



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20170244

表达异源木糖异构酶对谷氨酸棒杆菌利用木糖的影响

李燕军^{1,2}, 毛倩¹, 韩洪军², 高立栋², 张顺棠², 丁念念¹, 陈宁¹

(1. 代谢控制发酵技术国家地方联合工程实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457;

2. 莲花健康产业集团股份有限公司博士后科研工作站, 项城 466200)

摘要: 微生物细胞木糖代谢对生物质水解液全利用和促进特定重要化学品的合成具有重要意义。谷氨酸棒杆菌为重要的氨基酸工业生产菌株, 由于缺乏木糖异构酶编码基因而不能代谢木糖。本研究通过质粒过表达不同来源的木糖异构酶基因 *xyIA*, 实现了菌株对木糖的利用, 其中大肠杆菌木糖异构酶效果最好。由于木糖异构酶的活性是制约菌株代谢木糖的瓶颈因素, 因此对启动子的 SD 序列进行了替换以促进翻译效率, 使菌株在木糖培养基中生长的 A_{600} 值达到出发菌的 2.7 倍。通过基因组整合 3 个拷贝的优化后 *xyIA* 表达模块, 实现了无质粒的木糖代谢工程菌株的构建, 为后续谷氨酸棒杆菌利用木糖生产高附加值化学品的代谢工程研究奠定基础。

关键词: 谷氨酸棒杆菌; 木糖异构酶; 木糖代谢; 质粒表达; 基因组整合

中图分类号: Q812

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2019)01-0018-06

Effect of Expression of Heterologous Xylose Isomerase on Xylose Utilization of *Corynebacterium glutamicum*

LI Yanjun^{1,2}, MAO Qian¹, HAN Hongjun², GAO Lidong²,

ZHANG Shuntang², DING Niannian¹, CHEN Ning¹

(1. National and Local United Engineering Laboratory of Metabolic Control Fermentation Technology,

College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;

2. Post-Doctoral Research Center, Lotus Health Group Co., Ltd., Xiangcheng 466200, China)

Abstract: Microbial utilization of xylose plays an important role in making comprehensive use of biomass hydrolysate and improving the synthesis of certain important chemicals. *Corynebacterium glutamicum* is an important industrial amino acid producing strain. It cannot metabolize xylose due to its lack of xylose isomerase encoding gene. In this study, xylose isomerase genes from different bacteria were overexpressed in *C. glutamicum* to achieve the utilization of xylose, and the xylose isomerase derived from *Escherichia coli* was found to be the best. Because xylose isomerase activity is the bottleneck restricting the xylose metabolic capability, the SD and adjacent sequence of endogenous GDH was added into the *tac* promoter. The shake flask cultivation results indicated that the biomass of the resulting strain grown in xylose supplemented basal medium reached 2.7 times that of the control. The optimized *xyIA* expression cassette was integrated into the genome by 3 copies to construct the strain that is able to metabolize xylose without plasmid. These results lay the foundation for further metabolic engineering study in constructing *C. glutamicum* strains that produce high value-added chemicals using xylose as a substrate.

Key words: *Corynebacterium glutamicum*; xylose isomerase; xylose utilization; plasmid-based expression; genomic integration

随着石化资源的日益消耗和环境污染的日益突出, 开发以生物资源为基础的石化经济的替代路线对社会可持续发展具有重要意义。利用微生物对生物

质原料进行发酵转化是生物经济的核心环节。廉价的木质纤维素原料是储量巨大的生物质资源, 主要由纤维素、半纤维素和木质素组成。现行发酵工业主要

收稿日期: 2017-09-07; 修回日期: 2017-11-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(3150010035); 中国博士后科学基金资助项目(2016M601269)

作者简介: 李燕军(1983—), 男, 山西吕梁人, 讲师; 通信作者: 韩洪军, 高级工程师, lhhj5539@163.com

以粮食来源的淀粉糖为原料,对粮食安全构成一定的威胁,开发以农林废弃物为代表的木质纤维素原料作为替代碳源是发酵工业的发展趋势之一.木糖是自然界中含量仅次于葡萄糖的单糖,木糖基的含量在木质纤维素中达 18%~30%,占总糖类的 30%~50%^[1].半纤维素水解液中木糖含量可以达到可发酵总糖的 90%以上^[2].因此,木糖发酵是综合高效利用木质纤维素水解液所必需的.

木糖代谢能够增加特定前体物的供应,有利于微生物发酵生产芳香族氨基酸、组氨酸和核苷、某些维生素及其衍生物.戊糖磷酸途径(HMP)是除糖酵解(EMP)外细胞内第二重要糖分解代谢途径,为细胞的合成代谢提供多种原料.微生物首先通过 HMP 途径来实现对木糖的代谢,木糖进入细菌细胞后,经木糖异构酶(xylose isomerase, XI)催化形成木酮糖,随后在木酮糖激酶的作用下形成木酮糖-5-磷酸,进入 HMP 途径.芳香族氨基酸的合成需要经过莽草酸途径,以来源于 HMP 途径的赤藓糖-4-磷酸和来源于 EMP 的磷酸烯醇式丙酮酸作为共同初始底物^[3].利用木糖除了容易生成赤藓糖-4-磷酸外,还可以减少 PTS 系统转运葡萄糖过程对磷酸烯醇式丙酮酸的消耗. Li 等^[4]构建的重组菌,以木糖与葡萄糖的混合糖为碳源,莽草酸产量比单独利用葡萄糖时要高.

自然界中绝大多数微生物以葡萄糖为碳源,不具备五碳糖(如木糖和阿拉伯糖)的代谢途径.半个多世纪以来,谷氨酸棒杆菌一直是重要的氨基酸和核苷生产菌,目前谷氨酸和赖氨酸的全球年产量分别高达 250 万吨和 150 万吨左右^[5-6].近年来,随着代谢工程和合成生物技术的发展,利用谷氨酸棒杆菌工程菌株可以生产越来越多的产品.然而,谷氨酸棒杆菌不具备完整的木糖代谢途径,其基因组上只含有木酮糖激酶编码基因.因此,需要引入异源木糖异构酶编码基因才能实现谷氨酸棒杆菌对木糖的利用.本研究首先克隆了多个外源木糖异构酶,通过质粒的形式在谷氨酸棒杆菌中过表达,菌株能够以木糖为唯一碳源进行生长.其次,对最优木糖异构酶表达质粒上核糖体结合位点进行替换,促进了菌株对木糖的利用能力.最后,对木糖表达元件进行了多拷贝基因组整合,实现了无质粒木糖代谢工程菌株的构建.

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 (*E. coli*) DH5 α 、大肠杆菌 (*E. coli*)

MG1655、谷氨酸棒杆菌 (*C. glutamicum*) ATCC 13032、野油菜黄单胞菌 (*Xanthomonas campestris*) ATCC33913、枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*) 168、表达质粒 pXMJ19(Cm^R, *tac* 启动子)和自杀型质粒 pK18mobsacB(Km^R)均为本实验室保藏.

1.2 培养基

LB 培养基(g/L):胰蛋白胨 10,酵母粉 5,NaCl 5,pH 7.0,121 °C 灭菌 20 min. 固体培养基含 20 g/L 琼脂.

BHI 培养基(g/L):脑心浸提物 37,山梨醇 91,pH 7.0~7.2,121 °C 灭菌 20 min. 固体培养基含 20 g/L 琼脂.

种子培养基(g/L):BHI 培养基,葡萄糖 0.5.

发酵培养基(CGX II, 500 mL):(NH₄)₂SO₄ 5 g,尿素 1 g,K₂HPO₄ 0.5 g,KH₂PO₄ 0.5 g,MgSO₄ 0.125 g,MOPS 21 g,1% CaCl₂ 溶液 500 μ L,V_H 溶液(1 mg V_H 溶于 1 L 蒸馏水)100 μ L,原儿茶酸溶液(3,4-二羟基苯甲酸 300 mg、10 mol/L NaOH 1 mL、蒸馏水 9 mL 混合)500 μ L,微量元素混合液(FeSO₄·7H₂O 1 g,MnSO₄·H₂O 1 g,ZnSO₄·7H₂O 0.1 g,CuSO₄ 0.02 g,NiCl₂·6H₂O 0.002 g,用盐酸调 pH 至 1.0,蒸馏水补足 90 mL)500 μ L,木糖 5 g,pH 7.0~7.2,121 °C 灭菌 20 min.

1.3 培养方法

摇管培养:从 -80 °C 甘油保菌管吸取 20 μ L 菌液接种于 BHI 摇管,32 °C、200 r/min 摇床培养 12~16 h.

种子培养:将 BHI 摇管中培养的菌液以 1%接种量接入装有 30 mL 种子培养基的三角瓶中,32 °C、200 r/min 摇床培养 8 h.

发酵培养:待种子瓶 $A_{600} = 6 \sim 8$ 时,以 4%接种量接入装有 50 mL 发酵培养基的三角瓶中,32 °C、200 r/min 摇床培养.

1.4 菌株构建

根据 GenBank 中大肠杆菌 MG1655、枯草芽胞杆菌 168 和野油菜黄单胞菌 ATCC33913 的木糖异构酶编码基因 *xyIA* 序列分别设计特异性引物,以各自基因组 DNA 为模板,扩增 *xyIA* 基因片段,回收纯化 PCR 产物.双酶切(酶切位点见表 1)将 pXMJ19 质粒线性化,利用 ClonExpress® II One Step Cloning Kit(Vazyme)同源重组的方法分别连接 4 个 *xyIA* 基因片段和线性化质粒片段,获得过表达质粒 pXMJ19-*xyIA*_{eco}、pXMJ19-*xyIA*_{bsu}、pXMJ19-*xyIA*_{xcc1} 和 pXMJ19-*xyIA*_{xcc2}. 采用类似方法构建 pXMJ19-

SD_{GDH-xyIA_{eco}} 质粒, 通过上游引物引入谷氨酸脱氢酶启动子的 Shine-Dalgarno (SD) 及周边序列. 通过电转

化方法将这些过表达质粒转入谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 感受态细胞中, 得到相应菌株.

表 1 引物
Tab. 1 Primers

用途	名称	核苷酸序列 5'-3'	酶切位点
单拷贝	M1	acaatGCATGCTGGAAGGTGCGGGTTAAC	<i>Sph</i> I
	M2	AGTCGATAAGCCCGGATCAGGGCCTTTGTCTACGACTTCTTG	
	M3	CAAGAAGTCGTAGACAAAGGCCCTGATCCGGGCTTATCGACT	
	M4	CGCATCGTAGAGTCCACCCTTAAGGGCGACACGGAATG	
	M5	CATTTCCGTGTCGCCCTTAAGGGTGGACTCTACGATGCG	
	M6	ttaaCTGCACTGCACTCAAACCCTGGGAAC	<i>Pst</i> I
	M7	GGGTAAATATCTACGCCAAGC	
双拷贝	M8	tatgaccatgattacgaattcCGACATCCCCTCAGCATCAT	
	M9	CCACCATCAAACAGGATTTTCGGACCCTTGCGAATCTGGCT	
	M10	AGCCAGATTCGCAAGGGTCAGAGTTGCAGCAAGCGGTC	
	M11	AGATGCGACCGTAGTTGTGCTGCGACACGAAATGTTGAATAC	
	M12	GTATTCAACATTTCCGTGTCGACGACAACACTACGGTTCGCATCT	<i>EcoR</i> I
	M13	gccagtgccaagctgcatgcTGAAGAGCCGCTTTAGACATCC	<i>Sph</i> I
	M14	ctgttcgacaaataatctagaGTTAACAGATCGTTTAGATCCGAAGG	
	M15	caaaacagccaagctgaattcTTATTTGTCGAACAGATAATGGTTTACC	
	M16	CGAAAATCCTGTTTGATGGTGG	
	M17	GCGACACGGAATGTTGAATAC	
pXMJ19-xyIA _{eco}	M18	tgccctgcaggtcgactctagaATGCAAGCCTATTTTGACCAGC	<i>Xba</i> I
	M19	gctgaattcgagctcggtaccTTATTTGTCGAACAGATAATGGTTTACC	<i>Kpn</i> I
pXMJ19-xyIA _{bsu}	M20	attaagcttgcagctcgagATGGCTCAATCTCATTCCAGTTC	<i>Pst</i> I
	M21	caaaacagccaagctgaattcTTATACTTCTAAAATGATTGGTTCAATATCG	<i>EcoR</i> I
pXMJ19-xyIA _{xcc}	M22	CCTACCAGCAGCACTACCAGAA	
	M23	TGGAGACTGACATGGGTT	
	M24	CGGCTTTTTTCAGTCGAGT	<i>Xba</i> I
	M25	TGCCGATTGGACATCTTG	<i>Kpn</i> I
	M26	tgccctgcaggtcgactctagaATGAGCAACACCGTTTTTCATCG	
	M27	gctgaattcgagctcggtaccTCAACGCGTCAGGTACTGATTG	
	pXMJ19-SD _{GDH-xyIA_{eco}}	M28	AAGCTTAGGAAATCATGGGAACGAGGAAATCATGCAAGCCTATTTGACCAGC
M29		aattGGTACCTTATTTGTCGAACAGATAATGGT	<i>Kpn</i> I

以谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 基因组为模板, 分别扩增上游、下游同源臂片段; 以质粒 pXMJ19-SD_{GDH-xyIA_{eco}} 为模板扩增木糖异构酶 *Ptac*-SD_{GDH-xyIA_{eco}} 片段. PCR 产物经纯化回收后, 通过重叠 PCR 反应获得整合片段: 上游同源臂 + *Ptac* + *xyIA* + 下游同源臂. 通过同源重组方法连接到双酶切线性化的 pK18mobsacB 质粒上, 获得整合质粒 pK18mobsacB-xyIA_{eco}. 采用电转化将质粒 pK18mobsacB-xyIA_{eco} 转化至谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 感受态细胞. 将菌体涂布在含卡那霉素 (10 μg/mL) 的 BHI 平板上, 于 32 °C 培养 24 ~ 30 h. 待长出转化子后, 挑取单菌落分别对点含卡那霉素和 15% 蔗糖的平板, 32 °C 培养 16 ~ 20 h. 挑选表型正确 (在卡那霉素平板生长良好而在蔗糖平板生长受到明显抑制) 的菌落, 进行菌落 PCR 鉴定, 保存正确发生第一轮交换的菌株. 将单交

换菌株接种到含卡那霉素的 BHI 摇管中培养 12 ~ 16 h, 再转接蔗糖摇管培养后, 稀释 8 ~ 10 万倍涂布蔗糖平板. 将长出的单菌落分别对点蔗糖和卡那霉素平板, 32 °C 培养 12 ~ 16 h, 挑选表型正确 (在蔗糖平板生长良好而在卡那霉素平板生长受到明显抑制) 的菌落, 进行菌落 PCR 和测序验证, 得到基因组整合菌株.

1.5 测定方法

菌体生物量测定: 发酵过程中每隔 4 h 取样, 利用分光光度计测定 *A*₆₀₀ 值.

残糖测定: 取 500 μL 发酵液于 1.5 mL 离心管中, 12 000 r/min 离心 2 min, 取上清液稀释一定倍数后, 经 0.22 μm 膜过滤. 用 SPD-20A 型岛津高效液相色谱仪测定木糖浓度, 检测条件: 色谱柱为 Bio-Rad Aminex HPX-87H (300 mm × 7.8 mm), 示差检

测器,流动相 5 mmol/L 硫酸,流量 0.6 mL/min,柱温 30 °C.

2 结果与讨论

2.1 不同来源木糖异构酶的质粒过表达

Kawaguchi 等^[7]最早在谷氨酸棒杆菌中构建了木糖代谢途径,在过表达来源于大肠杆菌的木糖异构酶(XI,由基因 *xyIA* 编码)后,菌株能够以木糖为唯一碳源生长.随后,研究者们纷纷效仿该方法在谷氨酸棒杆菌中过表达大肠杆菌的 XI^[8-9].那么,其他细菌来源的 XI 也值得研究.比如,野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris*)在葡萄糖存在的条件下能够稳定地代谢木糖^[10],其基因组上存在双拷贝 *xyIA*,其中一个与木酮糖激酶编码基因 *xyIB* 形成基因簇,另一个独立存在,且碱基位点存在一些突变.那么可以设想,野油菜黄单胞菌是否在适应环境的过程中增加了一个 *xyIA* 拷贝,该基因上碱基变异是否有利于编码活性增强的 XI.因此,本文分别克隆了野油菜黄单胞菌的两个 *xyIA*,同时克隆了枯草芽胞杆菌的和大肠杆菌的 *xyIA*,构建了过表达质粒 pXMJ19-*xyIA*_{xcc1}、pXMJ19-*xyIA*_{xcc2}、pXMJ19-*xyIA*_{bsu} 和 pXMJ19-*xyIA*_{eco}.将 4 个质粒分别转化到谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 中,测定了菌株在以木糖为唯一碳源的基本培养基 CGXII 上的生长曲线(图 1).

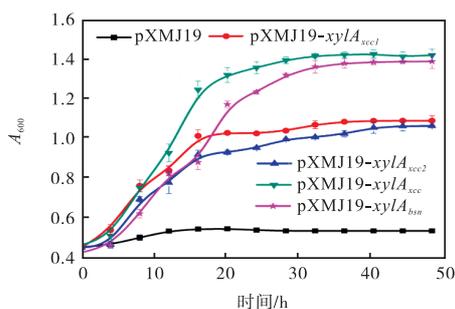


图 1 谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 质粒过表达不同来源 *xyIA* 的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of *xyIA* genes from different bacteria overexpressed in *C. glutamicum* ATCC13032

由图 1 可知,携带空质粒的菌株在木糖培养基中不能生长,出现 A_{600} 值的小幅上升是由于接种瓶培养时从种子液带入少量培养基.过表达野油菜黄单胞菌 *xyIA* 时 A_{600} 达到 1 左右,且 *xyIA*_{xcc1} 效果略好于 *xyIA*_{xcc2}.过表达枯草芽胞杆菌 *xyIA* 时菌株前 10 h 生长慢于表达野油菜黄单胞菌 *xyIA*,然而与后者相比,在 10 h 之后菌株仍然保持较快的生长速率,培养结

束时 A_{600} 达到 1.38.过表达大肠杆菌 *xyIA* 时菌株生长速率最快,终 A_{600} 值也最高,达到 1.41.

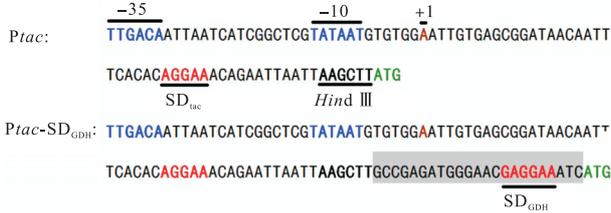
由此可见,本研究中不同来源的 XI 在谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 中均成功表达,pXMJ19 质粒上 *xyIA* 表达的启动子是来源于大肠杆菌的 *tac* 强启动子.同样,Kawaguchi 等^[7]利用来源于 pTrc99A 的 *trc* 强启动子也实现了 *xyIA* 在谷氨酸棒杆菌 R 菌株中的表达.然而,叶菁^[11]利用 pEC-XK99E 质粒(*trc* 启动子)在谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 中表达 *xyIA* 失败,他认为可能的原因是 *trc* 启动子在谷氨酸棒杆菌中的活性较低,或者 pEC-XK99E 在谷氨酸棒杆菌中的拷贝数较低.由图 1 也可以看出,不同来源的 XI 对谷氨酸棒杆菌利用木糖的影响较大,表达大肠杆菌 XI 时木糖代谢水平最高.目前关于酿酒酵母利用木糖的报道较多,研究者们利用进化工程筛选到木糖代谢和/或乙醇发酵提高的菌株,通过分析发现进化菌株基因组上出现了多个拷贝的 *xyIA*^[12-14].这些结果表明 XI 的活性对重组菌株利用木糖发挥至关重要的作用.从反应机理来看,XI 可逆催化从木糖到木酮糖的异构化反应,反应平衡时木糖的转化率才达 20%左右^[15].因此,为了增强谷氨酸棒杆菌的木糖利用能力,需要源源不断地高效表达 XI.

2.2 *tac*启动子核糖体结合位点的替换

从图 1 可知,虽然表达大肠杆菌 XI 的谷氨酸棒杆菌利用木糖能力最强,但菌体生物量还较低,需要进一步强化 XI 的表达.翻译起始的效率对基因表达水平具有重要影响,原核基因的表达是通过 mRNA 5'端 SD 序列与核糖体 30S 亚基结合来起始的.SD 序列与起始密码子的距离及之间的碱基组成对翻译效率影响显著^[16].谷氨酸棒杆菌一些基因缺少 SD 序列,也有 SD 序列接近或与起始密码子 ATG 重叠,这与大肠杆菌等其他细菌差别很大^[17].考虑到 pXMJ19 上 *tac* 启动子的 SD 序列与目的基因起始密码子之间的距离过远,本文在 *xyIA*_{eco} 基因起始密码子前面添加了内源谷氨酸脱氢酶的 SD 序列及周边碱基(图 2),构建了 pXMJ19-SD_{GDH}-*xyIA*_{eco},旨在强化 XI 的翻译效率.因为野生型谷氨酸棒杆菌可以分泌高浓度的谷氨酸,其谷氨酸脱氢酶活性较高.携带 pXMJ19-*xyIA*_{eco} 和 pXMJ19-SD_{GDH}-*xyIA*_{eco} 菌株在木糖基本培养基上的生长曲线如图 3 所示.

由图 3 可知,添加谷氨酸棒杆菌内源谷氨酸脱氢酶 SD 序列后,菌株利用木糖生长速率明显加快,最终 A_{600} 达到 3.87,是对照组的 2.7 倍.SD_{GDH} 的添加显著促进了 *xyIA*_{eco} 的 mRNA 的翻译.叶菁^[11]利用 pEC-

XK99E 的 *trc* 启动子在谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 中表达 *xyIA* 失败后, 采用谷氨酸棒杆菌内源基因 *groES* 的启动子及 SD 序列实现了 *xyIA* 的成功表达.



Ptac 为 *tac* 启动子; *Ptac*-SD_{GDH} 为在起始密码子前面添加 SD_{GDH} 及周边碱基 (阴影部分) 的 *tac* 启动子

图 2 *xyIAeco* 表达的 *tac* 启动子序列分析

Fig. 2 Promoter sequence analysis of *tac* driving *xyIAeco* expression

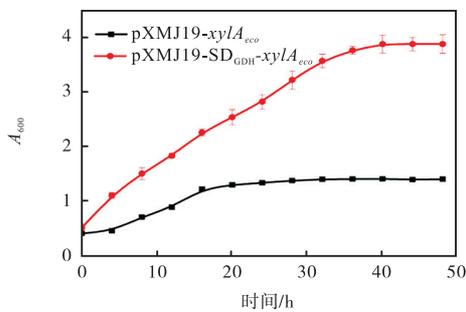


图 3 添加内源谷氨酸脱氢酶 SD 序列表达 *xyIAeco* 对谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 利用木糖的影响

Fig. 3 Effect of SD_{GDH}-added expression of *xyIAeco* on xylose utilization by *C. glutamicum* ATCC13032

2.3 *xyIAeco* 在谷氨酸棒杆菌基因组上多拷贝整合

含质粒工程菌株在发酵过程中一定的问题, 如质粒不稳定性及菌体生长变慢, 目前工业生产菌株的构建多采用基因组整合的手段. 因此, 将上述研究确定的 *Ptac*-SD_{GDH}-*xyIAeco* 表达元件分别进行了 1、2 和 3 个拷贝的基因组整合. 对 3 株无质粒菌株在木糖为唯一碳源的基本培养基中进行了摇瓶培养, 生长曲线如图 4 所示.

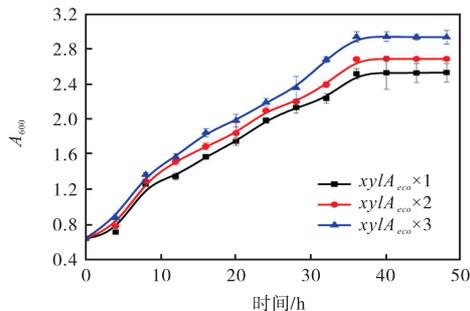


图 4 在谷氨酸棒杆菌基因组上分别整合 1、2 和 3 拷贝 *xyIAeco* 菌株的生长曲线

Fig. 4 Growth curves of *C. glutamicum* ATCC13032 with 1, 2 or 3 copies of *xyIAeco* integrated in its genome

随着 *xyIAeco* 整合拷贝数的增加, 菌株利用木糖生长的生物量逐步提高, XI 的酶活力与谷氨酸棒杆菌代谢木糖的能力呈正相关. 然而, 3 拷贝菌株培养结束时 A_{600} 值为 2.93, 与质粒过表达 *xyIAeco* 菌株相差较大. 这说明 *xyIAeco* 基因组整合的拷贝数还不够.

2.4 基因组整合和质粒表达 *xyIAeco* 菌株消耗木糖的对比

为了更好地对比 3 拷贝基因组整合与质粒过表达 *xyIAeco* 对谷氨酸棒杆菌利用木糖的差异, 测定了两株菌培养过程中木糖的消耗 (图 5). 由图 5 可知, 与菌体生长情况相吻合, 3 拷贝整合菌株木糖消耗速率要低于过表达菌株. 尽管如此, 还是成功构建了不含质粒的木糖代谢工程菌株, 为今后开发利用木糖生产有用的化学品奠定了基础.

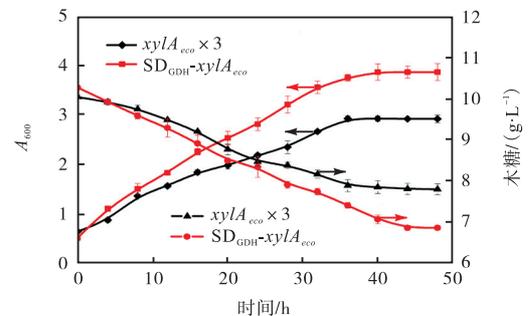


图 5 *xyIAeco* 3 拷贝整合和质粒过表达菌株利用木糖生长和耗糖曲线

Fig. 5 Curves of bacterial growth and xylose consumption by *C. glutamicum* ATCC13032 *xyIAeco*×3 and *C. glutamicum* ATCC13032/pXMJ19-SD_{GDH}-*xyIAeco*

另外, 也测试了工程菌株在葡萄糖和木糖混合碳源培养基上的生长和耗糖情况, 结果表明, 当葡萄糖存在时木糖几乎不被消耗. 而单独利用木糖时, 由于绕过了 HMP 途径产还原力的氧化阶段, 预期不会取得良好的发酵效果^[18]. 关于葡萄糖和木糖共利用的代谢特性和实际应用意义, 在综述文章中已经进行了阐述^[19]. 目前正致力于通过基因工程手段构建可以同步利用两种糖的谷氨酸棒杆菌工程菌株.

3 结论

在谷氨酸棒杆菌中过表达大肠杆菌、枯草芽胞杆菌和野油菜黄单胞菌来源的木糖异构酶编码基因 *xyIA*, 成功构建了木糖代谢途径, 其中大肠杆菌来源木糖异构酶的菌株利用木糖生长能力最强. 通过在 pXMJ19 质粒 *tac* 启动子上添加谷氨酸棒杆菌内源谷氨酸脱氢酶的 SD 序列及周边碱基, 提高木糖异构酶

的翻译效率,菌株利用木糖的生物量提高到出发菌的2.7倍。同时通过多拷贝基因组整合 *xyIA* 构建了无质粒木糖代谢菌株,但其木糖消耗和菌体生长能力低于质粒过表达菌株。由于木糖异构酶活性的高低是决定木糖代谢水平的关键因素,今后还需要优化 *xyIA* 表达的启动子及 SD 序列,同时利用新的基因组编辑技术实现更多拷贝数的基因整合,构建更加高效的谷氨酸棒杆菌木糖代谢工程菌株。

参考文献:

- [1] 徐勇,王荣,朱均均,等. 木糖高效生物转化的新出路[J]. 中国生物工程杂志,2012,32(5):113-119.
- [2] Villarreal M L M, Prata A M R, Felipe M G A, et al. Detoxification procedures of eucalyptus hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 40(1):17-24.
- [3] Krämer M, Bongaerts J, Bovenberg R, et al. Metabolic engineering for microbial production of shikimic acid[J]. Metabolic Engineering, 2003, 5(4):277-283.
- [4] Li K, Frost J. Microbial synthesis of 3-dehydroshikimic acid: A comparative analysis of *D*-xylose, *L*-arabinose, and *D*-glucose carbon sources[J]. Biotechnology Progress, 2008, 15(5):876-883.
- [5] Becker J, Wittmann C. Bio-based production of chemicals, materials and fuels-*Corynebacterium glutamicum* as versatile cell factory[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2012, 23(4):631-640.
- [6] Becker J, Wittmann C. Systems and synthetic metabolic engineering for amino acid production-the heartbeat of industrial strain development[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2012, 23(5):718-726.
- [7] Kawaguchi H, Vertès A A, Okino S, et al. Engineering of a xylose metabolic pathway in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(5):3418-3428.
- [8] Gopinath V, Meiswinkel T M, Wendisch V F, et al. Amino acid production from rice straw and wheat bran hydrolysates by recombinant pentose-utilizing *Corynebacterium glutamicum*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 92(5):985-996.
- [9] Wang C, Zhang H L, Cai H, et al. Succinic acid production from corn cob hydrolysates by genetically engineered *Corynebacterium glutamicum*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 172(1):340-350.
- [10] Zhang Z G, Chen H Z. Fermentation performance and structure characteristics of xanthan produced by *Xanthomonas campestris* with a glucose/xylose mixture[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010, 160(6):1653-1663.
- [11] 叶菁. 木糖异构酶基因 *xyIA* 在谷氨酸棒杆菌中的克隆与表达研究[D]. 武汉:华中科技大学,2013.
- [12] Shen Y, Chen X, Peng B Y, et al. An efficient xylose-fermenting recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain obtained through adaptive evolution and its global transcription profile[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 96(4):1079-1091.
- [13] Zhou H, Cheng J S, Wang B L, et al. Xylose isomerase overexpression along with engineering of the pentose phosphate pathway and evolutionary engineering enable rapid xylose utilization and ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Metabolic Engineering, 2012, 14(6):611-622.
- [14] Demeke M M, Dietz H, Li Y Y, et al. Development of a *D*-xylose fermenting and inhibitor tolerant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain with high performance in lignocellulose hydrolysates using metabolic and evolutionary engineering[J]. Biotechnology for Biofuels, 2013, 6(1):89.
- [15] Hsiao H Y, Chiang L C, Chen L F, et al. Effects of borate on isomerization and yeast fermentation of high xylose solution and acid hydrolysate of hemicellulose[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1982, 4:25-31.
- [16] Lou C B, Stanton B, Chen Y J, et al. Ribozyme-based insulator parts buffer synthetic circuits from genetic context[J]. Nature Biotechnology, 2012, 30(11):1137-1142.
- [17] Brinkrolf K, Brune I, Tauch A. The transcriptional regulatory network of the amino acid producer *Corynebacterium glutamicum*[J]. Journal of Biotechnology, 2007, 129(2):191-211.
- [18] Buschke N, Becker J, Schäfer R, et al. Systems metabolic engineering of xylose-utilizing *Corynebacterium glutamicum* for production of 1,5-diaminopentane[J]. Biotechnology Journal, 2003, 8(5):557-570.
- [19] 李燕军,赵岩,黄龙辉,等. 微生物同步利用葡萄糖和木糖代谢工程概述[J]. 发酵科技通讯,2017,46(1):54-59.