

辅因子 NADPH 调控对 D-1,2,4-丁三醇合成的影响

谷松鹤¹, 王金宝², 巩志金¹, 杨 革^{1*}, 高海军^{2*}

(1. 曲阜师范大学生命科学学院, 山东 曲阜 273100; 2. 北京理工大学生命学院, 北京 100081)

摘要:通过敲除编码 6-葡萄糖磷酸脱氢酶基因 *zuf* 和编码磷酸葡萄糖异构酶基因 *pgi*, 对合成 D-1,2,4-丁三醇(BT) 的重组大肠杆菌胞内辅因子 NADPH 再生进行扰动, 考察 NADPH/NADP⁺ 对 BT 合成的影响。结果显示, *pgi* 基因缺失菌株 MJ135kpG 胞内 NADPH/NADP⁺ 增加了 25%, 培养基中合理添加葡萄糖可以增强胞内 NADPH 供应, 促进 BT 合成。当初始葡萄糖浓度为 2 g/L 时, 24 h 时再补加葡萄糖 4 g/L 可以进一步提高 BT 产量至 4.13 g/L。

关键词: D-1,2,4-丁三醇; NADPH; 重组大肠杆菌; 基因敲除

中图分类号: Q93-33

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2021)S-0139-04

DOI: 10.16606/j.cnki.issn.0253-4320.2021.S.028

Effects of cofactor NADPH regulation on biosynthesis of D-1,2,4-butanetriol

GU Song-he¹, WANG Jin-bao², GONG Zhi-jin¹, YANG Ge^{1*}, GAO Hai-jun^{2*}

(1. College of Life Science, Qufu Normal University, Qufu 273100, China;

2. School of Life Science, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China)

Abstract: D-1,2,4-Butanetriol (BT) is an important intermediate in organic synthesis. Cytosolic cofactor NADPH of recombinant *Escherichia coli* that is used for synthesis of BTO is disturbed by deletion of *zuf* encoding for 6-glucose phosphate dehydrogenase and *pgi* encoding for glucose isomerase, to investigate the effects of NADPH/NADP⁺ on BTO synthesis via recombinant *Escherichia coli*. The results show that cytosolic NADPH/NADP⁺ in MJ135kpG strain with *pgi* gene deleted increases by 25%, and the appropriate addition of glucose in the medium can enhance the supply of cytosolic NADPH, which can promote the synthesis of BTO. As the initial concentration of glucose is 2 g·L⁻¹, the yield of BTO reaches 4.02 g·L⁻¹ in shake flask, and further increases to 4.13 g·L⁻¹ by adding glucose 4 g·L⁻¹ at 24 h. In a sum, enhancing NADPH supply is an effective strategy to improve BTO yield.

Key words: D-1,2,4-butanetriol; NADPH; recombinant *Escherichia coli*; Gene deletion

D-1,2,4-丁三醇(BT)是具有3个亲水羟基的四碳多元醇,作为一种重要的化学中间体,已应用于多个领域,如药物、造纸、聚合物和军工行业等^[1]。传统的BT合成方法为化学法,2003年Niu等^[1]首次报道了利用“两步法”以D-木糖和L-阿拉伯糖为底物生物合成1,2,4-丁三醇外消旋体的研究。2014年Valdehuesa等^[2]报道了利用工程菌“一步法”直接合成丁三醇。Li等^[3]在大肠杆菌(*E. coli*)中构建了一条以葡萄糖为底物经由苹果酸合成BT的代谢途径,但合成途径长,导致合成效率低。Abdel-Ghany等^[4]在拟南芥中引入经过密码子优化的源于细菌的基因合成丁三醇,但由于副产物对植物生长产生了不良影响,只能生产微量的丁三醇。

以木糖为底物合成BT时具有较高的合成效率,合成途径(图1)中最后一步3,4-二羟基丁醛还原反应由醇脱氢酶(*yqhD*)催化,其辅因子为

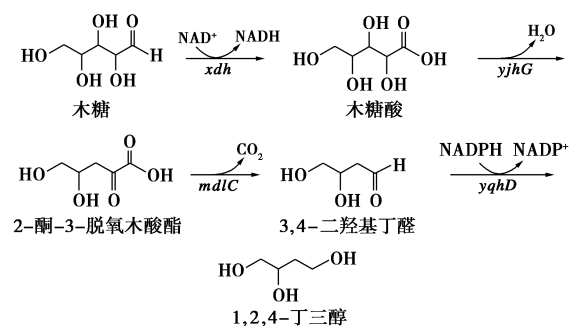


图1 D-木糖合成D-1,2,4-丁三醇的途径^[5]

收稿日期: 2021-02-04; 修回日期: 2021-04-19

基金项目: 国家重大专项资助项目(21001040202)

作者简介: 谷松鹤(1995-),女,硕士生,研究方向为生物化学与分子生物学,468304203@qq.com;杨革(1966-),男,博士,教授,硕士生导师,研究方向为发酵工程,通讯联系人,yangge100@126.com;高海军(1969-),男,博士,教授,硕士生导师,研究方向为发酵工程,通讯联系人,hj_gao@bit.com。

NADPH, 该辅因子在细胞生长和代谢过程中具有重要作用^[6]。 *E. coli* 代谢系统中, PPP 途径是辅因子 NADPH 再生的主要途径^[7], Chin 等^[8] 和 Siedler 等^[9] 通过敲除磷酸葡萄糖异构酶基因 *pgi* 或果糖激酶基因 *pfkA/pfkB*, 增加了胞内 NADPH 的供应, 提高了目标代谢物的合成效率。关于胞内还原力对丁三醇合成的影响相关研究还未见报道。

在前期丁三醇合成研究中^[10-11] 构建了以葡萄糖为碳源、能源底物, 以木糖为底物的合成系统, 木糖用于丁三醇合成, NADPH 主要由葡萄糖代谢产生。本文为了研究 NADPH 对 BT 合成的影响, 通过改造葡萄糖代谢途径对胞内 NADPH/NADP⁺ 进行调控, 探索 NADPH/NADP⁺ 与 BT 合成的关系; 通过葡萄糖添加方式的优化, 提高 NADPH 供应, 以促进 BT 的生成。

1 实验部分

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株与引物

本研究所用的质粒和菌株见表 1, 所用引物见表 2。

表 1 本研究所用质粒和菌株

质粒/菌株	特性	来源/ 参考文献
质粒		
pKD4, pKD46, pCP20	克隆载体	实验室
pTmx	pTrr99a 含有 <i>mdlC</i> , <i>xdh</i> , Amp ^R	[10]
菌株		
MJ134K	MG1655 ΔyjH $\Delta yagE$ $\Delta xylA$ $\Delta ptsG$, Kan ^R	[10]
MJ135kp	MJ134K 携带 pTmx	本文
MJ135kpG	MJ134K Δpgi , 携带 pTmx	本文
MJ135kpZ	MJ134K Δzuf , 携带 pTmx	本文

表 2 本研究所用引物

引物	引物序列(5'-3')	用途
<i>pgi</i> -F	ACAGCAGGTCGACATCAGCTCGCCGTGGC	扩增 <i>pgi</i>
<i>pgi</i> -R	GATGCAATGACTCGAATTATTTGGGGATA	扩增 <i>pgi</i>
<i>zuf</i> -F	GTTCTTCCAGTGTGAGAAATCAGCACCACC	扩增 <i>zuf</i>
<i>zuf</i> -R	TAAAGCTGGCGAATACGCACATTTTCTTTA	扩增 <i>zuf</i>
<i>pgi</i> -yz-F	TTCGCGCAGGATCTCAACAA	验证 <i>pgi</i>
<i>pgi</i> -yz-R	GCGGTCCGCCACACCCAGCC	验证 <i>pgi</i>
<i>zuf</i> -yz-F	TAATAAGCCCTTTGCAAT	验证 <i>zuf</i>
<i>zuf</i> -yz-R	GCGGTCCGCCACACCCAGCC	验证 <i>zuf</i>

1.1.2 主要试剂

基因扩增试剂盒、限制性内切酶、质粒提取试剂盒、DNA 回收试剂盒, 均为 TaKaRa (大连) 公司产品; 辅酶 II NADP (H) 含量检测试剂盒, 为 Solarbio (山东) 公司产品; 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG)、氨苄青霉素钠 (Ampicillin)、硫酸卡那霉素 (Kanamycin)、氯霉素 (Chloramphenicol), 购自 Sigma 公司; 酵母提取物、胰蛋白胨, 为 oxoid 公司产品; 其余试剂及试剂盒均为国产市售; 引物由上海生工生物工程公司合成。

1.1.3 培养基

LB 培养基 (g/L): 蛋白胨 10、酵母粉 5、氯化钠 10。根据需要添加琼脂 15 g/L 及抗生素 (卡那霉素 50 mg/L 和氨苄青霉素 50 mg/L)。

发酵培养基 (g/L): 蛋白胨 15、酵母粉 7.5、氯化钠 15。根据需要添加一定量过滤除菌的葡萄糖和木糖以及抗生素 (卡那霉素 50 mg/L 和氨苄青霉素 50 mg/L)。

1.2 方法

1.2.1 基因敲除方法

采用文献[12]的“一步法”敲除 *E. coli* 基因组上的基因。主要步骤为: 参考 *E. coli* MG1655 基因组序列和 pKD4 质粒序列, 设计含有同源臂的引物 *pgi*-F/*pgi*-R、*zuf*-F/*zuf*-R; 以从 CGSC (<https://cgsc2.biology.yale.edu/>) 购买的 *zuf* 和 *pgi* 基因缺失的 *E. coli* 菌株基因组作为模板扩增 Kan 抗性基因, 其两侧包含有 FRT 位点以及约 500 bp 与待敲除基因上下游一致的序列, 作为基因敲除靶片段; 纯化后, 电转化入含有 pKD46 的目的菌株, 筛选可得敲除了目的基因的菌株。采用该方法敲除 *E. coli* 基因组中的 *zuf* 和 *pgi* 基因, 并构建了携带质粒 pTmx 的菌株 MJ135kpZ、MJ135kpG、MJ135kp, 如表 1 所示。

1.2.2 培养方法

种子培养方法: 将 -80℃ 冰箱中保存的菌株划线至 LB 平板, 充分活化后挑取 2~3 个克隆至装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中进行摇瓶培养; 培养温度 37℃, 转速 190 r/min, 培养 14 h 至光密度 OD₆₀₀ 达到 5~6。

发酵方法: 取 5 mL 培养好的种子转接入装有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 摇瓶中, 培养温度 33℃, 摇床转速 190 r/min; 培养 6 h 后, 加入终浓度为 0.8 mmol/L 的 IPTG, 以及 20 g/L D-木糖、2 g/L 葡萄糖; 24 h 后, 再次加入终浓度为 2 g/L 的葡萄糖; 发酵时间 54 h, 发酵过程中定时取样分析, 每组

实验重复 3 次。

1.2.3 内源性辅酶 NADPH 的测定

参考文献[13],采用辅酶 II NADP(H)含量检测试剂盒进行。

1.2.4 发酵液中 BT 含量的测定

采用高效液相色谱法测定。取 2 mL 菌液室温下以 12 000 r/min 转速离心 1 min,上清液过滤后采用岛津 LC-15C 型 HPLC 进行检测。相关配置和条件为:示差折光检测器(RID-10A),Aminex HPX-87H(300 mm×7.8 mm)色谱柱(Bio-Rad,USA);流动相为 5 mmol/L H₂SO₄ 溶液,流速 0.6 mL/min,柱温 55℃,进样量 20 μL。采用 LC solution 15C 工作站记录数据,与标准样对照计算样品中各物质浓度。BT 和木糖的保留时间分别为 14.8、10 min。

1.2.5 菌体浓度的测定

采用光密度法。取培养好的菌液,稀释合适倍数,采用分光光度计在 600 nm 波长下测定光密度 OD₆₀₀ 作为菌体生长量。LB 培养基作为空白对照。

2 结果与讨论

2.1 葡萄糖利用途径对胞内 NADPH 的影响

BT 合成途径的运行需要 NADPH 参与,通过敲除编码 EMP 途径关键酶基因 *pgi* 和编码 PPP 途径关键酶基因 *zwf*,构建了扰动胞内 NADPH/NADP⁺ 的合成 BT 重组 *E. coli* 菌株 MJ135kpZ、MJ135kpG,以考察葡萄糖利用途径对胞内还原力平衡的影响,结果如表 3 所示。相较于对照菌株 MJ135kp,敲除 *pgi* 的菌株 MJ135kpG 在摇瓶发酵 48 h 后,胞内的 NADPH/NADP⁺ 明显提高,增加了 25%,而敲除 *zwf* 的菌株的 NADPH/NADP⁺ 显著降低。表明敲除 *pgi* 基因可以提高 NADPH/NADP⁺ 含量。*E. coli* 通过 EMP 途径和 PPP 途径进行葡萄糖代谢,PPP 途径关键基因 *zwf* 缺失,使葡萄糖主要通过 EMP 途径代谢,NADPH 的供应大大降低。而 EMP 途径关键基因 *pgi* 的缺失,极大地弱化了 EMP 途径,导致葡萄糖的主要代谢途径由 EMP 途径改为 PPP 途径,从而显著增加了 NADPH 的供应^[14-16]。

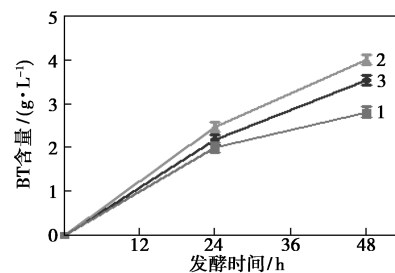
表 3 重组菌株葡萄糖代谢途径改造后胞内 NADPH/NADP⁺

菌株	敲除的基因	NADPH/NADP ⁺
MJ135kp	—	0.333±0.05
MJ135kpG	<i>pgi</i>	0.417±0.02
MJ135kpZ	<i>zwf</i>	0.020±0.01

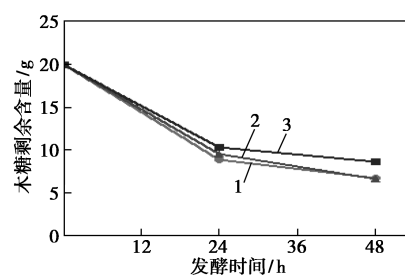
2.2 NADPH 调控对 BT 生物合成的影响

NADPH 是 BT 合成关键酶醇脱氢酶的辅酶,为了评估细胞 NADPH/NADP⁺ 和菌株合成 BT 能力之间的关系,比较了菌株 MJ135kp、MJ135kpG 和 MJ135kpZ 培养 24 和 48 h 后的 BT 产量。由图 2(a)可知,敲除了 *pgi* 的菌株 MJ135kpG 与菌株 MJ135kp 相比,BT 产量由 3.35 g/L 提高到 4.02 g/L,而敲除了 *zwf* 的菌株 MJ135kpZ 合成 BT 的能力则降低。这表明 NADPH/NADP⁺ 和 BT 产量关系密切,提高胞内 NADPH/NADP⁺ 可以促进 BT 的合成。

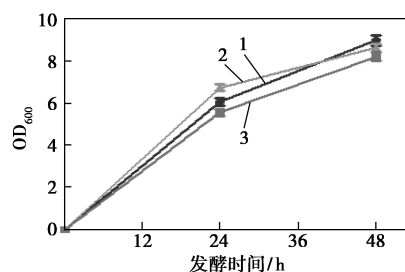
进一步考察了 NADPH 调控时,菌株的木糖利用情况和菌株生长情况。由图 2(b)、2(c)可知,敲除 *zwf* 和 *pgi* 对细胞生长影响不大。Zhao 等^[17]认为,由于在 *zwf* 突变体中,底物摄取速率和关键酶活性都发生了变化,因此代谢网络如何协调各途径来维持生长速率可能成为问题。



(a) BT 产量



(b) 木糖醇含量



(c) 不同菌株的含量

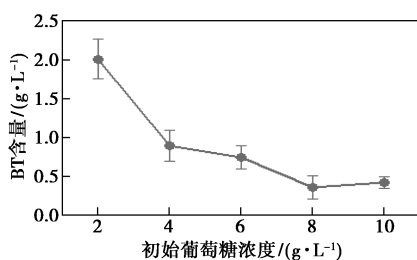
1—MJ135kp;2—MJ135kpG;3—MJ135kpZ

图 2 摇瓶发酵后各物质的含量

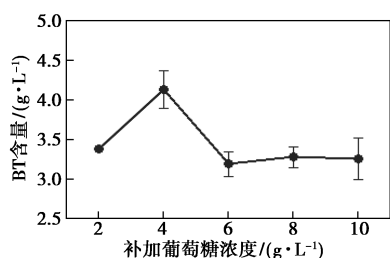
2.3 NADPH 的强化供应对 BT 合成的促进作用

为了增强胞内 NADPH 的供应,提高 BT 合成效

率,研究了不同初始葡萄糖浓度及葡萄糖供给方式对 BT 合成的影响。MJ135kpG 培养过程中 0 h 添加葡萄糖,培养 48 h 后发酵液中 BT 浓度如图 3(a) 所示。可以看出,随着葡萄糖浓度的增加,BT 产量下降。在初始葡萄糖浓度为 2 g/L 时 BT 浓度最高。另外进行了补加方式的研究,如图 3(b) 所示。0 h 添加葡萄糖 2 g/L,24 h 再补加葡萄糖 4 g/L,BT 合成量为 4.13 g/L。葡萄糖是菌株生长代谢的碳源和能源,并为 BT 合成提供 NADPH,但过高的初始葡萄糖浓度可能产生抑制菌体生长的乙酸等副产物,并使木糖的利用受到抑制^[12],影响了 BT 的合成。



(a) 初始葡萄糖浓度对 BT 产量的影响



(b) 补加葡萄糖对 BT 产量的影响

图 3 MJ135kpG 摇瓶发酵 48 h BT 含量

3 结论

本文通过对葡萄糖代谢途径进行改造,强化供应 NADPH 有效促进了 BT 的合成。敲除 EMP 途径关键基因 *pgi* 后,结果显示 *pgi* 基因缺失菌株 MJ135kpG 胞内 NADPH/NADP⁺增加了 25%。摇瓶发酵结果显示,NADPH/NADP⁺的增加也促进了 BT 的合成,BT 产量由未调控 NADPH 时的 3.35 g/L 提高到 4.02 g/L。初始葡萄糖浓度 2 g/L,24 h 时补加葡萄糖 4 g/L,BT 合成量增加到 4.13 g/L。强化 NADPH 供应是一个提高 BT 合成的有效策略。

参考文献

- [1] Niu W, Molefe M N, Frost J W. Microbial synthesis of the energetic material precursor 1,2,4-butanetriol [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(43): 12998-12999.
- [2] Valdehuesa K N G, Liu H, Ramos K R M, et al. Direct bioconversion of *D*-xylose to 1,2,4-butanetriol in an engineered *Escherichia coli* [J]. *Process Biochemistry*, 2014, 49(1): 25-32.
- [3] Li X, Cai Z, Li Y, et al. Design and construction of a non-natural malate to 1,2,4-butanetriol pathway creates possibility to produce 1,2,4-butanetriol from glucose [J]. *Scientific Reports*, 2014, 4(1): 1-9.
- [4] Abdel-Ghany S E, Day I, Heuberger A L, et al. Metabolic engineering of *Arabidopsis* for butanetriol production using bacterial genes [J]. *Metabolic Engineering*, 2013, 20: 109-120.
- [5] Valdehuesa K N G, Liu H W, Ramos K R M, et al. Direct bioconversion of *D*-xylose to 1,2,4-butanetriol in an engineered *Escherichia coli* [J]. *Process Biochemistry*, 2014, 49(1): 25-32.
- [6] Li W, Wu H, Li M, et al. Effect of NADPH availability on free fatty acid production in *Escherichia coli* [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2018, 115(2): 444-452.
- [7] Chemler J A, Fowler Z L, McHugh K P, et al. Improving NADPH availability for natural product biosynthesis in *Escherichia coli* by metabolic engineering [J]. *Metabolic Engineering*, 2010, 12: 96-104.
- [8] Chin J W, Khankal R, Monroe C A, et al. Analysis of NADPH supply during xylitol production by engineered *Escherichia coli* [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 102(1): 209-220.
- [9] Siedler S, Bringer S, Bott M. Increased NADPH availability in *Escherichia coli*: Improvement of the product per glucose ratio in reductive whole-cell biotransformation [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 92(5): 929-937.
- [10] Zhang N, Ma P, Gao H. Metabolic pathway optimization for biosynthesis of 1,2,4-butanetriol from xylose by recombinant *Escherichia coli* [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2016, 93: 51-58.
- [11] 马鹏飞, 蒙坚, 周静, 等. 重组大肠杆菌利用 *D*-木糖合成 *D*-1,2,4-丁三醇 [J]. *化工学报*. 2015, 66(7): 2620-2627.
- [12] Vinuselvi P, Lee S K. Rewiring carbon catabolite repression for microbial cell factory [J]. *Biochemistry and Molecular Biology Reports*, 2012, 45(2): 59-70.
- [13] Xu J, Han M, Zhang J, et al. Metabolic engineering corynebacterium glutamicum for the *L*-lysine production by increasing the flux into *L*-lysine biosynthetic pathway [J]. *Amino Acids*, 2014, 46(9): 2165-2175.
- [14] Yuan X, Wang J, Lin J, et al. Efficient production of xylitol by the integration of multiple copies of xylose reductase gene and the deletion of Embden-Meyerhof-Parnas pathway-associated genes to enhance NADPH regeneration in *Escherichia coli* [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2019, 46(8): 1061-1069.
- [15] Lindner S N, Ramirez L C, Krusemann J L, et al. NADPH-auxotrophic *E. coli*: A sensor strain for testing in vivo regeneration of NADPH [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(12): 2742-2749.
- [16] Ng C Y, Farasat I, Maranas C D, et al. Rational design of a synthetic Entner-Doudoroff pathway for improved and controllable NADPH regeneration [J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 29: 86-96.
- [17] Zhao J, Baba T, Mori H, et al. Effect of *zuf* gene knockout on the metabolism of *Escherichia coli* grown on glucose or acetate [J]. *Metabolic Engineering*, 2004, 6(2): 164-174. ■