厌氧条件下进行。

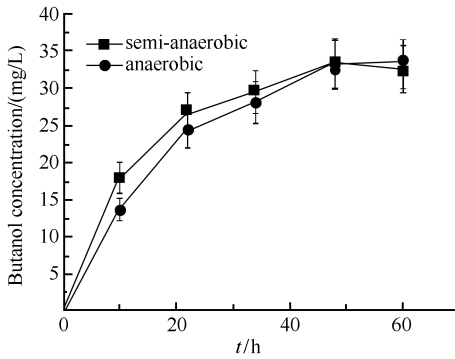


图7. 半厌氧和严格厌氧条件下丁醇的发酵产量

Figure 7. Butanol production under aerobic and semi-aerobic condition.

除了优化发酵培养基等条件来提高丁醇的产量外,还可以选择多种策略来进行大肠杆菌产丁醇能力的强化。因为丁醇对细胞有一定的生理毒性,所以提高大肠杆菌的丁醇耐受性也成为近年来的研究热点^[17]。由于来源于梭菌丁醇途径的相关酶在大肠杆菌中表达量不高,且在已报道的文章和本实验研究中,发酵液中均检测到存在乙醇、乙酸和丁酸等多种副产物,副产物的存在对产丁醇途径形成竞争,导致丁醇途径的代谢流被大大减弱,所以通过敲除一些对细胞生长没有太大影响的支路关键酶基因^[18],可以在一定程度上解决支路的干扰^[9]。同时通过改造大肠杆菌中已存在的途径使之获得产丁醇能力的研究也很多,如通过 β -氧化反转途径即利用大肠杆菌的脂肪代谢中间产物丁酰辅酶A生产丁醇的代谢通路等研究手段也被越来越多的采取^[19]。在丁醇途径中利用非梭菌来源的外源酶替代丁醇途径中的一些限速酶,可以解除一些因代谢过程中酶本身带来的一些限制因素^[12]。与本研究质粒构建策略和发酵方式相似的研究报道中丁醇产量为18.5–30.0 mg/L,本研究经过初步发酵优化后丁醇产量为34.1 mg/L与之相比较,存在一定的竞争力,所以通过后期的进一步研究深入,采用上述研究策略例如代谢支路途径敲除及NADH回补等方法,提高来

源于糖丁基梭菌的丁醇途径重组大肠杆菌的丁醇产量。虽然根据目前国内外的相关研究显示,绝大部分构建的丁醇异源生产菌的产量都远低于天然产丁醇梭菌(12 g/L左右),现阶段重组大肠杆菌和天然梭菌在丁醇生产上相比还未有明显优势,但是因为遗传背景的明确和基因操作工具的成熟,通过以上的改造策略,大肠杆菌在丁醇生产中具有广阔的前景,随着研究的深入以及各种生物工程以及代谢工程的发展,大肠杆菌一定会在丁醇的发酵生产中扮演重要角色,为生物丁醇的工业化生产提供巨大的推动力。

3 结论

本研究将糖丁基梭菌来源的丁醇途径首次克隆于大肠杆菌中并实现丁醇生产,是对构建携带该丁醇途径的重组大肠杆菌的初步探索。基于两个共表达质粒载体(pRSFDute-1和pETDuet-1)成功构建了携带有糖丁基梭菌(*Clostridium saccharobutylicum* DSM13864)丁醇合成途径关键酶基因的重组质粒pETDuet-*bcs*和pRSFDuet-*thlA-adhE*。将这两个重组质粒转化入大肠杆菌JM109(DE3),构建了重组大肠杆菌BUT1,并实现了糖丁基梭菌丁醇途径在大肠杆菌中的成功表达。在半厌氧发酵条件下重组菌BUT1发酵65 h,丁醇产量达到25.4 mg/L。对发酵培养基进行了优化后,当以TB为发酵培养基时丁醇产量最高,可达34.1 mg/L。

参考文献

- [1] Survase SA, van Heiningen A, Granstrom T. Continuous bio-catalytic conversion of sugar mixture to acetone-butanol-ethanol by immobilized *Clostridium acetobutylicum* DSM 792. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93(6): 2309-2316.
- [2] Qureshi N, Ezeji TC, Ebener J, Dien BS, Cotta MA, Blaschek HP. Butanol production by *Clostridium beijerinckii*. Part I: use of acid and enzyme hydrolyzed corn fiber. *Bioresource Technology*, 2008, 99(13): 5915-5922.
- [3] Ni Y, Xia ZY, Wang Y, Sun ZH. Continuous butanol fermentation from inexpensive sugar-based feedstocks by *Clostridium saccharobutylicum* DSM 13864. *Bioresource Technology*, 2013, 129: 680-685.
- [4] Ravagnani A, Jennert KCB, Steiner E, Grünberg R,

- Jefferies JR, Wilkinson SR, Young DI, Tidswell EC, Brown DP, Youngman P, Morris JG, Young M. Spo0A directly controls the switch from acid to solvent production in solvent-forming *Clostridia*. *Molecular Microbiology*, 2000, 37(5): 1172-1185.
- [5] Steen EJ, Chan R, Prasad N, Myers S, Petzold CJ, Redding A, Ouellet M, Keasling JD. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of *n*-butanol. *Microbial Cell Factories*, 2008, 7(1): 36.
- [6] Berezina OV, Zakharova NV, Brandt A, Yarotsky SV, Schwarz WH, Zverlov VV. Reconstructing the clostridial *n*-butanol metabolic pathway in *Lactobacillus brevis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87(2): 635-646.
- [7] Atsumi S, Cann AF, Connor MR, Shen CR, Smith KM, Brynildsen MP, Chou KJY, Hanai T, Liao JC. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol production. *Metabolic Engineering*, 2008, 10(6): 305-311.
- [8] Inui M, Suda M, Kimura S, Yasuda K, Suzuki H, Toda H, Yamamoto S, Okino S, Suzuki N, Yukawa H. Expression of *Clostridium acetobutylicum* butanol synthetic genes in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 77(6): 1305-1316.
- [9] Nielsen DR, Leonard E, Yoon SH, Tseng HC, Yuan C, Prather KL. Engineering alternative butanol production platforms in heterologous bacteria. *Metabolic Engineering*, 2009, 11(4/5): 262-273.
- [10] Shen CR, Lan EI, Dekishima Y, Baez A, Cho KM, Liao JC. Driving forces enable high-titer anaerobic 1-butanol synthesis in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(9): 2905-2915.
- [11] Atsumi S, Hanai T, Liao JC. Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels. *Nature*, 2008, 451(7174): 86-89.
- [12] Bond-Watts BB, Bellerose RJ, Chang MCY. Enzyme mechanism as a kinetic control element for designing synthetic biofuel pathways. *Nature Chemical Biology*, 2011, 7(4): 222-227.
- [13] Zhang Y, Zhou PP, Wang PX, Xie JL, Ye Q. Cloning and expression of key genes of butanol synthetic pathway in *Escherichia coli*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(5): 588-593. (in Chinese)
- 张艳, 周鹏鹏, 王丕祥, 谢静莉, 叶勤. 丁醇合成途径关键酶基因在大肠杆菌中的克隆和表达. *微生物学报*, 2012, 52(5): 588-593.
- [14] Tang W, Li J, Chen J, Yang S. Butanol pathway construction and promoter optimization in *Escherichia coli*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2012, 28(11): 1328-1336. (in Chinese)
- 唐玮, 李键, 陈军, 杨晟. 大肠杆菌异源生产丁醇途径组装及启动子优化. *生物工程学报*, 2012, 28(11): 1328-1336.
- [15] Zhang QY, Guo T, Du TF, Tang Y, He AY, Jiang M. Expression of *Clostridium acetobutylicum* butanol synthetic genes in *Escherichia coli* for butanol production. *Journal of Nanjing University of Technology (Natural Science Edition)*, 2012, 34(4): 118-122. (in Chinese)
- 张秋妍, 郭亭, 杜腾飞, 汤艳, 贺爱永, 姜岷. 产丁醇重组大肠杆菌的构建及初步发酵. *南京工业大学学报(自然科学版)*, 2012, 34(4): 118-122.
- [16] Zhou PP, Zhang Y, Wang PX, Xie JL, Ye Q. Butanol production from glycerol by recombinant *Escherichia coli*. *Annals of Microbiology*, 2014, 64(1): 219-227.
- [17] Knoshaug EP, Zhang M. Butanol tolerance in a selection of microorganisms. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2009, 153(1/3): 13-20.
- [18] Yan YL, Liu HJ, Zhang JA. Application and research progress of metabolic engineering in butanol production. *Modern Chemical Industry*, 2012, 32(4): 25-29. (in Chinese)
- 闫永亮, 刘宏娟, 张建安. 代谢工程在生物丁醇生产中的应用及研究进展. *现代化工*, 2012, 32(4): 25-29.
- [19] Dai ZJ, Dong HJ, Zhu Y, Zhang YP, Li Y. Metabolic engineering for biobutanol production: a review. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2013, 11(2): 58-64. (in Chinese)
- 戴宗杰, 董红军, 朱岩, 张延平, 李寅. 生物丁醇代谢工程的研究进展. *生物加工过程*, 2013, 11(2): 58-64.

Construction of butanol-producing pathway from *Clostridium saccharobutylicum* in *Escherichia coli* JM109 (DE3) and its fermentation

Jin Li^{1,2}, Ruizhi Han^{1,2}, Guochao Xu^{1,2}, Jinjun Dong^{1,2}, Ye Ni^{1,2*}

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

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

Abstract: [**Objective**] Several key genes (*thlA*, *bcs*-operon/*crt-bcd1-etfB2-fixB2-hbd* and *adhE*) in butanol pathway from *Clostridium saccharobutylicum* DSM13864 were cloned, and a butanol-producing *Escherichia coli* strain was successfully constructed. [**Methods**] Using genome of *Clostridium saccharobutylicum* DSM13864 as template, the key genes in butanol synthesis pathway were amplified, the recombinant plasmids pETDuet-*bcs* and pRSFDuet-*thlA-adhE* were constructed. Then the resultant plasmids were transformed into *E. coli* JM109(DE3) to obtain *E. coli* BUT1 for butanol production, under the semi-anaerobic condition. Effects of different mediums on butanol production were studied. [**Results**] The recombinant *E. coli* was capable of producing butanol (25.4 mg/L) under semi-anaerobic fermentation. After optimization on the fermentation medium, butanol titer reached 34.1 mg/L. [**Conclusion**] Butanol production by recombinant *E. coli* harboring exogenous butanol-producing pathway from *Clostridium saccharobutylicum* provides a feasible solution to overcome the hurdles in traditional butanol production approach by *Clostridia*.

Keywords: *Clostridium saccharobutylicum*, *Escherichia coli* JM109(DE3), butanol, semi-anaerobic fermentation

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (21276112, 31401634), by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20140135, BK20150003)

* Corresponding author. Tel: +86-510-85329265; E-mail: yni@jiangnan.edu.cn

Received: 19 March 2015/Revised: 30 April 2015