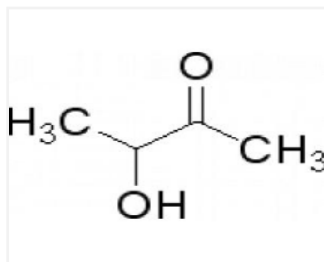


系统代谢工程改造光滑球拟酵母 生产3-羟基丁酮



绪论

◆ 3-羟基丁酮概述



分子结构式

- 化学名3-羟基-2-丁酮；
- 具有令人愉快的奶香香味

理化性质

应用领域	功能特性
食品行业	食用香料，应用于糖果、饮料
化学行业	用作稳定剂、起泡剂、防冻剂和增塑剂
制药行业	医药中间体、药物及其修饰
烟草行业	特殊香气物质基础

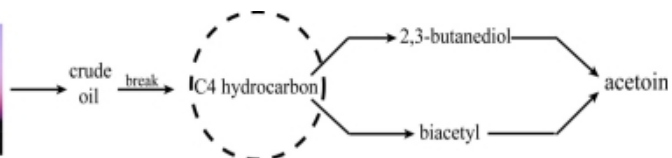


绪论

◆ 生产方法概述



化学合成法



原料

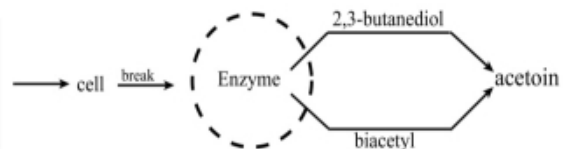
石油化工产品

产品特性

纯度不高、非天然产品，安全性低



酶转化法

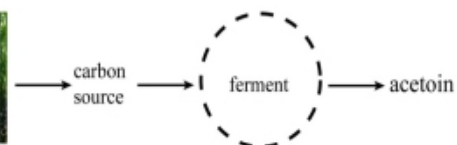


化工原料

纯度高、安全性高、酶制剂需求量大



发酵法



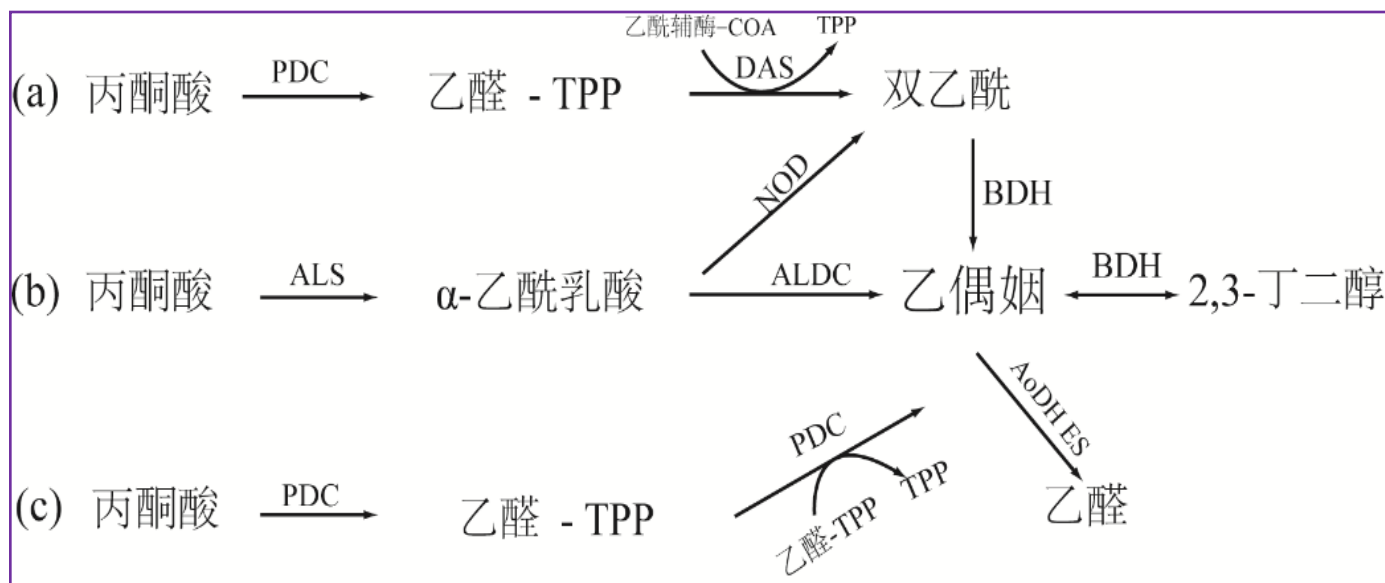
葡萄糖、蔗糖等

纯度高、天然产品、安全性高

微生物发酵法，具有:(1) 生产原料丰富；(2) 生产过程环境友好；(3) 产物纯度及安全性高等优点。



◆ 3-羟基丁酮代谢途径解析



合成途径： 分解途径：

- a. 丁二酮还原途径； 1. 丁二酮还原途径；
 b. 丙酮酸脱羧途径；
 c. 丙酮酸裂解途径； 2. 脱氢酶催化途径；



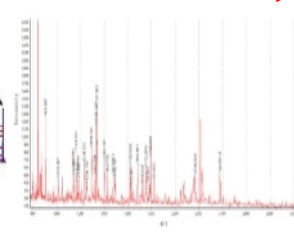
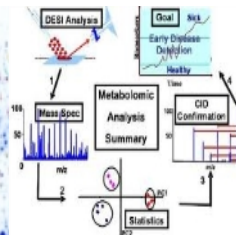
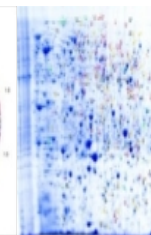
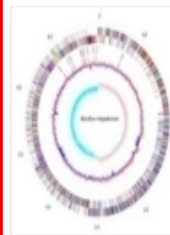
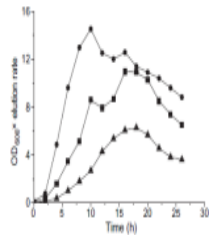
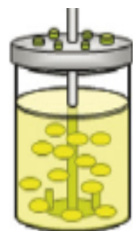
解决方案：

- (1) 丙酮酸的高效合成；
- (2) 调控关键酶活性；
- (3) 提高底物或产物转运效率



绪论

◆ 发酵法生产3-羟基丁酮的研究进展



传统育种

发酵条件优化

代谢途径改造

菌株

选育方法

发酵方法

产量

S. marcescens H13

紫外和LiCl复合诱变；
代谢工程改造

分批补料

75.2 g/L

B. pumilus DSM16187

亚硝基胍诱变

摇瓶发酵

63.0 g/L

B. amyloliquefaciens

自然选育；

分批发酵

71.5 g/L

FMME04

亚硝基胍诱变

厚德達理

勵志勤工



绪 论

◆ 发酵法生产3-羟基丁酮的研究进展

目前，筛选获得的3-羟基丁酮高产菌株仍存在问题，如：

- (1) 细菌易染菌或噬菌体；(2) 环境鲁棒性弱；
- (3) 产品安全性低；(4) 生产强度较低；

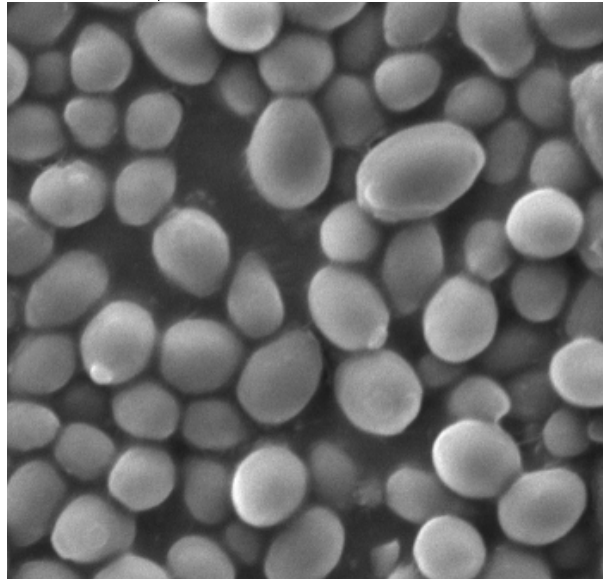
导致微生物发酵生产3-羟基丁酮仍未实现大规模工业化生产。



酵母具有耐高浓度葡萄糖、强环境鲁棒性、营养条件简单、易扩大培养等优点。因此，科研工作者则将研究工作重点转向酵母等真核微生物。



◆ 光滑球拟酵母(*C. glabrata*)优势



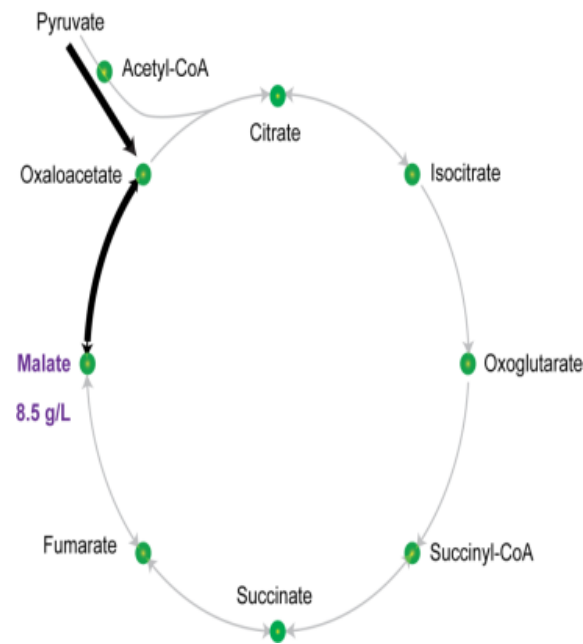
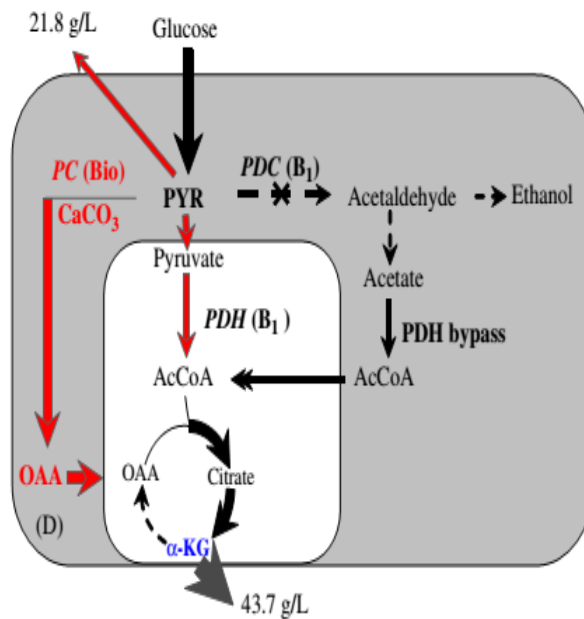
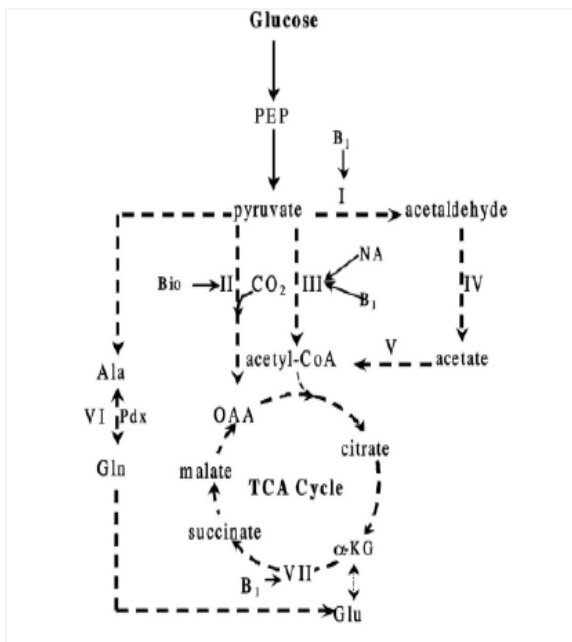
优势:

- 丙酮酸工业生产菌株(94.3 g/L)，提供充足合成前体;
- 营养需求简单，原料来源丰富;
- 作为单倍体，易实现基因操作;
- 具有清晰、完善的生理遗传信息。



绪论

◆ 生产精细化学品的研究进展



丙酮酸：通过诱变育种、适应性进化和发酵条件优化等策略，使丙酮酸产量高达94.3 g/L.

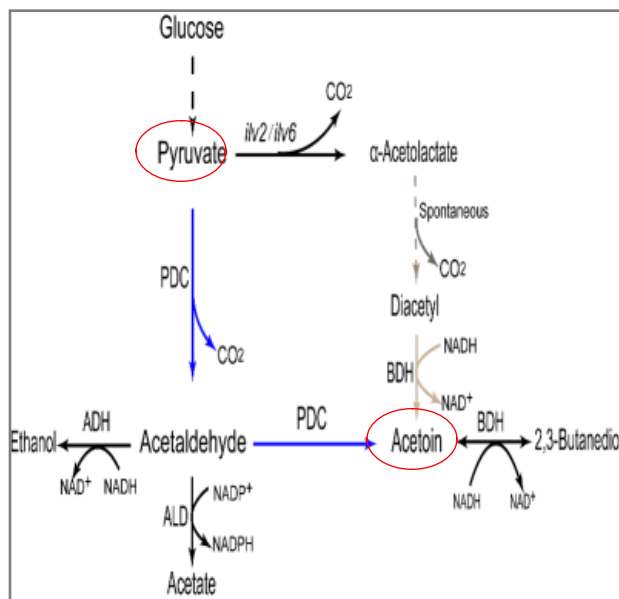
α -酮戊二酸：调控 Ca^{2+} 和硫胺素等浓度，选择性打开丙酮酸代谢节点，使其产量提高至43.7 g/L。

苹果酸：基于GSMM模拟分析，通过对代谢途径和转运途径改造，使其产量从0.8 g/L提高至8.5 g/L.



绪论

◆ *C. glabrata* 生产 3-羟基丁酮的关键问题



1. 非酶氧化脱羧反应(NOD): 反应速率慢, 且不易控制;
2. 丙酮酸裂解途径(CAR): PDC 酶活受硫胺素等辅酶的限制。

菌株仅积累
40 mg/L 3-
羟基丁酮

本研究主要解决的三个关键科学问题:

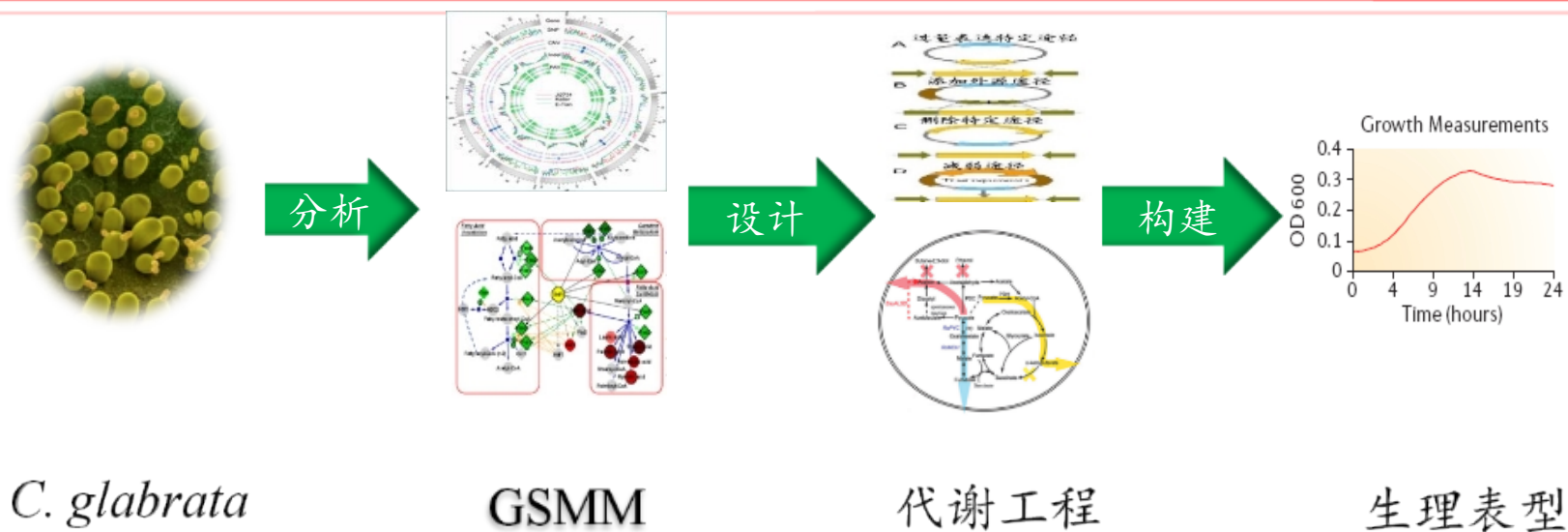
问题一: 如何实现 *C. glabrata* 胞内丙酮酸代谢节点的开阀分流?

问题二: 如何实现丙酮酸分流代谢途径的强化?

问题三: 如何提高 *C. glabrata* 抵御有机溶剂胁迫的耐受性?



本论文主要构想



针对上述科学问题，提出以下解决方案：

- 构建胞质丙酮酸脱羧途径；
- 构建线粒体丙酮酸脱羧途径；
- 强化胞质丙酮酸裂解途径；
- 解析3-羟基丁酮对 *C. glabrata* 生理功能的影响



主要内容

内容一：构建胞质丙酮酸脱羧途径对3-羟基丁酮合成的影响

厚德達理

勵志勤工



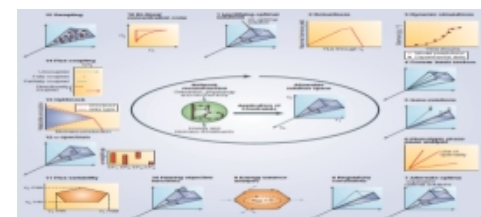
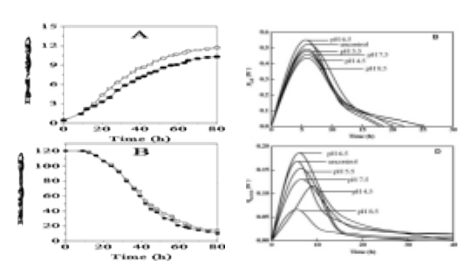
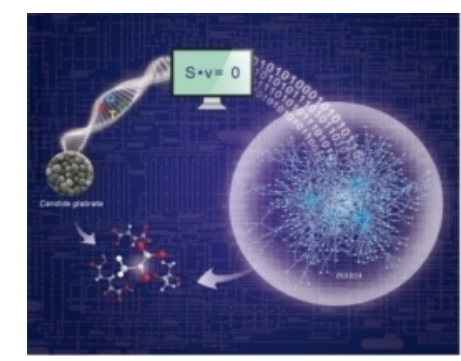
基于GSMM对丙酮酸脱羧途径的分析

相关代谢反应

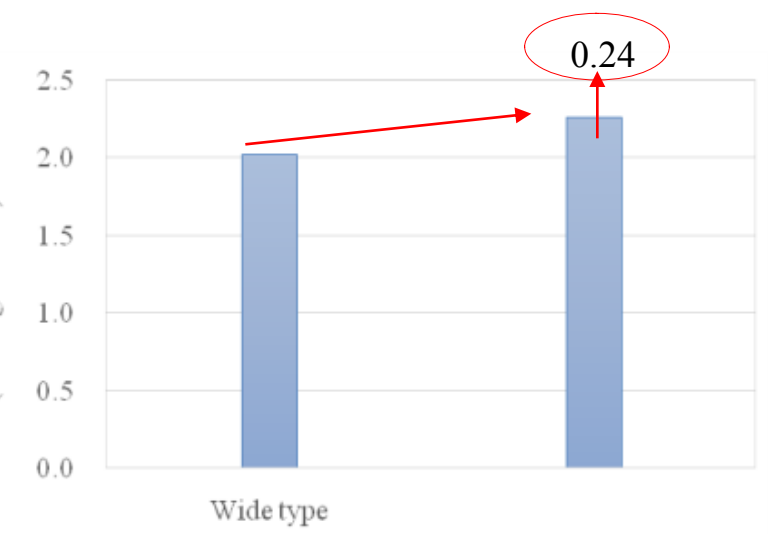
反应名称	生化反应式
‘ALS’	$2\text{HTPP}[\text{c}] + \text{PYR}[\text{c}] + \text{H}[\text{c}] \rightleftharpoons \text{ACLAC}[\text{c}] + \text{TPP}[\text{c}]$
‘ALDC’	$\text{ACLAC}[\text{c}] \rightleftharpoons \text{ACT}[\text{c}] + \text{CO}_2[\text{c}]$
‘ACT e’	$\text{ACT}[\text{c}] \rightleftharpoons \text{ACT}[\text{e}]$
‘EX-ACT’	$\text{ACT}[\text{e}] \rightleftharpoons$



iNX804



3-羟基丁酮模拟理论产量
(mmol/gDCW/h)



厚德達理

勵志勤工



胞质丙酮酸脱羧途径的构建

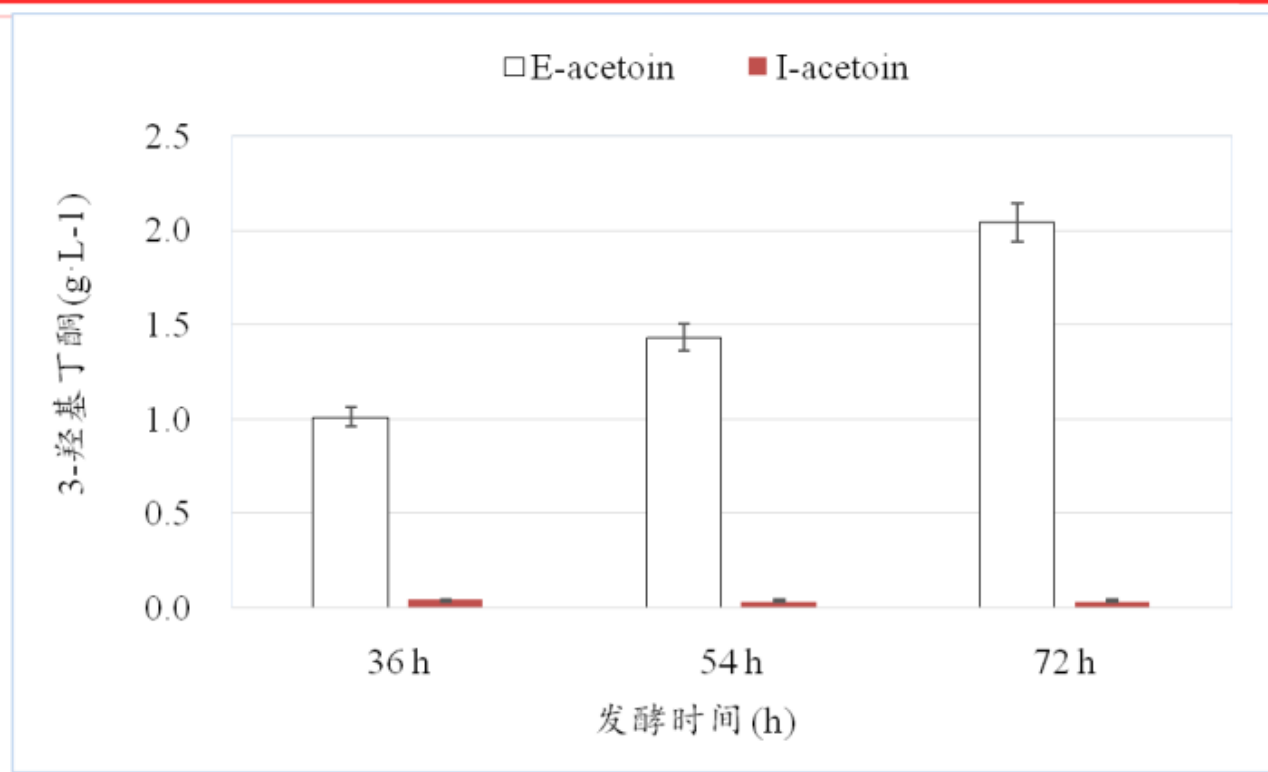
菌株	基因	来源	ALS (U/mg 蛋白)	ALDC (U/mg 蛋白)	3-羟基丁酮 (g/L)
MuA0	nt	nt	0.15 ± 0.01	ND	0.041 ± 0.002
MuA3	<i>alsS</i>	<i>B. subtilis</i>	0.81 ± 0.05	ND	0.077 ± 0.004
MuA4	<i>alsS</i>	<i>E. coli</i>	0.77 ± 0.1	ND	0.065 ± 0.002
MuA5	<i>aldC</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>	0.15 ± 0.01	1.85 ± 0.05	0.14 ± 0.04
MuA6	<i>aldC</i>	<i>B. pumilus</i>	0.14 ± 0.012	1.66 ± 0.05	0.12 ± 0.03
MuA8	<i>aldC</i>	<i>E. coli</i>	0.13 ± 0.01	1.57 ± 0.1	0.12 ± 0.02

参数	菌株		增加比率 B/A-1
	MuA0 (A)	MuA9 (B)	
ALS比酶活 ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{蛋白}$)	0.16 ± 0.01	0.83 ± 0.04	4.19
ALDC比酶活 ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{蛋白}$)	ND	1.86 ± 0.03	--
乙酰乳酸 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.12 ± 0.01	0.74 ± 0.01	5
3-羟基丁酮产量 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.042 ± 0.008	1.14 ± 0.05	26
2,3-丁二醇 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.035 ± 0.004	0.88 ± 0.04	24
乙醇 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.87 ± 0.02	2.15 ± 0.21	1.47

结果表明：丙酮酸脱羧途径使3-羟基丁酮产量提高至1.14 g/L (26倍)



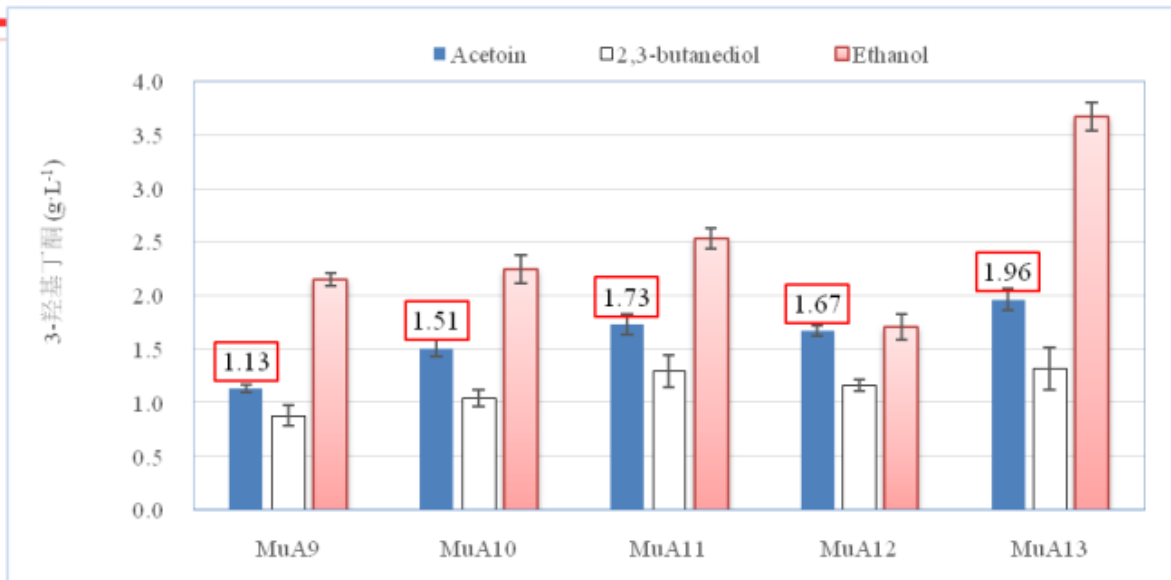
光滑球拟酵母转运3-羟基丁酮能力的研究



不同发酵时期胞内外3-羟基丁酮产量比例分别为1:22，1:39和1:65，表明*C. glabrata* 能高效地将胞内合成的3-羟基丁酮转运至胞外。



胞质丙酮酸脱羧途径的优化



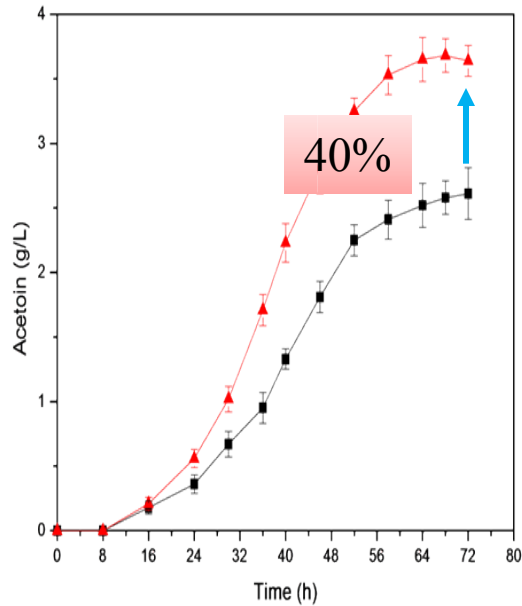
启动子优化策略使3-羟基丁酮的产量提高至1.96 g/L;

发酵参数	工程菌株		
	MuA13		MuA15
DCW (g·L ⁻¹)	10.27 ± 0.50		10.13 ± 0.50
丙酮酸 (g·L ⁻¹)	18.4 ± 0.7		16.3 ± 1.1
3-羟基丁酮 (g·L ⁻¹)	1.96 ± 0.31		2.08 ± 0.20
2,3-丁二醇 (g·L ⁻¹)	1.36 ± 0.03		2.03 ± 0.03
3-羟基丁酮/2,3-丁二醇	1.44		1.02
乙醇 (g·L ⁻¹)	3.67 ± 0.11		2.72 ± 0.20
胞内 NADH/NAD ⁺ 比率	0.62		0.64

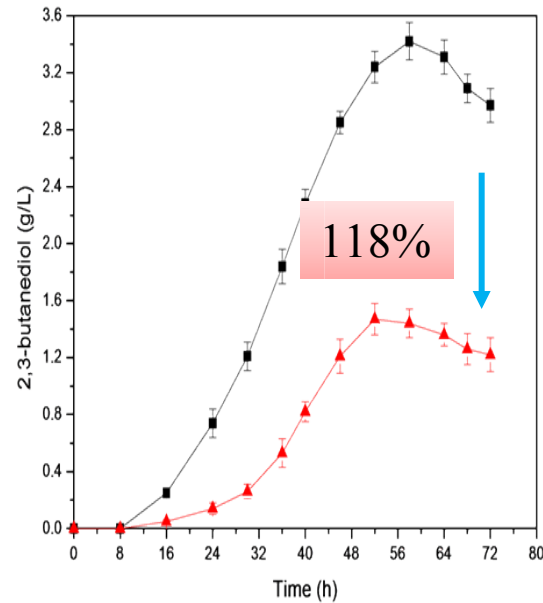
基因 adh 的敲除使2,3-丁醇和胞内NADH/NAD⁺水平分别提高了53.8%和6.4%。



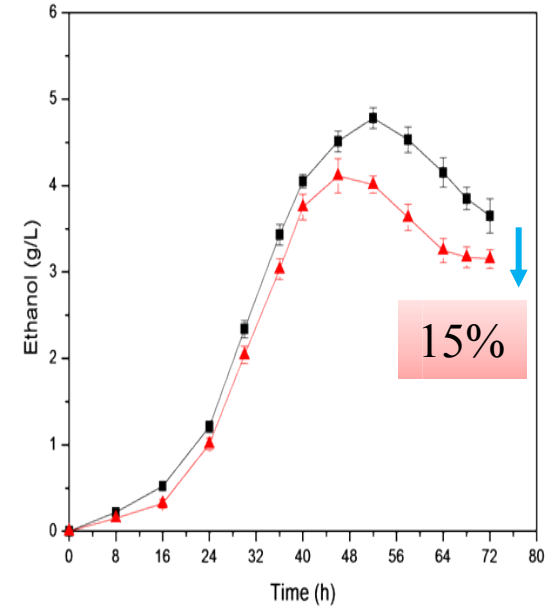
添加烟酸对3-羟基丁酮合成的影响



3-羟基丁酮



2,3-丁二醇



乙醇

添加 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 烟酸可使：

- 3-羟基丁酮产量增加至 3.67 g/L ；
- 抑制2,3-丁二醇的合成(降低至 1.22 g/L)；
- 乙醇产量也降低至 3.09 g/L 。



本章小结

- ❑ 借助GSMM iNX804和FBA模拟分析，发现：丙酮酸脱羧途径可实现*C. glabrata*高效合成3-羟基丁酮的目标；
- ❑ 借助基因表达、启动子优化和竞争途径抑制等策略使*C. glabrata*合成3-羟基丁酮产量提高至 $2.08 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ；
- ❑ 采用生化策略改善微生物胞内微环境，使3-羟基丁酮产量提高至 $3.67 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ，而2,3-丁二醇产量却降低至 $1.22 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。



主要内容

内容二：构建线粒体丙酮酸脱羧途径对3-羟基丁酮合成的影响

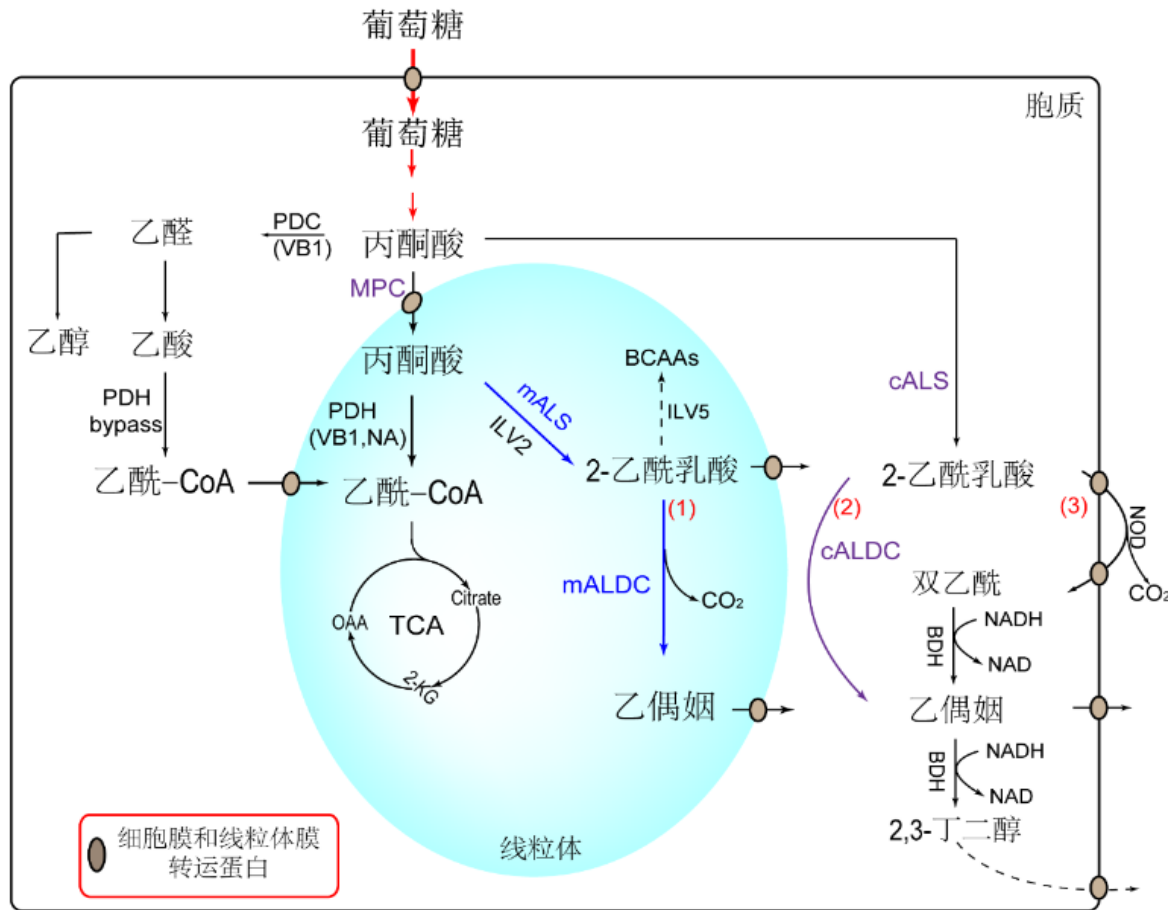
厚德達理

勵志勤工



代谢途径的设计

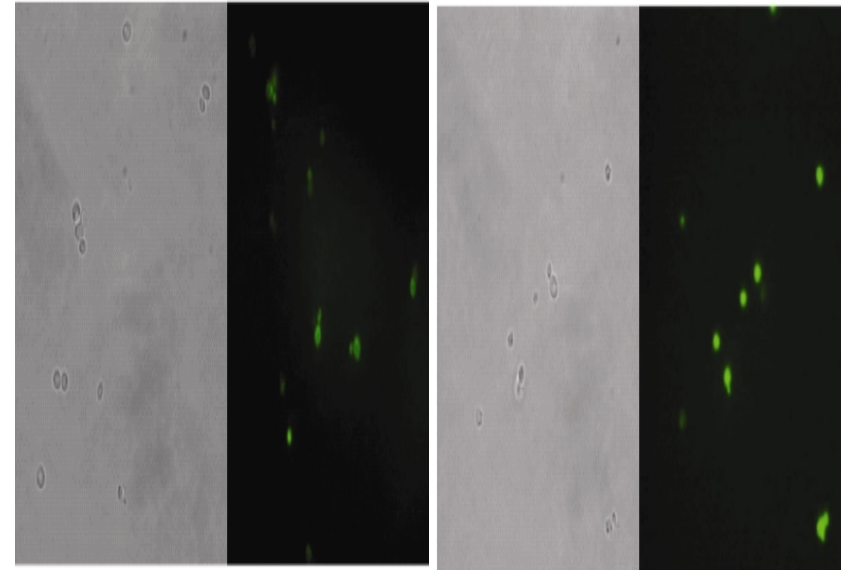
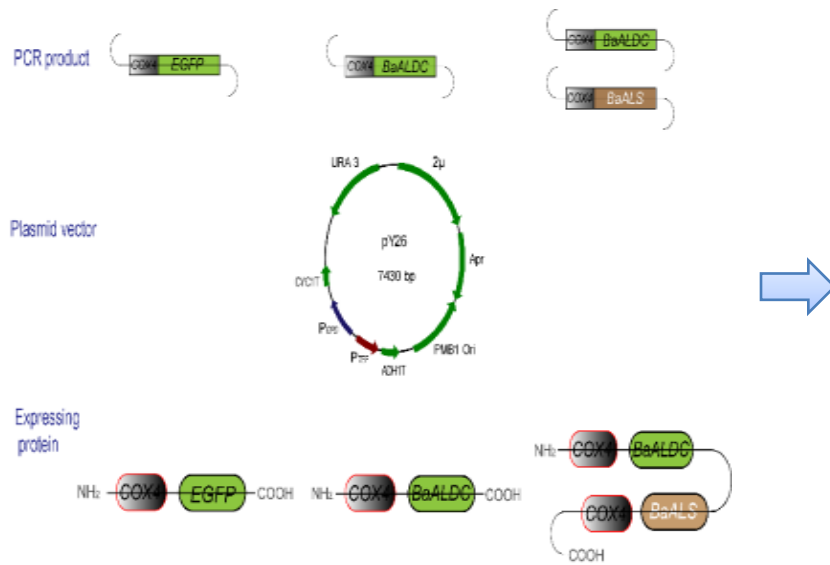
内容二：线粒体丙酮酸脱羧途径的构建



在 *C. glabrata* 线粒体中构建丙酮酸脱羧途径实现3-羟基丁酮的积累



线粒体信号肽CoxIV功能的验证



代谢策略

胞质

线粒体

结果表明：

线粒体信号肽CoxIV能够有效地介导目的基因准确定位于
*C. glabrata*线粒体。

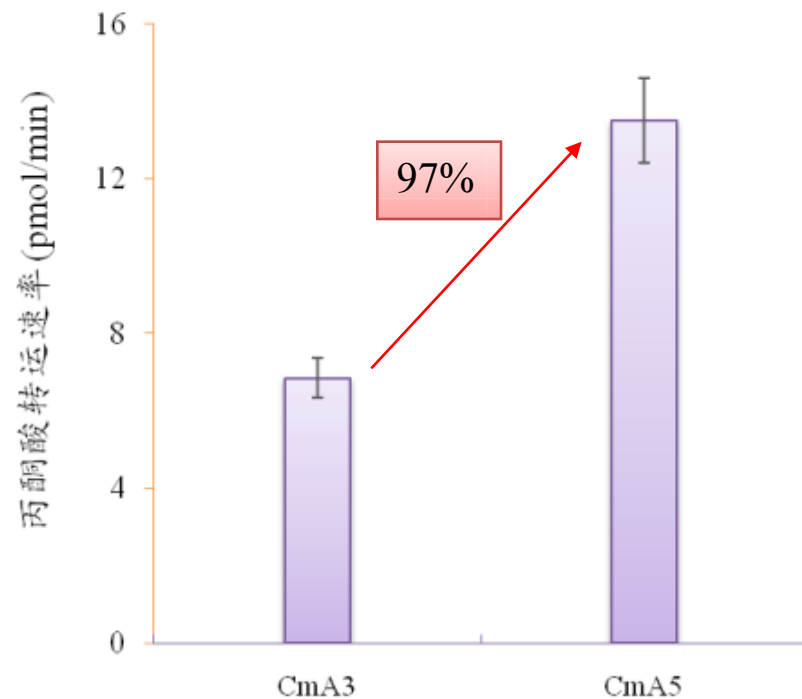
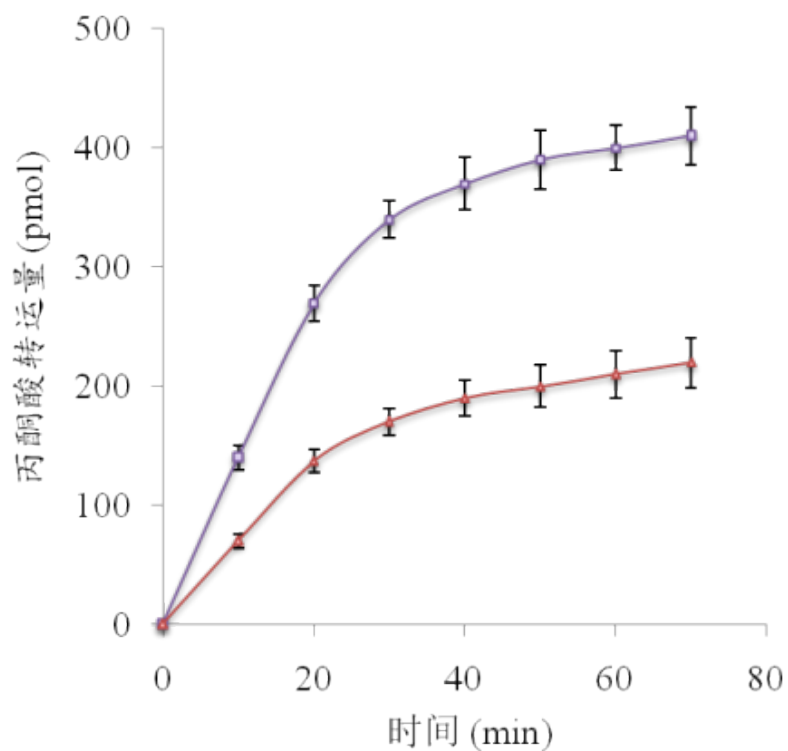
发酵参数	工程菌株		增加量(A/B-1)
	CmA3(A)	CmA4(B)	*100%
DCW (g·L ⁻¹)	9.85 ± 0.40	10.23 ± 0.51	-3.7
丙酮酸 (g·L ⁻¹)	16.8 ± 0.8	17.1 ± 1.3	-1.8
Δ丙酮酸	13.6	13.3	2.3
3-羟基丁酮产量 (g·L ⁻¹)	2.37 ± 0.31	2.04 ± 0.10	16.2
3-羟基丁酮得率 (g·g ⁻¹ DCW)	0.24	0.20	20.0
3-羟基丁酮/Δ丙酮酸 (g·g ⁻¹)	0.17	0.15	13.3
2,3-丁二醇 (g·L ⁻¹)	1.21 ± 0.03	1.26 ± 0.06	-4.0
乙醇(g·L ⁻¹)	2.16 ± 0.11	3.57 ± 0.10	-39.5
甘油(g·L ⁻¹)	1.16 ± 0.12	1.03 ± 0.14	12.6
α-酮戊二酸(g·L ⁻¹)	2.56 ± 0.14	3.42 ± 0.20	-25.1

与胞质脱羧途径(MuA4)相比，线粒体脱羧途径(MuA3)：

- (i) 3-羟基丁酮产量提高了16.2%；
- (ii) 3-羟基丁酮对丙酮酸得率增加了13.3%；



表达线粒体丙酮酸转运蛋白(MPC)



与对照菌株CmA3相比，表达线粒体转运蛋白Mpc1和Mpc2(CmA5)使线粒体丙酮酸转运速率增加了97%。

发酵参数	工程菌株		增加量(C/A-1) *100%
	CmA3(A)	CmA5(C)	
DCW (g·L ⁻¹)	9.85 ± 0.40	10.06± 0.30	2.1
丙酮酸 (g·L ⁻¹)	16.8 ± 0.8	13.4 ± 0.7	-20.2
Δ丙酮酸	13.6	17.0	25
3-羟基丁酮产量 (g·L ⁻¹)	2.37 ± 0.31	3.26 ± 0.40	37.6
3-羟基丁酮得率 (g·g ⁻¹ DCW)	0.24	0.32	33.3
3-羟基丁酮/Δ丙酮酸 (g·g ⁻¹)	0.17	0.19	11.8
2,3-丁二醇 (g·L ⁻¹)	1.21 ± 0.03	1.55 ± 0.08	28.1
乙醇 (g·L ⁻¹)	2.16 ± 0.11	2.59 ± 0.20	19.9
α-酮戊二酸(g·L ⁻¹)	2.56 ± 0.14	3.15 ± 0.22	23.0

线粒体丙酮酸转运蛋白的表达，使：

- (1) 3-羟基丁酮产量增加至3.26 g/L，提高了37.6%；
- (2) 3-羟基丁酮对细胞和丙酮酸得率分别提高了33.3%和11.8%；
- (3) α-酮戊二酸产量也相应地提高了23.0%。



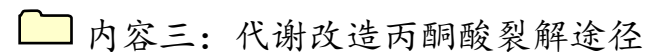
本章小结

- ❑ 借助增强型荧光蛋白的发光特征，证明线粒体信号肽CoxIV在*C. glabrata*中可准确介导目的基因的线粒体定位；
- ❑ 与胞质途径相比，线粒体途径使3-羟基丁酮产量及其对丙酮酸和细胞得率分别提高了13.3%、16.2%和20%；
- ❑ 共表达线粒体丙酮酸转运蛋白(MPC)，使丙酮酸转运速率增加了97%，且3-羟基丁酮产量进一步提高至 $3.26 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

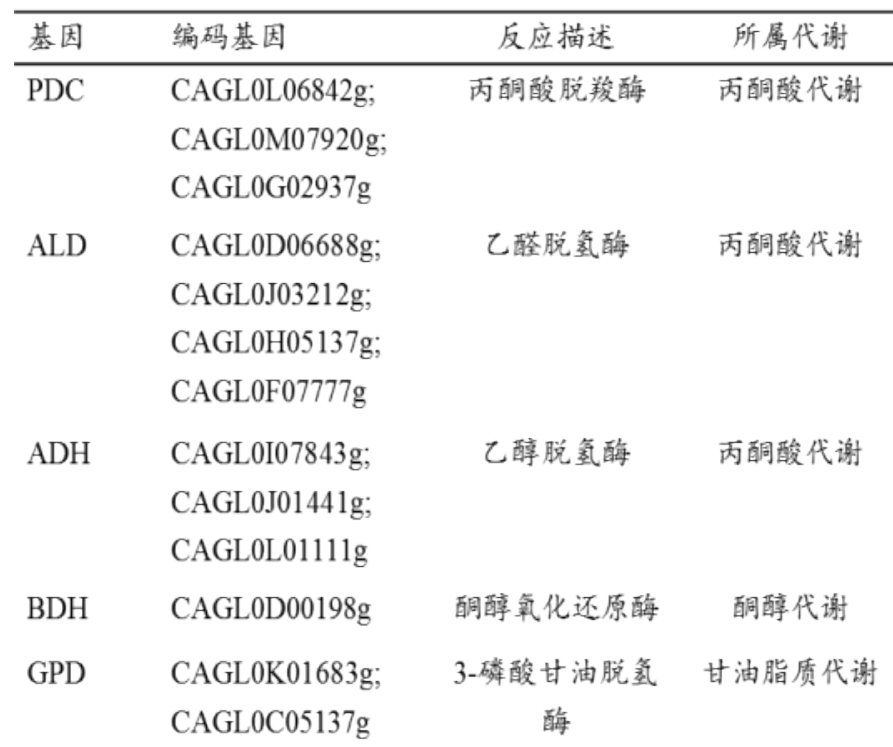


主要内容

内容三：代谢工程改造丙酮酸裂解途径对3-羟基丁酮合成的影响



丙酮酸裂解途径

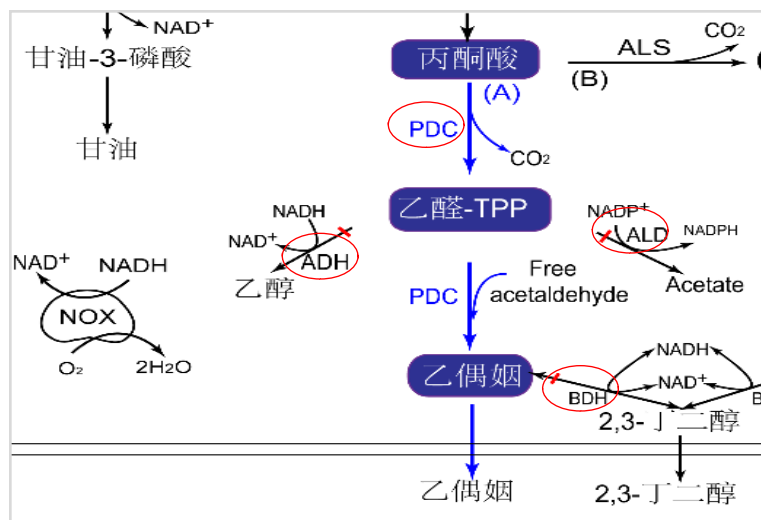


丙酮酸裂解途径：该途径相关反应及其基因注释均已完成，受丙酮酸、酮醇及甘油脂质等相关代谢的严格调控。



基于代谢扰动解析途径关键节点

乙醛/VB1	DCW (g·L ⁻¹)	丙酮酸(g·L ⁻¹)	甘油 (g·L ⁻¹)	乙醇 (g·L ⁻¹)	乙酸 (g·L ⁻¹)	乙偶姻(mg·L ⁻¹)	丁二醇(mg·L ⁻¹)
(0/20)	10.52 ± 0.20	32.4 ± 0.6	0.32 ± 0.03	1.10 ± 0.07	0.26 ± 0.01	35 ± 2	40 ± 1
(2.0/20)	11.61 ± 0.20	36.6 ± 0.8	0.39 ± 0.02	1.50 ± 0.1	0.22 ± 0.02	40 ± 1.5	42 ± 2
(5.0/20)	6.21 ± 0.31	17.1 ± 0.5	0.66 ± 0.02	1.46 ± 0.09	0.44 ± 0.02	300 ± 10	500 ± 8
(50/50)	5.64 ± 0.30	12.2 ± 1.0	0.79 ± 0.02	1.97 ± 0.1	0.75 ± 0.08	460 ± 23	670 ± 10
(160/80)	5.52 ± 0.22	10.3 ± 0.6	1.23 ± 0.1	2.44 ± 0.17	0.63 ± 0.03	1100 ± 40	1500 ± 20
(240/80)	5.41 ± 0.20	9.7 ± 0.8	1.07 ± 0.08	2.93 ± 0.2	0.88 ± 0.06	1200 ± 60	1800 ± 50
(600/150)	5.35 ± 0.11	9.4 ± 0.3	1.27 ± 0.1	2.63 ± 0.2	0.69 ± 0.03	900 ± 30	1100 ± 40



以乙醛和**VB1**为代谢扰动因子，发现：
PDC、ADH、ALD及BDH等相关酶
将是丙酮酸裂解途径合成3-羟基丁酮的
关键节点。



代谢工程强化丙酮酸裂解途径

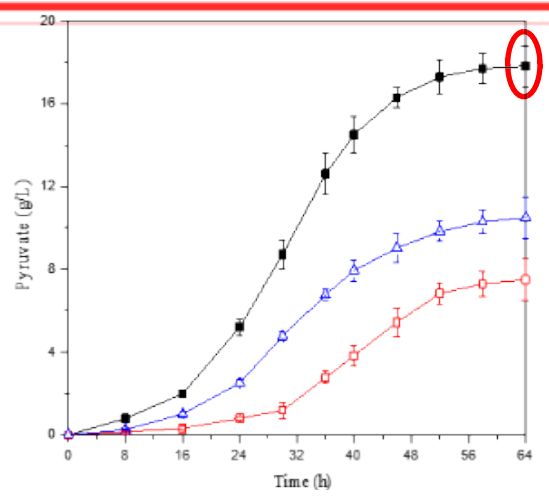
发酵参数				工程菌株			
	<i>C. glabrata</i>	<i>C-Δadh</i>	<i>C-Δald</i>	<i>C-Δadh-Δald</i>	<i>C-Δadh-Δald-Δbdh</i>	<i>C-Δadh-Δald-ScPDC1</i>	<i>C-Δadh-Δald-Δbdh-ScPDC1</i>
DCW (g·L ⁻¹)	11.61 ± 1.0	11.05 ± 1.0	10.46 ± 0.9	10.21 ± 0.5	10.27 ± 0.4	10.66 ± 0.7	10.53 ± 0.5
丙酮酸 (g·L ⁻¹)	28.6 ± 1.5	23.3 ± 1.0	24.7 ± 2.0	21.2 ± 1.2	19.6 ± 1.5	16.3 ± 1.0	17.1 ± 2.0
3-羟基丁酮 (g·L ⁻¹)	0.045 ± 0.01	0.71 ± 0.03	0.15 ± 0.02	1.02 ± 0.1	1.76 ± 0.2	1.37 ± 0.1	2.24 ± 0.2
产物得率 (g·g ⁻¹ DCW)	0.004	0.064	0.01	0.1	0.17	0.13	0.21
2,3-丁二醇 (g·L ⁻¹)	0.058 ± 0.01	1.01 ± 0.1	0.22 ± 0.01	1.54 ± 0.1	0.43 ± 0.02	2.13 ± 0.1	0.51 ± 0.04
乙醇 (g·L ⁻¹)	4.1 ± 0.1	3.1 ± 0.12	4.5 ± 0.21	3.4 ± 0.2	3.48 ± 0.22	3.57 ± 0.2	3.66 ± 0.12
甘油 (g·L ⁻¹)	0.96 ± 0.1	1.14 ± 0.07	1.01 ± 0.05	1.09 ± 0.1	1.13 ± 0.11	1.31 ± 0.2	1.39 ± 0.1
乙酸 (g·L ⁻¹)	1.03 ± 0.2	1.07 ± 0.1	0.53 ± 0.03	0.69 ± 0.02	0.61 ± 0.03	0.63 ± 0.04	0.56 ± 0.04
乙醛 (g·L ⁻¹)	0.11 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.25 ± 0.02	0.22 ± 0.01	0.26 ± 0.03	0.25 ± 0.04

强化丙酮酸裂解途径：

- 使3-羟基丁酮增加到2.24 g/L，比出发菌株提高了50倍；
- 而2,3-丁二醇产量降低至0.51 g/L。

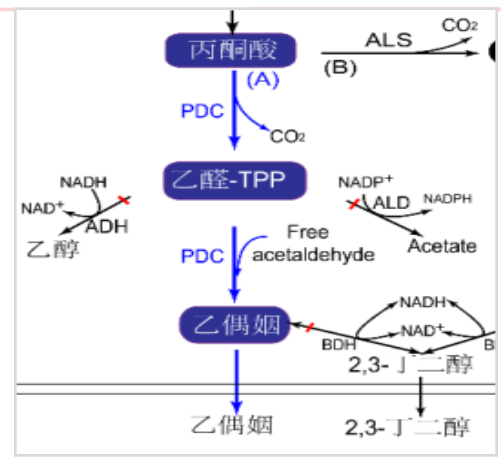


基于GSMM模拟分析合成瓶颈问题



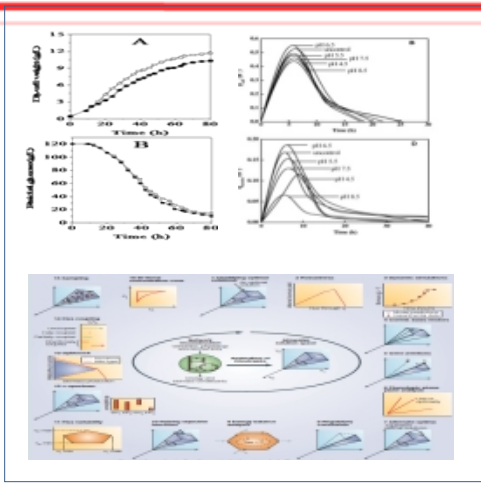
17 g/L 丙酮酸

制约

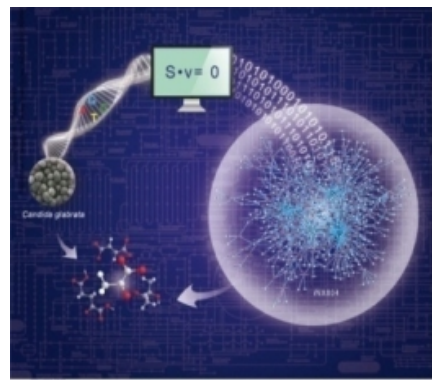


代谢能力

利用

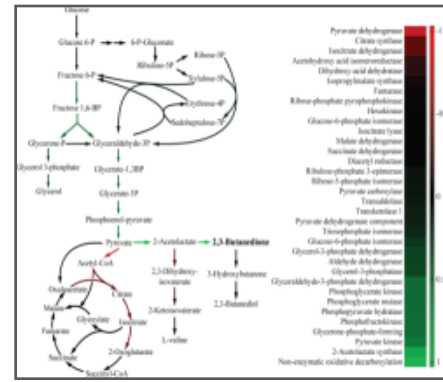


生理参数



iNX804

模拟



代谢流量分析

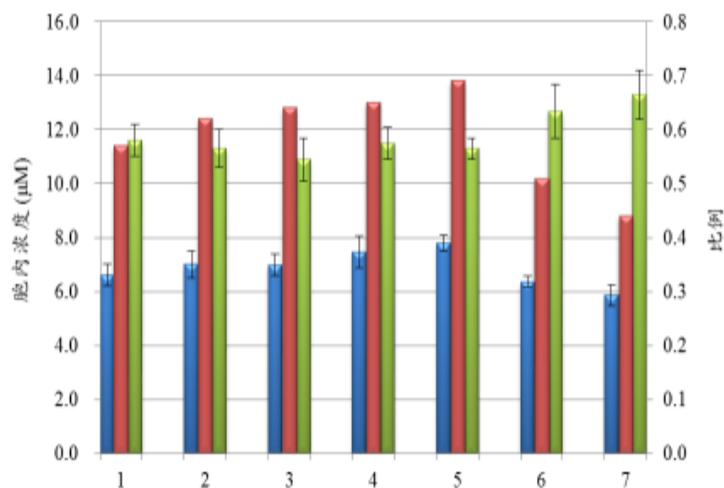
缩写	相应酶名称	增加倍数
GP	甘油3-磷酸酶	1.07
GPD	甘油-3-磷酸脱氢酶	1.17
GPI	葡萄糖-6-磷酸异构酶	1.03
PFK	磷酸果糖激酶	1.05
GAPD	甘油醛-3-磷酸脱氢酶	1.03
PC	丙酮酸羧化酶	1.01

基因靶点选择



过量表达NADH氧化酶(NOX)

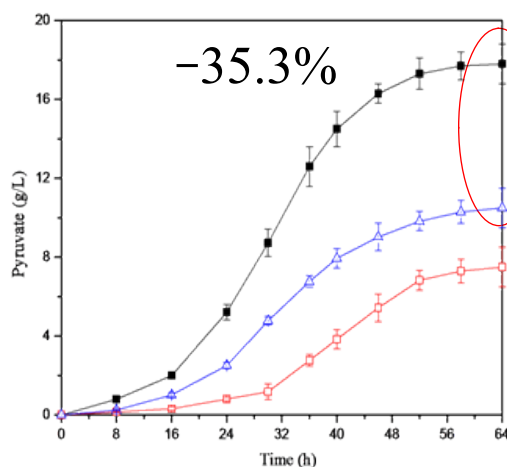
胞内辅因子水平分析



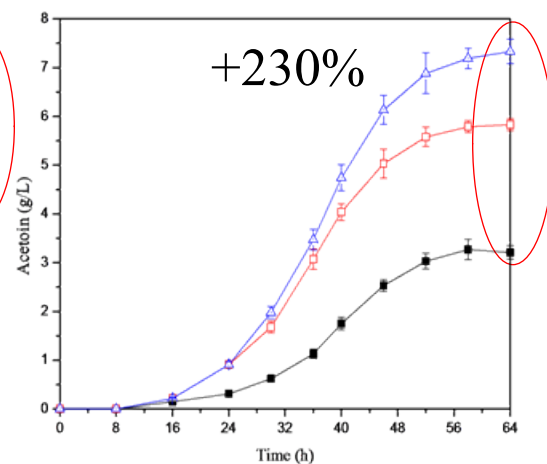
- 1 mol 葡萄糖合成3-羟基丁酮可净产生2 mol NADH;
- 3-羟基丁酮的合成可提高胞内NADH水平或NADH/NAD+比率;

过量表达NOX

- 丙酮酸产量降低至 $10.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$;
- 3-羟基丁酮产量则增加了2.3倍，提高至 $7.33 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$;



丙酮酸



3-羟基丁酮



本章小结

- ❑ 根据目标代谢途径及其调控信息，以乙醛和硫胺素为发酵搅动条件，确定了丙酮酸裂解途径的关键节点；
- ❑ 借助代谢工程策略实现对目标途径的遗传改造，使3-羟基丁酮产量提高至 $2.24 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ；
- ❑ 基于GSMM模拟和胞内NADH水平的分析，推测胞内NADH水平是抑制丙酮酸裂解途径高效合成3-羟基丁酮的关键因素；
- ❑ 过量表达NOX有效调控胞内NADH水平，使3-羟基丁酮产量进一步提高至 $7.33 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。