



## 克氏梭菌硫解酶的鉴定及其功能研究

杨娇<sup>1</sup>, 任聪<sup>1,2</sup>, 徐岩<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>江南大学生物工程学院, 酿酒科学与酶技术研究中心, 江苏 无锡 214122

<sup>2</sup>江南大学教育部工业生物技术重点实验室, 江苏 无锡 214122

**摘要:**【目的】硫解酶是梭菌属微生物合成短中链脂肪酸的关键酶。克氏梭菌(*Clostridium kluyveri*)具有 3 个高度同源的硫解酶编码基因, 对这 3 个基因的功能鉴定是解析克氏梭菌高己酸合成能力的关键。【方法】通过发酵动力学分析确定克氏梭菌的己酸和丁酸生成动力学特征; 转录组测序结合反转录-荧光定量 RCR 分析克氏梭菌 3 个硫解酶编码基因的表达水平和时序表达特征; 在大肠杆菌中异源表达这 3 个硫解酶, 并对其硫解酶动力学参数进行测定。【结果】克氏梭菌生成丁酸、己酸、辛酸, 其中己酸为主要代谢产物; 转录组数据显示, 在乙酸消耗完全之前, *thlA1* 基因维持恒定表达, *thlA2* 基因表达时序上调, *thlA3* 基因表达时序下调, 转录组测序表明 3 个硫解酶编码基因均具有较高水平的转录活性, *thlA2* 和 *thlA3* 的最高表达量分别约为 *thlA1* 的 29% 和 43%; 硫解酶动力学参数测定结果表明, 克氏梭菌 3 个硫解酶对于四碳底物均显示出相似的底物亲和力( $K_m$ ), 但 ThlA1 对四碳底物的催化效率( $k_{cat}/K_m$ )略低于 ThlA2 和 ThlA3。【结论】克氏梭菌的 3 个硫解酶均具有催化活性, 在克氏梭菌体内均呈活跃表达, 表明克氏梭菌拥有 3 个具有催化活性的硫解酶, 这为后续深入研究克氏梭菌己酸合成机理奠定了基础。

**关键词:** 克氏梭菌, 己酸, 硫解酶, 转录组

正己酸(Hexanoate, 下文简称己酸)是含有 6 个碳的直链脂肪酸, 具有奶酪香, 天然存在于动物脂肪、白酒、奶酪和香草中。己酸及其酯类因具有特殊的风味, 被广泛用于食品和香精行业, 是重要的食品添加剂。己酸还具有抑制病原菌、改善肠道微生物菌群、促进动物生长和增强动物免疫的作用, 可替代部分抗生素的使用, 其在动物

养殖方面得到越来越多的研究和应用<sup>[1]</sup>。此外, 包括己酸在内的中链脂肪酸在水相中溶解度较低、易于分离纯化, 是潜在的生物燃料中间体<sup>[2]</sup>。

当前己酸主要通过化学合成, 传统工艺采用硝酸氧化仲辛醇进行制备, 该方法转化率较高、成本低廉, 但也存在选择性不佳、环境污染较重等问题<sup>[3]</sup>。生物发酵法有望被用于食品级己酸的

基金项目: 国家自然科学基金(21706097, 31530055)

\*通信作者。Tel: +86-510-85918201; E-mail: yxu@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2018-02-09; 修回日期: 2018-05-04; 网络出版日期: 2018-05-21

合成。然而, 由于天然的己酸菌来源有限, 现有菌株发酵产生的己酸浓度和生产强度均不够高, 目前鲜有采用发酵法进行己酸生产, 菌株筛选和己酸合成途径的工程化改造仍然是目前己酸绿色生物合成的重点研究方向。

目前已发现的产己酸微生物菌株有克氏梭菌 (*Clostridium kluyveri*)<sup>[4]</sup>、埃氏巨球形菌 (*Megasphaera elsdenii* T81)<sup>[5]</sup>、半乳糖己酸菌 (*Caproiciproducens galactitolivorans*)<sup>[6]</sup>、瘤胃菌 CPB6 菌株 (*Ruminococcaceae* sp. CPB6)<sup>[7]</sup>等(表 1)。不同于其他类型的己酸菌, 克氏梭菌的底物利用谱非常有限, 不能利用葡萄糖或其他糖类, 以醇(乙醇、丙醇)和酸(乙酸、丁酸、琥珀酸)为底物进行丁酸、戊酸和己酸等短中链脂肪酸的合成<sup>[8]</sup>。克氏梭菌的最适碳源为乙醇和乙酸, 己酸为主要代谢产物, 同时生成少量的丁酸, 己酸/丁酸比例受到乙醇/乙酸比例的影响<sup>[9]</sup>。虽然克氏梭菌的代谢特征研究已逾 80 余年<sup>[4]</sup>, 但至今尚缺乏对该菌进行遗传操作的方法, 其己酸合成途径尚未得以完全解析。

目前的研究表明, 细菌合成己酸和丁酸主要通过逆向  $\beta$ -氧化(reversal of the  $\beta$ -oxidation)途径进行, 该途径被用于碳链的延长。以丁酸的合成为例, 该途径的酶系包括硫解酶(Thl: thiolase, 又称乙酰辅酶 A 乙酰转移酶)、3-羟基丁酰辅酶 A 脱氢酶(Hbd: 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase)、3-

羟基丁酰辅酶 A 脱水酶(Crt: 3-hydroxybutyryl-CoA dehydratase)、丁酰辅酶 A 脱氢酶复合物(Bcd/EtfAB: butyryl-CoA dehydrogenase complex)、辅酶 A 转移酶(Cat: CoA transferases)。硫解酶催化了逆向  $\beta$ -氧化合成的第一步反应, 即将酰基辅酶 A 与乙酰辅酶 A 进行缩合, 形成一分子 3-酮酰基辅酶 A, 延长一个二碳单位, 图 1 为基于酶促反应推导的克氏梭菌合成丁酸和己酸的代谢途径。

克氏梭菌具有 3 个硫解酶编码基因(*thlA1*, CKL\_3696; *thlA2*, CKL\_3697; *thlA3*, CKL\_3698), 多于其他产酸梭菌(丙酮丁醇梭菌 2 个, 拜式梭菌 2 个, 丁酸梭菌 2 个, 酪丁酸梭菌 1 个)。序列比对分析表明 ThlA2 与 ThlA3 蛋白序列同一性(identity)为 90%, ThlA1 与 ThlA2/ThlA3 的同一性为 81%, 这 3 个硫解酶与丙酮丁醇梭菌硫解酶的蛋白同一性在 75%以上(图 2)。可见克氏梭菌 3 个硫解酶高度同源, 且与丁酸合成菌株的硫解酶在蛋白质一级结构水平具有显著区别。从基因组织结构上来看, 克氏梭菌 3 个硫解酶编码基因 *thlA1*、*thlA2* 和 *thlA3* 的编码方向一致, 3 个基因上游非翻译区(5'UTR)长度分别为 880、796、182 bp, 这 3 个基因存在分别转录的可能性(图 2)。虽然硫解酶在梭菌纲微生物中较为常见, 大部分梭菌合成丁酸的效率较高, 但合成己酸的梭菌并不多见, 因此我们推测克氏梭菌中的硫解酶具有不同于丁酸合成菌硫解酶的底物催化能力。这 3 个硫解酶

表 1. 已报道的己酸菌  
Table 1. Reported Hexanoate-producing strains

Strains	Substrate	Source and reference
<i>Clostridium kluyveri</i> N6	Ethanol, acetate	Pit mud, China <sup>[10]</sup>
<i>Clostridium kluyveri</i> 3231B	Ethanol, acetate	Bovine rumen, USA <sup>[11]</sup>
<i>Ruminococcaceae</i> sp. CPB6	Lactate	Pit mud, China <sup>[7]</sup>
<i>Megasphaera elsdenii</i> T81	Glucose, lactate	Bovine rumen, USA <sup>[5]</sup>
<i>Caproiciproducens galactitolivoran</i> BS-1	D-galactitol	Anaerobic digester, South Korea <sup>[12]</sup>

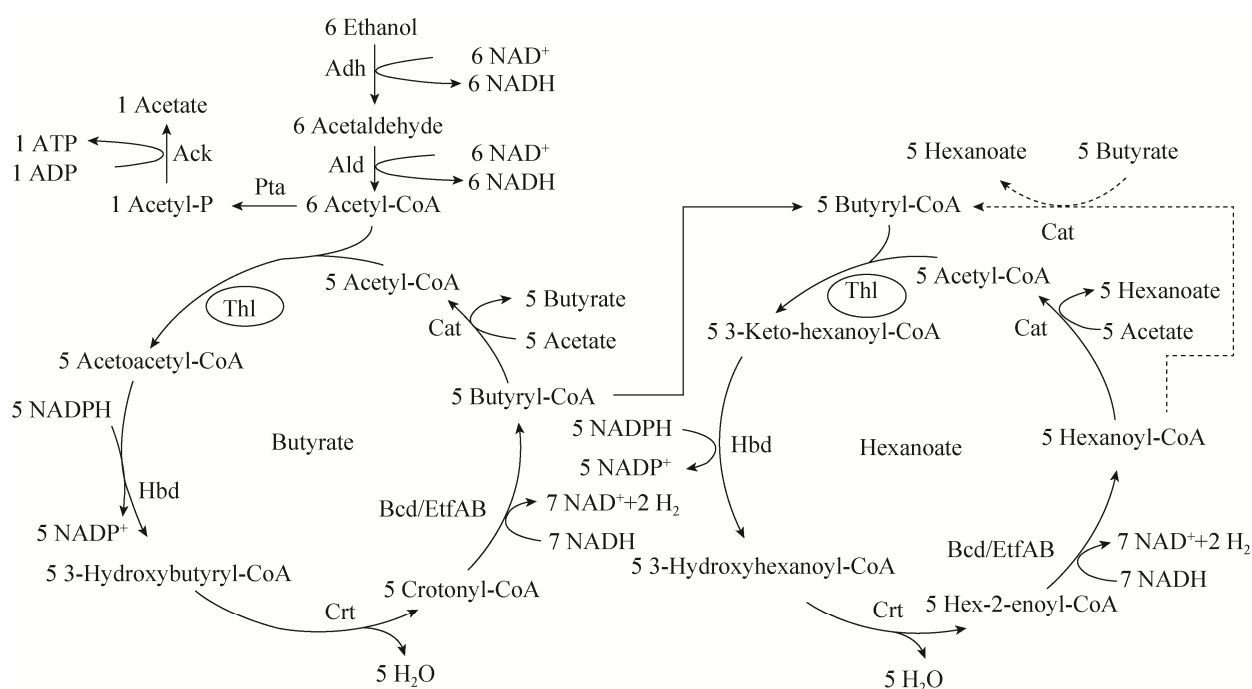


图 1. 克氏梭菌合成丁酸和己酸的代谢途径

Figure 1. The metabolic pathways for butyrate and hexanoate synthesis in *Clostridium kluyveri*. Adh: ethanol dehydrogenase; Ald: acetaldehyde dehydrogenase; Ack: acetate kinase; Pta: phosphotransacetylase; Thl: thiolase (acetyl-coenzyme A acetyltransferases); Hbd: 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase; Crt: 3-hydroxybutyryl-CoA dehydratase; Bcd/EtfAB: butyryl-CoA dehydrogenase complex; Cat: coenzyme A transferase.

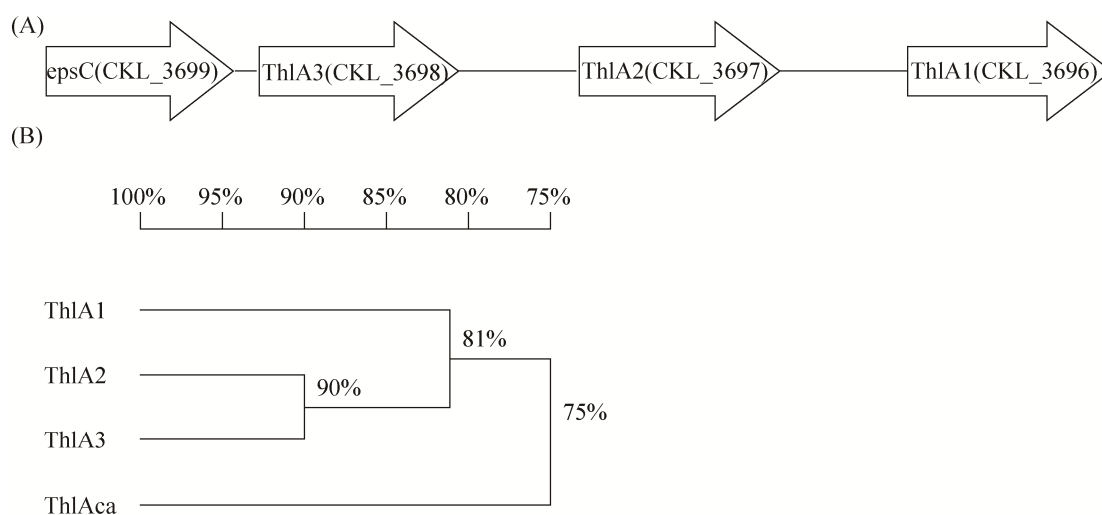


图 2. 克氏梭菌硫解酶编码基因结构和硫解酶蛋白质序列相似度分析

Figure 2. The genomic structure of three thiolase-encoding genes and the phylogenetic tree based on the alignment of protein sequences. A: the gene structure of *C. kluyveri* thiolase-encoding genes; B: the phylogenetic tree of *C. kluyveri* thiolases based on protein alignment. The percentage indicates the identity between the two subbranches.

是否在己酸合成过程中均发挥功能, 以及是否具有不同的底物特异性尚不清晰。

本文首先对克氏梭菌的发酵动力学特征进行了分析, 发现克氏梭菌以己酸为主要代谢产物, 合成少量的丁酸和微量的辛酸。虽然克氏梭菌 3 个硫解酶编码基因高度同源, 但转录分析表明 3 个硫解酶编码基因具有不同的表达水平和时序表达特征。随后进行的硫解酶动力学分析表明克氏梭菌 3 个硫解酶对于四碳底物均显示出相似的底物亲和力( $K_m$ ), 但对四碳底物的催化效率( $k_{cat}/K_m$ )却并非完全一致。本文通过发酵动力学、体内表达水平和体外酶学性质 3 个水平分析, 表明克氏梭菌的 3 个硫解酶均具有催化活性且在体内高水平表达, 在克氏梭菌中可能具有不同的生理功能, 该发现为后续克氏梭菌己酸合成特异性研究奠定了了的基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:** 本文所用到的菌株和质粒见表 2。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** Trizol total RNA extraction kit RNA 提取试剂盒(Life technologies, 美国), PrimeScript RT reagent kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒(TaKaRa, 大连), SYBR Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 荧光定量 PCR 试剂盒(TaKaRa, 大连)。

气相色谱仪-FID 7890B (Agilent, 美国), NanoDrop 8000 蛋白核酸测定分光光度计(Thermo Fisher Scientific, 美国), 实时荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems, 美国)。

**1.1.3 培养基:** (1) 改良乙醇醋酸钠培养基(g/L)<sup>[10]</sup>: 三水合乙酸钠 7.5, 三水合磷酸氢二钾 5.0, 无水硫酸镁 0.2, 硫酸铵 0.5, 酵母粉 10.0, 蛋白胨 10.0, 0.1%刃天青 500  $\mu$ L, pH 7.0,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min, 待培养基冷却后加入终浓度为 2% (V/V) 的无水乙醇。(2) LB 培养基(g/L): 酵母粉 5.0, 蛋白胨 10.0, 氯化钠 10.0。

### 1.2 培养方法及条件

克氏梭菌在 37 °C 的厌氧培养箱静置培养, 以乙醇醋酸钠培养基作为种子培养基和发酵培养

表 2. 本研究中涉及到的菌株和质粒

Table 2. Strains and plasmids used in this study

Strain/Plasmid	Description*	Source or reference
<b>Clostridia strain</b>		
<i>C. kluyveri</i> DSM555	Utilize ethanol and acetate as carbon source to produce hexanoate and butyrate	This work
<b><i>E. coli</i></b>		
JM109	recA <sup>-</sup>	Novagen
Rosetta (DE3)	pRARE, Cm <sup>r</sup>	Novagen
<b>Plasmids</b>		
pET28a	Kan <sup>r</sup>	NTCC
pET28a-thlA1	pET28a with <i>thlA1</i> gene from <i>C. kluyveri</i>	This work
pET28a-thlA2	pET28a with <i>thlA2</i> gene from <i>C. kluyveri</i>	This work
pET28a-thlA3	pET28a with <i>thlA3</i> gene from <i>C. kluyveri</i>	This work
pET28a-thlA <sub>ca</sub>	pET28a with <i>thlA<sub>ca</sub></i> gene from <i>C. acetobutylicum</i>	This work

\*Cm<sup>r</sup>: chloramphenicol resistance; Kan<sup>r</sup>: kanamycin resistance.

基。克氏梭菌发酵方法为：从平板上挑取单菌落接入 5 mL 一级种子培养基中，培养约 24 h 后按 10% (*V/V*)接种量接种入二级种子培养基中，约 24 h 后按照 10% (*V/V*)接种量转接种入 30 mL 发酵培养基中，每隔 12 h 进行取样，用于底物和产物分析。大肠杆菌在 LB 培养基中进行好氧培养，以卡那霉素(50  $\mu\text{g/mL}$ )和氯霉素(25  $\mu\text{g/mL}$ )进行筛选。

### 1.3 总 RNA 提取

发酵体积为 2000 mL，分别在对数生长早期(E)、中期(M)、转换期(T)和稳定期(S)收集菌液，8000 r/min，4  $^{\circ}\text{C}$  离心 10 min，去除上清收集菌体冻存于液氮中。取大约 0.1 g 菌体置于研钵中，在液氮保护下，将菌体研磨成白色粉末状，迅速分装至装有 1.0 mL Trizol 试剂的 1.5 mL 离心管中，振荡迅速混匀(放入菌体粉末前确认液氮已完全挥发)。加入 200  $\mu\text{L}$  的氯仿，以异丙醇沉淀法，按照 Trizol 试剂使用说明书提取总 RNA。RNA 浓度由 NanoDrop 8000 检测，完整性经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.4 RNA-Seq 测序及数据处理

分别收集克氏梭菌对数生长早期(E)、中期(M)、转换期(T)和稳定期(S)的 4 个阶段的菌体，将菌体研磨成白色粉末状，迅速分装至装有 1.0 mL Trizol 试剂的 1.5 mL 离心管中。将样品存储在干冰中送至北京百迈克生物科技有限公司完成 RNA-Seq 测序。RNA 样品的检测分别采用 Nanodrop、Qubit 2.0、Agilent 2100、电泳方法，检测 RNA 样品的纯度、浓度、完整性。样品检测合格后，进行 cDNA 文库的构建。测序平台为 Illumina HiSeq 2500。对 Raw Data 进行数据过滤，去除其中的接头序列及低质量 reads 获得高质量

的 Clean Data。将 Clean Data 与克氏梭菌 DSM555 的全基因组进行序列比对，获得 Mapped Data。采用 RPKM<sup>[13]</sup>(Reads Per Kilobase of transcript per Million fragments mapped)作为基因表达水平的衡量指标。原始数据已经上传至 DDBJ 数据库，基因登录号为 DRA006683。

### 1.5 反转录-荧光定量 PCR

按照试剂盒(PrimeScript RT reagent kit with gDNA Eraser)说明书的操作指南，取 0.5  $\mu\text{g}$  RNA 进行反转录(反转录前先加入 gDNA Eraser 去除基因组 DNA 污染)，反转录体系 20  $\mu\text{L}$ 。以 cDNA 为模板，使用基因特异性引物，采用反转录-荧光定量 PCR 检测 3 个硫解酶编码基因在不同时间点的转录水平，以 16S rRNA 基因为内参基因，所用引物序列见表 3。由于克氏梭菌 3 个硫解酶编码基因序列高度相似，所用引物的特异性经常规 PCR 扩增并对扩增产物进行测序验证。反转录-荧光定量 PCR 反应体系(10  $\mu\text{L}$ )：SYBR Premix Ex Taq II 5  $\mu\text{L}$ ，上、下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 0.5  $\mu\text{L}$ ，模板 2.5  $\mu\text{L}$  (反转录 cDNA 在使用前进行稀释，检测硫解酶基因进行 50 倍稀释，检测 16S rRNA 基因进行 5000 倍稀释)，超纯水 1.5  $\mu\text{L}$ 。PCR 条件：95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 1 min；循环扩增条件为 95  $^{\circ}\text{C}$  10 s，55  $^{\circ}\text{C}$  30 s，72  $^{\circ}\text{C}$  30 s。

### 1.6 硫解酶编码基因的克隆与 *E. coli* 表达载体构建

根据克氏梭菌和丙酮丁醇梭菌的硫解酶编码基因序列，设计扩增 *thlA1*、*thlA2*、*thlA3*、*thlA<sub>ca</sub>* 基因的引物，在上游引物的 5'端设计 *Bam*H I 酶切位点，下游引物的 5'端设计 *Xho* I 酶切位点，引物序列见表 3。硫解酶基因编码区的 PCR 片段和 pET28a 载体分别经 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切、连接，

表 3. 本研究所用引物  
Table 3. Primers used in this study

Primer	Sequence (5'→3')	Description*
16S rRNA-F	AAGCAACGCGAAGAACCTTA	Forward qPCR primer for 16S rRNA
16S rRNA-R	CTCGTTAGGGTGCCACCTT	Reverse qPCR primer for 16S rRNA
<i>thlA1</i> -F	GAGTTAAACCAATGGCAAAATATGTTGAT	Forward qPCR primer for <i>thlA1</i>
<i>thlA1</i> -R	CTTGCTACTGCTATACTTTGAGCT	Reverse qPCR primer for <i>thlA1</i>
<i>thlA2</i> -F	ACGGACCTTTCTATGCAACAAAGTTG	Forward qPCR primer for <i>thlA2</i>
<i>thlA2</i> -R	AACGAGTATTCTTGACACAGAGCAG	Reverse qPCR primer for <i>thlA2</i>
<i>thlA3</i> -F	GACATCCAGTTGGAGCATCA	Forward qPCR primer for <i>thlA3</i>
<i>thlA3</i> -R	ATCTCTCTACTATTAAAGCAGTTCCCAT	Reverse qPCR primer for <i>thlA3</i>
<i>ThlA1</i> _BamH I-F	TATCggatccAGAGAAGTAGTTATTGTAAGTGCTGTA	Forward primer for <i>thlA1</i> cloning
<i>ThlA1</i> _Xho I-R	CCTActcgagTTATCTTTCAACTACTACAGCGGTTCCCTT	Reverse primer for <i>thlA1</i> cloning
<i>ThlA2</i> _BamH I	CGACggatccAAAGATGCAGTTATTGTAAGTGCACTA	Forward primer for <i>thlA2</i> cloning
<i>ThlA2</i> _Xho I-R	CGAGctcgagTTATCTTTCAACTATTAGTGCAGTTCCCAT	Reverse primer for <i>thlA2</i> cloning
<i>ThlA3</i> _BamH I-F	ACAGggatccAGAGAAGTAGTTATTGTAAGTGCACTG	Forward primer for <i>thlA3</i> cloning
<i>ThlA3</i> _Xho I-R	CATTctcgagTTATCTCTCTACTATTAAAGCAGTTCCCAT	Reverse primer for <i>thlA3</i> cloning
<i>ThlA<sub>ca</sub></i> _BamH I-F	ACAGggatccATGAAAGAAGTTGTAATAGCTAGT	Forward primer for <i>thlA<sub>ca</sub></i> cloning
<i>ThlA<sub>ca</sub></i> _Xho I-R	CATTctcgagCTAGCACTTTTCTAGCAATATTG	Reverse primer for <i>thlA<sub>ca</sub></i> cloning

\**thlA1*, thiolase A1 gene (CKL\_3696) of *C. kluyveri*; *thlA2*, thiolase A2 gene (CKL\_3697) of *C. kluyveri*; *thlA3*, thiolase A3 gene (CKL\_3698) of *C. kluyveri*; *thlA<sub>ca</sub>*, thiolase gene (CA\_C2873) of *C. acetobutylicum*; 16S rRNA, 16S rRNA gene (CKL\_0008) of *C. kluyveri*.

转化入大肠杆菌 JM109, 经卡那霉素(50 μg/mL)抗性平板筛选, 通过 PCR 和测序验证获得阳性克隆。将构建的表达载体转化入大肠杆菌 Rosetta (DE3), 培养条件为 37 °C、200 r/min, 加卡那霉素(50 μg/mL)和氯霉素(25 μg/mL)抗生素培养, 当  $OD_{600}$  约 0.6 时, 以 IPTG (0.1 mmol/L)进行过夜诱导表达, 培养条件为 17 °C、200 r/min。

## 1.7 蛋白纯化

在 4 °C、10000 r/min 条件下离心 10 min 收集菌体, 将细胞重悬于冰浴预冷的缓冲液 A (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 5 mmol/L β-巯基乙醇和 150 mmol/L NaCl), 细胞经超声破碎, 细胞裂解液经 4 °C、10000 r/min 离心 1 h 去除碎片。离心后的粗酶液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后与 Ni-NTA 琼脂糖柱 (Qiagen)结合。硫解酶蛋白经缓冲液 B (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 5 mmol/L β-巯基乙醇, 500 mmol/L

咪唑和 150 mmol/L NaCl)线性洗脱, 洗脱所用咪唑浓度为 500 mmol/L。纯化蛋白用超滤管(截留分子量大小 10 kDa)浓缩, 蛋白储存的缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 1 mmol/L DTT, 150 mmol/L NaCl)洗脱 2 次。取 5 μL 酶液加 200 μL 考马斯亮蓝溶液, 室温反应 3 min 后, 酶标仪测定 595 nm 波长下吸光值, 将测定的吸光值带入蛋白浓度计算标准曲线中计算酶浓度。将 4 个酶稀释到相同浓度后, 分装冻存于-80 °C。

## 1.8 硫解酶动力学参数的测定

反应条件为 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1 mmol/L DTT, 10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 乙酰乙酰辅酶 A 浓度变化范围为 0–100 μmol/L, 辅酶 A 浓度固定在 50 μmol/L。反应体系为 100 μL, 加入 60 ng 硫解酶起始反应, 反应开始后随着乙酰乙酰辅酶 A 的消耗, 其在  $OD_{303}$  的吸光值逐渐降低。用酶标

仪读取在 303 nm 波长下吸光值( $OD_{303}$ ), 进行酶活计算。酶活力定义为: 在 30 °C 反应条件下, 每分钟分解 1  $\mu\text{mol}$  的乙酰乙酰辅酶 A 所需要的酶量为一个酶活力单位(U)<sup>[14-15]</sup>。采用双倒数作图法, 利用 GraphPad Prism 7 数据处理软件计算硫解酶对乙酰乙酰辅酶 A 的  $K_m$  和  $k_{cat}$  值。克氏梭菌 3 个硫解酶的蛋白分子量分别为  $M_{ThIA1}$ =44.66 kDa、 $M_{ThIA2}$ =44.34 kDa、 $M_{ThIA3}$ =44.96 kDa, 丙酮丁醇梭菌硫解酶的蛋白分子量  $M_{ThIAca}$ =41.25 kDa。

## 1.9 发酵底物和代谢产物检测

克氏梭菌种子液按 10%接种量接种入乙醇醋酸钠培养基中, 于 37 °C 静置厌氧培养, 每隔 12 h 取样。底物(乙醇和乙酸)和产物(丁酸、己酸和辛酸)用气相色谱-火焰离子化检测器(GC-FID)进行检测。样品处理方法为: 取 1 mL 发酵液进行高速离心, 取 200  $\mu\text{L}$  上清液, 加入 50  $\mu\text{L}$  内标液(pH 2.2, 含 12.5 g/L 叔戊酸), 再加入 250  $\mu\text{L}$  乙醚作为萃取剂, 涡旋振荡 30 s, 高速离心 2 min, 取上清立即进行检测。色谱柱为 Agilent CP-Wax 57 CB, 进样口温度 220 °C, 检测器温度 220 °C, 载气氮气流速 45 mL/min, 氢气流速 40 mL/min, 空气流

速 450 mL/min, 进样量 1  $\mu\text{L}$ , 分流比 30 : 1。程序升温: 60 °C 保持 0.5 min, 20 °C/min 升温到 190 °C, 保持 4.5 min。

## 2 结果和分析

### 2.1 克氏梭菌己酸发酵动力学特征

克氏梭菌以乙醇和乙酸为底物, 本研究中发酵初始时刻的乙醇和乙酸根浓度分别为 325 mmol/L (15 g/L)和 50 mmol/L (3 g/L)。发酵终点时, 利用的乙醇与乙酸根摩尔比为 2.6 : 1.0; 丁酸、己酸和辛酸终浓度分别为 3.52 mmol/L (0.31 g/L)、45.71 mmol/L (5.31 g/L)和 1.11 mmol/L (0.16 g/L), 丁酸、己酸和辛酸摩尔比为 3 : 41 : 1, 质量比为 2 : 33 : 1 (图 3)。在此培养条件下, 克氏梭菌的主要代谢产物为己酸, 仅合成少量的丁酸和微量的辛酸。基于克氏梭菌己酸发酵动力学特征, 我们推测克氏梭菌的短中链脂肪酸合成酶系倾向于催化四碳和六碳产物的形成。发酵动力学分析还表明, 丁酸呈现出先合成再被利用的特征。丁酸之所以能被回用, 推测存在两种可能性: (1) 辅酶 A 转移酶(Cat)具有较为广泛的底物特异性<sup>[8]</sup>, Cat 可

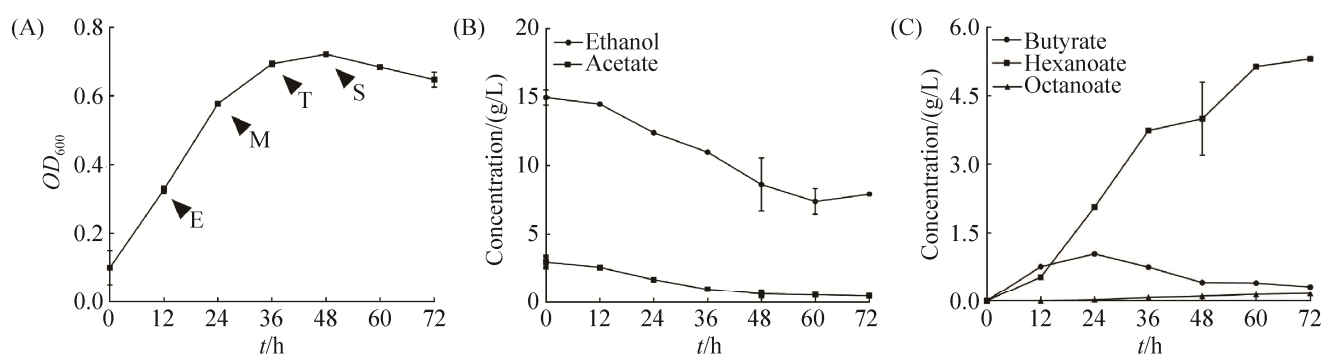


图 3. 克氏梭菌利用乙醇和乙酸作为碳源的生长、底物利用和产物生成趋势

Figure 3. The profiles of growth, substrate utilization and metabolite production in a batch fermentation of *C. kluyveri* DSM555 using ethanol and acetate as carbon sources. A: growth; B: the utilization of ethanol and acetate; C: the production of butyrate, hexanoate and octanoate.



以将辅酶 A 转移到乙酸上生成乙酰辅酶 A, 也可以将辅酶 A 转移到丁酸上, 生成丁酰辅酶 A; (2) Cat 催化的丁酸释放反应为:  $\text{Butyryl-CoA} + \text{Acetate} \rightleftharpoons \text{Butyrate} + \text{Acetyl-CoA}$ , 当乙酸被逐渐消耗后, 该反应可能倾向于逆向进行, 丁酸被回用。无论哪种途径, 丁酸均可以被转化为丁酰辅酶 A, 与一分子乙酰辅酶 A 在硫解酶催化下形成 3-酮基己酰辅酶 A。

当以乙醇和丁酸根作为碳源时, 克氏梭菌产生己酸和微量的辛酸, 丁酸呈现出净消耗, 无乙酸被检测到(图 4)。可见, 当乙酸存在时克氏梭菌可合成己酸和丁酸, 无乙酸而添加丁酸时合成己酸。根据克氏梭菌的己酸发酵动力学特征(图 3, 图 4)和丁酸、己酸合成途径(图 1), 我们推测克氏梭菌硫解酶同时具有催化丁酸合成和己酸合成的能力, 硫解酶的体内催化功能可能受到初始碳源种类的调控。

## 2.2 克氏梭菌硫解酶编码基因表达特征

以上发酵动力学分析表明, 当以乙醇和乙酸作为主要碳源时, 克氏梭菌倾向于己酸和丁酸的合成, 故克氏梭菌硫解酶可以同时催化己酸和丁酸的合成。为研究克氏梭菌 3 个硫解酶编码基因

的表达特征, 我们对丁酸快速累积阶段(对数生长早期, E)、己酸快速累积阶段(对数生长中期, M)、丁酸回用阶段(生长转换期, T)和乙酸完全消耗阶段(生长稳定期, S) 4 个关键发酵阶段的硫解酶编码基因的表达水平和时序表达特征分析。RNA-Seq 测定了 3955 个基因表达水平, 3 个硫解酶编码基因的最高表达水平(RPKM 值的大小)分别位列第 4、23 和 14 位。*thlA1*、*thlA2* 和 *thlA3* 表达的最高 RPKM 值分别为 32303 (E 期)、9331 (T 期)和 14037 (E 期) (图 5-A、C、E)。值得注意的是, 虽然 RNA-Seq 显示出 *thlA1* 在各时期的表达量均远高于 *thlA2* 和 *thlA3*, 但后两者的表达水平仍然相当可观。

尽管 3 个硫解酶高度同源, 但却具有不同的表达水平和时序表达特征。在生长稳定期(S)之前, *thlA1* 基因维持恒定表达, *thlA2* 基因表达时序上调, *thlA3* 基因表达时序下调(图 5)。此外, 在 S 期, 3 个硫解酶编码基因的表达均大幅度下调。对比底物利用情况(图 3-B), 在 S 期, 虽然具有大量未被利用的乙醇, 但乙酸已经降低到较低水平, 且该时刻菌体不再生长, 即将进入衰亡期。可见, 3 个硫解酶编码基因的表达严格依赖于菌体生长,

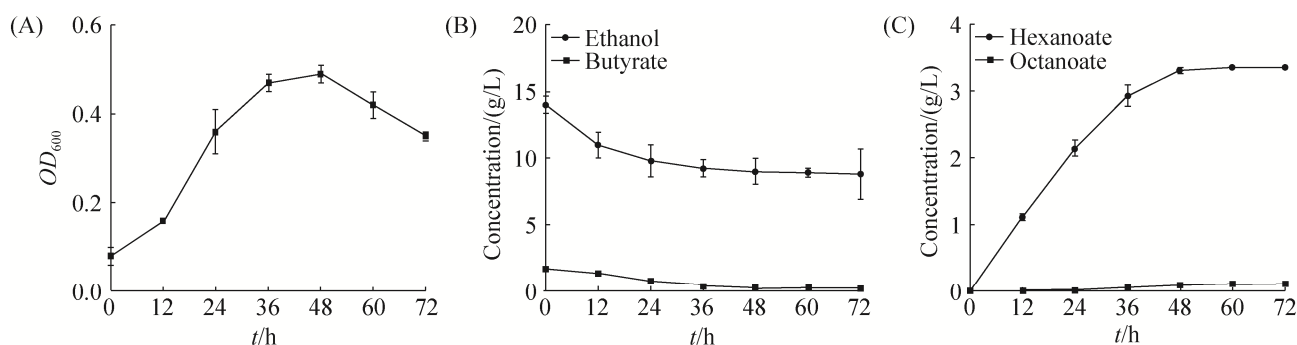


图 4. 克氏梭菌利用乙醇和丁酸作为碳源的生长、底物利用和产物生成趋势

Figure 4. The profiles of growth, substrate utilization and metabolite production in a batch fermentation of *C. kluyveri* DSM555 using ethanol and butyrate as carbon sources. A: growth; B: the utilization of ethanol and butyrate; C: the production of hexanoate and octanoate.



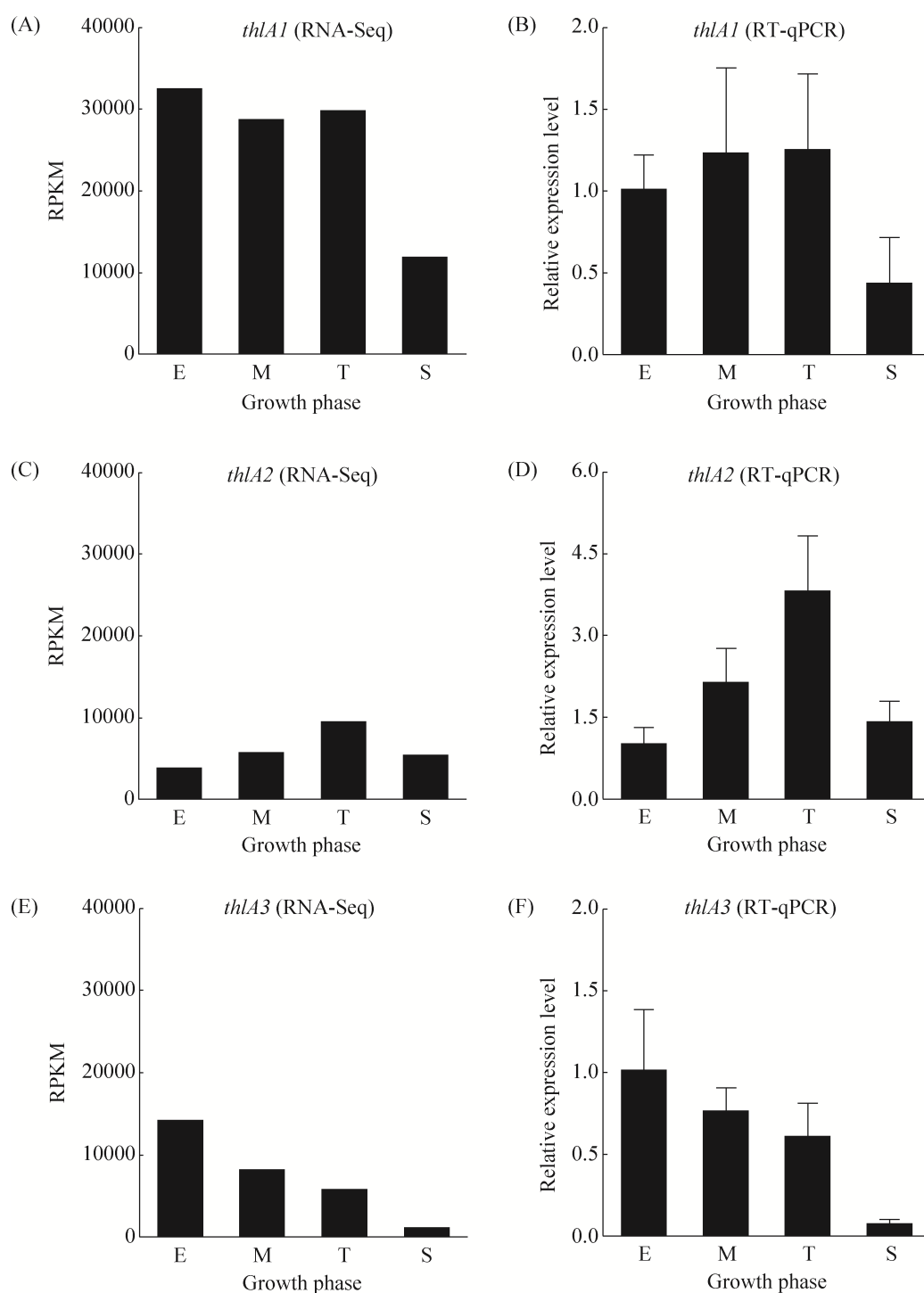


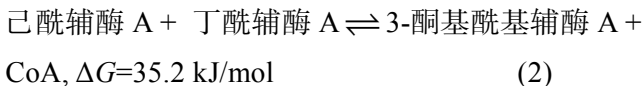
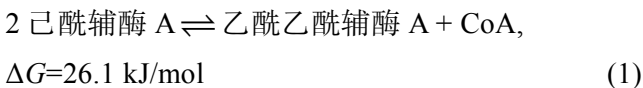
图 5. 克氏梭菌硫解酶编码基因时序表达情况

Figure 5. The expression levels of three thiolase-encoding genes in *C. kluyveri*. A, B, C, D, E and F represent transcriptome and reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) analysis of thiolase A1 encoding gene (*thlA1*), thiolase A2 encoding gene (*thlA2*), thiolase A3 encoding gene (*thlA3*). E, the early exponential phase of cell growth; M, the middle exponential phase of cell growth; T, transition phase of cell growth; S, stationary phase of cell growth.

推测这 3 个基因是菌体维持生长所必需的基因，当菌体衰亡或碳源相对缺乏时(克氏梭菌无法单独以乙醇为碳源生长)，3 个硫解酶无法维持高水平表达。

2.3 硫解酶动力学参数

从克氏梭菌和丙酮丁醇梭菌基因组 DNA 扩增 4 个硫解酶编码基因，在大肠杆菌中进行异源表达，通过 His-tag 标签亲和层析获得目的酶蛋白(图 6)。硫解酶在梭菌菌体内倾向于合成方向的催化反应，克氏梭菌合成乙酰乙酰辅酶 A 和 3-酮基己酰辅酶 A 的反应方程式(方程式 1-2)<sup>[16]</sup>。



上述生化反应显示，乙酰辅酶 A 的乙酰基被连接到酰基辅酶 A 的 β 碳原子上，形成增加了 1 个二碳单位的 3-酮基-酰基辅酶 A，ΔG>0，正向反应在热力学上不可行，体外测定硫解酶的底物亲和力时通常测定其在降解方向上的酶活力<sup>[17-18]</sup>。

以不同浓度的乙酰乙酰辅酶 A 和 50 μmol/L 辅酶 A 为底物，测定克氏梭菌来源的 3 个硫解酶和丙酮丁醇梭菌来源的硫解酶 ThlA<sub>ca</sub> 对四碳底物(乙酰乙酰辅酶 A)降解的动力学参数。ThlA1、

ThlA2、ThlA3 和 ThlA<sub>ca</sub> 对乙酰乙酰辅酶 A 的 K<sub>m</sub> 值分别为 65.1 μmol/L、62.3 μmol/L、65.0 μmol/L 和 57.8 μmol/L (表 4)。可见，克氏梭菌来源的 3 个硫解酶对底物乙酰乙酰辅酶 A 均具有相似的亲和力，与丙酮丁醇梭菌来源硫解酶 ThlA<sub>ca</sub> 的底物亲和性相当。从 k<sub>cat</sub> 值来看，ThlA2 (2.5×10<sup>6</sup> s<sup>-1</sup>)和 ThlA3 (2.6×10<sup>6</sup> s<sup>-1</sup>)与丙酮丁醇梭菌的 ThlA<sub>ca</sub> (2.4×10<sup>6</sup> s<sup>-1</sup>)相当，均高于 ThlA1 (1.7×10<sup>6</sup> s<sup>-1</sup>)。因此硫解酶 ThlA1 对 C4 底物(乙酰乙酰辅酶 A)的催

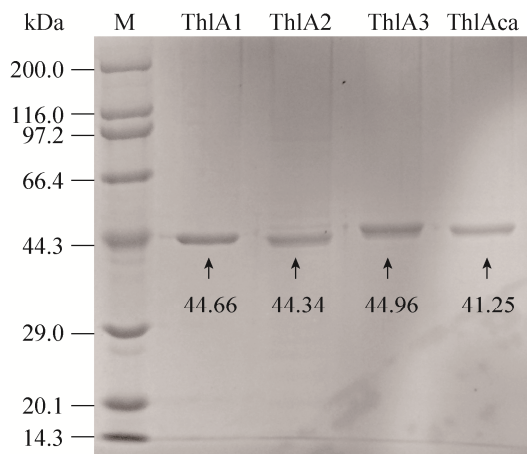


图 6. 重组硫解酶的 SDS-PAGE 分析  
Figure 6. The SDS-PAGE analysis of recombinant thiolases purified from *E. coli* Rosetta (DE3). M: standard protein ladder; ThlA1: *C. kluyveri* thlA1; ThlA2: *C. kluyveri* thlA2; ThlA3: *C. kluyveri* thlA3; ThlA<sub>ca</sub>: *C. acetobutylicum* thlA<sub>ca</sub>.

表 4. 硫解酶动力学参数  
Table 4. Kinetic parameters for thiolase

Strain	Acetoacetyl-CoA			Reference
	K <sub>m</sub> /(μmol/L)	k <sub>cat</sub> /(1/s)	(k <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub> )/(L/(μmol·s))	
<i>Clostridium pasteurianum</i>	133	NR	NR	[19]
<i>Clostridium butyricum</i> DSM 10702	32	NR	NR	[20]
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	32	NR	NR	[21]
<i>Clostridium kluyveri</i> (ThlA1)	65.1±5.1	(1.7±0.1)×10 <sup>6</sup>	(2.6±0.1)×10 <sup>4</sup>	This study
<i>Clostridium kluyveri</i> (ThlA2)	62.3±15.1	(2.5±0.4)×10 <sup>6</sup>	(4.0±0.3)×10 <sup>4</sup>	This study
<i>Clostridium kluyveri</i> (ThlA3)	65.0±10.1	(2.6±0.1)×10 <sup>6</sup>	(4.0±0.4)×10 <sup>4</sup>	This study
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824 (ThlA <sub>ca</sub> )	57.8±2.6	(2.4±0.2)×10 <sup>6</sup>	(4.1±0.1)×10 <sup>4</sup>	This study

NR, not reported

化能力略低于硫解酶 ThlA2 和 ThlA3, 推测 3 个硫解酶均可以参与丁酸的合成。结合 3 个硫解酶编码基因在克氏梭菌中均具有相当高的表达水平, 我们推测克氏梭菌可以表达出 3 种具有生物活性的硫解酶蛋白。但这 3 种硫解酶如何进行全酶组装, 在催化合成 3-酮基己酰辅酶 A 反应中是否具有不同的催化能力尚需深入研究。

### 3 讨论

对于长链脂肪酸合成, 酰基载体蛋白(ACP)被用作酰基的合成平台, 而对于 C4-C10 的短中链脂肪酸合成, 辅酶 A 通常被用作酰基载体<sup>[22]</sup>。相当一部分的梭菌都可以合成四碳(C4)的丁酸, 对四碳短链脂肪酸(丁酸)和脂肪醇(丁醇)合成途径的解析促进了丁酸和丁醇绿色生物合成技术的进步<sup>[17,23-25]</sup>。己酸作为碳链更长、微溶于水的中链脂肪酸, 其诸多化学、物理性质优于丁酸。长期以来克氏梭菌被认为是自然界存在最广泛的己酸产生菌, 但由于该菌发酵过程中菌体浓度较低(图 3-A), 缺乏遗传操作工具, 长期以来并未得到研究者过多的关注。近年来, 随着微生物组学的深入研究, 发现其他类型微生物与克氏梭菌混合培养时可以促进己酸的合成, 且混菌体系产己酸性能优于纯培养己酸菌, 克氏梭菌发酵产己酸的重要性被重新认识<sup>[26-28]</sup>。

克氏梭菌具有在微生物中鲜有的 C6 脂肪链合成酶系, 而硫解酶是催化六碳链合成的第一个关键酶。体外纯化的硫解酶倾向于催化硫酯键断裂, 而在微生物体内, 由于下游反应的拉动, 使体内表达出的硫解酶更倾向于硫酯键合成方向的反应。己酸合成反应途径中, 碳六产物形成的关键步骤为在硫解酶催化下乙酰辅酶 A 与丁酰辅酶

A 进行缩合反应, 生成 3-酮基己酰辅酶 A(碳六骨架), 该过程也会生成一定量的乙酰乙酰辅酶 A(3-酮基丁酰辅酶 A, 碳四骨架)。当以乙醇和乙酸盐作为碳源时, 终端代谢产物主要为己酸和丁酸; 而以乙醇和丁酸作为碳源时, 终端代谢产物主要为己酸, 丁酸为净消耗。本研究中发现克氏梭菌硫解酶的表达量非常高, 3-酮基辅酶 A 在胞内的存在时间可能较短, 3-酮基辅酶 A 胞内浓度可能受到底物类型的控制。当乙醇和乙酸盐作为碳源时, 胞内的辅酶 A 可能主要以乙酰辅酶 A 的形式存在, 丁酰辅酶 A/乙酰辅酶 A 比值较低, 硫解酶可以同时催化合成乙酰乙酰辅酶 A 和 3-酮基己酰辅酶 A; 而当以乙醇和丁酸盐作为碳源时, 由于丁酸盐供应充足, 可能使胞内的丁酰辅酶 A 浓度较高, 丁酰辅酶 A/乙酰辅酶 A 比值可能也较高, 硫解酶此时主要催化 3-酮基己酰辅酶 A 的合成。本研究中硫解酶动力学参数测定表明, 克氏梭菌的 3 个硫解酶均具有催化四碳底物(乙酰乙酰辅酶 A)的能力, 均参与了丁酸的合成, 但由于 3-酮基己酰辅酶 A 难以制备与获得, 暂未进行对六碳底物亲和性和催化能力的测定。尽管如此, 3 个硫解酶中至少其中之一具有催化合成六碳代谢中间体(3-酮基己酰辅酶 A)的能力, 故推测克氏梭菌中至少有一个硫解酶在合成 3-酮基己酰辅酶 A 时, 也能进行乙酰乙酰辅酶 A 的合成, 但难以进行六碳以上酮基辅酶 A 的合成。

克氏梭菌具有 3 个硫解酶编码基因, 多于一般梭菌的 1-2 个硫解酶编码基因。我们通过体内基因转录分析, 验证了克氏梭菌 3 个硫解酶编码基因在胞内进行高水平表达, 且具有不同的时序表达特征。在碳源相对不足(同时伴随着菌体衰亡)情况下, 3 个硫解酶的表达水平均出现显著下调,

这证明了克氏梭菌 3 个硫解酶编码基因在克氏梭菌体内均受到乙酸或菌体生长的控制。当碳源不再供应充足时, 硫解酶表达迅速下调, 因此推测 3 个硫解酶在菌株生长和正常生理代谢活动中发挥着非常重要的作用。

至今尚未有可以对克氏梭菌进行遗传操作的方法报道, 难以对 3 个硫解酶体内功能进行验证。后续研究将集中于克氏梭菌遗传操作系统的构建, 以及尝试将克氏梭菌来源的硫解酶编码基因在其他类型微生物中进行异源表达, 验证克氏梭菌 3 个硫解酶具有的生物学功能, 挖掘出用于合成六碳骨架的关键酶, 为 C6 平台化合物(如己酸、己醇、3-羟基己酸)的绿色生物合成提供高效的基因元件。

## 参 考 文 献

- [1] van Immerseel F, de Buck J, Boyen F, Bohez L, Pasmans F, Volf J, Sevcik M, Rychlik I, Haesebrouck F, Ducatelle R. Medium-chain fatty acids decrease colonization and invasion through *hilA* suppression shortly after infection of chickens with *Salmonella enterica* serovar enteritidis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(6): 3582–3587.
- [2] Agler MT, Spirito CM, Usack JG, Werner JJ, Angenent LT. Chain elongation with reactor microbiomes: upgrading dilute ethanol to medium-chain carboxylates. *Energy & Environmental Science*, 2012, 5(8): 8189–8192.
- [3] Ren ZZ, Gu CA, Wang ZG, Hu CQ, Niu JY. Catalysis of polybasic heteropolyacid in preparation of hexanoic acid from 2-octanol. *Fine Chemicals*, 2003, 20(8): 463–465. (in Chinese)  
任知忠, 谷长安, 王战国, 胡长青, 牛景扬. 多元杂多酸在仲辛醇制己酸中的催化作用. *精细化工*, 2003, 20(8): 463–465.
- [4] Barker HA, Taha SM. *Clostridium kluyverii*, an organism concerned in the formation of caproic acid from ethyl alcohol. *Journal of Bacteriology*, 1942, 43(3): 347–363.
- [5] Weimer PJ, Moen GN. Quantitative analysis of growth and volatile fatty acid production by the anaerobic ruminal bacterium *Megasphaera elsdenii* T81. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(9): 4075–4081.
- [6] Kim BC, Jeon BS, Kim S, Kim H, Um Y, Sang BI. *Caproiciproducens galactitolivorans* gen. nov., sp. nov., a bacterium capable of producing caproic acid from galactitol, isolated from a wastewater treatment plant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015, 65(12): 4902–4908.
- [7] Zhu XY, Zhou Y, Wang Y, Wu TT, Li XZ, Li DP, Tao Y. Production of high-concentration *n*-caproic acid from lactate through fermentation using a newly isolated *Ruminococcaceae* bacterium CPB6. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10: 102.
- [8] Seedorf H, Fricke WF, Veith B, Brüggemann H, Liesegang H, Strittmatter A, Miethke M, Buckel W, Hinderberger J, Li FL, Hagemeyer C, Thauer RK, Gottschalk G. The genome of *Clostridium kluyveri*, a strict anaerobe with unique metabolic features. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(6): 2128–2133.
- [9] Yin YN, Zhang YF, Karakashev DB, Wang JL, Angelidaki I. Biological caproate production by *Clostridium kluyveri* from ethanol and acetate as carbon sources. *Bioresource Technology*, 2017, 241: 638–644.
- [10] Hu XL, Du H, Xu Y. Identification and quantification of the caproic acid-producing bacterium *Clostridium kluyveri* in the fermentation of pit mud used for Chinese strong-aroma type liquor production. *International Journal of Food Microbiology*, 2015, 214: 116–122.
- [11] Weimer PJ, Stevenson DM. Isolation, characterization, and quantification of *Clostridium kluyveri* from the bovine rumen. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 94(2): 461–466.
- [12] Jeon BS, Kim BC, Um Y, Sang BI. Production of hexanoic acid from D-galactitol by a newly isolated *Clostridium* sp. BS-1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 88(5): 1161–1167.
- [13] Jiang H, Wong WH. Statistical inferences for isoform expression in RNA-Seq. *Bioinformatics*, 2009, 25(8): 1026–1032.
- [14] Hartmanis MG, Gatenbeck S. Intermediary metabolism in

- Clostridium acetobutylicum*: levels of enzymes involved in the formation of acetate and butyrate. *Applied and Environmental Microbiology*, 1984, 47(6): 1277–1283.
- [15] Cho C, Choe D, Jang YS, Kim KJ, Kim WJ, Cho BK, Papoutsakis ET, Bennett GN, Seung DY, Lee SY. Genome analysis of a hyper acetone-butanol-ethanol (ABE) producing *Clostridium acetobutylicum* BKM19. *Journal of Biotechnology*, 2017, 12(2): 1600457.
- [16] Flamholz A, Noor E, Bar-Even A, Milo R. eQuilibrator—the biochemical thermodynamics calculator. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(D1): D770–D775.
- [17] Mann MS, Lütke-Eversloh T. Thiolase engineering for enhanced butanol production in *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2013, 110(3): 887–897.
- [18] Meng YH, Li JL. Cloning, expression and characterization of a thiolase gene from *Clostridium pasteurianum*. *Biotechnology Letters*, 2006, 28: 1227.
- [19] Berndt H, Schlegel HG. Kinetics and properties of  $\beta$ -ketothiolase from *Clostridium pasteurianum*. *Archives of Microbiology*, 1975, 103(1): 21–30.
- [20] Klein M, Wenk P, Ansorge-Schumacher MB, Fritsch M, Hartmeier W. Heterologous expression and characterisation of a biosynthetic thiolase from *Clostridium butyricum* DSM 10702. *Enzyme and Microbial Technology*, 2009, 45(5): 361–366.
- [21] 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.
- [22] Dellomonaco C, Clomburg JM, Miller EN, Gonzalez R. Engineered reversal of the  $\beta$ -oxidation cycle for the synthesis of fuels and chemicals. *Nature*, 2011, 476(7360): 355–359.
- [23] Yu MR, Zhang YL, Tang IC, Yang ST. Metabolic engineering of *Clostridium tyrobutyricum* for *n*-butanol production. *Metabolic Engineering*, 2011, 13(4): 373–382.
- [24] Kim S, Jang YS, Ha SC, Ahn JW, Kim EJ, Lim JH, Cho C, Ryu YS, Lee SK, Lee SY, Kim KJ. Redox-switch regulatory mechanism of thiolase from *Clostridium acetobutylicum*. *Nature Communications*, 2015, 6: 8410.
- [25] Ren C, Gu Y, Hu SY, Wu Y, Wang P, Yang YL, Yang C, Yang S, Jiang WH. Identification and inactivation of pleiotropic regulator CcpA to eliminate glucose repression of xylose utilization in *Clostridium acetobutylicum*. *Metabolic Engineering*, 2010, 12(5): 446–454.
- [26] Diender M, Stams AJM, Sousa DZ. Production of medium-chain fatty acids and higher alcohols by a synthetic co-culture grown on carbon monoxide or syngas. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9: 82.
- [27] Weimer PJ, Nerdahl M, Brandl DJ. Production of medium-chain volatile fatty acids by mixed ruminal microorganisms is enhanced by ethanol in co-culture with *Clostridium kluyveri*. *Bioresource Technology*, 2015, 175: 97–101.
- [28] Leng L, Yang PX, Mao YP, Wu ZY, Zhang T, Lee PH. Thermodynamic and physiological study of caproate and 1, 3-propanediol co-production through glycerol fermentation and fatty acids chain elongation. *Water Research*, 2017, 114: 200–209.

# Identification and functional analysis of the three thiolases from *Clostridium kluyveri*

Jiao Yang<sup>1</sup>, Cong Ren<sup>1,2</sup>, Yan Xu<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Brewing and Enzyme Technology Center, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

<sup>2</sup> Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

**Abstract:** [Objective] *Clostridium kluyveri* genome encodes for three highly homologous thiolases. To identify the function of these three thiolases will help us to understand how *Clostridium kluyveri* can efficiently produce hexanoate. [Methods] The characteristics of hexanoate and butyrate production were examined via fermentation kinetics analysis. The transcriptome and reverse transcription-quantitative RCR were used to analyze the expression profiles of thiolase-encoding genes during fermentation. Thiolases from *Clostridium kluyveri* were heterologously expressed in *Escherichia coli* and their enzyme kinetic parameters were examined. [Results] *Clostridium kluyveri* produced butyrate, hexanoate and octanoate, of which hexanoate was the major product. Transcription analysis showed that *thlA1* gene was constitutively expressed, *thlA2* gene was up-regulated and *thlA3* gene was down-regulated before the depletion of acetate. The three thiolase-encoding genes all had higher transcription levels, and the highest expression levels of *thlA2* and *thlA3* were approximately 29% and 43% that of *thlA1*, respectively. The enzyme kinetic parameters with four-carbon substrate demonstrated that the three thiolases from *Clostridium kluyveri* had similar affinity. However, the catalytic efficiency ( $k_{cat}/K_m$ ) of ThlA1 for four-carbon substrates was lower than that of ThlA2 and ThlA3. [Conclusion] All of the three thiolases from *Clostridium kluyveri* had catalytic activities, and also actively expressed *in vivo*.

**Keywords:** *Clostridium kluyveri*, hexanoate, thiolase, transcriptome

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (21706097, 31530055)

\*Corresponding author. Tel: +86-510-85918201; E-mail: yxu@jiangnan.edu.cn

Received: 9 February 2018; Revised: 4 May 2018; Published online: 21 May 2018