

一、项目名称

微生物中 2,3-丁二醇手性异构体形成机制与应用

二、申报奖种

山东省自然科学奖

三、提名单位意见

我单位认真严格地审阅了该项目的提名书及全部附件材料，确认该项目符合山东省科学技术奖励规定的提名条件，全部材料真实有效，完成人、完成单位排序无异议，提名书相关栏目均符合填写要求。

2,3-丁二醇是一种重要的微生物初级代谢产物，据预测 2,3-丁二醇与其系列衍生物在全球市场销量达到每年 3200 万桶，市场价值约 430 亿美元，其生物法生产研究得到广泛关注。2,3-丁二醇具有三种手性异构体：*(2R, 3R)*-2,3-丁二醇、*(2S, 3S)*-2,3-丁二醇、*meso*-2,3-丁二醇。本项目针对微生物中 2,3-丁二醇手性异构体形成机制等关键科学问题，取得如下重要科学发现：揭示了地衣芽孢杆菌、阴沟肠杆菌、肺炎克雷伯氏菌等 2,3-丁二醇生产菌株中 2,3-丁二醇的手性异构体形成机制；基于微生物中 2,3-丁二醇手性异构体形成机制，重构 2,3-丁二醇合成途径，获得一系列可生产不同 2,3-丁二醇手性异构体的基因工程菌株；基于 2,3-丁二醇手性异构体机制及涉及的关键蛋白，获得了高效生产 2,3-丁二醇脱氢产物乙偶姻的基因工程菌株与体外合成技术。

本项目 8 篇代表性论文发表在 *Metabolic Engineering*、*Green Chemistry*、*The Journal of Biological Chemistry*、*Biotechnology for Biofuels* 等本领域的 Top 期刊，参加项目的 2 位研究生分别获得山东省优秀博士、硕士学位论文。研究成果产生了重要的国际影响，引领了微生物生理和代谢工程相关领域的国际前沿，为推动 2,3-丁二醇代谢相关基础研究及 2,3-丁二醇手性异构体合成技术的进步做出了突出贡献。对照山东省科学技术奖授奖条

件，推荐该项目申报山东省自然科学奖二等奖。

四、项目简介

本项目属于微生物生理和遗传研究领域。

2,3-丁二醇及其系列衍生物是一类重要的化工原料，主要来源于石油裂解时产生的四碳类碳氢化合物，生产工艺繁琐，成本高。利用自然界中广泛存在的生物质可再生资源生产 2,3-丁二醇及其衍生物，工艺简单，生产成本低，同时符合低碳经济的发展需要，具有重要的经济与社会效益。2,3-丁二醇具有三种手性异构体： $(2R, 3R)$ -2,3-丁二醇、 $(2S, 3S)$ -2,3-丁二醇、*meso*-2,3-丁二醇，尽管多种微生物均可发酵生产 2,3-丁二醇，但产物多为三种手性异构体的混合物，高光学纯 2,3-丁二醇生物法生产水平低。

本项目以可高效生产 2,3-丁二醇的天然菌株为出发点，针对微生物中 2,3-丁二醇的手性异构体形成机制、不同 2,3-丁二醇手性异构体的生产菌株构建及 2,3-丁二醇衍生物乙偶姻的生产等关键科学问题，取得如下重要科学发现：

- 1、揭示了地衣芽孢杆菌、阴沟肠杆菌、肺炎克雷伯氏菌等 2,3-丁二醇生产菌株中 2,3-丁二醇的手性异构体形成机制，确定了决定 2,3-丁二醇光学纯度关键蛋白 2,3-丁二醇脱氢酶的催化特性与生物学功能。

- 2、基于不同微生物中 2,3-丁二醇手性异构体形成机制，重构 2,3-丁二醇合成途径，获得了一系列可生产 $(2R, 3R)$ -2,3-丁二醇、 $(2S, 3S)$ -2,3-丁二醇、*meso*-2,3-丁二醇的基因工程菌株。

- 3、基于 2,3-丁二醇手性异构体机制及涉及的关键蛋白，获得了高效生产 2,3-丁二醇脱氢产物乙偶姻的基因工程菌株与体外合成技术。

本项目 8 篇代表性论文发表在 *Metabolic Engineering*、*Green Chemistry*、*The Journal of Biological Chemistry*、*Biotechnology for Biofuels* 等本领域的 Top 期刊。8 篇代表性论文发表后，共被他人引用 300 次，被 SCI 他人引用

226 次。被 Chemical Reviews、Biotechnology Advances、ACS Catalysis、Metabolic Engineering 等国际主流期刊多次引用，得到了美国工程院院士 Gregory Stephanopoulos、美国科学院院士 James C. Liao、美国工程院外籍院士 Sang Yup Lee 等国际知名学者的引用和正面评价。项目的研究成果产生了重要的国际影响，引领了 2,3-丁二醇相关微生物生理与代谢工程研究的国际前沿。

五、客观评价

1. JCR 1 区期刊 Biotechnology for Biofuels 将本项目代表性论文 7 评为该杂志发表论文中 Most accessed 的 5 篇论文之一（2 篇研究性论文之一，唯一 1 篇 2013 年后发表的论文），网址 <https://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/#tab-2>。

2. 2018 年，美国科学院院士、加州大学洛杉矶校区化学暨生物分子工程系、生物工程系教授兼主任 James C. Liao 在 Metabolic Engineering 发表的综述论文中引用了本项目代表性论文 8，认为“或者，可以重新设计在不涉及 α -乙酰乳酸脱羧酶的 2,3-丁二醇合成途径，通过 α -乙酰乳酸的非酶促脱羧反应实现双乙酰的体内生物合成。该研究表明，添加 Fe^{3+} 有利于脱羧反应，并使光学纯(2*S*, 3*S*)-2,3-丁二醇的产量达到 2.2 g/L。”（Metabolic Engineering 2018, 50:16-46）。

3. 2018 年，加拿大 University of Ottawa 的 Zisheng Zhang 在 Biotechnology Advances 发表的综述论文中引用了本项目代表性论文 2，认为“为提高阴沟肠杆菌生产 2,3-丁二醇的光学纯度，内源 2,3-丁二醇脱氢酶被敲除，来自短小芽孢杆菌的外源 2,3-丁二醇脱氢酶被表达，构建的工程菌株可以生产光学纯的(2*R*, 3*R*)-2,3-丁二醇。”（Biotechnology Advances 2018, DOI:10.1016/j.biotechadv.2018.03.019）。

4. 2014 年，美国工程院外籍院士、韩国国家科学与工程院院士、韩国

科学技术院资深教授 Sang Yup Lee 在 *Biotechnology Advances* 发表的综述论文中引用了本项目代表性论文 1，认为“在大肠杆菌中对 2,3-丁二醇合成基因簇进行了系统分析，以选择和优化出最有利于 2,3-丁二醇生产的基因簇。基因簇筛选成功后，通过使用不同的启动子来优化该基因簇的表达，另外基于生物量和胞外代谢物的分析进一步优化发酵条件，以提高 2,3-丁二醇的产量。最终通过补料分批发酵，*E. coli* BL21/pETRABC 菌株可生产 73.8 g/L 的 2,3-丁二醇，生产效率为 1.19 g/L/h。”（*Biotechnology Advances* 2015, 33:1455-1466）。

5. 2016 年，江南大学长江学者刘立明教授在 *Chemical Reviews* 发表的综述论文中引用了本项目代表性论文 1，认为“为了减少代谢负担并提高 2,3-丁二醇的产量，分别在不同强度的启动子下表达阴沟肠杆菌 2,3-丁二醇合成基因簇，包括 IPTG 诱导型启动子 P_{T7} 和 P_{tac} 、组成型启动子 P_c 和 2,3-丁二醇合成基因簇自身启动子 P_{abc} 。在 *E. coli* BL21/pET-RABC 中，以 P_{abc} 为优势启动子表达 ALDC、ALS 和 BDH 的活性均高于其他菌株，补料分批发酵生产 2,3-丁二醇的产量最终增加至 73.8 g/L。”（*Chemical Reviews* 2018, 118, 4-72）。

6. 2018 年，韩国蔚山国家科学技术研究所教授、韩国 Pusan National University 副校长 Sunghoon Park 在 *Biotechnology Advances* 发表的综述论文中成段引用了本项目代表性论文 3，认为“最近，甘油脱氢酶被报道催化乙偶姻与 2,3-丁二醇间的转化以实现 NADH 的消除与再生。”（*Biotechnology Advances* 2018, 36:150-167）。

7. 2014 年，日本国家先进工业科学技术研究所 Tamotsu Hoshino 教授在 *Metabolic Engineering* 发表的研究论文中引用了本项目代表性论文 1，认为“大肠杆菌细胞本身基本不产 2,3-丁二醇，但基因工程改造大肠杆菌已被用于生产 2,3-丁二醇，最高产量达到 73.8 g/L。”（*Metabolic Engineering* 2014, 25:204–214）。

8. 2015 年,美国 Ohio State University 教授 Shang-Tian Yang 在 *Microbial Cell Factories* 发表的研究论文中引用了本项目代表性论文 3, 认为“王等发现 DhaD 被甘油诱导, 除了催化甘油脱氢生成二羟基丙酮外, 该蛋白同样可以在 NADH 存在的情况下催化乙偶姻还原生成 2,3-丁二醇”(*Microbial Cell Factories* 2015, 14:122)。

9. 2015 年, 日本地球创新技术研究所 Masayuki Inui 教授在 *Applied Microbiology and Biotechnology* 发表的研究论文中引用了本项目代表性论文 3, 认为“最近, 一个密切相关的研究发现肺炎克雷伯氏菌 ATCC 25955 中 *dhaD* 编码的甘油脱氢酶 GDH 在氧化甘油生成二羟基丙酮与还原乙偶姻生成 2,3-丁二醇中发挥双重作用。”(*Applied Microbiology and Biotechnology* 2015, 99:1427-1433)。

10. 2015 年, 韩国 Sogang University 教授 Jinwon Lee 在 *Journal of Biotechnology* 发表的研究论文中引用了本项目代表性论文 3, 认为“基于最新的研究结果, 甘油脱氢酶 GDH 已被公认不仅作为重要的多元醇脱氢酶在不同微生物的甘油代谢中发挥作用, 肺炎克雷伯氏菌中该蛋白同样被证实可催化(3R)-乙偶姻/(2R, 3R)-2,3-丁二醇或(3S)-乙偶姻/*meso*-2,3-丁二醇间的转化。”(*Journal of Biotechnology* 2015, 209:7-13)。

11. 2016 年, 南非 University of the Free State 教授在 JCR 1 区期刊 *Biotechnology for Biofuels* 上将本项目代表性论文 8 引入“Editorial: chemicals and bioproducts from biomass”, 认为“褚等在大肠杆菌中设计了一条代谢途径用于由葡萄糖直接生产(2S, 3S)-2,3-丁二醇。”(*Biotechnology for Biofuels* 2016, 9:233)。

12. 2018 年, 英国 University of Manchester 教授、Manchester Institute of Biotechnology 主任 Nigel S Scrutton 在 *Current Opinion in Biotechnology* 发表的综述论文中引用了本项目代表性论文 8, 认为“在大肠杆菌中表达来源于阴

沟肠杆菌的 α -乙酰乳酸合成酶和 *meso*-2,3-二醇脱氢酶,以葡萄糖为底物生产生物燃料添加剂(2*S*, 3*S*)-2,3-丁二醇。虽然实验室规模生产(2*S*, 3*S*)-2,3-丁二醇的总产量较低(2.2 g/L; 95.0% ee),但是各种(2*S*, 3*S*)-2,3-丁二醇生产过程的成本分析表明,使用该方法能够降低生产成本(\$9.4/kg)。”(Current Opinion in Biotechnology 2018, 50:1-10)。

13. 2016 年,丹麦 Technical University of Denmark 教授 Peter Ruhdal Jensen 在 Metabolic Engineering 发表的研究论文中引用了本项目代表性论文 8,认为“如前言部分所述,(2*S*, 3*S*)-2,3-丁二醇可被不同基因工程微生物生产,但只有一篇报道描述了从葡萄糖直接生产(2*S*, 3*S*)-2,3-丁二醇。”(Metabolic Engineering 2016, 36:57-67)。

14. 2018 年,加拿大 University of Ottawa 的 Zisheng Zhang 在 Biotechnology Advances 发表的综述论文中引用了本项目代表性论文 6,认为“葛和同事们对地衣芽孢杆菌中两种 2,3-丁二醇脱氢酶的立体特异性进行了研究,分别构建了 *budC* 及 *gdh* 的单敲除菌株。研究发现地衣芽孢杆菌 *B. licheniformis* Δ *budC* 能够生产 123.7 g/L 的(2*R*, 3*R*)-2,3-丁二醇,而地衣芽孢杆菌 *B. licheniformis* Δ *gdh* 能够生产 90.1 g/L 的 *meso*-2,3-丁二醇。”(Biotechnology Advances 2018, DOI:10.1016/j.biotechadv.2018.03.019)。

15. 2019 年,澳大利亚 Macquarie University 教授 Anwar Sunna 在 Biotechnology Advances 发表的综述论文中引用了本项目代表性论文 5,认为“高等人开发了一种无细胞合成途径,通过引入 α -乙酰乳酸合成酶和 α -乙酰乳酸脱羧酶,进一步将丙酮酸选择性地转化为(3*R*)-乙偶姻。当将五种酶与甘油组合到一起反应时,能够转化甘油生成(3*R*)-乙偶姻,达到理论产率的 85.5% (光学纯度为 95.4%)。”(Biotechnology Advances 2019, 37:91-108)。

16. 2017 年,美国工程院院士、Metabolic Engineering 主编、美国麻省理工学院化学工程与生物技术教授、哈佛大学医学院生物工程教授 Gregory

Stephanopoulos 在 ACS Synthetic Biology 发表的研究论文中引用了本项目代表性论文 5, 认为“对于体外合成生物学来说, ATP 是一种昂贵的辅酶因子, 因此希望消除 ATP 依赖性酶促反应的使用, 旨在避免完全使用 ATP 的人工途径是体外催化的一种有趣的想法。”(ACS Synthetic Biology 2017, 6:1691-1700)。

17. 2018 年, 德国 Chair of Chemistry of Biogenic Resources、Technical University of Munich 教授 Volker Sieber 在 ACS Catalysis 发表的综述论文中引用了本项目代表性论文 5, 认为“高等人使用来自硫化叶菌的二羟基羧酸脱水酶和乙酰乳酸合成酶将 D-甘油酸转化为丙酮酸, 他们通过来自天蓝色链霉菌的醛醇氧化酶将甘油的两步氧化与 D-甘油酸的生成相结合将该反应扩展到新的级联反应中。然后通过乙酰乳酸合成酶和乙酰乳酸脱羧酶催化的脱羧反应, 经乙酰乳酸将丙酮酸进一步转化为(R)-乙偶姻。反应消耗 10.4 mM 甘油, (R)-乙偶姻的得率达到理论得率的 86%。”(ACS Catalysis 2018, 8:2385-2396)。

18. 2018 年, 奥地利 University of Graz 教授 Wolfgang Kroutil 在 Chemical Reviews 发表的综述论文中独立成段引用了本项目代表性论文 5, 认为“在无细胞多酶级联反应中, 甘油仅通过三个酶促步骤便被转化为丙酮酸, 并且不需要任何辅因子再生过程, 该催化过程包括由来自天蓝色链霉菌的醛醇氧化酶两步氧化甘油生成甘油酸, 同时形成副产物过氧化氢, 过氧化氢经过氧化氢酶分解生成水和分子氧。之后由来自硫化叶菌的二羟基羧酸脱水酶催化甘油酸生成丙酮酸。催化 24 小时, 10 mM 甘油被转化生成 9.3 mM 丙酮酸, 并且未检测到副产物的形成。在体外催化甘油生产丙酮酸模块的基础上, 通过偶联来源于地衣芽孢杆菌的 α -乙酰乳酸合成酶和 α -乙酰乳酸脱羧酶, 丙酮酸能够被进一步转化为(R)-乙偶姻。最终 10.4 mM 甘油被转化生成 4.4 mM (R)-乙偶姻, 达到理论得率的 86%, ee 值达到 95%。”(Chemical Reviews 2018, 118:270-348)。

19. 2018 年，中国科学院大连化学物理研究所薛松研究员在 RSC Advances 发表的研究论文中引用了该项目代表性论文 4，认为“迄今为止，已经发现并设计了许多细菌菌株，例如 *Bacillus subtilis*、*Klebsiella pneumoniae*、*Enterobacter aerogenes* 和 *Enterobacter cloacae*，用于生产乙偶姻。在这些微生物中，用于乙偶姻生物生产的最有希望的微生物是阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*)。阴沟肠杆菌 SDM 在简单培养基中快速生长，并将主要的木质纤维素中的葡萄糖和木糖转化成乙偶姻。”(RSC Advances 2018, 8:39066-39073)。

20. 2016 年，南京工业大学长江学者、国家杰出青年基金获得者黄和教授在 Applied Microbiology and Biotechnology 发表的研究论文中引用了该项目代表性论文 1，认为“(3R)-乙偶姻与(2R, 3R)-2,3-丁二醇的高产量表明增强由(3R)-乙偶姻到(2R, 3R)-2,3-丁二醇的转化是提高(2R, 3R)-2,3-丁二醇生产的关键步骤，可以通过提高(3R)-乙偶姻的转化提高(2R, 3R)-2,3-丁二醇的产量。”(Applied Microbiology and Biotechnology 2016, 100:637-647)。

六、代表性论文专著目录

1、 You-qiang Xu, Hai-pei Chu, Chao Gao, Fei Tao, Zi-kang Zhou, Kun Li, Li-xiang Li, Cui-qing Ma*, Ping Xu*, 2014, Systematic metabolic engineering of *Escherichia coli* for high-yield production of fuel bio-chemical 2,3-butanediol, Metab Eng. 23:22-33

2、 Li-xiang Li[§], Kun Li[§], Yu Wang, Chao Chen, You-qiang Xu, Li-jie Zhang, Bin-bin Han, Chao Gao, Cui-qing Ma*, Ping Xu*, 2015, Metabolic engineering of *Enterobacter cloacae* for high-yield production of enantiopure (2R,3R)-2,3-butanediol from lignocellulose-derived sugars, Metab Eng. 28:19-27

3、 Yu Wang[§], Fei Tao[§], Ping Xu*. 2014, Glycerol dehydrogenase plays a dual role in glycerol metabolism and 2,3-butanediol formation in *Klebsiella*

pneumoniae, J Biol Chem. 289:6080-6090

4、 Li-jie Zhang, Qiu-yuan Liu, Yong-sheng Ge, Li-xiang Li, Chao Gao, Ping Xu and Cui-qing Ma*, 2016, Biotechnological production of acetoin, a biobased platform chemical, from a lignocellulosic resource by metabolically engineered *Enterobacter cloacae*, Green Chem. 18:1560-1570

5、 Chao Gao, Zhong Li, Li-jie Zhang, Chao Wang, Kun Li, Cui-qing Ma*, Ping Xu*, 2015, An artificial enzymatic reaction cascade for a cell-free bio-system based on glycerol, Green Chem. 17:804-807

6、 Yong-sheng Ge[§], Kun Li[§], Li-xiang Li, Chao Gao*, Li-jie Zhang, Cui-qing Ma*, Ping Xu, 2016, Contracted but effective: production of enantiopure 2,3-butanediol by thermophilic and GRAS *Bacillus licheniformis*, Green Chem. 18:4693-4703

7、 Li-xiang Li, Li-jie Zhang, Kun Li, Yu Wang, Chao Gao, Bin-bin Han, Cui-qing Ma*, Ping Xu*, 2013, A newly isolated *Bacillus licheniformis* strain thermophilically produces 2,3-butanediol, a platform and fuel bio-chemical. Biotechnol Biofuels. 6:123

8、 Hai-pei Chu, Bo Xin, Pei-hai Liu, Yu Wang, Li-xiang Li, Xiu-xiu Liu, Xuan Zhang, Cui-qing Ma, Ping Xu, Chao Gao*, 2015, Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of (2*S*,3*S*)-butane-2,3-diol from glucose, Biotechnol Biofuels. 8:143

七、主要完成人情况

1、姓名：马翠卿

排名：1

行政职务：

技术职称：教授

工作单位：山东大学

完成单位：山东大学

工作单位：山东大学

完成单位：山东大学

对本项目技术创造性贡献：是代表性论文 7 的第一作者，代表性论文 2 的并列第一作者，代表性论文 1、5、6、8 的合著作者。

曾获省级以上科技奖励情况：无。

5、姓名：徐友强 排名：5

行政职务： 技术职称： 中级

工作单位：山东大学

完成单位：山东大学

对本项目技术创造性贡献：是代表性论文 1 的第一作者，代表性论文 2 的合著作者。

曾获省级以上科技奖励情况：无。

八、完成人合作关系说明

本项目五位完成人马翠卿、高超、许平、李理想、徐友强以“微生物技术国家重点实验室”与“微生物代谢国家重点实验室”为研究平台，以国家重点学科“微生物学”为依托，以“微生物生理与代谢工程”为研究方向，以“微生物中 2,3-丁二醇手性异构体形成机制与应用”为主要研究内容，构建成了一个密切合作的研究团队，共同完成了项目的研究内容。以共同发表论文的方式进行合作，具体合作成果如下：

序号	合作方式	合作者/项目排名	合作时间	合作成果
1	合作发表论文	徐友强/5, 李理想/4, 高超/2, 马翠卿/1, 许平/3	2014	代表性论文 1
2	合作发表论文	李理想/4, 徐友强/5, 高超/2, 马翠卿/1, 许平/3	2015	代表性论文 2
3	合作发表论文	高超/2, 李理想/4, 马翠卿/1, 许平/3	2016	代表性论文 4

4	合作发表论文	高超/2, 马翠卿/1, 许平/3	2015	代表性论文 5
5	合作发表论文	李理想/4, 高超/2, 马翠卿/1, 许平/3	2016	代表性论文 6
6	合作发表论文	高超/2, 李理想/4, 马翠卿/1, 许平/3	2013	代表性论文 7
7	合作发表论文	高超/2, 李理想/4, 马翠卿/1, 许平/3	2015	代表性论文 8