

# 高产光学纯(R)-乙偶姻工程菌株的构建与发酵工艺优化\*

马志林<sup>1</sup>, 陈先锐<sup>2\*\*</sup>, 叶柳健<sup>1</sup>, 李检秀<sup>2</sup>, 黄艳燕<sup>2</sup>, 张云开<sup>1</sup>, 蒙健宗<sup>1\*\*</sup>

(1. 广西大学生命科学与技术学院, 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广西南宁 530004; 2. 广西科学院, 国家非粮生物质能源工程技术研究中心, 非粮生物质酶解国家重点实验室, 广西生物质工程技术研究中心, 广西生物炼制重点实验室, 广西南宁 530007)

**摘要:**本研究拟在大肠杆菌中构建光学纯(R)-乙偶姻的合成途径和利用辅酶工程调控 NADH/NAD<sup>+</sup> 氧化还原平衡, 并对工程菌发酵(R)-乙偶姻进行优化。将来源于 *Enterobacter cloacae* 的  $\alpha$ -乙酰乳酸合成酶基因 *budB*、 $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶基因 *budA* 和来源于 *Lactobacillus brevis* 的 NADH 氧化酶基因 *noxE* 进行密码子优化后组成基因簇, 构建表达质粒并导入大肠杆菌, 进一步优化工程菌的培养基成分和发酵条件, 提高(R)-乙偶姻的合成能力。结果表明: 获得专一性合成高光学纯(R)-乙偶姻的大肠杆菌工程菌株 GXASR, 对其发酵条件进行系统优化后, 摇瓶发酵的(R)-乙偶姻产量为 36.82 g/L, 光学纯度达 99.1%, 发酵罐补料发酵的(R)-乙偶姻产量达到 67.65 g/L。在大肠杆菌细胞中过表达外源基因簇 *budB-budA-noxE* 能够高效合成光学纯(R)-乙偶姻, 经发酵优化后, 工程菌的(R)-乙偶姻产量、生产强度和得率均显著提高, 为代谢工程改造大肠杆菌生产高光学纯(R)-乙偶姻提供了理论基础。

**关键词:** 合成生物学 辅酶工程 工程菌株 (R)-乙偶姻 发酵优化

中图分类号: Q81 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2020)01-0049-08



微信扫一扫, 与作者在线交流(OSID)

## 0 引言

乙偶姻(Acetoin, AC), 化学品名为 3-羟基-2-丁酮, 又名 3-羟基丁酮或甲基乙酰甲醇, 具有强烈的奶油、脂肪、黄油样香气, 是多种天然食品和发酵食品的重要风味物质。我国标准 GB 2760—2014 规定乙偶姻为允许使用的食用香料, FEMA 安全号是

2008<sup>[1-3]</sup>。而且, 乙偶姻作为一种重要的四碳平台化合物, 已经被美国能源部指定为优先开发的平台化合物之一, 在食品、化工、医药、烟草、化妆品、调酒等行业具有广泛的用途<sup>[4-5]</sup>。乙偶姻具有(R)-乙偶姻和(S)-乙偶姻两种旋光异构体, 单一构型的(R)-乙偶姻在合成高附加值手性药物中间体、化学中间体、液晶材料等方面具有重要应用, 因此光学纯(R)-乙偶姻的价值要远远高于混合型乙偶姻<sup>[3-4]</sup>。

\* 国家自然科学基金项目(21868007), 中央引导地方科技发展专项(桂科 ZY1949015)和广西重大科技创新基地建设项目(2018-15-Z03)资助。

### 【作者简介】

马志林(1993—), 男, 在读硕士研究生, 主要从事生物发酵研究。

### 【\*\*通信作者】

陈先锐(1987—), 男, 助理研究员, 主要从事微生物分子遗传与生理代谢研究, E-mail: chenxianrui123@126.com; 蒙健宗(1972—), 男, 研究员, 主要从事生物工程技术研究, E-mail: meng\_jz@163.com。

### 【引用本文】

DOI: 10.13656/j.cnki.gxkx.20200311.006

马志林, 陈先锐, 叶柳健, 等. 高产光学纯(R)-乙偶姻工程菌株的构建与发酵工艺优化[J]. 广西科学, 2020, 27(1): 49-56.

MA Z L, CHEN X R, YE L J, et al. Construction of High Yield Optically Pure (R) Acetoin Engineering Strain and Optimization of Fermentation Process [J]. Guangxi Sciences, 2020, 27(1): 49-56.

目前生产乙偶姻的方法主要为化学合成法<sup>[6]</sup>和微生物合成法<sup>[7-14]</sup>。化学合成乙偶姻产品中容易掺杂致癌致病化合物,限制了乙偶姻作为食品香精香料的使用。微生物合成的乙偶姻属于天然香料,其市场价格要远远高于化学合成的产品。自然界能够合成乙偶姻的微生物有很多,如粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)、产酸克雷伯氏菌(*Klebsiella oxytaca*)、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)、阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)、多粘类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*)和部分芽孢杆菌属(*Bacillus*)等<sup>[15-19]</sup>,但天然菌株往往合成乙偶姻的能力较弱、(R)-乙偶姻光学纯度低或菌株具有致病性,不利于(R)-乙偶姻的微生物发酵生产,导致光学纯(R)-乙偶姻的市场价格居高不下,极大地限制了其发展和应用。

近年来,选育和改造天然微生物合成乙偶姻取得较多的研究成果。Xu等<sup>[20]</sup>通过诱变筛选得到高产菌株*B. subtilis* TH-49,以葡萄糖为碳源得到乙偶姻产量46.9 g/L;Sun等<sup>[21]</sup>利用紫外及LiCl进行复合诱变后筛选得到*S. marcescens* H32,再以蔗糖为碳源进行补料分批发酵,乙偶姻产量能达到60.5 g/L。诱变育种随机性较高,通过代谢工程手段对细胞合成(R)-乙偶姻进行定向改造逐渐成为研究的主流。Bai等<sup>[22]</sup>和Lv等<sup>[23]</sup>分别对菌株*S. marcescens*进行遗传操作,通过敲除*meso*-2,3-丁二醇脱氢酶基因*slaC*,或过量表达转录调控因子基因*slaR*,使其具有利用蔗糖生产(R)-乙偶姻的能力,产量分别为21.8 g/L和39.9 g/L;Wang等<sup>[24]</sup>敲除*K. pneumoniae* CGMCC 1.6366的2,3-丁二醇脱氢酶编码基因*budC*,可阻断菌株将乙偶姻转化为2,3-丁二醇;进一步敲除乙偶姻脱氢酶编码基因*acoAB-CD*,工程菌株利用葡萄糖在补料发酵条件下生产(R)-乙偶姻可达62.3 g/L,光学纯度为98.0%。大肠杆菌*Escherichia coli*属于非致病菌株,并且其本身不合成乙偶姻,因此有利于定向改造成生产光学纯(R)-乙偶姻的工程菌株。Xiao等<sup>[25]</sup>在*E. coli* BL21(DE3)中过量表达来自*B. subtilis*的2,3-丁二醇脱氢酶基因*ydjL (bdhA)*和来自*Lactobacillus brevis*的NADH氧化酶基因*noxE*,以(2R,3R)-2,3-丁二醇为原料进行全细胞催化得到41.8 g/L(R)-乙偶姻,光学纯度为96.0%;Xu等<sup>[3]</sup>克隆*S. marcescens*的*budR*、*budA*、*budB*基因以及*L. brevis*的NADH氧化酶基因,将其导入*E. coli* DH5 $\alpha$ 中进行表达,葡

萄糖补料分批发酵的(R)-乙偶姻产量为60.3 g/L,光学纯度为97.3%。

在微生物细胞中, $\alpha$ -乙酰乳酸合成酶( $\alpha$ -acetolactate Synthase, AlsS)和 $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶( $\alpha$ -acetolactate Decarboxylase, AlsD)是发酵丙酮酸生成(R)-乙偶姻的两个关键酶。另外,糖酵解和三羧酸循环会产生大量的还原型辅酶NADH,而由丙酮酸到(R)-乙偶姻的合成并没有消耗NADH,因此如果单一增强(R)-乙偶姻的合成会造成NADH累积,细胞将启动各种杂醇杂酸合成途径消耗过量的NADH来实现氧化型辅酶NAD<sup>+</sup>再生,必然会降低(R)-乙偶姻的合成效率和光学纯度。本研究通过对细胞(R)-乙偶姻代谢途径进行系统分析,利用辅酶工程精确调控异源NADH氧化酶进行合理表达来消耗胞内过量的NADH,使胞内NADH/NAD<sup>+</sup>氧化还原平衡,从而提高(R)-乙偶姻光学纯度。以大肠杆菌*E. coli* MG1655为宿主细胞,将来源于*E. cloacae*的 $\alpha$ -乙酰乳酸合成酶基因*budB*、 $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶基因*budA*和来源于*L. brevis*的NADH氧化酶基因*noxE*的核苷酸序列进行密码子优化,利用人工合成的方法获得包含3个基因的基因簇,构建表达质粒pTrc99A-*budB*-*budA*-*noxE*并导入大肠杆菌获得工程菌株,达到提高目标产物转化率和维持胞内NADH/NAD<sup>+</sup>氧化还原平衡的双重目的,进一步优化工程菌的培养基成分和发酵条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株及载体

宿主菌株*E. coli* MG1655和表达载体pTrc99A由作者所在实验室保藏。

#### 1.1.2 试剂

T4 DNA连接酶和各种限制性内切酶(NEB);质粒提取试剂盒、凝胶回收试剂盒和DNA纯化试剂盒(Promega);蛋白胨和酵母粉(OXOID,分析纯);葡萄糖、氯化钠(分析纯)、乙腈(国药集团化学试剂有限公司,HPLC级别);乙酸乙酯(成都市科龙化工试剂厂,分析纯);乙偶姻(>98.0%)和2,3-丁二醇(>97.0%)(TCA);氨苄(Amp,北京索莱宝科技有限公司);甜菜碱(阿拉丁公司);维生素B1(生工生物工程(上海)股份有限公司)。

#### 1.1.3 仪器

恒温水浴摇床ZWY-110X50(上海智城分析仪

器制造有限公司), 生物传感分析仪 SBA-40D(山东省科学院生物研究所), 3 L 发酵罐(上海保兴生物工程设备有限公司), 旋转蒸发器 RE-5000(上海贤德实验仪器有限公司), 气相色谱仪 7890A(安捷伦科技有限公司), 紫外可见分光光度计 DU800(美国贝克曼库尔特公司), MIKRO 200 离心机(德国 Hettich 科学仪器公司)。

#### 1.1.4 培养基

种子培养基(LB 培养基): 酵母粉 5 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 氯化钠 10 g/L, pH 值调至 7.0, 转化子培养时添加氨苄 0.1 g/L, 固体培养基另加 20 g/L 琼脂粉。

初始发酵培养基: 葡萄糖 80 g/L, 酵母粉 7 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 氯化钠 0.5 g/L, 氨苄 0.1 g/L, 甜菜碱 4 mmol/L, 维生素 B<sub>1</sub> 0.1 g/L, pH 值调至 7.0。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 产(R)-乙偶姻工程菌株的构建

将来源于 *E. cloacae* 的  $\alpha$ -乙酰乳酸合成酶基因 *budB*、 $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶基因 *budA* 和来源于 *L. brevis* 的 NADH 氧化酶基因 *noxE* 的核苷酸序列进行密码子优化, 在每个基因前面添加含核糖体结合位点和间隔序列 TAAGGAGGATATACA 连接成基因簇 *budB-budA-noxE*, 并由苏州金唯智生物科技有限公司进行人工合成, 利用酶切位点 *Sac* I 和 *Bam* HI 将基因簇 *budB-budA-noxE* 插入质粒 pTrc99A 的启动子后面, 获得多顺反子重组质粒 pTrc99A-*budB-budA-noxE*, 再将重组质粒 pTrc99A-*budB-budA-noxE* 转化宿主菌 *E. coli* MG1655; 以含质粒 pTrc99A 的 *E. coli* MG1655 作为空白对照。分别挑取两种转化子提取质粒进行质粒酶切验证、PCR 验证和测序验证。

#### 1.2.2 产(R)-乙偶姻工程菌株的发酵

将验证正确的转化子接到含 Amp<sup>r</sup> 的 LB 液体培养基中, 37℃ 培养 12 h, 然后分别按照 10% 的接种量转接于含有 50 mL 初始发酵培养基的三角瓶(250 mL)中, 实验组与对照组各 3 瓶, 37℃, 250 r/min, 培养 36 h。取发酵液, 经离心机 12 000 r/min 离心 2 min 后, 取上清液, 经过稀释一定倍数后测残糖浓度以及(R)-乙偶姻含量。其中, (R)-乙偶姻得率为产物(R)-乙偶姻质量与消耗葡萄糖质量之比, 生产强度为产物(R)-乙偶姻浓度与发酵周期之比。

#### 1.2.3 产(R)-乙偶姻工程菌株发酵条件的优化

利用摇瓶发酵分别对葡萄糖浓度、酵母粉浓度、

蛋白胨浓度、最佳接种量以及最适初始 pH 值进行单因素实验, 优化工程菌株发酵培养基和培养条件。

#### 1.2.4 产(R)-乙偶姻工程菌株发酵罐补料发酵

优化初始发酵培养基后, 将菌种接种于 3 L 发酵罐中, 装液量 1.5 L, 控制通气量 1.0 vvm, 搅拌转速 500 r/min, 温度 37℃。当残糖浓度为 30—40 g/L 时补加葡萄糖至 150—170 g/L, 待发酵至残糖浓度降到 5—8 g/L 时停止发酵。

#### 1.2.5 残糖浓度的检测

取发酵液 12 000 r/min 离心处理 2 min, 取上清液稀释 100 倍后, 用生物传感分析仪 SBA-40D 检测残糖浓度。

#### 1.2.6 乙偶姻以及 2,3-丁二醇浓度的检测

使用气相色谱仪测定乙偶姻和 2,3-丁二醇的浓度。色谱柱为 Phenomenex ZB-WAXplus 毛细管色谱柱(30 m×0.32 mm×0.25  $\mu$ m), 进样口温度和检测器温度均为 250℃, 使用内标法并以乙腈作内标来进行检测。

#### 1.2.7 (R)-乙偶姻光学纯度的测定

采用气相色谱仪测定(R)-乙偶姻的光学纯。色谱柱为 Agilent Cyclosil-B 毛细管手性柱(30 m×0.32 mm×0.25  $\mu$ m); FID 氢火焰检测器, 载气为氮气, 流速 1.6 mL/min。起始柱温度 100℃, 保留 1 min, 然后以 10℃/min 的速度升温至 120℃, 以 6℃/min 的速度升温至 130℃, 以 20℃/min 的速度升温至 230℃, 进样口温度和检测器温度均为 240℃, 以乙酸乙酯为萃取剂。

## 2 结果与分析

### 2.1 产(R)-乙偶姻工程菌株 GXASR 的构建与发酵

将合成的基因簇 *budB-budA-noxE* 亚克隆至表达载体 pTrc99A, 构建重组质粒 pTrc99A-*budB-budA-noxE*, 将重组质粒转化 *E. coli* MG1655, 转化子提取质粒进行质粒酶切、PCR 条带电泳及 DNA 测序结果均验证正确, 证明工程菌株构建成功, 命名为 GXASR。同时本研究在各个基因前引入 RBS 序列来增强与核糖体间的亲和力, 提高蛋白翻译效率<sup>[26]</sup>, 以此来提高  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶、 $\alpha$ -乙酰乳酸合成酶以及氧化还原酶的表达, 调控代谢流, 以增加(R)-乙偶姻产量。

将对照菌株与工程菌株 GXASR 进行摇瓶培养, 36 h 后发酵结束, 对发酵液进行检测, 对照菌株发酵液中没有检测到(R)-乙偶姻产生, 工程菌株 GXASR

能够有效地合成(R)-乙偶姻(表1)。

表1 工程菌株GXASR在初始培养基中的发酵

Table 1 Fermentation performances of engineering strain GXASR in initial medium

菌种 Strains	残还原糖浓度 Concentration of residual sugar (g/L)	(R)-乙偶姻浓度 Concentration of (R)-Acetoin (g/L)	2,3-丁二醇浓度 Concentration of 2,3-BD (g/L)	得率 Yield (g/g)	生产强度 Productivity(g/(L·h))
MG1655/pTrc99A	74.10±0.77	ND	ND	—	—
GXASR	0.00	26.5±0.63	2.49±0.55	0.33	0.73

注:ND表示未检测到

Note:ND means not detected

## 2.2 产(R)-乙偶姻工程菌株GXASR发酵条件优化

### 2.2.1 葡萄糖浓度对GXASR工程菌株合成(R)-乙偶姻的影响

工程菌株GXASR在葡萄糖浓度80—120 g/L范围内,随着碳源浓度的升高,(R)-乙偶姻产量也随着提高。但是,随着碳源浓度的升高,培养基变得更加黏稠使得传质效率变低,且较高的碳源浓度,使得

表2 葡萄糖浓度对工程菌株GXASR合成(R)-乙偶姻的影响

Table 2 Effect of glucose concentration on (R)-acetoin produced by engineering strain GXASR

葡萄糖浓度 Concentration of glucose (g/L)	发酵周期 Fermentation time (h)	残还原糖浓度 Concentration of residual sugar (g/L)	(R)-乙偶姻浓度 Concentration of (R)-Acetoin (g/L)	2,3-丁二醇浓度 Concentration of 2,3-BD (g/L)	得率 Yield (g/g)	生产强度 Productivity (g/(L·h))
80	36	0.35±0.03	26.10±0.86	2.17±0.34	0.33	0.73
90	38	0.43±0.08	28.44±0.77	2.31±0.25	0.32	0.75
100	40	6.60±0.73	30.49±0.82	3.54±0.46	0.33	0.76
110	48	16.47±0.84	31.16±0.61	9.10±0.38	0.33	0.65
120	54	29.40±0.61	33.24±0.64	12.24±0.77	0.37	0.62

### 2.2.2 蛋白胨浓度对工程菌株GXASR合成(R)-乙偶姻的影响

工程菌株GXASR在蛋白胨浓度为15 g/L时,(R)-乙偶姻浓度、得率、生产强度都达到了最大;当蛋白胨浓度超过15 g/L时,(R)-乙偶姻合成效率反

表3 蛋白胨浓度对工程菌株GXASR合成(R)-乙偶姻的影响

Table 3 Effect of peptone concentration on (R)-acetoin produced by engineering strain GXASR

蛋白胨浓度 Concentration of peptone (g/L)	发酵周期 Fermentation time (h)	残还原糖浓度 Concentration of residual sugar (g/L)	(R)-乙偶姻浓度 Concentration of (R)-Acetoin (g/L)	2,3-丁二醇浓度 Concentration of 2,3-BD (g/L)	得率 Yield (g/g)	生产强度 Productivity (g/(L·h))
5.0	36	7.73±0.25	28.01±0.26	0.98±0.13	0.30	0.78
7.5	36	6.73±0.43	29.73±0.17	1.21±0.06	0.32	0.83
10.0	36	1.73±0.36	32.41±0.82	1.48±0.22	0.33	0.90
12.5	36	3.67±0.54	33.31±0.61	1.62±0.04	0.35	0.93
15.0	36	6.23±0.61	34.05±0.05	1.56±0.14	0.36	0.95
17.5	36	3.63±0.71	33.48±0.88	1.62±0.25	0.35	0.93
20.0	36	8.97±0.83	31.27±0.34	1.39±0.30	0.34	0.87

菌体所受的渗透压变得更大,不利于菌体生长以及产物的合成。当葡萄糖浓度>100 g/L时,发酵周期明显延长,并且残糖浓度较高,乙偶姻产量提高幅度较小而副产物2,3-丁二醇浓度提高幅度较大(表2),从发酵周期、葡萄糖利用程度、乙偶姻产量、副产物生成量以及生产强度综合考虑,将发酵培养基碳源浓度定为100 g/L。

而变低,得率以及生产效率也跟着下降(表3),这可能是由于蛋白胨浓度不断变高,使得氮源浓度过高导致营养富余,菌体将多余的营养物质用于合成自身所需的其他物质,从而致使(R)-乙偶姻合成效率低下,故将发酵培养基蛋白胨浓度定为15 g/L。

### 2.2.3 酵母粉浓度对工程菌株 GXASR 合成(R)-乙偶姻的影响

酵母粉浓度为 15 g/L 时, (R)-乙偶姻浓度、得率和生产强度最高; 随着酵母粉浓度继续增大, 3 项指

表 4 酵母粉浓度对工程菌株 GXASR 合成(R)-乙偶姻的影响

Table 4 Effect of yeast extract concentration on (R)-acetoin produced by engineering strain GXASR

酵母粉浓度 Concentration of yeast extract (g/L)	发酵周期 Fermentation time (h)	残还原糖浓度 Concentration of residual sugar (g/L)	(R)-乙偶姻浓度 Concentration of (R)-Acetoin (g/L)	2,3-丁二醇浓度 Concentration of 2,3-BD (g/L)	得率 Yield (g/g)	生产强度 Productivity (g/(L·h))
5.0	36	7.45±0.32	30.74±0.58	1.91±0.03	0.31	0.85
7.5	36	1.70±0.53	32.68±0.83	2.71±0.21	0.33	0.90
10.0	36	2.83±0.66	33.00±0.80	2.43±0.33	0.34	0.92
12.5	36	2.55±0.82	34.36±0.24	2.86±0.54	0.37	0.95
15.0	36	0.20±0.10	35.51±0.33	2.85±0.18	0.38	0.99
17.5	36	3.77±0.75	35.13±0.22	2.52±0.39	0.37	0.98
20.0	36	0.27±0.16	35.01±0.67	3.11±0.26	0.35	0.97

### 2.2.4 发酵初始 pH 值以及接种量对工程菌株 GXASR 合成(R)-乙偶姻的影响

pH 值为 6.0—7.5 时, 工程菌株耗糖效率均比较好, 残糖浓度小于 10 g/L, 当 pH 值为 6.5 时, 菌株的(R)-乙偶姻产量最高(图 1)。首先菌株在 pH 值为 7.0 的种子培养基中培养后, 转接到 pH 值为 6.5 的发酵培养基中, 由于 pH 值相近, 菌种很容易适应 pH 值的变化; 其次菌种在发酵过程中会产生有机酸, 培养基会呈现弱酸性的趋势, 选择 pH 值为 6.5 的发酵条件, 在发酵过程中不需要补加过多的碱以维持培养基呈中性, 减少了碱液对发酵过程的影响。接种量为 10% 时菌株耗糖效率最快, (R)-乙偶姻产量最高。接种量过低, 菌种增殖速度慢, (R)-乙偶姻产量不理想; 而接种量过高, 菌种增殖速度快, 细胞生长额外消耗了较多的碳源, 导致用于合成(R)-乙偶姻的葡萄糖减少, 故(R)-乙偶姻不升反降(图 2)。因

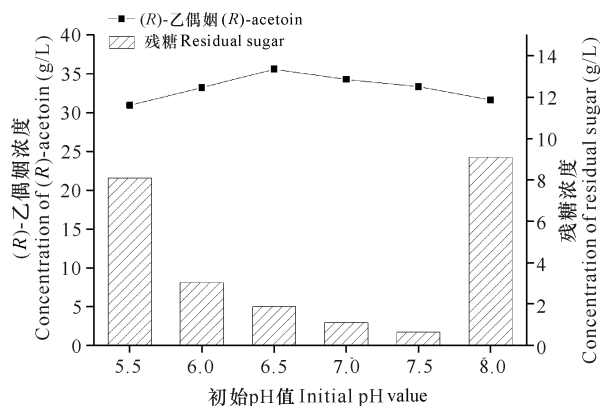


图 1 初始 pH 值对菌株 GXASR 合成(R)-乙偶姻的影响

Fig. 1 Effect of initial pH value on (R)-acetoin produced by GXASR

标都略有下降(表 4), 这是由于菌株将富余的营养物质以及能量用于副产物的合成, 从而降低(R)-乙偶姻合成效率, 因此将发酵培养基酵母粉浓度定为 15 g/L。

此, 确定菌种最适发酵培养基 pH 值为 6.5, 最适接种量为 10%。在优化的条件下摇瓶发酵(R)-乙偶姻产量为 36.82 g/L, 光学纯为 99.1%。

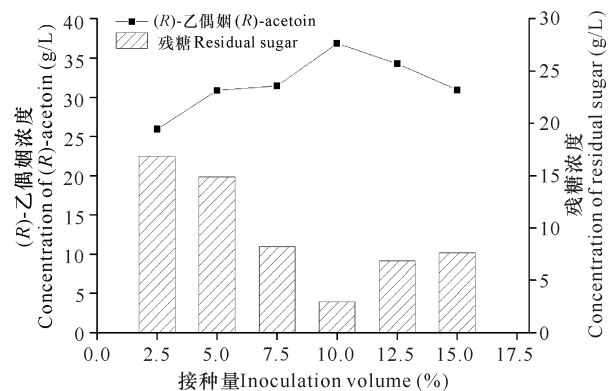


图 2 接种量对菌株 GXASR 合成(R)-乙偶姻的影响

Fig. 2 Effect of inoculate volume on (R)-acetoin produced by GXASR

### 2.3 工程菌株 GXASR 发酵罐补料发酵

经过发酵条件的优化, 确定以 100 g/L 葡萄糖为碳源、15 g/L 蛋白胨和 15 g/L 酵母粉为氮源的发酵培养基, pH 值为 6.5 以及接种量 10% 进行 3 L 发酵罐补料发酵实验。在发酵过程中的不同时间点进行取样, 检测发酵液菌体浓度、(R)-乙偶姻浓度、2,3-丁二醇浓度以及残糖浓度。当残糖浓度降至 30—40 g/L 时一次补加葡萄糖至 160 g/L。发酵初期菌体  $OD_{600}$  增长迅速, 耗糖较快, 发酵 7.5 h 时残糖浓度降低到 40.2 g/L, 菌体  $OD_{600}$  达 17.4, 此时菌体浓度高、代谢活力强, 通过补加葡萄糖, 细胞可以高效合成(R)-乙偶姻, 发酵液中(R)-乙偶姻浓度快速升高。发酵 36 h 时, 残糖浓度降至 8.5 g/L, 发酵液中(R)-

乙偶姻浓度不再增加,发酵结束,(R)-乙偶姻产量达到 67.65 g/L,生产强度为 1.88 g/(L·h),得率为 0.40 g/g(图 3)。

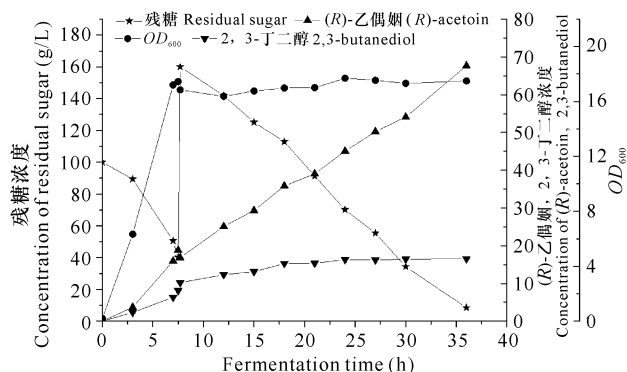


图 3 工程菌株 GXASR 补料发酵

Fig. 3 The fed-batch fermentation of engineering strain GXASR

### 3 讨论

化学法及天然菌种产生的乙偶姻都是(R)-乙偶姻和(S)-乙偶姻的混合物,两者的物理化学性质相近,手性拆分十分困难,存在高成本、高能耗、污染严重等问题,极大地限制了光学纯(R)-乙偶姻开发和应用。因此,开展微生物代谢网络改造及高效生产光学纯(R)-乙偶姻的研究具有重要的意义,也是近年来研究热点之一。Kochius 等<sup>[27]</sup>利用酶催化氧化 *meso*-2,3-丁二醇的方法合成(R)-乙偶姻,浓度为 48 mmol/L,反应需要的辅酶 NAD<sup>+</sup>由电化学方法再生;2016年,Guo 等<sup>[28]</sup>在 *E. coli* BL21(DE3)中表达 *meso*-2,3-丁二醇脱氢酶、NADH 氧化酶和血红蛋白的基因,将获得的 *E. coli*/pET-*mbdh-nox-vgb* 作为全细胞生物催化剂,可以高效催化 *meso*-2,3-丁二醇还原为(R)-乙偶姻,(R)-乙偶姻的产量为 86.7 g/L,光学纯度为 97.9%。但全细胞催化法需要采用 *meso*-2,3-丁二醇、(R,R)-2,3-丁二醇等作为底物,光学纯的底物成本高昂,无法应用于工业生产(R)-乙偶姻。有相当多的报道<sup>[3,22-25]</sup>通过合成生物学方法和代谢工程方法在微生物细胞中高效表达(R)-乙偶姻合成的关键酶基因或敲除(R)-乙偶姻降解的相关基因,对菌株进行代谢网络改造,采用葡萄糖、蔗糖等碳源合成(R)-乙偶姻,其产量和光学纯度都有较大的提高。但是工程菌株中代谢网络的碳架物质流量往往会发生重大改变,导致(R)-乙偶姻合成与细胞内氧化还原平衡关系的失调,进而限制(R)-乙偶姻产量和光学纯度的进一步提高,(R)-乙偶姻光学纯

度通常在 98%以下。大肠杆菌遗传背景清晰、转化效率高、遗传操作技术成熟,使其在代谢工程等研究领域备受青睐,是用于构建微生物细胞工厂合成生物基化学品首选宿主之一。本研究以大肠杆菌 *E. coli* MG1655 为宿主细胞,将来源于 *E. cloacae* 的  $\alpha$ -乙酰乳酸合成酶基因 *budB*、 $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶基因 *budA* 和来源于 *L. brevis* 的 NADH 氧化酶基因 *noxE* 组成基因簇,构建大肠杆菌生产(R)-乙偶姻工程菌株,实现大肠杆菌高效合成(R)-乙偶姻和胞内 NADH/NAD<sup>+</sup>氧化还原平衡,通过优化发酵过程,经摇瓶发酵的(R)-乙偶姻产量为 36.82 g/L,光学纯度高达 99.1%,发酵罐补料发酵的(R)-乙偶姻产量达到 67.65 g/L,生产强度为 1.88 g/(L·h),得率为 0.40 g/g,发酵周期短,生产强度高,是具有潜力的(R)-乙偶姻生产方法。

同时在研究中发现,以葡萄糖、酵母粉和蛋白胨等作为原料时成本仍较高,在大规模发酵生产时不利于提高效益;发酵过程中随着(R)-乙偶姻的积累,会出现 2,3-丁二醇、乙醇、乳酸、乙酸等副产物的产出,副产物浓度升高时会降低目的产物的转化率并导致生物毒性,对菌体的生长速率、菌体浓度以及外源基因表达都会产生明显的抑制作用。本研究下一步将探讨利用廉价原料替代高价碳源氮源,并通过代谢工程、基因组学等手段对细胞内(R)-乙偶姻的合成和分解代谢网络进行系统解析与优化,为低成本、高效率生产高光学纯(R)-乙偶姻提供操作性良好的技术支持。

### 4 结论

本研究成功构建了产光学纯(R)-乙偶姻的大肠杆菌工程菌株 GXASR,并通过摇瓶发酵对发酵培养基和培养条件进行优化,使得工程菌株 GXASR 能高效地合成(R)-乙偶姻。GXASR 工程菌株在优化后的培养基以及发酵条件中,经摇瓶发酵的(R)-乙偶姻产量为 36.82 g/L,通过发酵罐补料发酵 36 h,(R)-乙偶姻产量能够达到 67.65 g/L,光学纯为 99.1%,生产强度为 1.88 g/(L·h),得率为 0.40 g/g,显著提高了(R)-乙偶姻合成效率。本研究为人工途径合成(R)-乙偶姻提供了现实指导意义。

### 参考文献

- [1] XIAO Z J, LU J R. Strategies for enhancing fermentative production of acetoin: A review [J]. Biotechnology Ad-

- vance,2014,32(2):492-503.
- [2] XIAO Z J, LU J R. Generation of acetoin and its derivatives in foods [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2014,62(28):6487-6497.
- [3] XU Q M, XIE L X, LI Y Y, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for efficient production of (3*R*)-acetoin [J]. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2015,90(1):93-100.
- [4] GAO C, ZHANG L, XIE Y, et al. Production of (3*S*)-acetoin from diacetyl by using stereoselective NADPH-dependent carbonyl reductase and glucose dehydrogenase [J]. Bioresource Technology,2013,137:111-115.
- [5] WERP Y T, PETERSEN G. Top value added chemicals from biomass: Volume I-Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas [R]. Washington DC: US Department of Energy,2004.
- [6] 甄德帅. 香料乙偶姻(3-羟基-2-丁酮)化学工艺合成现状 [J]. 黔南民族师范学院学报,2015,35(4):121-124.
- [7] 李欣,张显,杨套伟,等. 代谢工程改造枯草芽孢杆菌发酵生产乙偶姻 [J]. 基因组学与应用生物学,2017(12):5159-5166.
- [8] BAE S J, KIM S, HAHN J S. Efficient production of acetoin in *Saccharomyces cerevisiae* by disruption of 2,3-butanediol dehydrogenase and expression of NADH oxidase [J]. Scientific Reports,2016,6:27667.
- [9] WANG S, LUO Q, LIU J, et al. Mutation and fermentation optimization of *Bacillus amyloliquefaciens* for acetoin production [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2018,34(5):803-811.
- [10] DAI J, WANG Z, XIU Z L. High production of optically pure (3*R*)-acetoin by a newly isolated marine strain of *Bacillus subtilis* CGMCC 13141 [J]. Bioprocess and Biosystems Engineering,2019,42(3):475-483.
- [11] JIA X, KELLY R M, HAN Y. Simultaneous biosynthesis of (*R*)-acetoin and ethylene glycol from D-xylose through, in vitro, metabolic engineering [J]. Metabolic Engineering Communications,2018,7:e00074.
- [12] ZHANG G, WANG Q, SU Y, et al. Genome sequence of *Staphylococcus aureus* PX03, an acetoin-producing strain with a small-sized genome [J]. Genome Announcements,2017,5(37):e00753-17.
- [13] CHO S, KIM K D, AHN J H, et al. Selective production of 2,3-butanediol and acetoin by a newly isolated bacterium *Klebsiella oxytoca* M1 [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2013, 170 (8): 1922 - 1933.
- [14] TIAN Y, XU H, LIU J, et al. Construction of acetoin high-producing *Bacillus subtilis* strain [J]. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2016, 30 (4): 700-705.
- [15] SHI L T, GAO S S, YU Y, et al. Microbial production of 2,3-butanediol by a newly-isolated strain of *Serratia marcescens* [J]. Biotechnology Letters, 2014, 36: 969-973.
- [16] JANTAMA K, POLYIAM P, KHUNNONKWAO P, et al. Efficient reduction of the formation of by-products and improvement of production yield of 2,3-butanediol by a combined deletion of alcohol dehydrogenase, acetate kinase-phosphotransacetylase, and lactate dehydrogenase genes in metabolically engineered *Klebsiella oxytoca* in mineral salts medium [J]. Metabolic Engineering,2015,30:16-26.
- [17] RATHNASINGH C, PARK J M, KIM D K, et al. Metabolic engineering of *Klebsiella pneumoniae* and in silico investigation for enhanced 2,3-butanediol production [J]. Biotechnology Letters,2016,38(6):975-982.
- [18] LI L X, LI K, WANG Y, et al. Metabolic engineering of *Enterobacter cloacae* for high-yield production of enantiopure (2*R*, 3*R*)-butanediol from lignocellulose-derived sugars [J]. Metabolic Engineering, 2015, 28: 19-27.
- [19] YU B, SUN J B, BOMMAREDDY R R, et al. Novel (2*R*, 3*R*)-2,3-butanediol dehydrogenase from potential industrial strain *Paenibacillus polymyxa* ATCC 12321 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011,77(12):4230-4233.
- [20] XU H, JIA S, LIU J. Development of a mutant strain of *Bacillus subtilis* showing enhanced production of acetoin [J]. African Journal of Biotechnology, 2013, 10 (5):779-799.
- [21] SUN J, ZHANG L, RAO B, et al. Enhanced acetoin production by *Serratia marcescens* H32 using statistical optimization and a two-stage agitation speed control strategy [J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering,2012,17(3):598-605.
- [22] BAI F, DAI L, FAN J, et al. Engineered *Serratia marcescens* for efficient (3*R*)-acetoin and (2*R*, 3*R*)-2,3-butanediol production [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology,2015,42(5):779-786.
- [23] LV X, DAI L, BAI F, et al. Metabolic engineering of *Serratia marcescens* MG1 for enhanced production of (3*R*)-acetoin [J]. Bioresources Bioprocessing,2016,3(1):52.
- [24] WANG D, ZHOU J, CHEN C, et al. *R*-acetoin accumulation and dissimilation in *Klebsiella pneumoniae* [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2015,42(8):1105-1115.
- [25] XIAO Z J, LV C, GAO C, et al. A novel whole-cell biocatalyst with NAD<sup>+</sup> regeneration for production of chiral chemicals [J]. PLoS One,2010,5(1):e8860.
- [26] OLINS P O, RANGWALA S H. A novel sequence element derived from bacteriophage T7 mRNA acts as an enhancer of translation of the *lacZ* gene in *Escherichia coli* [J]. The Journal of Biological Chemistry,1989,264(29):16973-16976.
- [27] KOCHIUS S, PAETZOLD M, SCHOLZ A, et al.

Enantioselective enzymatic synthesis of the  $\alpha$ -hydroxy ketone (*R*)-acetoin from *meso*-2,3-butanediol [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2014, 103:61-66.

[28] GUO Z, ZHAO X, HE Y, et al. Efficient (*3R*)-acetoin

production from *meso*-2,3-butanediol using a new whole-cell biocatalyst with co-expression of *meso*-2,3-butanediol dehydrogenase, NADH oxidase and *Vitreoscilla* hemoglobin [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2017, 27(1):92-100.

## Construction of High Yield Optically Pure (*R*) Acetoin Engineering Strain and Optimization of Fermentation Process

MA Zhilin<sup>1</sup>, CHEN Xianrui<sup>2</sup>, YE Liujuan<sup>1</sup>, LI Jianxiu<sup>2</sup>, HUANG Yanyan<sup>2</sup>, ZHANG Yunkai<sup>1</sup>, MENG Jianzong<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-Bioresources, College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China; 2. National Engineering Research Center for Non-food Biorefinery, State Key Laboratory of Non-food Biomass and Enzyme Technology, Guangxi Biomass Engineering Technology Research Center, Guangxi Key Laboratory of Biorefinery, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China)

**Abstract:** The synthetic pathway of optically pure (*R*) acetoin was constructed and coenzyme engineering was applied to regulate NADH/NAD<sup>+</sup> redox equilibrium in *Escherichia coli* which was used to optimize the fermentation conditions. The gene cluster was constructed by codon-optimizing the  $\alpha$ -acetolactate synthase gene *budB*,  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase gene *budA* from *Enterobacter cloacae*, and NADH oxidase gene *noxE* from *Lactobacillus brevis*. The expression plasmids were constructed and introduced into *E. coli*. The medium components and fermentation conditions of engineered strain were optimized to improve the synthesis ability of (*R*) acetoin. The results showed that an engineered strain of *E. coli* with high specific optical purity (*R*) acetoin GXASR was obtained. After systematic optimization of fermentation conditions, the (*R*) acetoin yield of shake flask fermentation was 36.82 g/L, the optical purity reached 99.1%. And the yield of (*R*) acetoin by fed-batch fermentation reached 67.65 g/L. (*R*) acetoin could be synthesized efficiently by overexpressing the exogenous gene cluster *budB-budA-noxE* in *E. coli* cells. After optimization of fermentation, the (*R*) acetoin yield, production intensity and receiving rate were significantly increased. It provided a theoretical basis for metabolic engineering transformation of *E. coli* to produce high optically pure (*R*) acetoin.

**Key words:** synthetic biology, cofactor engineering, engineering strain, (*R*) acetoin, fermentation optimization

责任编辑: 陆雁



微信公众号投稿更便捷

联系电话: 0771-2503923

邮箱: [gxkx@gxas.cn](mailto:gxkx@gxas.cn)

投稿系统网址: <http://gxkx.ijournal.cn/gxkx/ch>