

## 罗氏真养菌 W50 的 L-阿拉伯糖代谢途径工程改造

卢雪梅<sup>1,2</sup>, 刘桂明<sup>1</sup>, 王宇<sup>1</sup>, 丁久元<sup>1</sup>, 翁维琦<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>中国科学院微生物研究所, 北京 100101

<sup>2</sup>中国科学院大学, 北京 100049

**摘要:**【目的】在产聚- $\beta$ -羟基丁酸酯 (Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate, PHB) 的罗氏真养菌 (*Ralstonia eutropha*) H16 突变株 W50 中建立完整的阿拉伯糖代谢途径, 引入高亲和力阿拉伯糖转运蛋白, 获得能利用 L-阿拉伯糖的重组菌株, 为获得能高效利用纤维质降解物并积累 PHB 的工程菌株奠定基础。【方法】利用 PCR 技术扩增 *R. eutropha* H16 的 PHB 合酶启动子  $P_{phaC1}$ 、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) W3110 的阿拉伯糖代谢酶基因 *araBAD* 和高亲和力阿拉伯糖转运蛋白基因 *araFGH*。将  $P_{phaC1}$ 、*araBAD* 与表达载体 pBBR1MCS 连接, 构建带有阿拉伯糖代谢酶基因的表达式载体, 转化 *R. eutropha* W50 得到重组菌株 W50-1。利用双质粒和染色体重组两种方法将 *araFGH* 导入 W50-1 菌, 分别得到重组菌株 W50-2 和 W50-3。通过摇瓶发酵研究重组菌株 W50-1、W50-2 和 W50-3 的发酵特性。【结果】酶活分析结果表明, 阿拉伯糖代谢酶基因实现了表达。重组菌株 W50-1、W50-2 和 W50-3 均能利用 L-阿拉伯糖, 并且表达了转运蛋白基因的重组菌利用 L-阿拉伯糖的能力提高。摇瓶发酵结果表明, W50-1 可以在含 0.1 mol/L 阿拉伯糖的发酵培养基中生长, 但不能利用低浓度 (0.01 mol/L) 阿拉伯糖。W50-2、W50-3 菌株能够利用低浓度阿拉伯糖生长, 并且在含 0.1 mol/L 阿拉伯糖的培养基中, W50-3 的生物量是 W50-1 的 2.5 倍, 合成的 PHB 占菌体干重的 38.6%。【结论】在 *R. eutropha* W50 中表达阿拉伯糖代谢酶基因及转运蛋白基因, 可以使其高效利用 L-阿拉伯糖生长并积累一定水平的 PHB。

**关键词:** L-阿拉伯糖代谢, 转运蛋白, 聚- $\beta$ -羟基丁酸酯, *Ralstonia eutropha*

**中图分类号:** Q935      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2013) 12-1267-09

聚- $\beta$ -羟基丁酸酯 (PHB) 是广泛存在于微生物体内的一种储存物质, 由其制成的产品在自然环境中可以被彻底分解为  $CO_2$  和  $H_2O$ , 具有良好的生物可降解性, 可替代化工塑料以缓解能源危机、减少白色污染<sup>[1]</sup>。此外, PHB 还具有生物相容性、光学活性等特性, 使其在医药、光学等领域也具有广阔的应用前景<sup>[2]</sup>。但是, 目前 PHB 主要以粮源产品作为碳源发酵生产, 生产成本比石化基塑料高 3-4 倍, 制

约了 PHB 的大量推广应用<sup>[3]</sup>。因此, 用非粮原料生产 PHB, 对降低生产成本和可持续发展具有重大意义。

木质纤维材料是地球上最丰富且来源广泛的可再生资源。木质纤维素主要成分为纤维素、半纤维素及木质素<sup>[4]</sup>, 纤维素、半纤维素降解后的产物中含有各种己糖和戊糖及一些寡聚糖, 其中除了含量高达 60% 的葡萄糖组分之外, 以木糖和阿拉伯糖为

\* 通信作者。Tel: +86-10-64807360; E-mail: wengwq@im.ac.cn

作者简介: 卢雪梅 (1987-), 女, 山东泰安人, 硕士研究生, 专业方向为微生物生化工程。E-mail: luxuemei5678@163.com

收稿日期: 2013-04-15; 修回日期: 2013-06-07

主的戊糖含量占到了 10% - 30%，而阿拉伯糖的含量占到 1% - 5% [5]。因此，农业废料的纤维质降解液可以作为一种工业发酵的低成本原料加以利用。

天然可利用 L-阿拉伯糖的微生物主要为体内存在可转运阿拉伯糖的蛋白及降解阿拉伯糖的酶类的细菌和真菌。例如，在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中，通过较高亲和力的阿拉伯糖转运蛋白 AraFGH 及较低亲和力转运蛋白 AraE，将阿拉伯糖转运至胞内，并由阿拉伯糖操纵子 *araBAD* 编码的阿拉伯糖代谢酶系核酮糖激酶 (ribulose kinase)、阿拉伯糖异构酶 (arabinose isomerase) 和核酮糖-5-磷酸差向异构酶 (ribulose-5-phosphate epimerase) 将阿拉伯糖转变为木酮糖-5-磷酸，进入磷酸戊糖途径 [6]。

罗氏真养菌 (*Ralstonia eutropha*) H16 是用于 PHB 生产的模式菌株，其突变株 W50 能够以葡萄糖为碳源高产 PHB 或 PHBV，具有很高的工业应用价

值 [7]。然而，该菌株不具备天然利用木糖和阿拉伯糖的能力，不能完全利用纤维质降解产物进行发酵生产 PHB [8]。

在本文中，我们在 *R. eutropha* W50 中表达了来源于大肠杆菌的阿拉伯糖代谢酶基因 *araBAD* [9]，并利用双表达载体、染色体重组两种方法导入了来源于大肠杆菌的高亲和力阿拉伯糖转运蛋白基因 *araFGH* [10]，得到了可以较高效利用阿拉伯糖并积累 PHB 的工程菌株。这是在 *R. eutropha* H16 突变株 W50 中引入完整阿拉伯糖代谢途径的首次报道。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒：表 1 为本实验所用菌株和质粒。

表 1. 实验所用菌株和质粒

Table 1. Strains and plasmids in this work

Strains and plasmids	Characteristics	Source
Strains		
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 $\alpha$	$\phi$ 80d/ <i>LacZ</i> $\Delta$ M15, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i>	This lab
S17-1	<i>recA</i> , <i>proA</i> , <i>thi-1</i> , <i>chr::tra</i>	Smion R [10]
W3110	IN ( <i>rrnD-rrnE</i> ) 1 <i>rpb-1</i>	This lab
<i>Ralstonia eutropha</i>		
W50	<i>R. eutropha</i> H16 mutant	This lab
W50-1	Cm <sup>R</sup> , W50 carrying pLXM1-BAD	This study
W50-2	Cm <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup> , W50 carrying pLXM1-BAD and pLXM2	This study
W50-FGH	<i>GabD4::araFGH</i>	This study
W50-3	Cm <sup>R</sup> , <i>GabD4::araFGH</i> , carrying pLXM1-BAD	This study
Plasmids		
pMD19-T	T-vector, 2.7 kb, Amp <sup>R</sup> , <i>lacZ</i>	TaKaRa Co.
pBBR1 MCS	Cm <sup>R</sup> , <i>LacZ</i> - $\alpha$ <i>mob rep</i>	Kovach ME [12]
pBBR1 MCS-3	Tc <sup>R</sup> , <i>LacZ</i> - $\alpha$ <i>mob rep</i>	Kovach ME [12]
pJQ200mp18Tc	Tc <sup>R</sup> , <i>sacB mob</i>	Peplinski K [13]
pLXM1	Cm <sup>R</sup> , pBBR1 MCS derivative carrying the P <sub>pha C1</sub> gene	This study
pLXM1-BAD	Cm <sup>R</sup> , pLXM1 derivative carrying the <i>araBAD</i> gene	This study
pLXM2	Tc <sup>R</sup> , pBBR1 MCS-3 derivative carrying the <i>araFGH</i> gene	This study
pLXM3	Tc <sup>R</sup> , pJQ200mp18Tc derivative carrying the <i>araFGH</i> gene inserted in the <i>gabD4</i> homologous arm	This study

1.1.2 主要试剂：所有分子生物学工具酶均购自 TaKaRa 公司；核酮糖购自 Sigma 公司；其余生化药品为进口或国产分析纯试剂。

1.1.3 培养基：① LB 培养基，用于培养大肠杆菌 (*Escherichia coli*)。② PG 培养基，用于培养 W50：每升含蛋白胨 10 g，酵母粉 5 g，葡萄糖 3 g，(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 g。③ 含 10% 蔗糖的 PG 培养基，作为第二次重组

的筛选培养基；④ 发酵培养基：参考文献 [14]。另外配制 2 mol/L 的阿拉伯糖，用于配制含不同浓度阿拉伯糖的培养基。*E. coli* 在 37℃ 培养，*R. eutropha* 在 30℃ 培养。抗生素使用浓度为：氨苄青霉素 100  $\mu$ g/mL，氯霉素 50  $\mu$ g/mL，四环素 5  $\mu$ g/mL。

### 1.2 目的基因的 PCR 扩增

以 *R. eutropha* H16 基因组 DNA 为模板，用引

物 P1 和 P2 经聚合酶链式反应 (PCR) 扩增得到约 450 bp 的组成型启动子  $P_{phaC1}$  片段。以 *E. coli* W3110 基因组 DNA 为模板, 用引物 P3 和 P4 扩增得到约 4.2 kb 的阿拉伯糖操纵子结构基因 *araBAD*;

用引物 P5 和 P6 扩增得到约 4.1 kb 的带有自身诱导型启动子的阿拉伯糖转运蛋白基因 *araFGH*; 用引物 P7 和 P8 扩增得到琥珀酸半醛脱氢酶基因 *gabD4*。

表 2. 实验所用引物

Table 2. Primers in this study

Primers	Sequences (5'→3')	Size /bp	Restriction site
P1	TAAGAGCTCGTAGAGCCAGCCAATGGCCACGAT	33	<i>Sac</i> I
P2	AGATCTAGACCGGCTCCGGGATTGCCCT	29	<i>Xba</i> I
P3	ATCTAGAAGAGAGACAATCAAATCATGGCGATTGCAATTGGC	42	<i>Xba</i> I
P4	CTCCTCGAGACTTACTTACTAGTTACTGCCCCGAATATGCCTTCG	46	<i>Xho</i> I <i>Spe</i> I
P5	GGGTCTAGATTTTCATTTTGGGATGGCTCTC	34	<i>Xba</i> I
P6	GGTGAGCTCGGGAAAAACGCTAAATGTTGCGAG	34	<i>Sac</i> I
P7	ATCTAGACCCACCAGGAGAACACAC	25	<i>Xba</i> I
P8	ACTGCAGCGCAACTACCAGATCGT	25	<i>Pst</i> I

### 1.3 重组质粒的构建

用 *Sac*I 和 *Xba*I 双酶切含有  $P_{phaC1}$  的 T 载体重组质粒, 回收目的片段, 与用同样双酶切开的 pBBR1MCS 连接, 筛选得到含有  $P_{phaC1}$  的表达载体, 命名为 pLXM1。然后用 *Xba*I 和 *Xho*I 双酶切含有 *araBAD* 的 T 载体重组质粒, 回收目的基因片段, 与用同样双酶切开的 pLXM1 连接, 由此将 *araBAD* 连接到  $P_{phaC1}$  下游, 筛选得到含有  $P_{phaC1}$  启动子控制下的阿拉伯糖代谢基因 *araBAD* 的表达载体, 命名为 pLXM1-BAD。

用 *Xba* I 和 *Sac* I 双酶切含有 *araFGH* 的 T 载体重组质粒, 回收目的基因片段, 与用同样双酶切开的 pBBR1MCS-3 连接, 筛选得到含有带自身启动子的阿拉伯糖转运蛋白基因 *araFGH* 的表达载体, 命名为 pLXM2。

### 1.4 整合载体的构建

用 *Xba* I 和 *Sac* I 双酶切含有带自身诱导型启动子的 *araFGH* 的 T 载体重组质粒, 回收目的基因片段, 然后利用 T4 DNA 聚合酶将末端平滑化。将含有 *gabD4* 基因的 T 载体重组质粒用 *Sma* I 酶切, 去磷酸化, 与末端平滑化的 *araFGH* 连接, 筛选得到在同源臂中间插入有 *araFGH* 基因的重组质粒。用 *Xba* I 和 *Pst* I 双酶切此重组质粒, 回收目的片段, 与用同样双酶切开的敲除载体 pJQ200mp18Tc 连接, 热激转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 筛选得到含有 *araFGH* 的重组整合质粒, 命名为 pLXM3。

### 1.5 接合转移

将质粒 pLXM3 转化大肠杆菌 S17-1<sup>[11]</sup>, 筛选得

到 S17-1/pLXM3。将 S17-1/pLXM3 (供体菌) 接入含有四环素的 LB 摇管, W50 (受体菌) 接入 PG 摇管, 过夜培养。第 2 天, 取 10  $\mu$ L 受体菌接入 PG 摇管, 于 30 $^{\circ}$ C 培养 8 h, 取 50  $\mu$ L 供体菌接入 LB 摇管, 于 37 $^{\circ}$ C 培养 4 h。然后取 100  $\mu$ L 受体菌和 200  $\mu$ L 供体菌的菌液, 分别在室温下 600  $\times$  g 离心 10 min。除去上清, 取 100  $\mu$ L PG 培养基悬浮供体菌和受体菌沉淀, 将混合菌悬液静置于 30 $^{\circ}$ C 温箱中过夜培养。混合菌悬液涂布于含有氨基青霉素和四环素的双重抗生素平板上。

### 1.6 染色体重组菌株的筛选

接合转移后, 利用菌落 PCR 方法对发生一次交换的菌株进行筛选, 将阳性重组子接种于 LB-4s (低盐 LB) 摇管中过夜培养, 用 0.95% 的生理盐水稀释阳性重组子菌液至适当浓度, 取适量涂布含 20% 蔗糖的 PG 培养基平板。3-4 d 后, 挑选菌落, 分别点种含有及不含 5  $\mu$ g/mL 四环素的 PG 平板, 对没有四环素抗性的菌落进行 PCR, 筛选得到发生二次交换的菌落。

### 1.7 酶活分析

**1.7.1 粗酶液制备:** 取培养至对数中后期的发酵液 1 mL, 7000  $\times$  g 离心 2 min 收集菌体, 用 0.1 mol/L Tris-HCL (pH 7.8) 洗涤两次, 悬浮, 置冰浴中超声波破碎细胞, 离心, 上清液即为粗酶液。

**1.7.2 阿拉伯糖异构酶活性测定:** 方法参考文献 [15-16]。半胱氨酸吡唑法测量体系为 3.5 mL。阿拉伯糖异构酶酶活单位定义为每分钟产生 1  $\mu$ mol

L-核酮糖所需的酶量。

**1.7.3 核酮糖激酶活性测定:**方法参考文献 [17 - 18]。核酮糖激酶酶活单位定义为每分钟消耗  $1 \mu\text{mol}$  NADH 所需的酶量。

**1.7.4 核酮糖-5-磷酸差向异构酶活性测定:**参考文献 [19 - 20]。核酮糖-5-磷酸差向异构酶活单位定义为每分钟消耗  $1 \mu\text{mol}$  NADH 所需的酶量。

## 1.8 发酵试验

**1.8.1 摇瓶发酵:**将 W50、W50-1、W50-2、W50-3 分别接种于培养基②中,摇床培养 18 h,洗去培养基②,悬浮于培养基④中。取适量  $2 \text{ mol/L}$  的阿拉伯糖或葡萄糖加入培养基④中,配制成不同浓度的阿拉伯糖 ( $0.01 \text{ mol/L}$ 、 $0.1 \text{ mol/L}$ ) 培养基以及混合糖培养基 ( $0.01 \text{ mol/L}$  葡萄糖 +  $0.09 \text{ mol/L}$  阿拉伯糖)。按照 5% 的接种量接种,摇床培养,每隔 12 h 取样分析。

**1.8.2 生物量的测定:**发酵液用蒸馏水适当稀释,测定  $600 \text{ nm}$  处的光密度。

**1.8.3 L-阿拉伯糖的测定** [21]: 发酵液经  $10000 \times g$  离心 5 min 后,取上清,用  $0.22 \mu\text{m}$  微孔膜过滤后,用高效液相色谱仪 Agilent 1200 测定 L-阿拉伯糖。

**1.8.4 菌体干重的测定:**取发酵液  $10 \text{ mL}$ ,  $10000 \times g$  离心 5 min 后,水洗两次,  $70^\circ\text{C}$  烘干后称重。

**1.8.5 PHB 的测定:**将干燥菌体转移至厌氧管,加入  $2 \text{ mL}$  苯甲酸酸化甲醇,  $2 \text{ mL}$  氯仿,加帽盖严后,置于  $100^\circ\text{C}$  水浴 4 h,凉至室温后加入  $2 \text{ mL}$  ddH<sub>2</sub>O 抽提,采用气相色谱法检测 PHB。

## 2 结果和分析

### 2.1 W50 利用阿拉伯糖能力初探

将 W50 在以阿拉伯糖或葡萄糖为唯一碳源的发酵培养基中培养,糖的初始浓度分别为  $0.01 \text{ mol/L}$ 、 $0.05 \text{ mol/L}$ 、 $0.1 \text{ mol/L}$ 。发酵结果表明:W50 在含 3 种浓度葡萄糖的培养基 (Glu) 中能够正常生长,而在含 3 种浓度阿拉伯糖的培养基 (Ara) 与无碳源培养基 (MM) 中均不能生长 (图 1)。因此,我们得出结论:*R. eutropha* H16 突变株 W50 不能利用阿拉伯糖。

### 2.2 携带阿拉伯糖代谢基因的重组菌的筛选与培养

将带有阿拉伯糖代谢基因的重组质粒 pLXM1-

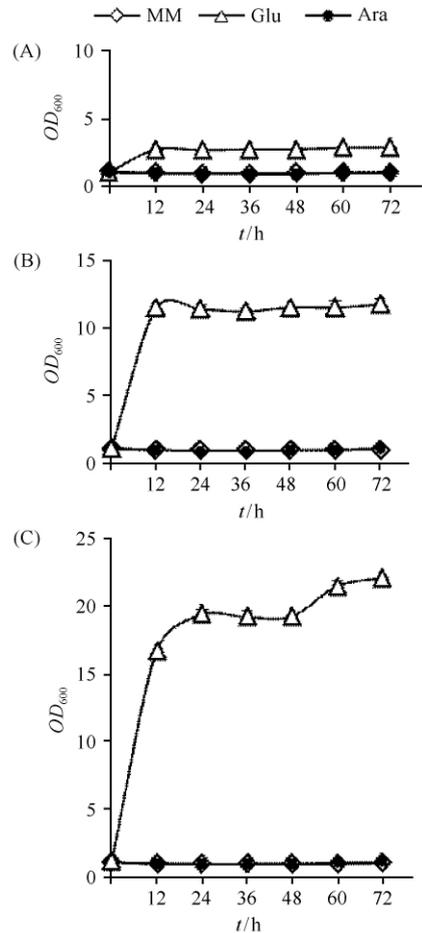


图 1. W50 在以阿拉伯糖或葡萄糖为唯一碳源的培养基中的生长

Figure 1. Growth profile of W50 in the medium using arabinose or glucose as the sole carbon source. Medium: A,  $0.01 \text{ mol/L}$  sugar; B,  $0.05 \text{ mol/L}$  sugar; C,  $0.1 \text{ mol/L}$  sugar.

BAD 电击转化 W50, 得到重组菌株 W50-1。将 W50-1 分别在含  $0.01 \text{ mol/L}$ 、 $0.1 \text{ mol/L}$  阿拉伯糖及混合糖 ( $0.01 \text{ mol/L}$  Glu +  $0.09 \text{ mol/L}$  Ara) 的发酵培养基中培养,结果表明重组菌可以在  $0.1 \text{ mol/L}$  阿拉伯糖及混合糖培养基中生长,并且在混合糖培养基中生长速率和阿拉伯糖利用速率更快,但在  $0.01 \text{ mol/L}$  阿拉伯糖培养基中不能生长 (图 2)。

### 2.3 双质粒系统共表达阿拉伯糖代谢酶基因 *araBAD* 及高亲和力转运蛋白基因 *araFGH*

以 pBBR1MCS-3 ( $\text{Tc}^R$ ) 为载体,构建了带有高亲和力阿拉伯糖转运蛋白基因 *araFGH* 的表达载体 pLXM2。将 pLXM2 电击转化携带 pLXM1-BAD 的 W50-1 工程菌株,在含 Cm 和 Tc 的 PG 平板上培养,筛选得到携带双质粒的重组菌株,命名为 W50-2。

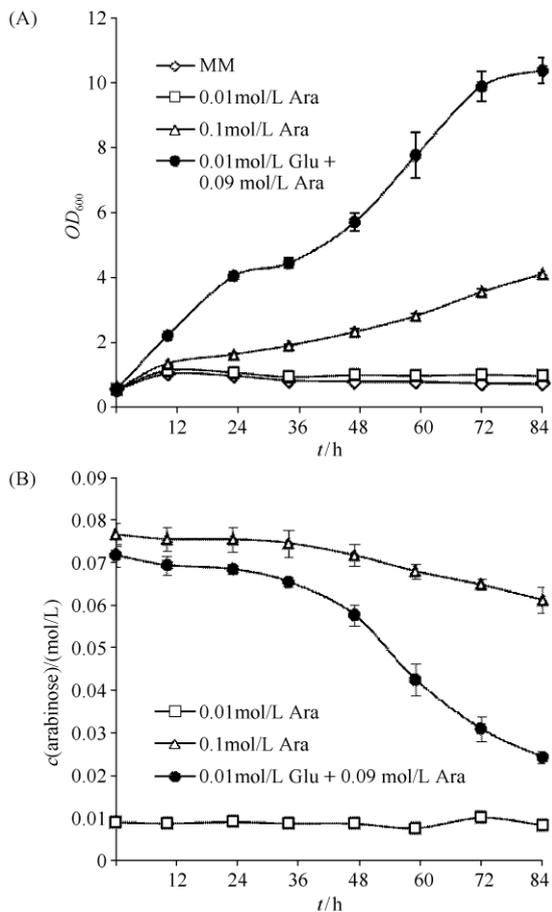


图 2. W50-1 在不同糖培养基中的生长 (A) 及阿拉伯糖的利用 (B)

Figure 2. Growth profile of W50-1 in different sugar medium (A) and the utilization of arabinose (B).

将 W50-2 分别在含 0.01 mol/L、0.1 mol/L 阿拉伯糖及混合糖 (0.01 mol/L Glu + 0.09 mol/L Ara) 的发酵培养基中培养。结果表明, 重组菌株在 0.01 mol/L 阿拉伯糖培养基中也可以生长, 说明转运蛋白基因成功表达。在 0.01 mol/L 阿拉伯糖培养基中, W50-1 的生物量仅为接种量, 而 W50-2 的生物量达到了与含同浓度葡萄糖培养基中的生物量相当的水平。与 W50-1 相比, W50-2 在 0.1 mol/L 阿拉伯糖培养基中生物量增加 67%, 在混合糖培养基中生物量增加 13.4% (图 3)。

但在 0.1 mol/L 阿拉伯糖及混合糖培养基中, 工程菌株生长却变得缓慢, 推测是由于同时添了加两种抗生素的影响。为验证此推测, 将工程菌株分别在只添加氯霉素和同时添加氯霉素、四环素的培养基中培养, 结果如图 4 所示, 在单抗生素培养基中工程菌生物量比在双抗培养基中高出约 40%。

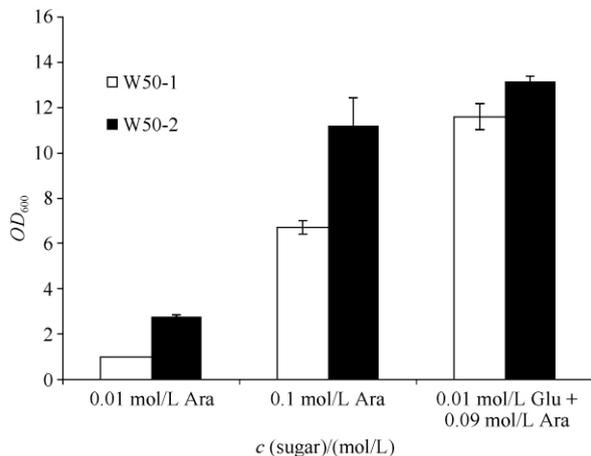


图 3. W50-1 与 W50-2 在不同糖培养基中的生物量

Figure 3. Biomass of W50-1 and W50-2 in different sugar medium.

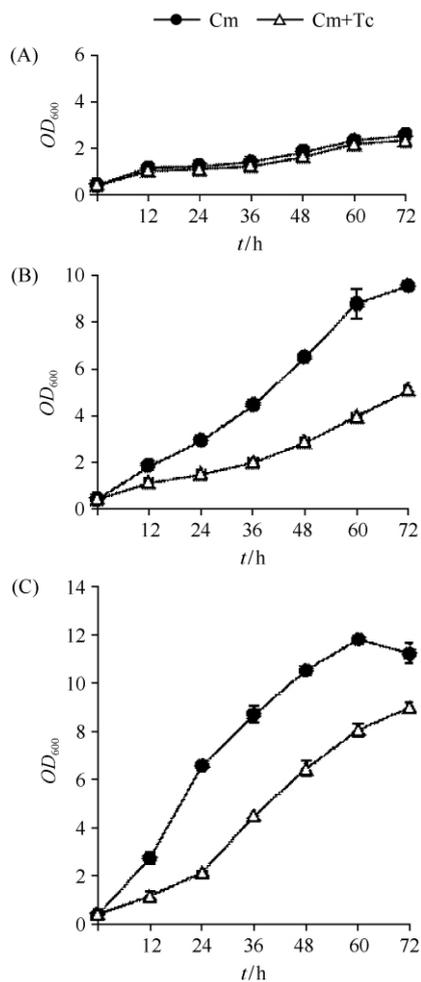


图 4. W50-2 在含单抗生素及双抗生素的不同糖浓度培养基中的生长

Figure 4. Growth profile of W50-2 in single or double antibiotics medium with different sugar concentration. Medium: A, 0.01 mol/L arabinose; B, 0.1 mol/L arabinose; C, 0.01 mol/L Glu + 0.09 mol/L Ara.

## 2.4 转运蛋白基因与染色体整合菌株的筛选与培养

通过同源重组方法,将 *araFGH* 整合到 W50 染色体上的 *gabD4* 基因座中,经菌落 PCR,筛选得到重组菌株 W50-FGH。将 pLXM1-BAD 电击转化 W50-FGH,筛选得到染色体整合有高亲和力阿拉伯糖转运蛋白基因并同时携带阿拉伯糖代谢酶基因的工程菌,命名为 W50-3。

将 W50-3 分别在含 0.01 mol/L、0.1 mol/L 阿拉伯糖及混合糖 (0.01 mol/L Glu + 0.09 mol/L Ara) 的发酵培养基中培养。结果表明,在低浓度 (0.01 mol/L) 阿拉伯糖培养基中, W50-3 生长  $OD_{600}$  可以达到 2.1,与在同浓度葡萄糖培养基中的生长量基本相当;在较高浓度 (0.1 mol/L) 阿拉伯糖培养基中, W50-3 的生物量增加,为 W50-1 生物量的 2.5 倍。在混合糖 (0.01 mol/L Glu + 0.09 mol/L Ara) 培养基中, W50-3 与 W50-1 相比生物量增加了 38% (表 3、图 5)。

表 3. W50-1 和 W50-3 的生物量比较

Table 3. The comparison of biomass between W50-1 and W50-3

Medium	Biomass ( $OD_{600}$ )	
	W50-1	W50-3
0.01 mol/L Ara	0.96	2.1
0.1 mol/L Ara	6.7	16
0.01 mol/L Glu + 0.09 mol/L Ara	11.6	16

## 2.5 工程菌 W50-3 合成 PHB 的测定

上述结果表明,带有阿拉伯糖代谢酶基因和转运蛋白基因的工程菌株 W50-3 可以在以阿拉伯糖为唯一碳源的培养基中生长。我们进一步考察了 W50-3 利用阿拉伯糖积累 PHB 的能力。取发酵后烘干后的菌体,酯化处理,采用气相色谱法检测 PHB。结果表明,在含 0.01 mol/L 阿拉伯糖的发酵培养基中, W50-3 积累的 PHB 仅占菌体干重的 1%;在含 0.1 mol/L 阿拉伯糖的发酵培养基中, W50-3 发酵产生的 PHB 占菌体干重的 38.6%;在混合糖 (0.01 mol/L Glu + 0.09 mol/L Ara) 发酵培养基中, W50-3 发酵产生的 PHB 占菌体干重的 37.5%。

## 2.6 工程菌 W50-3 的阿拉伯糖代谢酶活性

对重组菌 W50-3 的阿拉伯糖代谢酶 (阿拉伯糖异构酶、核酮糖激酶、核酮糖-5-磷酸差向异构酶) 活性分别进行了测定。结果表明,3 个阿拉伯糖代谢酶基因都实现表达,在粗酶液中分别检测到相应的酶活性 (表 4)。

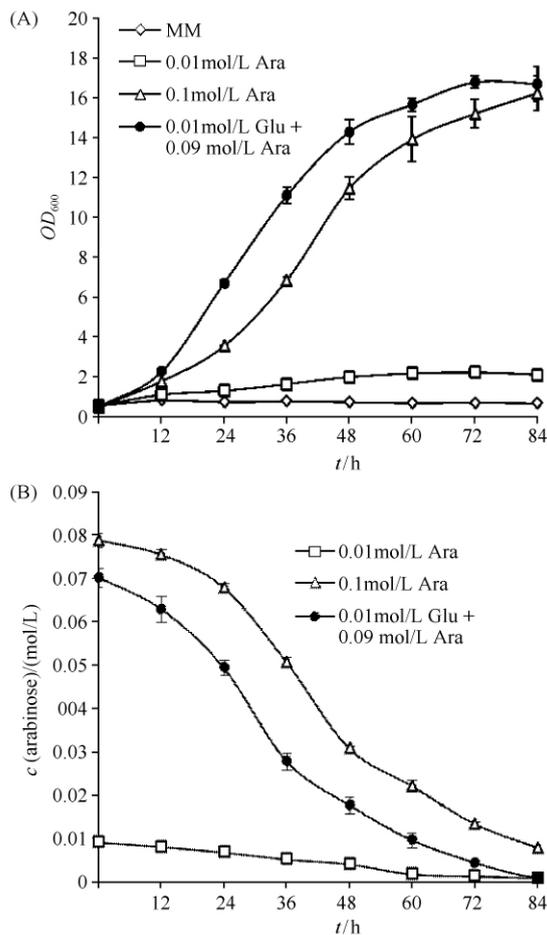


图 5. W50-3 在不同糖培养基中的生长 (A) 及阿拉伯糖的利用 (B)

Figure 5. Growth profile of W50-3 in different sugar medium (A) and the utilization of arabinose (B).

表 4. 工程菌 W50-3 的阿拉伯糖代谢酶活性

Table 4. The specific activity of arabinose metabolic enzymes in W50-3

Enzyme	Specific activity / (U/mg protein)
Arabinose isomerase	7.8 ± 0.53
Ribulose kinase	0.95 ± 0.009
Ribulose-5-phosphate epimerase	0.17 ± 0.003

## 3 讨论

诸多研究表明, *R. eutropha* H16 是一株优良的积累 PHB 的菌种,既能利用  $H_2O$ 、 $CO_2$ ,又可利用果糖及多种有机酸、甲醇等积累 PHB,但利用葡萄糖能力较差。1994 年,陈琦等<sup>[14]</sup>通过诱变 *R. eutropha* H16 得到了可高效利用葡萄糖的菌株 W50。但到

目前为止, 还没有 *R. eutropha* H16 中阿拉伯糖代谢途径的报道, 也没有针对 H16 中阿拉伯糖代谢途径的遗传工程改造工作。

本工作首次尝试利用基因工程方法使 *R. eutropha* H16 突变株 W50 具备阿拉伯糖利用能力。将大肠杆菌来源的阿拉伯糖代谢酶基因 *araBAD* 置于组成型强启动子  $P_{phaC1}$ <sup>[22]</sup> 控制之下, 导入 W50 得到的重组菌株 W50-1 能够利用阿拉伯糖生长, 表明基因 *araBAD* 可以在 W50 中表达, 并且 *R. eutropha* W50 具有一定的阿拉伯糖转运能力。然而, W50-1 却不能利用低浓度 (0.01 mol/L) 阿拉伯糖, 由此我们推测, *R. eutropha* W50 的阿拉伯糖转运能力可能由较低亲和力的非特异性转运系统介导, 因此我们尝试将源自大肠杆菌的高亲和力阿拉伯糖转运蛋白基因 *araFGH* 引入 *R. eutropha* W50。利用双质粒系统得到的重组菌株 W50-2 能利用低浓度阿拉伯糖, 并且在较高浓度阿拉伯糖的培养基中生物量显著增加, 表明了高亲和力阿拉伯糖转运蛋白对菌株利用阿拉伯糖能力的重要性。而为了消除抗生素及质粒不稳定的影响, 我们选择了编码琥珀酸半醛脱氢酶的 *gabD4* 基因座作为整合靶点 (前期试验表明 *gabD4* 基因的敲除对 W50 的生长及 PHB 积累没有影响 (未发表的结果)), 通过同源重组将 *araFGH* 整合在 *R. eutropha* W50 染色体中得到的工程菌株 W50-3 在不同阿拉伯糖浓度的培养基中生物量均有显著提高, 甚至达到了与含同浓度葡萄糖培养基中的生物量相当的水平, 并且在含 0.1 mol/L 阿拉伯糖的培养基中可以积累占菌体干重 38.6% 的 PHB。这些结果表明, 在 *R. eutropha* W50 中稳定表达高亲和力阿拉伯糖转运蛋白和阿拉伯糖代谢酶系, 可以实现阿拉伯糖的高效利用。这为获得可以共利用葡萄糖、木糖、阿拉伯糖的 PHB 生产菌株打下了基础, 为获得更高效利用木质纤维素降解液的菌株提供了参考。

尽管 W50-3 能够较高效利用阿拉伯糖, 但与葡萄糖相比, 阿拉伯糖的利用速率仍较低。推测可能是由于阿拉伯糖代谢酶活力较低并且磷酸戊糖途径的代谢通量远低于糖酵解途径。因此, 提高阿拉伯糖代谢酶活力、对磷酸戊糖途径进行改造, 是进一步提高阿拉伯糖利用速率的研究目标。

利用木质纤维素降解液来生产 PHB, 菌株需高效共利用降解液中的糖类碳源, 包括六碳糖和五碳

糖。在 H16 中, 已经有研究工作拓展了其可利用的碳源, 但探索混合糖共利用方面的工作较少。而目前已经有大量的研究致力于共利用混合糖生产乙醇。Beate Wiedemann 等在酿酒酵母中表达了枯草芽孢杆菌、大肠杆菌的阿拉伯糖代谢酶, 促进了阿拉伯糖与六碳糖的共利用, 提高了乙醇的产率<sup>[23]</sup>。Aloke Kumar Bera 等获得可共利用葡萄糖、半乳糖、甘露糖、木糖及阿拉伯糖五种混合糖的重组酿酒酵母菌株, 乙醇产量达到 72.5%<sup>[24]</sup>。此外, Sasaki M 等通过改造谷氨酸棒杆菌中的五碳糖转运蛋白来提高五碳糖、六碳糖的共利用速率, 提高有机酸的产量<sup>[25]</sup>。本工作已获得可利用阿拉伯糖并积累 PHB 的菌株, 而研究葡萄糖、阿拉伯糖共利用以及提高 PHB 产量的工作也正在进行中。

## 参考文献

- [1] Uchino K, Saito T, Jendrossek D. Poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase PhaZa1 is involved in mobilization of accumulated PHB in *Ralstonia eutropha* H16. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74 (4) : 1058-1063.
- [2] Philip S, Keshavarz T, Roy I. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2007, 82 (3) : 233-247.
- [3] Bertrand JL, Ramsay BA, Ramsay JA, CC. Biosynthesis of poly- $\beta$ -Hydroxyalkanoates from pentoses by *Pseudomonas pseudoflava*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, 56 (10) : 3133-3188.
- [4] Bhalla A, Bansal N, Kumar S, Bischoff KM, Sani RK. Improved lignocellulose conversion to biofuels with thermophilic bacteria and thermostable enzymes. *Bioresource Technology*, 2013, 128: 751-759.
- [5] Aristidou A, Penttilä M. Metabolic engineering applications to renewable resource. *Current Opinion in Biotechnology*, 2000, 11 (2) : 187-198.
- [6] Wisselink HW, Toirkens MJ, del Rosario Franco Berriel M, Winkler AA, van Dijken JP, Pronk JT, van Maris AJ. Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic alcoholic fermentation of L-arabinose. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73 (15) : 4881-4891.
- [7] Yi Z, Huang H, Weng W, Chen Q, Chen D, Zheng D. Studies on poly- $\beta$ -hydroxybutyrate by the mutant 65-7 of

- Alcaligenes extrophus*. *Microbiologica China*, 1995, 22 (1) : 29-31. (in Chinese)
- 易祖华, 黄和容, 翁维琦, 陈琦, 陈东, 郑平弟. 真养产碱杆菌突变株 65-7 产聚羟基丁酸的研究. *微生物学通报*, 1995, 22 (1) : 29-31.
- [8] Sichert S, Hetzler S, Broker D, Steinbuchel A. Extension of the substrate utilization range of *Ralstonia eutropha* strain H16 by metabolic engineering to include mannose and glucose. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77 (4) : 1325-1334.
- [9] Kawaguchi H, Sasaki M, Vertes AA, Inui M, Yukawa H. Engineering of an L-arabinose metabolic pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 77 (5) : 1053-1062.
- [10] Horazdovsky BF, Hogg RW. Genetic reconstitution of the high-affinity L-arabinose. *Journal of Bacteriology*, 1989, 171 (6) : 3053-3059.
- [11] Simon R, Priefer U, Puhler A. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Nature Biotechnology*, 1983, 1 (9) : 784-791.
- [12] Kovach ME, Elzer PH, Hill DS. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*, 1995, 166 (1) : 175-176.
- [13] Peplinski K, Ehrenreich A, Doring C, Bomeke M, Reinecke F, Huttmacher C, Steinbuchel A. Genome-wide transcriptome analyses of the 'Knallgas' bacterium *Ralstonia eutropha* H16 with regard to polyhydroxyalkanoate metabolism. *Microbiology*, 2010, 156 (Pt 7) : 2136-2152.
- [14] Chen Q, Yi Z, Huang H. Breeding of glucose utilizing mutants for poly- $\beta$ -hydroxybutyrate fermentations. *Microbiologica China*, 1994, 21 (6) : 333-335. (in Chinese)
- 陈琦, 易祖华, 黄和容. 利用葡萄糖发酵产聚羟基丁酸菌株的选育. *微生物学通报*, 1994, 21 (6) : 333-335.
- [15] Dische Z, Borenfreund E. A new spectrophotometric method for the detection and determination of keto sugars and trioses. *Determination of Keto Sugars*, 1951, 192 (2) : 583-587.
- [16] Patrick JW, Lee N. Purification and properties of an L-arabinose isomerase from *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1968, 243 (25) : 312-4318.
- [17] Lee N, Englesberg E. Dual effects of structural genes in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1962, 48 (3) : 335-348.
- [18] Zhang L, Leyn SA, Gu Y, Jiang W, Rodionov DA, Yang C. Ribulokinase and transcriptional regulation of arabinose metabolism in *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194 (5) : 1055-1064.
- [19] Becker J, Boles E. A modified *Saccharomyces cerevisiae* strain that consumes L-arabinose and produces ethanol. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69 (7) : 4144-4150.
- [20] Englesberg E, Anderson RL, Weinberg R, Lee N. L-arabinose-sensitive, L-ribulose 5-phosphate 4-epimerase-deficient mutants of *Escherichia coli*. *Bacteriol*, 1962, 84 (1) : 137-146.
- [21] Liu X, Ai N, Zhang H, Lu M, Ji D, Yu F, Ji J. Quantification of glucose, xylose, arabinose, furfural, and HMF in corncob hydrolysate by HPLC-PDA-ELSD. *Carbohydrate Research*, 2012, 353 : 111-114.
- [22] Fukui T, Ohsawa K, Mifune J, Orita I, Nakamura S. Evaluation of promoters for gene expression in polyhydroxyalkanoate-producing *Cupriavidus necator* H16. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 89 (5) : 1527-1536.
- [23] Wiedemann B, Boles E. Codon-optimized bacterial genes improve L-Arabinose fermentation in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74 (7) : 2043-2050.
- [24] Bera AK, Sedlak M, Khan A, Ho NW. Establishment of L-arabinose fermentation in glucose/xylose co-fermenting recombinant *Saccharomyces cerevisiae* 424A (LNH-ST) by genetic engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87 (5) : 1803-1811.
- [25] Sasaki M, Jojima T, Kawaguchi H, Inui M, Yukawa H. Engineering of pentose transport in *Corynebacterium glutamicum* to improve simultaneous utilization of mixed sugars. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 85 (1) : 105-115.

# Engineering of an L-arabinose metabolic pathway in *Ralstonia eutropha* W50

Xuemei Lu<sup>1,2</sup>, Guiming Liu<sup>1</sup>, Yu Wang<sup>1</sup>, Jiuyuan Ding<sup>1</sup>, Weiqi Weng<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

<sup>2</sup>University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** [Objective] To broaden the substrate spectrum including L-arabinose, *Ralstonia eutropha* W50, a mutant strain with high yield of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB), was metabolically engineered by expressing the genes encoding L-arabinose catabolic enzymes and high-affinity L-arabinose transporter from *Escherichia coli*. [Methods] The promoter fragment of PHB synthase gene *phaCI* ( $P_{phaCI}$ ) from *R. eutropha* H16 and the *araBAD* genes from *E. coli* W3110 were cloned by PCR and inserted into expression vector pBBR1MCS. The resulting recombinant plasmid was transformed into W50 to generate W50-1. The *araFGH* gene from *E. coli* W3110 was introduced into W50-1 by plasmid system or homologous recombination, yielding W50-2 and W50-3 respectively. The fermentation characteristics of the three engineered strains were investigated. [Results] The flask fermentation experiments of the engineered strains show that W50-1 carrying the arabinose catabolic genes under the control of  $P_{phaCI}$  could grow in the fermentation medium containing 0.1 mol/L arabinose as the sole carbon source, but could not utilize low concentration arabinose (0.01 mol/L). However, W50-2 and W50-3 containing the gene of high-affinity arabinose transporter were able to utilize low concentration arabinose. In the fermentation medium containing 0.1 mol/L arabinose, the biomass of W50-3 was 2.5 fold higher than that of W50-1, and the PHB accumulation amount of W50-3 accounted for 38.6% of the cell dry weight. [Conclusion] *R. eutropha* W50 was able to metabolize L-arabinose by the expression of *araBAD* genes, and the simultaneous expression of *araFGH* genes could further improve its ability of L-arabinose utilization. By using L-arabinose as the sole carbon source, the recombinant strain W50-3 can accumulate a noticeable level of PHB.

**Keywords:** L-arabinose metabolism, transporter, poly- $\beta$ -hydroxybutyrate, *Ralstonia eutropha*

(本文责编:王晋芳)

\* Corresponding author. Tel: +86-10-64807360; E-mail: wengwq@im.ac.cn

Received: 15 April 2013 / Revised: 7 June 2013