

克雷伯氏肺炎杆菌群体感应系统缺失 对合成2,3-丁二醇的影响

柳鹏福^{1,2} 王晨红² 储消和¹ 史吉平² 郝健²

1. 浙江工业大学长三角绿色制药协同创新中心, 杭州 310014;

2. 中国科学院上海高等研究院, 上海 201210

摘要 通过同源重组技术敲除克雷伯氏肺炎杆菌的 *luxS* 基因,使其群体感应系统失活,研究突变株在2,3-丁二醇发酵培养基中的生长状况及对2,3-丁二醇合成的影响;同时检测对其他副产物合成的影响,通过对野生株和 *luxS* 突变株发酵合成2,3-丁二醇的结果进行研究发现,与野生株相比,失去了群体感应功能的 *luxS* 突变株利用同样质量浓度的葡萄糖合成2,3-丁二醇的能力提高了47.75%,同时琥珀酸、乳酸和乙醇等主要副产物的质量浓度大幅降低。

关键词 克雷伯氏肺炎杆菌; 2,3-丁二醇; 群体感应系统; *luxS* 基因

中图分类号 Q 939.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2017)01-0061-07

克雷伯氏肺炎杆菌是一种重要的工业微生物,广泛应用于1,3-丙二醇、2,3-丁二醇、3-羟基丙酸和葡萄糖酸等化学品的工业生产^[1-2]。其中2,3-丁二醇是一种极具潜力的重要的平台化合物,2,3-丁二醇脱水可形成1,3-丁二烯,后者是合成橡胶的重要原料;2,3-丁二醇具有较高的辛烧值和燃烧热(2 718 J/g),挥发性低,使得其成为一种环境友好的燃料添加剂,未来有望作为一种新型生物能源^[3-4]。

克雷伯氏肺炎杆菌中2,3-丁二醇合成是以丙酮酸为底物,经由 α -乙酰乳酸、乙偶姻等中间代谢产物最终转化成2,3-丁二醇,此过程中伴随有乙醇、乙酸、乳酸、甲酸、琥珀酸等副产物的生成。目前对克雷伯氏肺炎杆菌合成2,3-丁二醇的研究主要围绕产物和副产物合成相关途径的改造,提高产量,减少副产物^[5-8]。

群体感应(quorum sensing, QS)是指细菌能够通过某些特定信号分子的浓度变化来感知周围环境中自身或其他细菌的数量变化,从而作出相应的应答。群体感应调控着很多细菌的生物功能,如根瘤菌与植物共生、蓝细菌中异形胞的分化、根癌农杆菌中Ti质粒接合转移、病原细菌胞外酶与毒素产生、

生物膜形成、菌体发光、抗生素形成等^[9]。克雷伯氏肺炎杆菌也存在群体感应系统,其调控系统属于呋喃酰硼酸(furanosyl borate diester)系统,又被称为AI-2(autoinducer-2)系统,其信号分子由不同细菌中高度保守的编码S-核糖基高半胱氨酸酶(S-ribosylhomocysteinase)的LuxS蛋白合成^[10]。群体感应系统对胞内基因的表达调控往往具有全局性,即同时影响细菌多个代谢途径和生长状态,对克雷伯氏肺炎杆菌群体感应系统方面的研究主要是对其生物膜形成的影响^[11-12],对2,3-丁二醇等代谢产物合成影响的研究尚未见报道。

本研究通过同源重组技术敲除克雷伯氏肺炎杆菌的 *luxS* 基因,使其群体感应系统失活,研究突变株在2,3-丁二醇发酵培养基中的生长状况和对2,3-丁二醇合成的影响,同时检测对其他副产物合成的影响,旨在为2,3-丁二醇工业生产菌株的改良提供一种新的思路。

1 材料与方法

1.1 菌株、载体和引物

本研究使用的菌株和载体见表1。

收稿日期: 2016-05-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(41306142, 21576279)

柳鹏福, 博士, 讲师. 研究方向: 工业生物技术. E-mail: powerfulliu@126.com

通信作者: 郝健, 博士, 副研究员. 研究方向: 工业生物技术. E-mail: haoj@sari.ac.cn

表 1 本研究使用的菌株和载体

Table 1 The strains and vectors used in this study

菌株或载体 Strains or vectors	基本描述 Description	来源 Source
<i>K. pneumoniae</i> CGMCC 1.6366	2,3-butanediol producer	CGMCC
<i>E. coli</i> DH5 α	Host of plasmid	TAKARA
<i>K. pneumoniae</i> -pDK6-red	Km ^r , harboring pDK6-red	Wei et al. ^[13]
<i>K. pneumoniae</i> $\Delta luxS$	<i>K. pneumoniae</i> CGMCC 1.6366, $\Delta luxS$	This work
pMD TM 18-T easy	Amp ^r , TA cloning vector,	Takara [®]
pIJ778	Str ^r , FRT sites,	Lab stock
pIJ790	Cm ^r , encoding λ Red genes	Lab stock
pDK6-red	Km ^r , <i>gam</i> , <i>bet</i> , <i>exo</i> ,	Lab stock
pMD18t- $\Delta luxS$	amp ^r , str ^r , $\delta luxS :: str$,	This work

本研究中用到的引物及其序列: *luxS*-s1: cagc-ccgcattctgcgttctatg; *luxS*-a1: cgctcgcgaccgcaccacgc-cgc; *luxS*-str-s1: aaatcaccgttttgcgatctgcgttct-gcgtaccgaaccattccggggatccgctcacc; *luxS*-str-a1: gcggcagcccattggcgaaatgtcgataattccacgcctgtagctg-gagctgcttc.

1.2 培养基

2,3-丁二醇发酵培养基成分(g/L): 葡萄糖 100, 玉米浆 8, (NH₄)₂SO₄ 2, K₂HPO₄ · 3H₂O 6, KH₂PO₄ 3, MgSO₄ · 7H₂O 0.2, FeSO₄ · 7H₂O 0.05, CaCl₂ · 2H₂O 0.2, 微量元素 1 mL。

微量元素溶液的组成(mg/L): MnSO₄ · 4H₂O 100, ZnCl₂ 70, Na₂MoO₄ · 2H₂O 35, CuSO₄ · 5H₂O 29.28, CoCl₂ · 6H₂O 200, H₃BO₃ 60, NiCl₂ · 6H₂O 25, 浓盐酸(37% HCl) 0.9 mL。

1.3 克雷伯氏肺炎杆菌基因敲除的方法

本研究使用的基因敲除方法所依赖的同源重组系统为 Red 重组酶系统^[13], 构建过程如下:

用 *luxS* 基因的上下游引物 *luxS*-s1 和 *luxS*-a1 从克雷伯肺炎杆菌基因组扩增获得片段, TA 克隆于 pMD18T-easy 载体, 获得 pMD18-T-*luxS*。与重组质粒 pIJ790 共转入大肠杆菌 DH5 α 。

用含有 *luxS* 的同源臂的引物 *luxS*-Str-s1 和 *luxS*-Str-a1, 以质粒 pIJ778 为模板, 扩增链霉素抗性盒, 转入上一步含有双质粒 pIJ790 和 pMD19-T-*luxS* 的菌株, 用链霉素平板筛选线性片段整合到 pMD18-T-*luxS* 的阳性克隆, 获得长度为 500 bp 同源臂的同源重组质粒 pMD18T- $\Delta luxS :: Str$ 。

以质粒 pMD18T- $\Delta luxS :: Str$ 为模板, 用引物 *luxS*-s1 和 *luxS*-a1 扩增目的同源重组线性片段 DNA- $\Delta luxS :: Str$, 电转化含有质粒 pDK6-red 的 *K. pneumoniae* 细胞的感受态细胞, 获得抗性片段

插入 *luxS* 基因内部的目的菌株。

1.4 克雷伯氏肺炎杆菌及突变菌株的发酵试验

采用火焰接种法, 将提前活化好的种子液按 1% 的接种量接种到装液量为 3 L 的 5 L 发酵罐中, 发酵温度设定为 37 °C, pH 控制在 6.0, 每隔 2 h 从发酵罐中取约 1.5 mL 的新鲜发酵液, 测菌体密度 (*D*₆₀₀ 值), 并制样用于 HPLC 分析, 实时观察发酵数据的变化, 当发酵液中的葡萄糖消耗殆尽时, 终止发酵过程。发酵过程进行 3 次重复, 结果为 3 次平均值。

1.5 高效液相色谱分析方法

采用高效液相色谱(HPLC)实时检测发酵液中底物葡萄糖、产物 2,3-丁二醇及副产物如乙醇、乙酸、琥珀酸、乳酸和乙偶姻的含量变化。

样品的处理方法如下: 取新鲜发酵液约 1.5 mL 于 EP 管内, 12 000 r/min 离心 2 min, 上清液用超纯水精确稀释 100 倍充分混匀后, 取 200 μ L 过滤后的样品测样。

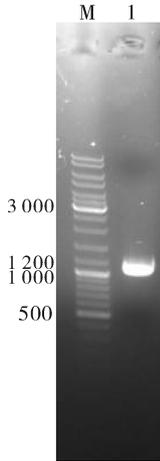
色谱柱为 Bio-red 公司的 Aminex HPX-87H 柱, 柱温设定为 65 °C, 流动相为 0.005 mol/L 的 H₂SO₄, 流动相的流速为 0.8 mL/min, 进样量为 20 μ L; 检测器为岛津公司的 SPD-M20A 型光电二极管阵列检测器和 RID-10A 型折光示差检测器。

2 结果与分析

2.1 克雷伯氏肺炎杆菌 *luxS* 基因缺失突变株的构建

具有 AI-2 型群体感应功能的细菌中负责合成 AI-2 信号分子的 *luxS* 基因编码 S-核糖基高半胱氨酸酶(S-ribosylhomocysteinase), 从克雷伯氏肺炎杆菌已公布的基因组序列(GenBank: CP012744.1) 中, 编码 *luxS* 基因的 DNA 序列位于 1 179 936 到

1 180 451,大小为 516 bp,考虑到克雷伯氏肺炎杆菌基因敲除需要 500 bp 以上的同源臂,从该基因中间位置上下游各选择 500 bp 左右的位置设计引物 *luxS*-s1 和 *luxS*-a1,扩增出来的片段大小应该为 1 086 bp,电泳结果如图 1,可以看到通过引物 *luxS*-s1 和 *luxS*-a1,从克雷伯氏肺炎杆菌基因组上成功扩增出了大小为 1.1 kb 左右的条带,符合预期。



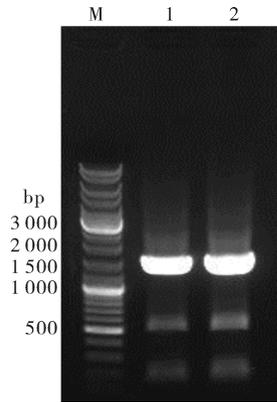
M:DNA marker; 1:*luxS* 上下游片段 *luxS* gene contained up-downstream sequence.

图1 *luxS* 基因上下游片段 PCR 结果

Fig.1 Fragment of *luxS* gene contained up-downstream sequence

为了使克雷伯氏肺炎杆菌基因组上的 *luxS* 基因失活,需要在基因内部插入一段抗性片段,本研究选择扩增质粒 pIJ778 上的链霉素抗性片段,根据序列,设计引物 *luxS*-Str-s1 和 *luxS*-Str-a1,该对引物 5'端为与 *luxS* 基因匹配的序列,3'端为用于扩增 pIJ778 载体上链霉素抗性的序列,用这对引物扩增出大小为 1.5 kb 左右的抗性片段,电泳结果(图 2)符合预期。

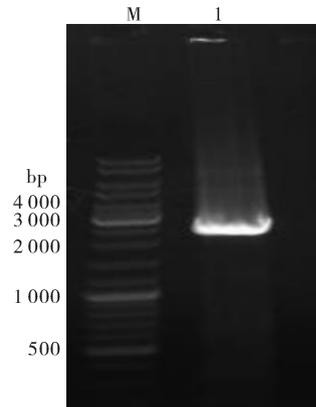
按本文“1.3”的方案用 RED 重组方法将链霉素抗性片段插入 *luxS* 的片段内部,形成两端为 500 bp 左右同源臂,中间为链霉素抗性的敲除片段 $\Delta luxS :: Str$,利用 RED 重组系统插入克雷伯氏肺炎杆菌的 *luxS* 基因处,用引物 *luxS*-s1 和 *luxS*-a1 做菌落 PCR 对阳性菌落进行确证,电泳结果如图 3 所示,菌落 PCR 扩增出来的片段大小为预期的 2.5 kb 左右,说明已将链霉素抗性片段插入了 *luxS* 基因内部,得到了 LuxS 蛋白被破坏且失去了群体感应调控功能的突变株。



M:DNA marker; 1,2:链霉素抗性片段 Streptomycin-resistant fragment.

图2 链霉素抗性片段 PCR 结果

Fig.2 Streptomycin-resistant fragment



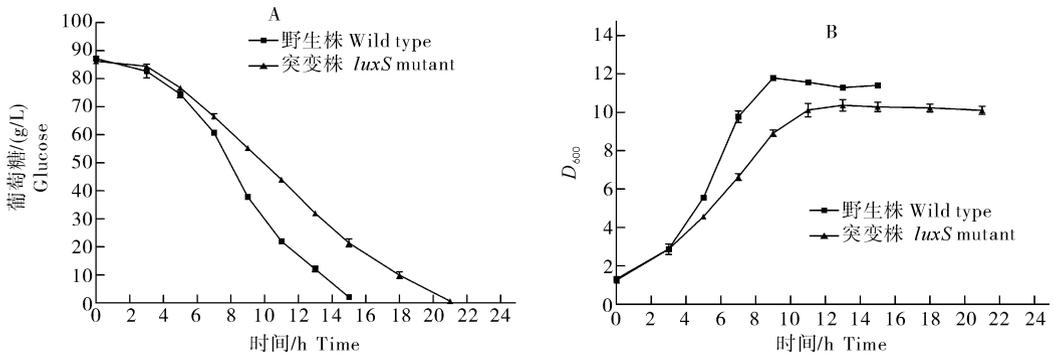
M:DNA marker; 1:菌落 PCR 扩增片段 Colony PCR fragment.

图3 阳性菌落 PCR 鉴定

Fig.3 PCR identification of positive colony

2.2 野生株和 *luxS* 突变株发酵结果分析

1)野生株和 *luxS* 突变株的生长性能。以生产 2,3-丁二醇的发酵培养基来研究野生株和 *luxS* 突变株的生长性能,结果见图 4。初始发酵培养基的葡萄糖质量浓度均为 100 g/L,野生株和 *luxS* 突变株均经过短暂的适应期后,开始快速消耗葡萄糖,同时生物量快速增加。LuxS 蛋白缺失的突变株消耗葡萄糖的速度明显慢于野生株,与此对应的,突变株生长速度也慢于野生株。野生株在 15 h 就把培养基中的葡萄糖全部消耗完,而 *luxS* 突变株要到 21 h 才全部消耗完。同样条件下野生株进入稳定生长期的 D_{600} 为 11,而 *luxS* 突变株稳定生长期的 D_{600} 只能达到 10,说明失去了群体感应调控系统的突变株在利用葡萄糖为碳源的培养基上生长变慢,生物量减少,生长代谢的强度低于野生株。



A: 葡萄糖消耗曲线; B: 生长曲线。A: Glucose consumption curve; B: Growth curve.

图 4 葡萄糖消耗和生长曲线

Fig.4 Curve of glucose consumption and growth

2) 野生株和 *luxS* 突变株对 2,3-丁二醇合成的影响。发酵生产 2,3-丁二醇的试验结果如图 5 所示,可以看出在发酵过程中,野生株和 *luxS* 突变株均在发酵试验进行到 3 h 左右时开始积累 2,3-丁二醇,随着发酵过程中葡萄糖的消耗,主要代谢产物 2,3-丁二醇的积累量不断增加,尽管 *luxS* 突变株生长变慢,消耗葡萄糖减少,但 2 个菌株积累 2,3-丁二醇的速率基本一致。野生株在发酵试验进行到约 15 h 时,葡萄糖消耗殆尽,积累 2,3-丁二醇约为 20.63 g/L; *luxS* 突变株在发酵试验进行到约 15 h 时,积累 2,3-丁二醇约为 20.69 g/L,与野生株无明显差别,发酵试验继续进行到 21 h 时, *luxS* 突变株葡萄糖消耗完毕,此时积累 2,3-丁二醇约为 30.48 g/L,与野生株相比,产量提高了约 47.75%。以葡萄糖为原料的转化率计算结果显示,野生株为 20.63%,而 *luxS* 突变株为 30.48%,提高明显。由此可见,失去了群体感应功能的突变株转化葡萄糖生成 2,3-丁二醇的效率大大提高,这对于工业生产来说非常有利,会大大降低生产成本。

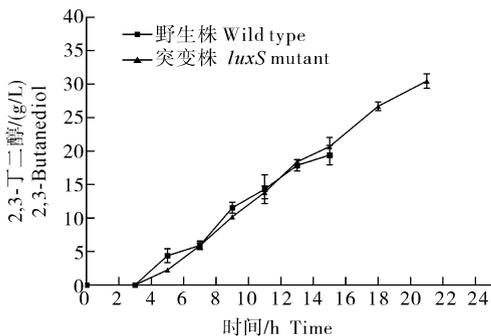


图 5 2,3-丁二醇产量曲线

Fig.5 2,3-Butanediol concentration curve

3) 野生株和 *luxS* 突变株发酵合成 2,3-丁二醇过程中相关副产物的检测结果。图 6 为根据相关文献^[5-8]总结出来的克雷伯氏肺炎杆菌葡萄糖相关的代谢途径,葡萄糖进入克雷伯氏肺炎杆菌细胞内后,经历一系列复杂的代谢,合成 2,3-丁二醇,同时产生一系列副产物,包括乙偶姻、琥珀酸、乳酸、乙醇和乙酸。为了探讨 *luxS* 突变株合成 2,3-丁二醇效率更高的原因,检测了野生株和 *luxS* 突变株发酵生产 2,3-丁二醇过程中相关副产物的质量浓度,结果如图 7 和表 2 所示; 5 个副产物中,琥珀酸(图 7A)、乳酸(图 7B)和乙醇(图 7C)是 2,3-丁二醇主要的发酵副产物,而乙酸(图 7D)和乙偶姻(图 7E)质量浓度相对较低,对 2,3-丁二醇的产量影响不大。在发酵后期,2 株菌中琥珀酸和乳酸的产量都大幅升高,但 *luxS* 突变株的升高幅度低于野生株的,其中野生株在 15 h 发酵终点琥珀酸质量浓度达到 5.57 g/L,乳酸质量浓度高达 9.71 g/L,而 *luxS* 突变株在 15 h 琥珀酸质量浓度仅有 1.50 g/L 左右,乳酸质量浓度仅有 3.00 g/L 左右,即使达到 21 h 的发酵终点,琥珀酸质量浓度也只有 3.06 g/L,乳酸质量浓度为 7.27 g/L,均远低于野生株发酵过程中这 2 个副产物的质量浓度。另一个主要副产物乙醇在野生株的发酵后期质量浓度也迅速升高,而突变株在发酵中期升高后,后期又迅速降低。野生型发酵终点乙醇质量浓度为 5.62 g/L,而 *luxS* 突变株发酵终点乙醇质量浓度只剩下 0.004 g/L,几乎可以忽略不计。也就是说这 3 个主要副产物在野生型菌株中均有较大积累,而 *luxS* 突变株中却大幅下降,这是 *luxS* 突变株中 2,3-丁二醇的转化率比野生株高 47.75% 的主要原因。

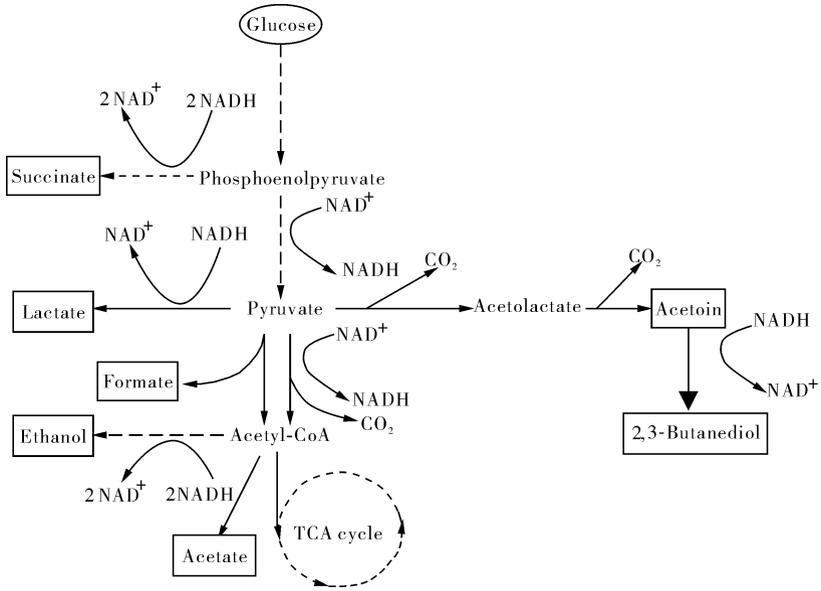


图 6 克雷伯氏肺炎杆菌葡萄糖相关代谢途径^[5-8]

Fig.6 Metabolic pathway of glucose in *Klebsiella pneumoniae*

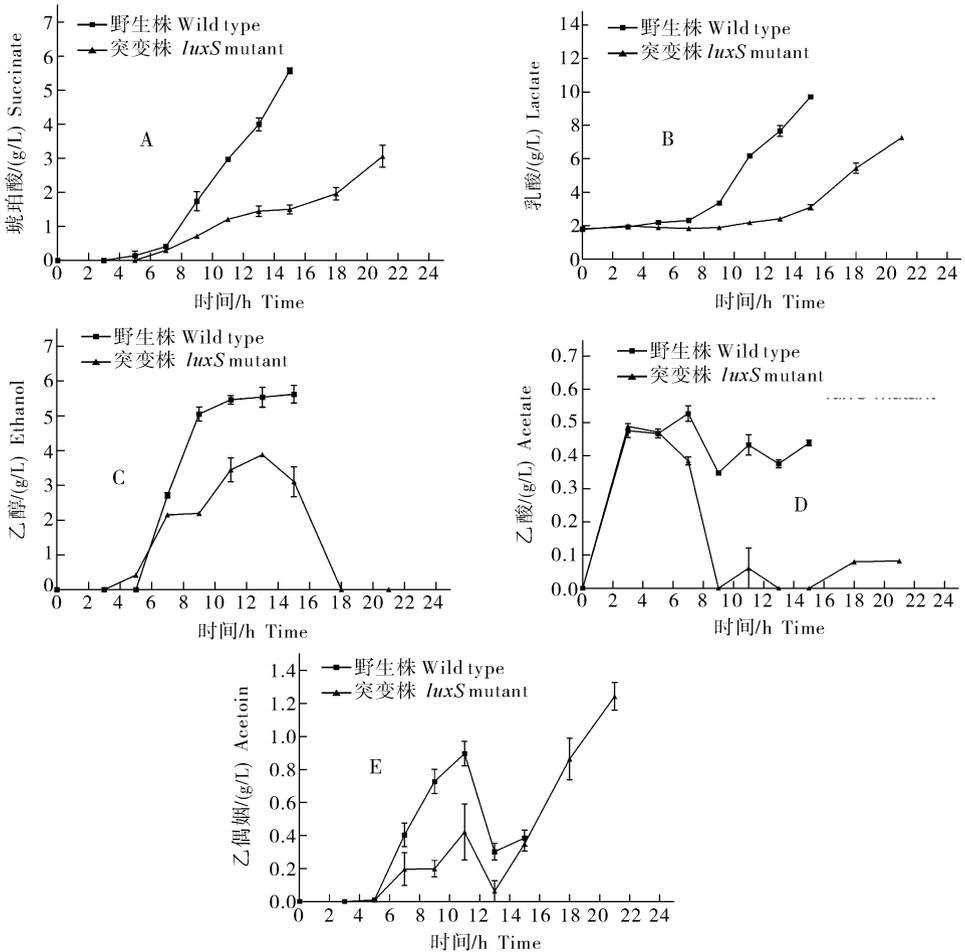


图 7 各副产物质量浓度曲线

Fig.7 Concentration curve of several by-products

另外 2 个副产物中,乙酸的含量在 3 株菌中均很低,对 2,3-丁二醇的产量影响不大,而乙偶姻是 2,3-丁二醇代谢的前体物质,恰恰是该物质在野生株的发酵终点含量为 0.38 g/L,而 *luxS* 突变株发酵终点含量为 1.24 g/L,这从另一个角度也说明了 *luxS* 突变株的群体效应缺失导致葡萄糖的代谢流分配发生改变,向乙偶姻和 2,3-丁二醇途径的代谢流量增大,而向其他途径的代谢流量减少,最终导致了该途径上的乙偶姻和 2,3-丁二醇产量都大于野生株的。

表 2 2 株菌发酵液中各产物的质量浓度
Table 2 Mass concentration of several products in wild-type strain and *luxS* mutant

产物 Product	野生株质量浓度/(g/L) Mass concentration of wild-type	突变株质量浓度/(g/L) Mass concentration of <i>luxS</i> mutant
2,3-丁二醇 2,3-Butanediol	20.64±2.05	30.48±1.51
琥珀酸 Succinate	5.57±0.12	3.06±0.46
乳酸 Lactate	9.71±0.08	7.27±0.18
乙酸 Acetate	0.53±0.01	0.23±0.01
乙醇 Ethanol	5.62±0.36	0.004±0.01
乙偶姻 Acetoin	0.38±0.07	1.24±0.12

3 讨论

克雷伯氏肺炎杆菌是一种广泛应用于多个大宗化工品生产的工业微生物,在工业生产过程中,都涉及到大规模的液体深层发酵工艺。克雷伯氏肺炎杆菌在高生长密度环境下受 LuxS 蛋白介导的群体感应系统调控,很多生理功能会发生改变。目前关于 LuxS 蛋白对克雷伯氏肺炎杆菌生理功能影响的研究主要集中在其生物膜形成方面,对其细胞内重要代谢途径影响的研究尚未引起重视。

本研究利用同源重组的原理,成功构建了克雷伯氏肺炎杆菌的 *luxS* 基因缺失突变株,通过在以葡萄糖为碳源的 2,3-丁二醇发酵培养基发酵,从葡萄糖消耗速率、发酵生物量、主产物 2,3-丁二醇质量浓度和副产物琥珀酸、乳酸、乙醇、乙酸和乙偶姻的质量浓度等角度对发酵结果进行了分析对比。结果发现,与野生型相比,缺失了群体感应功能的 *luxS* 突变株葡萄糖消耗速率变慢,生物量减少,3 个主要副产物琥珀酸、乳酸和乙醇的质量浓度都大幅降低,而主产物 2,3-丁二醇的质量浓度和转化率都大幅上升。因此,本研究认为:生物群体感应系统的缺失导致了克雷伯氏肺炎杆菌利用葡萄糖的代谢

流量发生明显改变,增加了碳源向乙偶姻和 2,3-丁二醇的代谢通路的流量,有效提高了 2,3-丁二醇的产量,尤其是大幅度提高了葡萄糖向 2,3-丁二醇的转化率,在相同质量浓度碳源条件下,2,3-丁二醇产量提高了 47.75%,大幅降低了生产成本,为克雷伯氏肺炎杆菌生产 2,3-丁二醇的遗传改造提供了新的思路。

本研究结果表明,克雷伯氏肺炎杆菌群体感应功能的缺失导致向 2,3-丁二醇途径的代谢流量发生改变,但其具体调控模式尚不清楚,接下来拟从转录组学和代谢组学方面研究野生株和 *luxS* 突变株各相关途径酶活性的改变和中间产物质量浓度的变化,探究群体感应功能对各代谢途径调控的具体方式,解析 *luxS* 突变株代谢流量改变的具体原因,为进一步的遗传改造提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] BRISSE S, GRIMONT F, GRIMONT P. The genus *Klebsiella* [J]. Prokaryotes, 2006, 6: 159-196.
- [2] ZENG A P, BIEBL H. Tools and applications of biochemical engineering science [M]. Berlin: Springer, 2002: 239-259.
- [3] CELINSKA E G, RAJEK W. Biotechnological production of 2,3-butanediol current state and prospects [J]. Biotechnology advances, 2009, 27: 715-725.
- [4] GARG S, JAIN A. Fermentative production of 2, 3-butanediol: a review [J]. Bioresource technology, 1995, 51 (2): 103-109.
- [5] CHEN C, WEI D, SHI J, et al. Mechanism of 2, 3-butanediol stereoisomer formation in *Klebsiella pneumoniae* [J]. Applied microbiology and biotechnology, 2014, 98: 4603-4613.
- [6] THAKKER C, BHOSALE S, RANADE D. Formation of succinic acid by *Klebsiella pneumoniae* MCM B-325 under aerobic and anaerobic conditions [J]. Journal of microbiology and biotechnology, 2006, 16: 870.
- [7] OH B R, SEO J W, HEO S Y, et al. Enhancement of ethanol production from glycerol in a *Klebsiella pneumoniae* mutant strain by the inactivation of lactate dehydrogenase [J]. Process biochemistry, 2012, 47: 156-159.
- [8] PARK J M, SONG H, LEE H J, et al. Genome-scale reconstruction and in silico analysis of *klebsiella oxytoca* for 2, 3-butanediol production [J]. Microb cell fact, 2013, 12(1): 20.
- [9] FUQUA W C, WINANS S C, GREENBERG E P. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators [J]. J Bacteriol, 1994, 176: 269-275.
- [10] XAVIER K B, BASSLER B L. LuxS quorum sensing: more than just a numbers game [J]. Curr Opin Microbiol, 2003, 6:

191-197.

- [11] BALESTRINO D, HAAGENSEN J A, RICH C, et al. Characterization of type 2 quorum sensing in *Klebsiella pneumoniae* and relationship with biofilm formation[J]. Journal of bacteriology, 2005, 187(8): 2870-2880.
- [12] ARAUJO C D, BALESTRINO D, ROTH L, et al. Quorum

sensing affects biofilm formation through lipopolysaccharide synthesis in *Klebsiella pneumoniae*[J]. Res Microbiol, 2010, 161(7): 595-603.

- [13] WEI D, WANG M, SHI J, et al. Red recombinase assisted gene replacement in *klebsiella pneumoniae*[J]. Journal of industrial microbiology & biotechnology, 2012, 39:1219-1226.

Influence of deleting quorum sensing system in *Klebsiella pneumoniae* on synthesis of 2,3-butanediol

LIU Pengfu^{1,2} WANG Chenhong² CHU Xiaohe¹ SHI Jiping² HAO Jian²

1. Collaborative Innovation Center of Yangtze River Delta Region Green Pharmaceuticals, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China;

2. Shanghai Advanced Research Institute, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201210, China

Abstract The *luxS* gene from quorum sensing system of *K. pneumoniae* was deleted to study the mechanism of quorum sensing. The yield of 2,3-butanediol and several by-products in the *K. pneumoniae* wild type and its *luxS* mutant was compared. Results showed that the yield of 2,3-butanediol in the *luxS* mutant was 47.75% higher than that in the production with the same concentration of glucose. The concentration of the by-products including succinic acid, lactic acid and ethanol was obviously decreased.

Keywords *Klebsiella pneumoniae*; 2,3-butanediol; quorum sensing system; *luxS* gene

(责任编辑: 张志钰)