



丙酮丁醇梭菌硫氧还蛋白系统在溶剂生产过程中的功能

杨汇照¹, 范奕萱², 蒋丹丹³, Armin Ehrenreich², 刘晓环¹, 李福利^{2*}, 刘自勇^{2*}

1 中国海洋大学环境科学与工程学院, 山东 青岛 266100

2 中国科学院生物燃料重点实验室, 中国科学院青岛生物能源与过程研究所, 山东 青岛 266101

3 大连工业大学生物工程学院, 辽宁 大连 116034

杨汇照, 范奕萱, 蒋丹丹, Armin Ehrenreich, 刘晓环, 李福利, 刘自勇. 丙酮丁醇梭菌硫氧还蛋白系统在溶剂生产过程中的功能. 微生物学报, 2022, 62(3): 993–1003.

Yang Huizhao, Fan Yixuan, Jiang Dandan, Armin Ehrenreich, Liu Xiaohuan, Li Fuli, Liu Ziyong. The role of thioredoxin system in solvent production process of *Clostridium acetobutylicum*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(3): 993–1003.

摘要:【目的】探究丙酮丁醇梭菌硫氧还蛋白系统在生长和代谢过程中的功能。【方法】使用 ClosTron 系统对硫氧还蛋白系统中的硫氧还蛋白还原酶基因(*trxB*)进行插入失活, 得到突变株, 通过 Southern 杂交方法验证插入内含子的拷贝数; 在基本培养基中进行分批发酵, 比较并分析突变株的生长特点; 通过 pH 控制, 利用限磷的连续发酵方法使丙酮丁醇梭菌稳定地在产酸期和产溶剂期生长, 分析野生型菌株和突变株在稳定的产酸期和产醇期的生长和产物合成情况; 通过添加不同浓度的过氧化氢检测野生型和突变株的抗氧化压力。【结果】抗性筛选和基因测序结果表明, 成功构建了硫氧还蛋白还原酶失活的突变株, 命名为 *Clostridium acetobutylicum* *trxB::int(29)*。在分批发酵中, 突变株和野生型菌株的最大生长量相近, 细胞在 600 nm 处的光吸收值(OD_{600})达到 6.5, 但是突变株在 36 h 的 OD_{600} 达到最大, 较野生型推迟 12 h; 在连续发酵的产酸期, 野生型菌株与突变株生长变化不大, OD_{600} 分别稳定在 4.6 和 4.4, 且葡萄糖的消耗和酸产量相差不大; 在产溶剂期, 突变株的 OD_{600} 稳定在 3.5, 低于野生型的 4.0, 同时, 丙酮产量达到 25.5 mmol/L, 高于野生型(18 mmol/L), 丁醇产量达到 36.1 mmol/L, 低于野生型(48 mmol/L); 添加低浓度的过氧化氢对突变株的影响不大, 高浓度的过氧化氢对突变株造成的损伤大于野生型。【结论】硫氧还蛋白还原酶基因的失活不是致死突变, 突变株在产酸期的生长和产酸能力与

基金项目: 国家自然科学基金(31800026); 中国科学院生物燃料重点实验室项目(CASKLB201804)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31800026) and by the Project of Key Laboratory of Biofuel, Chinese Academy of Sciences (CASKLB201804)

*Corresponding authors. Tel: +86-532-80662655; E-mail: Liu Ziyong, liuzy@qibebt.ac.cn; Li Fuli, lifl@qibebt.ac.cn

Received: 15 June 2021; Revised: 22 July 2021; Published online: 5 August 2021

野生型相近, 表明该基因的失活没有影响产酸期的代谢过程; *trxB* 基因的失活主要影响了产溶剂期的氧化还原平衡, 造成丙酮/丁醇的比率升高。

关键词: 丙酮丁醇梭菌; 硫氧还蛋白; 限磷连续发酵; ClosTron 系统

The role of thioredoxin system in solvent production process of *Clostridium acetobutylicum*

YANG Huizhao¹, FAN Yixuan², JIANG Dandan³, ARMIN Ehrenreich², LIU Xiaohuan¹, LI Fuli^{2*}, LIU Ziyong^{2*}

1 College of Environmental Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266100, Shandong, China

2 Key Laboratory of Biofuels, Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266101, Shandong, China

3 College of Biotechnology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning, China

Abstract: [Objective] This study aimed at investigating the roles of thioredoxin dependent reduction pathway in growth and metabolism of *Clostridium acetobutylicum*. [Methods] We used ClosTron technology to inactivate the thioredoxin reductase genes (*trxB*) of Trx-dependent reduction system in *C. acetobutylicum* to obtain the mutant, which was further verified by Southern blotting to test the copy number of the intron. Batch fermentation was implemented in minimum medium to analyze the growth and metabolic products of the wild type and mutant. The wild type and mutant were maintained at acidogenesis and solventogenesis phase to investigate the growth and production in the phosphorus-limited continuous fermentation. Antioxidant capacity was also studied by adding different concentrations of hydrogen peroxide. [Results] The results of resistance screening and gene sequencing showed that a thioredoxin reductase inactivated mutant named *C. acetobutylicum trxB::int(29)* was successfully constructed. In batch fermentation, the maximum optical density (OD_{600}) value of mutant and wild type was similar, reaching 6.5; but the maximum OD_{600} of mutant was obtained at 36 h, 12 h later than that of wild type. Nevertheless, in the acidogenic phase of continuous fermentation, the growth of wild type and mutant had little change. OD_{600} was stable at 4.6 and 4.4, respectively; glucose consumption and acid production were also similar. At the solventogenic phase, OD_{600} of the mutant was 3.5 and the butanol titer decreased to 36.1 mmol/L, lower than those of the wild type (4.0 and 48 mmol/L); but the acetone titer increased to 25.5 mmol/L compared to the wild type of 18 mmol/L. Furthermore, low concentration of hydrogen peroxide had little effect on the mutant, while high concentration caused more damage to the mutant than the wild type. [Conclusion] The inactivation of thioredoxin reductase gene was not a lethal mutation. The growth and acid production ability of the mutant were similar to those of the wild type, indicating that the inactivation of thioredoxin reductase gene did not affect the metabolic process of acetogenesis. The inactivation of *trxB* gene mainly affected the redox balance during solventogenic phase, resulting in the increase of acetone/butanol ratio.

Keywords: *Clostridium acetobutylicum*; thioredoxin; phosphorus-limited continuous fermentation; ClosTron system

半胱氨酸是生命体新陈代谢过程中不可或缺的含硫氨基酸,半胱氨酸分子中含有活泼的巯基或硫醇基(-SH),处于还原状态,来自不同半胱氨酸的两个巯基可以发生氧化还原反应形成二硫键,二硫键又可以被还原重新生成巯基^[1-2],细胞通过巯基的还原态和氧化态(thio/disulfide)的变化调控重要的代谢活动,参与核酸合成、损伤修复、信号传递及应对环境变化^[3]。二硫键的还原需要还原力,硫氧还蛋白(thioredoxin, *trx*)和硫氧还蛋白还原酶(thioredoxin reductase)组成的催化体系可以将NADPH的电子传递给二硫键,从而生成还原态的巯基(图1),因此这两种酶和NADPH共同形成硫氧还蛋白还原系统^[4-5],参与原核和真核细胞的许多关键生物学过程,维持细胞质的还原环境^[6]。在植物细胞内,叶绿体硫氧还蛋白是其氧化还原体系的关键组成部分,能够介导环境信号到叶绿体蛋白,为维持植物细胞氧化还原稳态起到重要作用^[7-8]。在大肠杆菌中,硫氧

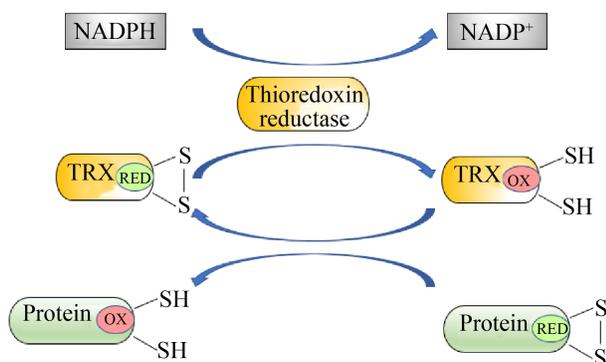


图1 硫氧还蛋白还原酶还原氧化性硫氧还蛋白示意图^[6-8]

Figure 1 Schematic diagram of the reduction of oxidative thioredoxin by thioredoxin reductase^[6-8]. This schematic diagram depicts the catalytic system composed of thioredoxin reductase and thioredoxin (TRX) transferring electrons from NADPH to disulfide bonds to generate reduced sulfhydryl groups.

还蛋白还原系统对于维持正常生长是必不可少的,同时敲除硫氧还蛋白和谷胱甘肽还原系统时,大肠杆菌无法在有氧环境中生长^[9],结果表明,这2种还原系统在功能上可能彼此部分替代。相比之下,在酿酒酵母中,硫氧还蛋白还原系统的功能明显不同于大肠杆菌^[10],酿酒酵母的硫氧还蛋白还原系统中包含2个编码硫氧还蛋白的基因 *trx1* 和 *trx2*, *trx1* 或 *trx2* 单突变体在生长速率和细胞形态方面与野生型相同,而双突变体的细胞周期受到严重影响,传代时间明显增加^[11]。在枯草芽孢杆菌中,硫氧还蛋白为细胞生长必需的蛋白质,当硫氧还蛋白缺失,具有抗氧化功能的其他基因表达水平明显提高,且细胞中参与硫的利用的相关基因表达水平明显提高^[12]。金黄色葡萄球菌为了抵抗宿主细胞的氧化防御机制,体内的硫氧还蛋白通过向关键还原酶提供还原力,以维持细胞内的氧化还原稳态,同时硫氧还蛋白还原酶与NADPH将硫氧还蛋白还原^[13],特别是在谷胱甘肽还原系统缺乏的情况下,硫氧还蛋白还原系统对金黄色葡萄球菌在氧化应激下的生存尤为重要^[14]。总而言之,尽管硫氧还蛋白还原系统是普遍的二硫化物还原系统,但在不同的微生物中,细胞功能的实现有着显著不同。此外在有些微生物中,硫氧还蛋白还原系统还具有清除过氧化物的功能^[15](图2)。

丙酮丁醇梭菌是厌氧产孢的革兰氏阳性细菌,是工业发酵中生产丙酮和丁醇的模式菌株,根据功能基因组分析,丙酮丁醇梭菌具有2个硫氧还蛋白还原系统^[16]。它们的编码基因分别是 *trxA1-trxB1-gpx3* (基因编号: CAC1547-CAC1549) 和 *trxA2-trxB2* (基因编号: CAC3082-CAC3083)。前者包含3个基因,分别编码硫氧还蛋白、硫氧还蛋白还原酶和谷胱甘肽过氧化物酶同源物,并作为多顺反子单元串联定位。后者包含

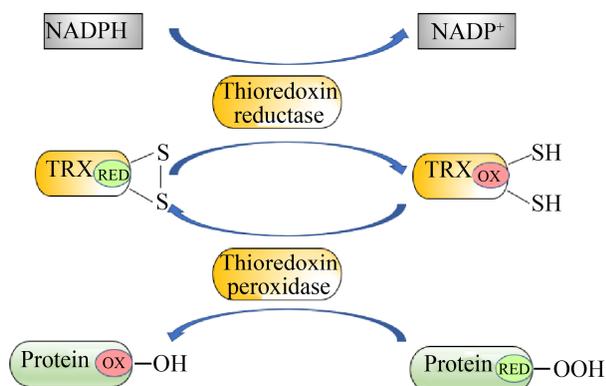


图2 硫氧还蛋白还原系统清除过氧化物示意图^[7-8]
Figure 2 Schematic diagram of thioredoxin reduction system to remove peroxide^[7-8]. This schematic diagram depicts the catalytic system composed of thioredoxin reductase and thioredoxin (TRX), which transfers electrons from NADPH to carboxyl groups to generate alcohol groups and scavenging peroxides (protein-OOH).

分别编码硫氧还蛋白和硫氧还蛋白还原酶的2个串联基因。前期的研究中,通过向培养基中通入氧气检测丙酮丁醇梭菌的功能基因的转录水平变化,发现前者在10 min内强烈上调,而后者转录水平变化不大^[17],表明 *trxA1-trxB1-gpx3* 基因簇编码的硫氧还蛋白还原系统在丙酮丁醇

梭菌应对氧化压力的过程中扮演重要作用,在应对氧化压力时启动大量转录并表达相关功能蛋白。因此,在本研究中,失活了 *trxB* (基因编号: CAC1548) 基因以破坏该系统功能,通过比较相同培养条件下野生型和突变株的代谢变化来解析该系统的功能。

1 材料与方法

1.1 质粒和菌株

在本研究中使用的质粒和菌株见表1。

1.2 主要试剂

Taq DNA 聚合酶、*Pfu* DNA 聚合酶购于赛默飞世尔科技(中国)有限公司。Kapa DNA 聚合酶购于上海捷易生物科技有限公司。琼脂糖凝胶回收试剂盒购于广州飞扬生物工程有限公司。细菌基因组 DNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒、DNA 分子 Marker、T4 连接酶购于北京全式金生物技术有限公司。红霉素、甲砒霉素和四环素购于北京索莱宝科技有限公司。氯霉素购于生工生物工程(上海)股份有限公司。Southern 技术所用试剂盒购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

表1 本研究中使用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains/plasmids	Characteristics	Sources
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	Wild type strain	ATCC
<i>Escherichia coli</i> TOP10	F ⁻ , Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), <i>mcrA</i> , φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ <i>lacX74</i> , <i>endA1</i> , Δ(<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , (<i>Str^R</i>), <i>nupG</i>	Transgen GmbH, Beijing
<i>C. acetobutylicum</i> <i>trxB::int</i> (29)	Group II intron inserted at 29./30. bp of <i>trxB</i> (CAC1548), <i>Erm^R</i>	This study
pMTL007	Clostridial expression vector for expression of ClosTron containing <i>Erm</i> RAM, <i>Cm^R</i>	[18]
pMTL007C-E2	Clostridial expression vector for expression of ClosTron containing <i>Erm</i> RAM, <i>Cm^R</i>	[18]
pAN2	Plasmid harboring φ3T I methyltransferase gene of <i>B. subtilis</i> phage φ3tI to methylate shuttle plasmids before their introduction into <i>C. acetobutylicum</i> , <i>Tet^R</i>	[18]
pMTL007C-E2- <i>trxB</i>	ClosTron plasmid retargeted to <i>C. acetobutylicum</i> <i>trxB</i> (CAC1548) gene, <i>Cm^R</i>	This study

1.3 培养基

LB 培养基(g/L): 酵母提取物 5 g, 胰蛋白胨 10 g, 氯化钠 10 g, 去离子水溶解并定容至 1 L, 115 °C 灭菌 30 min, 根据需要添加抗生素。若为固体培养基, 灭菌前需要添加 15 g 琼脂粉。

梭菌生长培养基(clostridial growth medium, CGM) (g/L): 取 1 L 去离子水, 加入 KH_2PO_4 0.75 g, K_2HPO_4 0.75 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.71 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, NaCl 1 g, 酵母提取物 5 g, 天冬酰胺 2 g, 葡萄糖 50 g, 115 °C 灭菌 30 min。若为固体培养基, 灭菌前需要添加 15 g 琼脂粉。

基本培养基(minimal medium, MM) (g/L): 取 800 mL 去离子水, 115 °C 灭菌 30 min, 灭菌锅温度降到 100 °C 以下, 称取 KH_2PO_4 1 g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1 g, NaCl 0.01 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.015 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g 溶于其中, 称取 50 g 葡萄糖溶解在 200 mL 去离子水中, 再次灭菌。在灭菌结束后趁热取出, 将 ρ -氨基苯甲酸 2 mg, Thiamin-HCl 2 mg, 生物素 0.1 mg 以及 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.015 g 溶解在葡萄糖溶液中, 过滤(0.22 $\mu\text{mol/L}$ 的滤膜)后加入到培养基中, 最后通氮气置换出培养基瓶中的氧气。

磷元素限制培养基(phosphate-limited medium, PLMM, 控制磷酸盐浓度为 0.5 mmol/L) (g/L): 取 800 mL 去离子水, 115 °C 灭菌 30 min, 灭菌锅温度降到 100 °C 以下, 称取 KH_2PO_4 0.07 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, NaCl 0.01 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.015 g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g 溶于其中, 使用稀硫酸调节 pH 为 2.5, 同时, 称取 40 g 葡萄糖溶

于 200 mL 去离子水中, 再次灭菌。在灭菌结束后趁热取出, 将 ρ -氨基苯甲酸 2 mg, Thiamin-HCl 2 mg, 生物素 0.1 mg 以及 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.015 g 溶解在葡萄糖溶液中, 将配置好的糖溶液加到 800 mL 灭菌盐溶液中, 将其加入到盐溶液中, 最后向培养基瓶中通入高纯氮气置换出其中的氧气。

1.4 构建工程菌株

2001 年, 丙酮丁醇梭菌 ATCC 824 的基因组测序工作已经完成。在 NCBI 可以根据基因在细菌中的功能查找基因序列。本研究选定硫氧还蛋白还原酶基因(thioredoxin reductase, *trxB*, 基因编号 CAC1548)作为敲除的目的基因, 根据基因功能预测该操纵子作用于硫醇氧化还原途径中。构建突变株所使用的引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 引物详情见表 2。

利用 ClosTron 系统对 *trxB* 基因插入失活。首先构建穿梭重组质粒 pMTL007C-E2-*trxB*, 将构建的质粒转化入含有 pAN2 的大肠杆菌 TOP10 感受态细胞中进行甲基化。通过电转将甲基化后的 pMTL007C-E2-*trxB* 质粒转入到 *C. acetobutylicum* 感受态细胞中, 先在甲砒霉素浓度为 15 $\mu\text{g/mL}$ 的 CGM 平板上筛选, 再转接到红霉素浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 的 CGM 平板上筛选, 将筛选得到的转化子接种到红霉素浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 的 5 mL 液体 CGM 培养基中, 在 37 °C 摇床中培养约 12 h 后提取基因组 DNA。以基因组 DNA 为模板, 利用检测引物, 进行 PCR 扩增, 通过 PCR 产物鉴定转化子是否正确。阳性克隆重新在含有红霉素抗性的 CGM 平板上划线培养, 对得到的单克隆再进行验证, 验证正确的突变株于 -80 °C 冰箱中保存。Southern 杂交方法验证内含子插入位点单一性^[18-19]。

表 2 本研究中使用的引物

Table 2 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')	Sources
EBS universal	CGAAATTAGAACTTGCCTTCAGTAAAC	[18]
<i>trxB</i> ClosTron mutant primers	<i>trxB</i> -IBS: AAAAAAGCTTATAATTATCCTTAGCAGGCCCACTTGTGCGCCCAGATAGG GTG <i>trxB</i> -EBS1d: CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCCCCTTCCTAACTT ACCTTCTTTGT <i>trxB</i> -EBS2: TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGATTCTGCTCGATAGAGGAAAGTGTCT	This study
spofdx-seq-F	GATGTAGATAGGATAATAGAATCCATAGAAAATATAGG	This study
<i>trxB</i> gene check primers	CAC1548F: GTGAGGCTGTAGATAAGTATGG CAC1548R: TCCGAAACATCGTATATTCC	This study
Intron II probe primers	Intron II-F: CGCGACTCATAGAATTATTTC Intron II-R: ATACTCAGGCCTCAATTAACC	This study

1.5 丙酮丁醇梭菌发酵方法

1.5.1 丙酮丁醇梭菌分批发酵方法

丙酮丁醇梭菌及其突变株的分批发酵在体积为 250 mL 的厌氧血清瓶中进行, 置于摇床中, 控制转速为 200 r/min、温度为 37 °C, 工作体积为 50 mL, 菌液接种量为 5%。基本培养基中成分清晰, 易于检测野生型和突变株在相同培养条件下的生长差异。在发酵过程中, 从发酵零时开始每隔 12 h 测定并记录菌液在 600 nm 的吸光度值, 同时取样 2 mL, 离心保留上清, 在 -20 °C 冰箱中保存。

1.5.2 丙酮丁醇梭菌连续发酵方法

丙酮丁醇梭菌的连续发酵在总体积为 1.5 L 的发酵罐中进行, 工作体积为 1 L, 使用 2 mol/L 的 KOH 溶液控制 pH 值, 控制温度为 37 °C, 转速为 200 r/min, 菌液接种量为 10%, 连续发酵的稀释速率为 0.075。首先在 2 个 50 mL 的基本培养基中培养细菌, 生长到 OD_{600} 约为 5 时, 2 瓶菌液接种到 1 L 的限磷培养基中, 接种后从发酵零时开始每隔 12 h 测定并记录菌液在 600 nm 的吸光度值, 同时取样 2 mL, 离心保留上清, 在 -20 °C 冰箱中保存。首先调节 pH 稳定在 5.7 进行产酸期发酵, 在产酸期连续发酵 4 d 后, 进入稳定的产酸期发酵阶段, 发酵罐内

细菌生长速率趋于稳定, 菌量和产物浓度也处于稳定状态, 此时的主要产物是乙酸和丁酸。随后由于产酸期产生大量乙酸和丁酸, 发酵液 pH 降低, 将发酵罐内 pH 调为 4.5, 24 h 内 pH 由 5.7 可降至 4.5, 进入产溶剂发酵期, 通过 4 d 的连续发酵, 进入稳定的产溶剂期发酵阶段, 此时的主要产物为丙酮、丁醇和乙醇, 产溶剂期结束以后, 整个连续发酵结束。

1.6 分析方法

细胞吸光度值(optical density, OD)由紫外分光光度计 Ultrospec 2100 Pro (美国 GE 公司) 测定 600 nm 处的细胞光吸收密度(OD_{600}), 用来表示微生物细胞在培养基中的生长量; 葡萄糖、乙醇、丙酮、丁醇、乙酸和丁酸的测定参照文献进行^[18]。连续发酵样品每个样品点测定生长量和产物浓度 2 次, 取平均值作图和表。

1.7 丙酮丁醇梭菌野生型与 *trxB* 基因突变株氧化应激实验

在 CGM 平板上分别挑取丙酮丁醇梭菌野生型和 *trxB* 基因突变株单菌落至 5 mL CGM 厌氧管中于 37 °C 过夜培养。在菌液 OD_{600} 达到 3 时, 将厌氧管转移至厌氧操作箱中。分别将菌液稀释 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 5 个梯度, 取 0.2 mL 在 CGM 平板上涂布。厌氧条件下 37 °C

培养 24–36 h, 比较不同稀释梯度的菌落数, 确定合适的稀释梯度以便于菌落计数。

将定量 H_2O_2 添加到稀释后的野生型和 *trxB* 基因突变株菌液中, 使菌液的终浓度为 0、10、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 。静置 20 min 后, 在 CGM 平板上涂布。平板在厌氧条件下 37 °C 培养 24–36 h 后菌落计数确定存活率, 每个梯度稀释有 5 个生物学重复。

2 结果与分析

2.1 构建 *trxB* 基因突变株

构建正确的重组质粒 pMTL007C-E2-*trxB*, 并通过电转化将其转入到丙酮丁醇梭菌中。使用含有红霉素的 CGM 平板筛选出可能正确的突变株。提取菌株基因组 DNA, 使用 PCR 的方法对筛选到的突变株进行鉴定。以 *trxB* 基因突变株和野生型菌株的基因组 DNA 分别做模板, 使用 CAC1548F 和 CAC1548R 为引物进行 PCR 扩增, 因为突变株的 *trxB* 基因被外源内含

子插入, 因此以突变株的基因组 DNA 为模板得到的产物长度应比野生型的长大约 1 800 bp。PCR 结果(图 3A)表明, 野生型基因组 DNA 的 PCR 产物在 300 bp 处有一条条带, 而突变体在 2.1 kb 处有一条条带, 比野生型长 1.8 kb, 结果证明通过筛选得到了突变株。通过分析, *trxB* 基因突变株基因组 DNA 为模板得到的 PCR 产物的测序结果, 确定内含子在 29/30 bp 处插入到了 *trxB* 基因中, 表明通过将内含子插入到 *trxB* 特定位置而使 *trxB* 基因失活, 获得了 *trxB* 基因失活的突变株 *C. acetobutylicum* *trxB::int(29)*。

为了进一步确认 *C. acetobutylicum* *trxB::int(29)* 的染色体 DNA 中仅存在一个内含子拷贝, 使用特异性内含子探针对 *C. acetobutylicum* *trxB::int(29)* 基因组进行 Southern 杂交分析, 具体方法参照文献[19]。结果如图 3B, 没有观察到野生型基因组 DNA 的杂交信号, 并且 *trxB* 基因突变体的基因组 DNA 仅在 2 000 bp 处显示出一条条带,

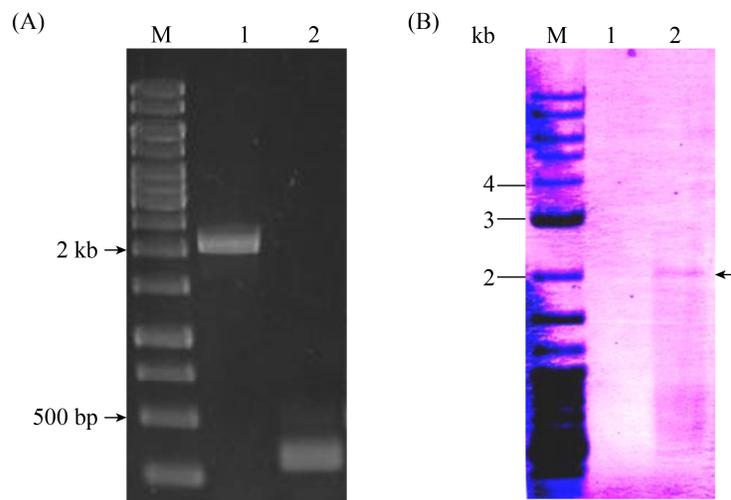


图 3 *trxB* 基因突变株 PCR (A) 和 Southern 杂交 (B) 验证

Figure 3 PCR verification (A) and Southern blotting (B) of the *trxB* mutant. A: M: marker; lane 1: CAC1548F and CAC1548R primers, the *trxB* mutant genome DNA; lane 2: CAC1548F and CAC1548R primers, wild type genome DNA; B: M: marker; lane 1: genomic DNA of wild type (negative control); lane 2: genomic DNA of the *trxB* mutant. The arrow indicated the position of hybridization bands.

表明 *C. acetobutylicum* *trxB*::int(29) 在染色体上仅具有一个内含子拷贝。

2.2 突变株与野生型菌株的发酵

2.2.1 *trxB* 基因突变株在基本培养基中的分批发酵

将野生型和 *trxB* 基因突变株在含 50 g/L 葡萄糖的基本培养基中培养, 显示出相似的生长表型。如图 4 所示, 野生型菌株在 24 h 的 OD_{600} 达到了最大, *trxB* 基因突变株在 36 h 的 OD_{600} 达到最大, 晚于野生型, 且突变株最大光密度略低于野生型, 表明硫氧还蛋白还原酶的缺失影响了丙酮丁醇梭菌的生长。

2.2.2 *trxB* 基因突变株在限磷培养基中的连续发酵

为了进一步探究 *trxB* 失活对生长和代谢的影响, 在磷酸盐限制的连续培养基中培养了野生型和 *trxB* 基因突变菌株。在相同的发酵条件下, 2 个菌株在连续发酵的产酸和产溶剂生长过程中均达到稳态生长。在连续培养期间测定光密度 (OD_{600}) 和葡萄糖的浓度, 分别如图 5、6 所示。

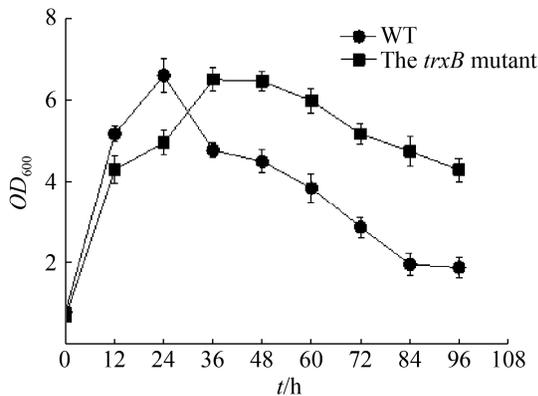


图 4 野生型与 *trxB* 突变体在基本培养基中的分批发酵表型

Figure 4 The wild type and the *trxB* mutant cultured in minimal medium in the batch fermentation. The experiment was repeated three times to obtain the standard deviation.

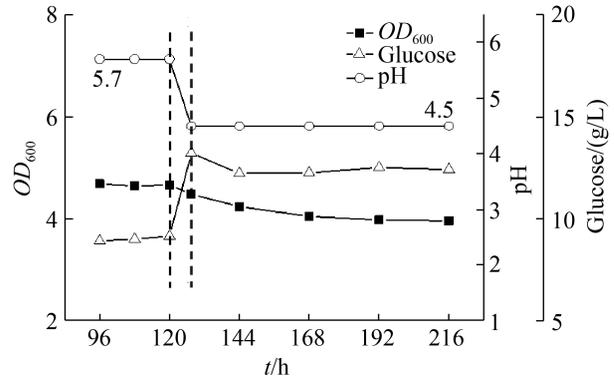


图 5 野生型菌株在限磷培养基中连续发酵的特性
Figure 5 The fermentation profile of a phosphate-limited continuous culture of the wild type. The dashed lines indicated the dynamic pH shift from 5.7 to 4.5.

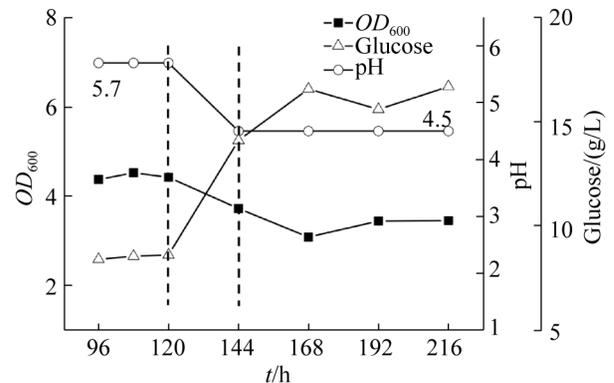


图 6 *trxB* 基因突变株在限磷培养基中连续发酵的特性

Figure 6 Characteristics of continuous fermentation of *trxB* gene mutant in phosphorus-limited medium. The dashed lines indicated the dynamic pH shift from 5.7 to 4.5.

测定 2 种菌株在连续发酵产酸期和产溶剂期的产物浓度并列于表 3 中。

在图 5 中可以看出, 野生型菌株在磷酸盐限制的连续发酵培养中, 产酸期 OD_{600} 约为 4.6, 在 120 h 时发酵培养基中剩余的葡萄糖浓度约为 9.6 g/L。pH 值变化 7.5 h 后, 菌株进入了产溶剂生长期, 在连续发酵 216 h 时趋于稳定, OD_{600}

表 3 野生型菌株和 *trxB* 基因突变株在限磷培养基中连续发酵产酸期和产溶剂期的产物

Table 3 Product concentrations of *C. acetobutylicum* wild type and the *trxB* mutant in the acidogenic growth and solventogenic growth phases of continuous fermentation in phosphorus-limited medium

Product	The wild type		The <i>trxB</i> mutant	
	120 h/ (mmol/L)	216 h/ (mmol/L)	120 h/ (mmol/L)	216 h/ (mmol/L)
Acetate	26.0	18.0	38.9	4.2
Butyrate	83.0	25.0	84.7	11.6
Acetone	0.8	18.0	1.9	25.5
Ethanol	3.3	6.1	4.2	5.1
Butanol	6.2	48.0	5.1	36.1

约为 4, 在连续培养的第 216 h 测得的葡萄糖浓度为 12.4 g/L (表 3)。

对于 *C. acetobutylicum trxB::int(29)* 菌株, 在产酸生长期的 OD_{600} 为 4.4, 与野生型相当。120 h 培养物中剩余葡萄糖的浓度为 8.6 g/L, 略低于野生型。此外, 乙酸和丁酸的浓度低于野生型(表 3)。然而, 在产溶剂生长期中, OD_{600} 在稳定后为 3.5, 低于野生型(OD_{600} 约为 4)。值得注意的是, 在 216 h 的产溶剂生长期中, 丙酮的浓度高于野生型, 而丁醇的浓度低于野生型(表 3)。在产溶剂生长期中, 野生型丙酮与丁醇的比例约为 1:2, 突变株丙酮与丁醇的比例约为 1:1.5, 丙酮与丁醇的比例突变株高于野生型。因此, 这些结果表明, *trxB* 基因的突变主要影响了产溶剂期的丙酮丁醇的产生。

2.3 野生型菌株与 *trxB* 基因突变株在 H_2O_2 氧化胁迫下的敏感度

使用 H_2O_2 作为氧化剂, 通过研究丙酮丁醇梭菌野生型和 *trxB* 基因突变株在不同程度氧化胁迫下细菌的存活率, 表征 2 种菌株对不同程度氧化胁迫压力的敏感度。如图 7 所示, 当 H_2O_2

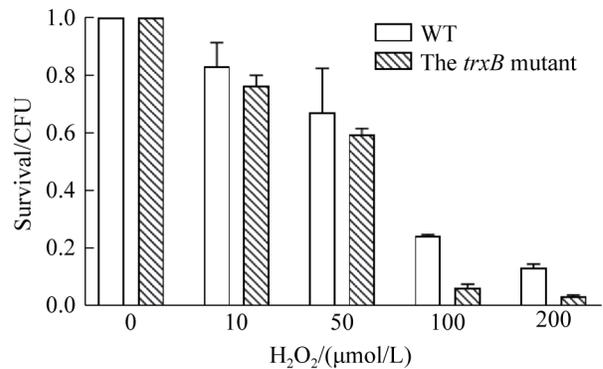


图 7 野生型菌株和 *trxB* 基因突变株在氧化压力胁迫下的存活率

Figure 7 Survival of *C. acetobutylicum* wild type and the *trxB* mutant in response to oxidative stress. Each serial dilution experiment has 5 biological replicates.

浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 和 50 $\mu\text{mol/L}$ 时, *trxB* 基因突变株在氧化胁迫下的细菌存活率略低于野生型。当 H_2O_2 浓度达到 100 $\mu\text{mol/L}$ 和 200 $\mu\text{mol/L}$ 时, *trxB* 突变株相较于野生型菌株, 在氧化压力胁迫下, 细菌的存活率明显降低, 在 H_2O_2 浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 野生型存活率为 0.24, *trxB* 基因突变株存活率仅为 0.06, 在 H_2O_2 浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 时, 野生型存活率为 0.13, *trxB* 基因突变株存活率仅为 0.03。结果说明, 低浓度的 H_2O_2 对突变株的影响不大, 当浓度增高到 100 $\mu\text{mol/L}$ 以上时, 相较于野生型菌株, 突变株的存活率大大降低。

3 讨论

利用 ClosTron 技术得到的丙酮丁醇梭菌 *trxB* 基因突变株可以在基本培养基中生长, 相较于野生型的生长, 虽然生长速率有所降低, 但最大生物量和野生型菌株相差不大(图 4), 说明在厌氧发酵条件下, *trxB* 基因的缺失不会影响丙酮丁醇梭菌的正常生长代谢, 这与大肠杆

菌中的情况相近^[9]。根据功能基因组的分析,在丙酮丁醇梭菌中,存在 2 个 Trx 依赖性还原系统,分别由 *trxA1-trxB1-gpx3* 和 *trxA2-trxB2* 基因簇编码,同时,丙酮丁醇梭菌中含有谷胱甘肽氧化还原系统^[16]。当丙酮丁醇梭菌代谢过程中产生氧化压力或生长环境变化导致菌株面对氧化压力胁迫时,理论上这 3 个系统都可以清除氧化自由基,实现菌株代谢过程中的氧化还原平衡,我们推测,*trxB* 基因失活后,需要该代谢步骤完成的生物反应由另外一个硫氧还蛋白系统或谷胱甘肽氧化还原系统完成,因此,*trxB* 基因的失活不影响突变株在厌氧条件下的发酵。但是当遇到高强度的氧化压力时,需要丙酮丁醇梭菌所有的抗氧化系统同时工作,缺失硫氧还系统的突变株存活能力降低,在添加 H₂O₂ 的实验中,低浓度的 H₂O₂ 对野生型菌株和突变株的影响相似,但高浓度的 H₂O₂ 大大提高了突变株的致死率。

丙酮丁醇梭菌的发酵是一个典型的酸醇双期发酵过程,在产酸期的主要产物是乙酸和丁酸,产溶剂期的主要产物是丙酮和丁醇,该代谢过程已有很多综述性论文详细介绍^[20-21],总的来说,丙酮丁醇梭菌代谢过程中主要产物的前体都是乙酰辅酶 A,从能量代谢角度分析,乙酸和丁酸的合成过程是产生 ATP 的,在丙酮丁醇梭菌的对数生长期需要大量 ATP 进行生物合成,因此,对数生长期和产酸期重合;在稳定生长期,生物质不再积累,对 ATP 的需求相对于生长期少,丙酮和丁醇成为主要代谢产物。其中,丙酮和丁醇的合成也有不同,丙酮合成过程中不需要还原力,即 NAD(P)H 的参与,而丁醇的合成产物合成需要大量的 NAD(P)H 参与,因此,当碳源变化或是外源添加物影响了 NAD(P)H 的供应,就会造成丙酮和丁醇比率的变化,例如,在发酵培养基中添加中性红、甲

基紫精等人工电子载体的情况下,会增加 NAD(P)H 的供给,使丙酮丁醇梭菌发酵的主要产物转变为丁醇和乙醇^[22]。在连续发酵培养基中,向葡萄糖中添加甘油作为碳源时,也会提高丁醇在终产物中的比率,同时降低丙酮的比率,原因就是甘油代谢可以比葡萄糖代谢提供更多的 NAD(P)H^[23]。在本研究中,突变株在产溶剂期的丙酮产量比野生型菌株高,而丁醇产量低,造成突变株的丙酮/丁醇的比率比野生型菌株高,我们认为 *trxB* 基因失活后的功能可以被其他的氧化还原替代,但是完成相同的功能,消耗的还原力(NAD(P)H)比 Trx-硫氧还系统多,因此造成产溶剂期 NAD(P)H 供应减少,造成突变株的丙酮/丁醇比率提高。

参考文献

- [1] Davey L, Halperin SA, Lee SF. Thiol-disulfide exchange in gram-positive firmicutes. *Trends in Microbiology*, 2016, 24(11): 902–915.
- [2] Möller M, Hederstedt L. Role of membrane-bound thiol-disulfide oxidoreductases in endospore-forming bacteria. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2006, 8(5/6): 823–833.
- [3] Miller CG, Holmgren A, Arnér ESJ, Schmidt EE. NADPH-dependent and -independent disulfide reductase systems. *Free Radical Biology and Medicine*, 2018, 127: 248–261.
- [4] Aliverti A, Pandini V, Pennati A, de Rosa M, Zanetti G. Structural and functional diversity of ferredoxin-NADP⁺ reductases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2008, 474(2): 283–291.
- [5] Karplus PA, Daniels MJ, Herriott JR. Atomic structure of ferredoxin-NADP⁺ reductase: prototype for a structurally novel flavoenzyme family. *Science*, 1991, 251(4989): 60–66.
- [6] Arnér ESJ, Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *European Journal of Biochemistry*, 2000, 267(20): 6102–6109.
- [7] Kang ZH, Qin T, Zhao ZP. Thioredoxins and thioredoxin reductase in chloroplasts: a review. *Gene*, 2019, 706: 32–42.
- [8] Nikkanen L, Rintamäki E. Thioredoxin-dependent

- regulatory networks in chloroplasts under fluctuating light conditions. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*, 2014, 369(1640): 20130224.
- [9] Ritz D, Patel H, Doan B, Zheng M, Åslund F, Storz G, Beckwith J. Thioredoxin 2 is involved in the oxidative stress response in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(4): 2505–2512.
- [10] Grant CM, MacIver FH, Dawes IW. Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 1996, 29(6): 511–515.
- [11] Muller EG. Thioredoxin deficiency in yeast prolongs S phase and shortens the G1 interval of the cell cycle. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266(14): 9194–9202.
- [12] Mostertz J, Hochgräfe F, Jürgen B, Schweder T, Hecker M. The role of thioredoxin TrxA in *Bacillus subtilis*: a proteomics and transcriptomics approach. *Journal of Proteomics*, 2008, 8(13): 2676–2690.
- [13] Bose M, Bhattacharyya S, Biswas R, Roychowdhury A, Bhattacharjee A, Ghosh AK, Das AK. Elucidation of the mechanism of disulfide exchange between staphylococcal thioredoxin 2 and thioredoxin reductase 2: a structural insight. *Biochimie*, 2019, 160: 1–13.
- [14] Lun J, Holmgren A. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radical Biology and Medicine*, 2014, 66: 75–87.
- [15] Riebe O, Fischer RJ, Wampler DA, Kurtz DM, Bahl H. Pathway for H₂O₂ and O₂ detoxification in *Clostridium acetobutylicum*. *Microbiology: Reading, England*, 2009, 155(Pt 1): 16–24.
- [16] Kino K, Kuratsu S, Noguchi A, Kokubo M, Nakazawa Y, Arai T, Yagasaki M, Kirimura K. Novel substrate specificity of glutathione synthesis enzymes from *Streptococcus agalactiae* and *Clostridium acetobutylicum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 352(2): 351–359.
- [17] Kawasaki S, Watamura Y, Ono M, Watanabe T, Takeda K, Niimura Y. Adaptive responses to oxygen stress in obligatory anaerobes *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium aminovalericum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(12): 8442–8450.
- [18] 徐荆, 刘自勇, 朱海峰, 高亮亮, 张培玉, 李福利. 丙酮丁醇梭菌半胱氨酸合成途径中铁氧还蛋白和胱硫醚- γ -裂解酶基因功能. *微生物学报*, 2020, 60(3): 570–581.
- Xu J, Liu ZY, Zhu HF, Gao LL, Zhang PY, Li FL. Role of ferredoxin and cystathionine γ -lyase in cysteine biosynthesis of *Clostridium acetobutylicum*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(3): 570–581. (in Chinese)
- [19] Sambrook J, Russel DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, 2001.
- [20] Lütke-Eversloh T, Bahl H. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*: recent advances to improve butanol production. *Current Opinion in Biotechnology*, 2011, 22(5): 634–647.
- [21] Jones DT, Woods DR. Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiological Reviews*, 1986, 50(4): 484–524.
- [22] Grimm C, Janssen H, Krause D, Fischer RJ, Bahl H, Dürre P, Liebl W, Ehrenreich A. Genome-wide gene expression analysis of the switch between acidogenesis and solventogenesis in continuous cultures of *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2011, 20(1): 1–15.
- [23] Hönicke D, Janssen H, Grimm C, Ehrenreich A, Lütke-Eversloh T. Global transcriptional changes of *Clostridium acetobutylicum* cultures with increased butanol: acetone ratios. *New Biotechnology*, 2012, 29(4): 485–493.

(本文责编 张晓丽)