

DOI: 10.13364/j.issn.1672-6510.20230143

数字出版日期: 2024-04-17; 数字出版网址: <http://link.cnki.net/urlid/12.1355.N.20240416.1630.002>

大肠杆菌 GalP-GIK 途径功能分析

李 文¹, 王彩喆¹, 牟林云^{2,3}, 王正祥^{1,2}

(1. 天津科技大学化工与材料学院, 天津 300457; 2. 天津市工业微生物重点实验室, 天津 300457;
3. 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘 要: 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 主要经磷酸转移酶系统 (phosphotransferase system, PTS) 完成葡萄糖的底物水平磷酸化, 启动葡萄糖代谢。为了拓展大肠杆菌的葡萄糖转运代谢能力, 在删除大肠杆菌 PTS 系统的基础上, 通过对半乳糖转运蛋白 (GalP) 与葡萄糖激酶 (GIK) 的过量表达搭建不依赖 PTS 系统的 GalP-GIK 葡萄糖转运途径, 研究并探索大肠杆菌葡萄糖代谢的启动新方式及其效率, 并考察其生理代谢的变化。通过基因重组技术删除大肠杆菌 B0013-025 基因组中 *ptsHI-crr*、*ptsG* 及 *mlc* 基因, 获得了突变株 025P。此突变株在以葡萄糖为唯一碳源的培养基中几乎不生长, PTS 系统被破坏后, 葡萄糖转运能力出现了严重缺失。进一步利用启动子 *gap* 增强 *galP* 与 *glk* 的表达, 所获得的重组菌株 025PG 恢复了经氧化磷酸化启动葡萄糖代谢的能力。强化 GalP-GIK 途径不仅可以启动葡萄糖代谢, 还可以启动半乳糖与阿拉伯糖代谢, 代谢强弱排序为葡萄糖 ($\mu = 0.31 \text{ h}^{-1}$) > 半乳糖 ($\mu = 0.27 \text{ h}^{-1}$) > 阿拉伯糖 ($\mu = 0.21 \text{ h}^{-1}$) > 果糖 = 木糖 ($\mu = 0.01 \text{ h}^{-1}$)。因此, 不依赖 PTS 系统的大肠杆菌菌株 025PG 在强化 GalP-GIK 途径后能够重新代谢葡萄糖, 此结果为后续相关工业菌株的遗传选育提供了理论基础。

关键词: 大肠杆菌; 半乳糖转运蛋白; 葡萄糖激酶; PTS 系统; 糖类转运代谢

中图分类号: Q936

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510 (2024) 04-0039-07

Functional Analysis of GalP-GIK Pathway in *Escherichia coli*

LI Wen¹, WANG Caizhe¹, MOU Linyun^{2,3}, WANG Zhengxiang^{1,2}

(1. College of Chemical Engineering and Materials Science, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China; 2. Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, Tianjin 300457, China;
3. College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The metabolic pathway of glucose in *Escherichia coli* is mainly initialized through a phosphotransferase system (PTS) for substrate level phosphorylation of glucose. In order to expand the ability of glucose transport and metabolism in *E. coli*, a PTS-independent glucose transport pathway (GalP-GIK) was established through the overexpression of galactose transporter (GalP) and glucokinase (GIK) on the basis of deleting the PTS system of *E. coli*. The new initiation mode and efficiency of glucose metabolism of *E. coli* were investigated, and the changes of physiological metabolism were further explored. Mutant strain 025P was obtained by deleting *ptsHI-crr*, *ptsG* and *mlc* genes from *E. coli* B0013-025 genome by gene recombinant technology. The mutant strain 025P grew hardly in the medium with glucose as the only carbon source, indicating a significant loss of glucose transport capacity after the destruction of PTS system. The expression of *galP* and *glk* was further enhanced by promoter *gap*, and the ability to initiate glucose metabolism by oxidative phosphorylation of the recombinant strain 025PG was restored. Strengthening the GalP-GIK pathway could not only initiate glucose metabolism, but also galactose and arabinose metabolism. The order of metabolic strength was glucose ($\mu = 0.31 \text{ h}^{-1}$) > galactose ($\mu = 0.27 \text{ h}^{-1}$) > arabinose ($\mu = 0.21 \text{ h}^{-1}$) > fructose = xylose ($\mu = 0.01 \text{ h}^{-1}$). In conclusion, the PTS-independent strain 025PG was

收稿日期: 2023-07-23; 修回日期: 2023-10-30

基金项目: 天津市杰出人才计划项目 (JC20200309)

作者简介: 李 文 (1999—), 女, 河北石家庄人, 硕士研究生; 通信作者: 王正祥, 教授, zxwang0519@tust.edu.cn

able to re-metabolize glucose after overexpression of GalP-GIK pathway, which has provided a theoretical basis for the subsequent genetic selection of related industrial strains.

Key words: *Escherichia coli*; galactose transporter; glucokinase; PTS system; carbohydrate transport and metabolism

引文格式:

李文,王彩喆,牟林云,等. 大肠杆菌 GalP-GIK 途径功能分析[J]. 天津科技大学学报, 2024, 39(4): 39–45.

LI W, WANG C Z, MOU L Y, et al. Functional analysis of GalP-GIK pathway in *Escherichia coli* [J]. Journal of Tianjin university of science & technology, 2024, 39(4): 39–45.

葡萄糖是自然界中含量最为丰富的单糖,是淀粉、纤维素等多糖的基本组成单位,也是生物制造业的主要碳源,可通过微生物代谢(发酵)规模化工业生产多种重要产品,如氨基酸、维生素、有机酸等。因此,微生物菌种的葡萄糖代谢效率与代谢方式对发酵工业产品的种类以及生产效率起到决定性作用。

大肠杆菌(*Escherichia coli*)是自然界中分布广泛的革兰氏阴性兼性厌氧菌。经过遗传修饰与代谢重建,大肠杆菌已应用于多种重要工业产品的规模化生产,发展成为工业育种的基本出发菌株或底盘微生物^[1-2]。磷酸转移酶系统(phosphotransferase system, PTS)是大肠杆菌在自然状态下转运并代谢葡萄糖的主要途径,该系统由 EI、HPr、EIICB^{Glc}(由 *ptsHI-crr* 编码)和复合体 EIICB^{Glc}(由 *ptsG* 编码)这 4 个转运蛋白构成^[3-4],参与并维持细胞的生理活动与代谢。甘露糖-PTS 也参与葡萄糖的运输^[3, 5],已有研究表明该途径受到 *mlc* 基因的转录阻遏^[6-7]。大肠杆菌通过 PTS 转运葡萄糖,会消耗糖酵解途径关键中间产物磷酸烯醇式丙酮酸(PEP),直接影响糖酵解途径效率和后续代谢流分布。因此,重建大肠杆菌的葡萄糖转运代谢途径,改变其转运方式,对提高若干好氧代谢产物的合成效率可能具有重要意义。

大肠杆菌在缺乏 PTS 的情况下,细胞可以通过半乳糖转运蛋白(GalP)恢复糖的运输。Flores 等^[8]在大肠杆菌 JM101 中使 PTS 失活获得突变体 PTS⁻Glc⁻;为获得生长速度快的进化菌株 PTS⁻Glc⁺,对 PTS⁻突变体进行连续培养,分离回复突变体,其生长速度与利用葡萄糖为碳源的野生型菌株相似。这些回复突变体运输葡萄糖依赖于半乳糖转运体 GalP(由 *galP* 编码),而葡萄糖磷酸化则由葡萄糖激酶 GIK(由 *glk* 编码)完成^[9-11]。但是,大肠杆菌能否利用 GalP-GIK 途径有效启动葡萄糖及其他单糖的代谢尚不清楚。因此,本研究在删除大肠杆菌 PTS 相关基因的基础上,尝试增强 GalP-GIK 途径的表达,考察大肠杆菌的葡萄糖转运代谢效率的变化,并初步评价其对其他单糖的转运代谢效率的变化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒与引物

菌株、质粒和引物详细信息见表 1。大肠杆菌(*E. coli*)JM109 是用于分子克隆与重组质粒构建的宿主细胞,菌株 *E. coli* B0013 为早期分离保藏的野生菌株^[12],其衍生菌株已在乳酸单体^[13]、燃料乙醇^[14]等研究中得到应用。出发菌株 *E. coli* 025 来自课题组前期研究构建的菌株,其编码乙酸、乳酸和甲酸合成酶的关键基因被删除^[15]。质粒 pKD46^[16]、pSKsym^[17]、pSK-EcdifGm^[18]及 pMD-T-*ptsG*: : *difGm*^[15]为本研究室前期构建并保存。*E. coli* 025P、*E. coli* 025PG 菌株以及质粒 pGLUpkg 为本研究构建。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司经化学法合成获得。

1.1.2 主要试剂与仪器

DNA 限制性内切酶,大连 Takara 公司;T4 DNA 连接酶、DNA ladder marker,上海 Thermo Scientific 公司;质粒提取试剂盒,广州飞扬生物工程有限公司;氨苄青霉素(Amp)、庆大霉素(Gm)和 L-阿拉伯糖,生工生物工程(上海)股份有限公司,酵母浸膏、胰蛋白胨,英国 Oxoid 公司;其他试剂均为分析纯试剂。

L96 型基因扩增仪,杭州朗基科学仪器有限公司;ECM 399 型电击转化仪,美国 BTX 公司。

1.1.3 培养基

菌株培养的常规培养基为 LB 培养基^[12],必要时向培养基中添加 100 μg/mL Amp 或 30 μg/mL Gm。菌株选择性培养基用于考察菌株对不同单糖的利用情况,选用改良 M9 培养基^[12,19],添加葡萄糖、半乳糖、果糖、木糖或阿拉伯糖使其终质量浓度为 5 g/L。

1.2 方法

1.2.1 目的基因删除

质粒的提取、酶切、转化及转化子筛选等参照文献[20]方法进行。利用 Red 和 Xer 同源重组技术^[18],

对大肠杆菌葡萄糖代谢相关基因 *ptsHI-crr*、*ptsG* 和 *mlc* 进行删除。

表 1 菌株、质粒和引物
Tab. 1 Strains, plasmids and primers

材料	相关特性	来源
菌株	<i>E. coli</i> JM109	克隆宿主
	<i>E. coli</i> B0013	野生菌株
	<i>E. coli</i> 025	B0013 缺失 <i>ackA-pta</i> 、 <i>ldhA</i> 、 <i>pflB</i> 基因
	<i>E. coli</i> 025P	025 缺失 <i>ptsHI-crr</i> 、 <i>ptsG</i> 、 <i>mlc</i> 基因
	<i>E. coli</i> 025PG	025P 带有 pGLUpkg 质粒
质粒	pKD46	Ap ^r ， γ - β - <i>exo</i> (Red 重组系统)，温度控制复制子
	pSKsym	Ap ^r ，克隆质粒
	pSK- <i>Ecdif</i> Gm	Ap ^r ，Gm ^r ， <i>dif</i> -Gm- <i>dif</i> 突变盒
	pMD-T- <i>ptsG</i> :: <i>dif</i> Gm	Gm ^r ， <i>ptsG</i> :: <i>dif</i> Gm 突变盒
	pGLUpkg	Ap ^r ，pSK-P _{gap} -glk-GalP，P _{gap} -glk-GalP 片段
引物	Dio-PTS1	GTTGGGACTGGCGGTACG
	Dio-PTS2	TGACCTTCTTCAGCAATACGC
	TPS-UpF	AAGGCACCAAAGGCAAGAC
	TPS-UpR	GATATCTAACGCTCACCCGATGATG
	TPS-DnF	CATCATCGGGTGAGCGTTAGATATCTTGCTCAACCGACAACG
	TPS-DnR	AGTTCAACGCCGCTATCAG
	Gap-1F	GCAGTAAACGACCCGTAAATG
	Gap-1R	CTTTGTCATATATTCCTACCAGCTATTGTAGTG
	Glk-1F	CACTAACAATAGCTGGTAGGAATATATGACAAAGTATGCATTAGTCGG
	Glk-1R	TTTCCTGTCTCCGCATTACAGAATGTGACCTAAGGTCTGG
	GalP-1F	CATTCTGTAATGCGGAGACAGGAAAATGCCTGACGCTAAAAACAGG
	GalP-1R	ATGGCGATAG GGAGACGGGA
	Mlc-Up1	AAGAGGATGCGGTTTCTG
	Mlc-Up2	TAGTGATACTGGCAGGAGCC
	Mlc-Dn1	GGCTCCTGCCAGTATCACTAGATATCTCTCAGACAGCATCCGTCAG
	Mlc-Dn2	TGGGAGGCTAACGCTTGTAAG
	Mlc-D1	CGATTGCTGAAGAGGATGC
	Mlc-D2	TTCGGGTGTCTCTTTGCTC
	PtsG1	TCGGTAAATCGCTGATGCTG
	PtsG2	GTAATACATGCGTCGAGGTTAG
	YptsG1	AATGTGCAACTTCTCCAATG
	YptsG2	GCTACCAGGTGACGAAAAAC

以 *E. coli* B0013 基因组为模板，通过 PCR 扩增出目的基因上下游片段，经重叠 PCR 制备融合片段；将该片段克隆入质粒 pSKsym 的 *Sma*I 位点，获得重组质粒；经 *Eco*RV 酶切后与 *dif*Gm 片段连接，获得带有突变盒片段的重组质粒，并以此为模板，PCR 扩增出突变盒 *ptsHI-crr*::*dif*Gm、*mlc*::*dif*Gm。以本课题组前期构建的质粒 pMD-T-*ptsG*::*dif*Gm^[15]为模板，PCR 扩增出突变盒 *ptsG*::*dif*Gm。将突变盒电击转化至含有辅助质粒 pKD46 的目标菌株中，选择阳性

转化子进行传代培养丢失抗性基因，最后通过菌落 DNA 的 PCR 结果验证目的基因突变菌株，所用引物见表 1。

1.2.2 表达质粒构建与转化

以大肠杆菌 B0013 基因组为模板，通过 PCR 扩增出 P_{gap}-*glk* 及 *galP* 片段，经重叠 PCR 制备融合片段 P_{gap}-glk-galP，并克隆入质粒 pSKsym 的 *Sma*I 位点，获得重组表达质粒 pGLUpkg；将该表达质粒经电转化^[20]至 PTS 基因删除菌株，通过含氨苄抗性平板

筛选重组菌株。

1.2.3 菌株培养

从 LB 平板挑取单菌落接种至 50 mL LB 液体培养基(250 mL 三角瓶), 37 °C、200 r/min 培养 12 h; 6 000 r/min 离心 5 min, 收集菌体, 用 M9 培养基洗涤并重悬后, 接种至含 5 g/L 单糖的 50 mL M9 培养基(250 mL 三角瓶), 保证接种后的初始生物量对应 600 nm 处吸光度 $A_{600} = 0.1$, 每 2 h 取样测定其生物量(A_{600})。

菌株传代培养: 在以上菌株培养的基础上, 每隔 12 h, 取适量菌悬液转接至添加 5 g/L 葡萄糖的 50 mL 新鲜 M9 培养基中, 保证接种后的初始生物量为 0.1, 每 2 h 取样测定 A_{600} , 最终选取生长速度快的传代菌株重新进行生长监测。

1.2.4 分析方法

采用 UV-1200 型分光光度计测定供试品在 600 nm 处的吸光度(A)监控培养过程中的生物量变化, A_{600} 为测试值与稀释倍数的乘积。以时间(t)为横坐标、 $\log_2 A$ 为纵坐标绘制生长曲线, 确定指数生长范围, 菌株倍增时间(t_d)、比生长速率(μ)分别按照式(1)和式(2)计算。

$$t_d = \frac{t_j - t_i}{\log_2(A_j/A_i)} \quad (1)$$

$$\mu = 1/t_d \quad (2)$$

式中: t_d 为倍增时间, h; μ 为比生长速率, h^{-1} ; t_j 为 j 时刻菌体生长时间, h; t_i 为 i 时刻菌体生长时间, h; A_j 为 j 时刻菌体吸光度; A_i 为 i 时刻菌体吸光度; 其中 $A_j = 2A_i$ 。

通过查询 NCBI(美国国立生物技术信息中心)信息库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)获得大肠杆菌基因组信息。

2 结果与分析

2.1 PTS 删除后 GalP-GIK 途径的功能验证

为了验证 GalP-GIK 途径的功能, 以 *E. coli* 025 为出发菌株, 删除其 PTS。首先对大肠杆菌 K-12 基因组进行分析, 其 GalP、GIK 编码基因分别为 *galP* 和 *glk*, 长度分别为 1 395 bp 和 966 bp(图 1)。

利用无痕基因删除技术, 将突变盒 *ptsHI-crr::difGm*、*ptsG::difGm* 和 *mle::difGm* 依次电击转化入 *E. coli* 025 中, 筛选在庆大霉素抗性平板上生长的转化子, 并传代丢失抗性基因, 采用验证引物对突变

株进行菌落 PCR 鉴定, 凝胶电泳结果如图 2 所示。*ptsHI-crr* 突变株条带大小为 800 bp(出发菌株为 3 600 bp); *mle* 突变株条带大小为 800 bp(出发菌株为 1 700 bp); *ptsG* 突变株条带大小为 1 100 bp(出发菌株为 1 800 bp)。由此可知, 出发菌株染色体中的目的基因被删除, 成功构建突变株 025($\Delta ptsHI-crr \Delta ptsG \Delta mle$), 重新命名为 *E. coli* 025P。

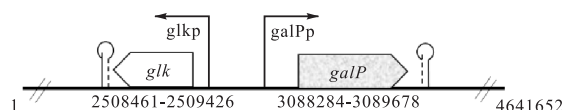
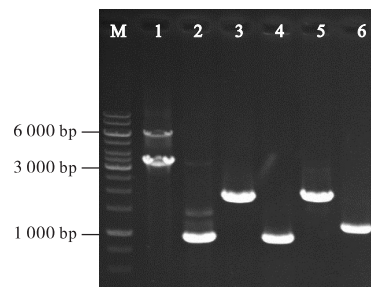


图 1 *E. coli* 中 GalP-GIK 途径编码基因

Fig. 1 Map of genes encoding GalP-GIK in *E. coli*



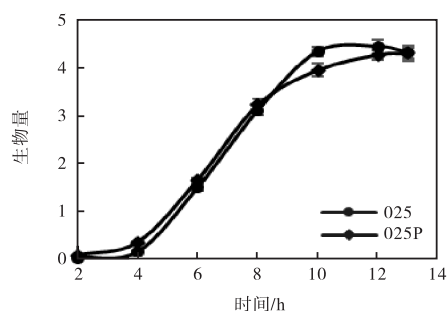
M. DNA ladder marker; 1 和 2. *ptsHI-crr* 基因删除前后验证产物; 3 和 4. *mle* 基因删除前后验证产物; 5 和 6. *ptsG* 基因删除前后验证产物。

图 2 突变株 *E. coli* 025P 的 PCR 鉴定结果

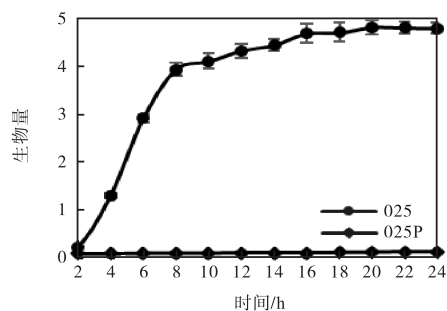
Fig. 2 Identification of mutant strain *E. coli* 025P by PCR amplification

分别在 LB 培养基和以不同单糖为唯一碳源的 M9 培养基中进行突变株的培养并绘制生长曲线, 生物量以 600 nm 处吸光度表示。突变株 *E. coli* 025P 与出发菌株 *E. coli* 025 的生长情况比较如图 3 所示。与出发菌株 *E. coli* 025 相比, 突变株 *E. coli* 025P 在 LB 培养基中的生长状况变化不大; 在 M9 培养基中, *E. coli* 025P 利用葡萄糖几乎不生长, 培养至 24 h 时, 生物量由 0.10 增加至 0.14, 比生长速率降低约 97.7%。

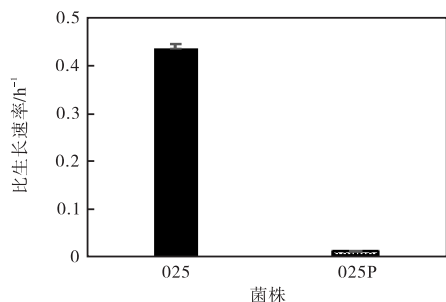
GalP 属于一种低亲和力的半乳糖与 H^+ 共转运体^[21]。突变株 *E. coli* 025P 能够在含半乳糖的 M9 培养基中微弱生长, 培养 24 h 时 A_{600} 为 0.54(图 4), 说明 GalP-GIK 途径存在于大肠杆菌中, 并且在自然状态下转运效率低。突变株 *E. coli* 025P 几乎不能代谢葡萄糖, 可能是由于突变株 *E. coli* 025P 中该途径不具有代谢功能, 或者是基因表达剂量较小, 功能较弱, 不足以支撑葡萄糖转运代谢。因此, 需进一步确认 GalP-GIK 途径是否具备功能以及经过表达后是否会提高其代谢葡萄糖的能力。



(a) 在 LB 培养基中的好氧生长



(b) 在 M9 葡萄糖培养基中的好氧生长



(c) 在 M9 葡萄糖培养基中的比生长速率

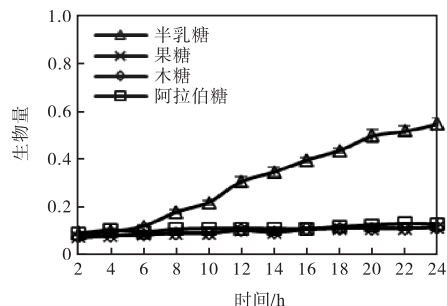
图 3 突变株 *E. coli* 025P 与出发菌株 *E. coli* 025 的生长情况比较Fig. 3 Growth difference between mutant strain *E. coli* 025P and parent strain *E. coli* 025

图 4 突变株 025P 利用不同单糖的生长情况

Fig. 4 Growth properties of mutant strain 025P on different sugars

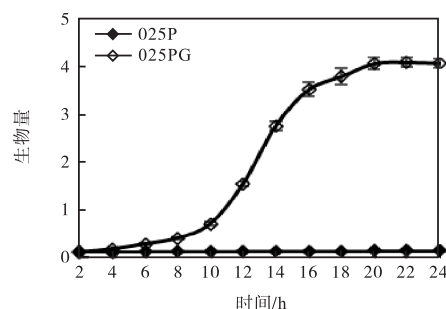
2.2 强化 GalP-Glk 途径可启动葡萄糖代谢

2.2.1 通过过表达 *galP* 与 *glk* 获得的重组菌能够代谢葡萄糖

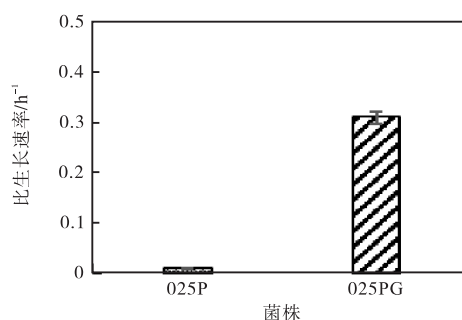
以 *E. coli* B0013 基因组为模板, 通过 PCR 扩增

与体外拼接, 获得 P_{gap} -*glk*-*galP* 片段 (2 900 bp), 克隆入载体质粒 pSKsym, 成功构建重组表达质粒 pGLUpkg。将该质粒电击转化至突变株 *E. coli* 025P, 筛选在氨苄抗性平板上生长的转化子, 获得重组菌 025P/pGLUpkg, 命名为 *E. coli* 025PG。将此菌株在以葡萄糖为唯一碳源的培养基中生长并获得其生长曲线。

重组菌 *E. coli* 025PG 恢复了对葡萄糖的代谢能力, 其在以葡萄糖为唯一碳源的 M9 培养基中的比生长速率为 0.31 h^{-1} [图 5(b)], 相较于对照菌株 *E. coli* 025P ($\mu = 0.01 \text{ h}^{-1}$) 提高了 30 倍, 最大生物量为 4.09 [图 5(a)]。以上结果表明, *E. coli* 025 在主要的代谢系统 PTS 缺失后, 不具备促进葡萄糖代谢的功能, 经重组表达质粒 pGLUpkg 介导表达后, 菌株才启动了 GalP-Glk 途径对葡萄糖进行代谢。可见, 过表达 *galP* 与 *glk* 是本研究中所使用的 *E. coli* 025 菌株中 GalP-Glk 代谢途径启动的必要条件。



(a) 在 M9 葡萄糖培养基中的好氧生长



(b) 在 M9 葡萄糖培养基中的比生长速率

图 5 重组菌株 *E. coli* 025PG 与突变株 *E. coli* 025P 的生长情况比较Fig. 5 Growth difference between recombinant strain *E. coli* 025PG and mutant strain *E. coli* 025P

2.2.2 重组菌经生理适应性传代基本恢复葡萄糖代谢

与 PTS 相比, 维持细胞生长的 GalP-Glk 途径仍存在转运葡萄糖水平较低的问题。传代菌株 *E. coli* 025PG、重组菌株 *E. coli* 025PG 与出发菌株 *E. coli*

025 的生长情况比较如图 6 所示。相较于原始菌株 *E. coli* 025, 重组菌 *E. coli* 025PG 的生长延滞期约 10 h, 最终生长所能达到的最大生物量由 4.81 降低到 4.09, 降低了 15.0%, 生长缓慢的缺点制约了其作为工业菌株发酵代谢产物的可能性。将重组菌 *E. coli* 025PG 在含葡萄糖的 M9 培养基中进行生理适应性传代, 经传代培养 14 次后, 其生长延滞期较原始菌株 *E. coli* 025 缩短近 5 h, 比生长速率则由重组菌 *E. coli* 025PG 的 0.31 h^{-1} 提升至 0.35 h^{-1} , 达到原始菌株 *E. coli* 025 利用 PTS 进行细胞增殖的 81.4%。

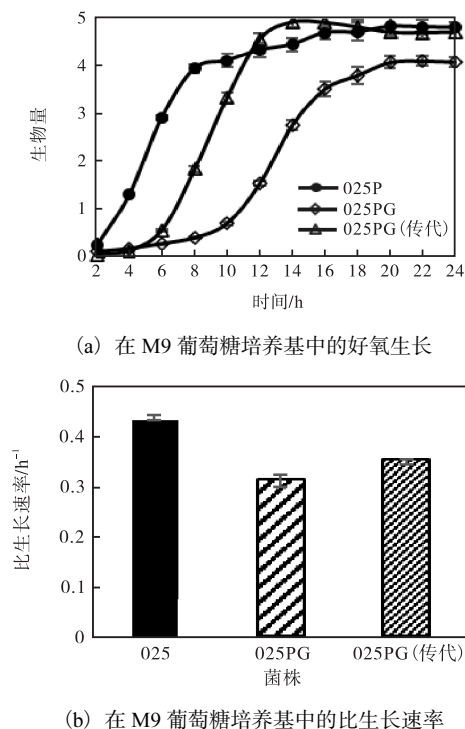


图 6 传代菌株 *E. coli* 025PG、重组菌株 *E. coli* 025PG 与出发菌株 *E. coli* 025 的生长情况比较

Fig. 6 Growth difference between passage strain *E. coli* 025PG, recombinant strain *E. coli* 025PG and parent strain *E. coli* 025

2.3 GalP-GIK 途径可启动多种单糖代谢

根据大肠杆菌转运方式的不同, 糖类可分为依赖 PTS 型与不依赖 PTS 型。果糖与葡萄糖相似, 同样依赖于由 EI、HPr、EIIA^{Fru} (*fruA* 编码) 以及 EIIBC^{Fru} (*fruB* 编码) 组成的果糖-PTS, 进入胞内形成果糖-1-磷酸^[10]。半乳糖、木糖及阿拉伯糖属于不依赖 PTS 型糖, 半乳糖可由高亲和力半乳糖转运蛋白 MglBAC 与低亲和力 GalP 转运至胞内^[22]; 木糖主要经 XylFGH 复合蛋白转运进入细胞, 先后由木糖异构酶 XylA 和木酮糖激酶 XylB 催化形成木酮糖-5-磷酸^[23]; 阿拉伯糖与木糖类似, 经 AraFGH 复合蛋白进

入胞内, 由阿拉伯糖异构酶 AraA、核酮糖激酶 AraB 与核酮糖-5-磷酸差向异构酶 AraD 依次催化形成木酮糖-5-磷酸^[24]。本研究原始菌株 *E. coli* 025 能够正常代谢这 4 种单糖〔图 7(a)〕, 在删除 PTS 彻底阻断葡萄糖与果糖的运输后, 理论上来说并不影响半乳糖、木糖及阿拉伯糖的代谢, 但观察突变株 *E. coli* 025P 利用不同单糖的生长情况, PTS 的缺失对这 3 种单糖的代谢造成了严重的影响, 使菌株只能在含半乳糖的 M9 培养基中微弱生长。本课题组前期研究^[25]发现, 菌株 *E. coli* B0013 由于自身木糖运输蛋白 XylFGH 的编码基因 *xylH* 发生无义突变, 导致其木糖代谢受到影响。突变株 *E. coli* 025P 几乎不能代谢阿拉伯糖的原因暂不清楚, 需进一步在后期研究中加以分析。

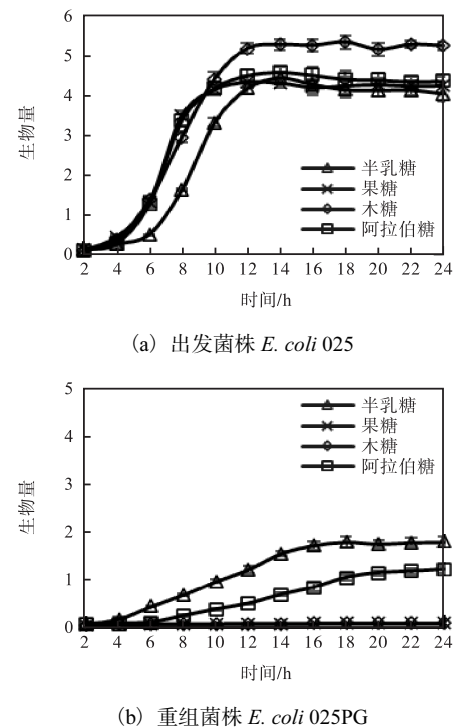


图 7 出发菌株 *E. coli* 025 与重组菌株 *E. coli* 025PG 利用不同单糖的生长情况

Fig. 7 Growth properties of parent strain *E. coli* 025 and recombinant strain *E. coli* 025PG on different sugars

增强 GalP-GIK 途径的重组菌株 *E. coli* 025PG 能够在含半乳糖与阿拉伯糖的 M9 培养基中生长, 在培养至 24 h 时 A_{600} 分别为 1.80 和 1.23, 比生长速率分别为 0.27 h^{-1} 和 0.21 h^{-1} 〔图 7(b)〕, 这表明 GalP-GIK 途径不仅能够启动葡萄糖代谢, 还能启动半乳糖与阿拉伯糖代谢, 对果糖与木糖不起作用, 并且发现该途径对于不同单糖的运输效率不同, 代谢单糖强弱

程度排序: 葡萄糖 ($\mu = 0.31 \text{ h}^{-1}$) > 半乳糖 ($\mu = 0.27 \text{ h}^{-1}$) > 阿拉伯糖 ($\mu = 0.21 \text{ h}^{-1}$) > 果糖 = 木糖 ($\mu = 0.01 \text{ h}^{-1}$)。

3 结 语

葡萄糖是微生物代谢的首选碳源, 本研究利用基因重组与表达技术对大肠杆菌中两种不同的葡萄糖转运代谢途径进行了代谢重建, 成功启动了 GalP-GIK 代谢途径, 构建了不依赖于 PTS 的重组菌株 *E. coli* 025PG, 该代谢途径可以启动大肠杆菌对葡萄糖的利用以保证细胞的正常生长, 并且在 5 种不同单糖的运输过程中, 对葡萄糖的代谢效率最快。重组菌株 *E. coli* 025PG 的生理代谢方式发生变化, 为了解大肠杆菌糖类跨膜转运机制及提升糖类的生物转化效率提供了参考, 同时对后续更高产量目标产物的规模化工业生产具有重要应用价值。

参考文献:

- [1] CHEN X Z, ZHOU L, TIAN K M, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli*: a sustainable industrial platform for bio-based chemical production[J]. *Biotechnology advances*, 2013, 31 (8) : 1200–1223.
- [2] 王正祥. 我国聚乳酸产业发展现状与对策研究[J]. *中国工程科学*, 2021, 23 (6) : 155–166.
- [3] ALMA A, ANDREA S R, ADELFO E, et al. New insights into transport capability of sugars and its impact on growth from novel mutants of *Escherichia coli*[J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2020, 104 (4) : 1463–1479.
- [4] 刘倩钰, 吴丽雯, 牛建军, 等. 细菌磷酸转移酶系统 (PTS) 的组成与功能研究进展[J]. *微生物学通报*, 2020, 47 (7) : 2266–2277.
- [5] JECKELMANN J M, ERNI B. The mannose phosphotransferase system (Man-PTS): mannose transporter and receptor for bacteriocins and bacteriophages[J]. *Biochimica et biophysica acta-biomembranes*, 2020, 1862 (11) : 183412.
- [6] KIM H J, JEONG H, LEE S J. Short-term adaptation modulates anaerobic metabolic flux to succinate by activating *exuT*, a novel *D*-glucose transporter in *Escherichia coli*[J]. *Frontiers in microbiology*, 2020, 11 (27) : 1–10.
- [7] PAN Q, LI Z J, JU X, et al. *Escherichia coli* segments its controls on carbon-dependent gene expression into global and specific regulations[J]. *Microbial biotechnology*, 2021, 14 (3) : 1084–1106.
- [8] FLORES N, FLORES S, ESCALANTE A, et al. Adaptation for fast growth on glucose by differential expression of central carbon metabolism and *gal* regulon genes in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system[J]. *Metabolic engineering*, 2005, 7 (2) : 70–87.
- [9] LUNIN V V, LI Y, SCHRAG J D, et al. Crystal structures of *Escherichia coli* ATP-dependent glucokinase and its complex with glucose[J]. *Journal of bacteriology*, 2004, 186 (20) : 6915–6927.
- [10] LUO Y, ZHANG T, WU H. The transport and mediation mechanisms of the common sugars in *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology advances*, 2014, 32 (5) : 905–919.
- [11] CARREON-RODRIGUEZ O E, GOSSET G, ESCALANTE A, et al. Glucose transport in *Escherichia coli*: from basics to transport engineering[J]. *Microorganisms*, 2023, 11 (6) : 1588.
- [12] ZHOU L, ZUO Z R, CHEN X Z, et al. Evaluation of genetic manipulation strategies on *D*-lactate production by *Escherichia coli*[J]. *Current microbiology*, 2011, 62 (3) : 981–989.
- [13] 张桦宇, 田康明, 赵继华, 等. 蔗糖为原料同步糖化发酵生产乳酸单体[J]. *甘蔗糖业*, 2021, 50 (4) : 77–84.
- [14] 孙金凤, 田康明, 沈微, 等. 底物选择性大肠杆菌共发酵葡萄糖和木糖产生乙醇[J]. *食品与发酵工业*, 2018, 44 (12) : 1–7.
- [15] 曹剑磊, 周丽, 张梁, 等. 产琥珀酸重组大肠杆菌的构建和发酵性能[J]. *应用与环境生物学报*, 2010, 16 (6) : 851–857.
- [16] DATSENKO K A, WANNER B L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products[J]. *Proceedings of the national academy of sciences*, 2000, 97 (12) : 6640–6645.
- [17] 周丽, 田康明, 左志锐, 等. 大肠杆菌琥珀酸和乙酸合成途径的删除及其重组菌株的 *D*-乳酸发酵[J]. *生物工程学报*, 2011, 27 (1) : 31–40.
- [18] 周丽, 牛丹丹, 李宁, 等. 基于 Red 重组系统和 Xer 重组系统的大肠杆菌多基因删除方法[J]. *微生物学通报*, 2010, 37 (6) : 923–928.
- [19] 冯静茹. 地衣芽孢杆菌蔗糖代谢途径特征分析[D]. 天津: 天津科技大学, 2022.
- [20] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物实验技术手册[M]. 北 (下转第 72 页)

- sourced dense image annotations[J]. International journal of computer vision, 2017, 123: 32–39.
- [33] HE K M, ZHANG X Y, REN S Q, et al. Deep residual learning for image recognition[C]//IEEE. Proceedings of the IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition. New York: IEEE, 2016.
- [34] WANG Y X, YANG H, QIAN X M, et al. Position focused attention network for image-text matching [EB/OL]. [2023-09-01]. <https://doi.org/10.48550/arXiv.1907.09748>.
- [35] WANG Z, LIU X, LI H, et al. CAMP: cross-modal adaptive message passing for text-image retrieval[C]//IEEE. Proceedings of the IEEE/CVF International Conference on Computer Vision. New York: IEEE, 2019: 5764–5773.
- [36] FU Z, MAO Z, SONG Y, et al. Learning semantic relationship among instances for image-text matching[C]//IEEE. Proceedings of the IEEE/CVF Conference on Computer Vision and Pattern Recognition. New York: IEEE, 2023: 15159–15168.
- [37] PAN Z, WU F, ZHANG B. Fine-grained image-text matching by cross-modal hard aligning network[C]//IEEE. Proceedings of the IEEE/CVF Conference on Computer Vision and Pattern Recognition. New York: IEEE, 2023: 19275–19284.

责任编辑: 郎婧

(上接第 45 页)

- 京: 中国轻工业出版社, 1994.
- [21] MCDONALD T P, WALMSLEY A R, HENDERSON P. Asparagine 394 in putative helix 11 of the galactose- H^+ symport protein (GalP) from *Escherichia coli* is associated with the internal binding site for cytochalasin B and sugar[J]. Journal of biological chemistry, 1997, 272(24): 15189–15199.
- [22] JECKELMANN J M, ERNI B. Transporters of glucose and other carbohydrates in bacteria[J]. Pflugers archiv: European journal of physiology, 2020, 472(9): 1129–1153.
- [23] BANARES A B, NISOLA G M, VALDEHUESA K N G, et al. Engineering of xylose metabolism in *Escherichia coli* for the production of valuable compounds[J]. Critical reviews in biotechnology, 2021, 41(5): 649–668.
- [24] DESAI T A, RAO C V. Regulation of arabinose and xylose metabolism in *Escherichia coli*[J]. Applied and environmental microbiology, 2010, 76(5): 1524–1532.
- [25] 孙金凤, 田康明, 沈微, 等. 大肠杆菌不同菌株木糖代谢差异性的遗传本质[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(10): 68–73.

责任编辑: 郎婧