

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (2) :164 - 175; 4 February 2015
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicroen
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140194

重组菌 *Ralstonia eutropha* W50-EAB D-木糖代谢相关的限速靶点

王露^{1, 2}, 刘桂明¹, 张英姿¹, 王宇¹, 丁久元¹, 翁维琦^{1*}

¹中国科学院微生物研究所, 中国科学院微生物生理与代谢工程重点实验室, 北京 100101

²中国科学院大学, 北京 100449

摘要: 【目的】通过代谢工程改造真养罗氏菌 (*Ralstonia eutropha*) W50-EAB 木糖代谢的相关限速靶点, 进一步提高 *R. eutropha* W50-EAB 的 D-木糖利用效率, 为获得高效利用纤维素水解液的菌株奠定基础。【方法】利用 PCR 技术扩增 *R. eutropha* 转酮酶基因 *tktA*, *cbbT2* 和转醛酶基因 *tal*, 将扩增的 *tktA*, *cbbT2* 和 *tal* 基因分别构建到表达载体 pBBR1MCS-3 上, 获得重组质粒 pWL1-TKT, pWL1-CBBT2, pWL1-TAL。通过电转的方式将质粒分别转化 W50-EAB 获得重组菌株 W50-KAB, W50-CAB 和 W50-TAB。利用基因敲除的方法, 获得醛还原酶基因 *h16_A3186* 敲除株 W50'-EAB。通过电转的方式将重组质粒 pWL1-TAL 导入敲除株 W50'-EAB 获得重组菌株 W50'-TAB。通过摇瓶发酵研究重组菌株 W50-KAB, W50-CAB, W50-TAB, W50'-EAB 以及 W50'-TAB 的发酵特性。【结果】酶活分析结果表明, 转酮酶和转醛酶基因实现表达。摇瓶发酵结果表明, 转酮酶基因过表达菌株 W50-KAB 和 W50-CAB 相比于对照菌株 W50-EAB/p3, 表现出降低的木糖利用能力; 而转醛酶基因过表达重组菌株 W50-TAB 以及敲除菌株 W50'-EAB 对木糖的利用得到一定的提高。在 0.1 mol/L 木糖的发酵培养基中, W50-EAB 的最大比生长速率为 0.035 h^{-1} , PHB 干重比为 $16.2 \pm 1.01\%$; 而 W50-TAB 的最大比生长速率提高到 0.039 h^{-1} , PHB 干重比达到 $20.5 \pm 0.76\%$; 醛还原酶基因敲除菌株 W50'-EAB 最大比生长速率提高到 0.040 h^{-1} , PHB 含量提高到 $19.8 \pm 1.05\%$ 。结果显示转醛酶基因的过表达与醛还原酶基因的敲除对木糖利用均表现出一定的优势, 将这两种优势组合获得菌株 W50'-TAB, 摇瓶发酵分析结果为最大比生长速率达到 0.042 h^{-1} , PHB 积累达到 $27.9 \pm 0.47\%$, 相比于对照菌株提高了 72.2%。另外, 在含有葡萄糖 (0.01 mol/L) 和木糖 (0.09 mol/L) 的混合糖培养下, 重组菌株 W50-TAB, W50'-EAB 和 W50'-TAB 相比于在纯木糖培养下都表现出更高的生物量和胞内 PHB 积累量。【结论】磷酸戊糖途径关键酶转醛酶基因的过表达加速了木糖代谢流, 从而可以高效利用木糖积累一定量的 PHB。醛还原酶对木糖代谢有阻碍作用, 敲除该酶基因后木糖代谢能力有了一定的提高, 而两者协同作用可以进一步提高重组菌株的木糖利用效率和 PHB 积累能力。

关键词: *R. eutropha* W50-EAB, 木糖代谢, 聚- β -羟基丁酸酯, 磷酸戊糖途径, 醛还原酶

中图分类号: Q935 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 02-0164-12

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

作者简介: 王露 (1988 -), 女, 河南濮阳人, 硕士研究生, 专业方向为生物生化工程。E-mail: shirly@gmail.com

收稿日期: 2014-04-14; 修回日期: 2014-06-03

真养罗氏菌 (*Ralstonia eutropha*) 是研究聚羟基脂肪酸酯 (polyhydroxyalkanoate, PHA) 合成的模式菌株, 同时也被广泛用于聚- β -羟基丁酸酯 (poly- β -hydroxybutyrate, PHB) 的发酵生产, 通过培养基营养物质的限制或调节, *R. eutropha* 可以积累 90% 以上的 PHB^[1]。但是作为一种环境友好材料, 现阶段基于生物基生产的 PHB 还不能与大量生产的以石油工业为基础的塑料材料竞争。其中生产成本是限制 PHB 广泛应用的主要因素, 因此使用廉价碳源生产 PHB 对保证粮食安全, 经济可持续发展和环保等都有很重大的意义。

木质纤维素是地球上最丰富且来源广泛的可再生资源, 经水解处理后主要含有 60% 的己糖和 30% 的戊糖^[2], 因此农业废料的纤维素水解液可以作为一种工业发酵的低成本原料加以利用。但是 *R. eutropha* 天然不具备 D-木糖 (D-Xylose, Xyl) 利用能力, 刘凯等在能利用葡萄糖 (Glucose, Glu) 发酵产 PHB 的 *R. eutropha* 突变菌株 W50^[3] 中表达来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) K-12 W3110 的木糖异构酶基因 *xylA* 和木糖激酶基因 *xylB* 以及木糖转运蛋白基因 *xylE*, 最终获得重组菌株 W50-EAB。该菌株获得了木糖利用能力, 并且可以积累一定的 PHB^[4]。但与以葡萄糖为碳源的发酵水平相比, 木糖发酵能力还需进一步改善。

磷酸戊糖途径 (Pentose Phosphate Pathway) 非氧化阶段是木糖代谢必经阶段, 木糖经木糖异构酶 (xylose isomerase, XI) 和木酮糖激酶 (xylulokinase, XK) 催化转化成 5-磷酸木酮糖进入磷酸戊糖途径非氧化阶段。对酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的研究表明, 表达多种异源木糖异构酶基因, 虽然可以获得较高的木糖异构酶活性, 但并不能明显提高菌株的木糖代谢能力^[5-10]。这提示在磷酸戊糖途径的非氧化阶段可能存在瓶颈。Björn Johansson^[11] 等研究发现在 *S. cerevisiae* 过表达磷酸戊糖途径非氧化阶段相关代谢酶基因可以有效提高 5-磷酸木酮糖的转化, 从而加速木糖代谢流。而在 *R. eutropha* 磷酸戊糖途径非氧化阶段是否存在类似的限速因素和靶点尚未有研究报道。转酮酶 (Transketolase) 和转醛酶 (Transaldolase) 是该途径的两个关键酶, 在 *R. eutropha* 基因组中存在两个转酮酶 (EC: 2.2.1.1) 编码基因 *tktA* 和 *cbbT2*, 以及一个转醛酶 (EC: 2.2.1.2) 编码基因 *tal*。它们催化的反应将磷

酸戊糖途径和糖酵解途径偶联在一起, 这两种酶活性可能会影响木糖代谢效率。此外, 生物信息学等分析结果表明在 *R. eutropha* 中基因 *h16_A3186* 可能编码一种醛还原酶 (EC: 1.1.1.21), 该酶催化木糖生成木糖醇的反应, 有可能会与木糖异构酶竞争底物。

因此, 本工作以转酮酶和转醛酶为靶点, 通过基因过表达强化磷酸戊糖途径非氧化阶段的代谢流; 以醛还原酶为靶点, 通过基因敲除阻断木糖的支路代谢, 研究了 *R. eutropha* 重组菌株的生理特性以及 PHB 的积累能力。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒: 本实验所用菌株和质粒列于表 1。

1.1.2 主要试剂: 所有分子生物学工具酶都购自 TaKaRa 公司; 6-磷酸果糖 (D-Fructose-6-phosphate), 4-磷酸赤藓糖 (D-Erythrose-4-phosphate), 3-磷酸甘油醛 (D/L-Glyceraldehyde-3-phosphate), 以及磷酸丙糖异构酶/磷酸甘油酸脱氢酶 (α -glycerophosphate dehydrogenase/triosephosphate isomerase) 均购自 Sigma 公司; 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 *E. coli*。② PN 培养基, 用于粗酶液制备和重组菌种子培养: 每升含胰蛋白胨 10 g, 葡萄糖酸钠 3 g, 硫酸铵 3 g, 酵母粉 5 g。③ 含 20% 蔗糖的 LB 培养基, 作为第 2 次重组的筛选培养基。④ 发酵培养基: 参考文献 [16]。另外配置 2 mol/L 的木糖以及 2 mol/L 的葡萄糖, 用于配置不同浓度的木糖培养基和混合糖培养基。*E. coli* 在 37°C 培养, *R. eutropha* 在 30°C 培养。抗生素使用浓度: 氨苄青霉素 100 μ g/L, 卡那霉素 50 μ g/mL, 四环素 5 μ g/mL, 氯霉素 50 μ g/mL。

1.2 目的基因的克隆

以 *R. eutropha* H16 基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 技术扩增相关片段, 引物 P1 和 P2 扩增获得转酮酶基因 *tkt* 片段, P3 和 P4 扩增转酮酶基因 *cbbT2* 片段, 引物 P5 和 P6 扩增转醛酶基因 *tal* 片段, 引物 P7 和 P8, P9 和 P10 分别扩增醛还原酶基因 *h16_A3186* 上下游约 750 bp 的片段, 再利用引物 P8 和

P9 通过重叠 PCR 将上下游片段连接起来, 获得 *h16* _A3186 同源臂片段。以 *E. coli* W3110 基因组为模

板, 引物 P11 和 P12 扩增 4-磷酸赤藓糖脱氢酶基因 *epd*。具体见表 2。

表 1. 实验所用菌株和质粒

Table 1. Strains and plasmids in this work

Stains and plasmids	Characteristics	Sources
Strains		
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	ϕ 80d / <i>LacZ</i> Δ M15, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i>	This lab
S17-4	<i>racA</i> , <i>proA</i> , <i>thi-1</i> , <i>chr::tra</i>	Simon R [12]
W3110	IN (<i>rrnD-rrnE</i>) 1 <i>rpb-1</i>	This lab
BL21 (DE3)	F-ompT hsdS _B (rB-mB ⁻) gal dcm (DE3)	Novagen
<i>Rastonia eutropha</i>		
W50-E	<i>gabD4::xylE</i> , W50 with the homologous recombination of <i>xylE</i>	Kai Liu [4]
W50'-E	Δ <i>h16_A3186</i> , <i>gabD4::xylE</i>	This Study
W50-EAB	Cm ^R , W50-E carrying p1-AB	Kai Liu [4]
W50'-EAB	Cm ^R , W50'-E carrying p1-AB	This Study
W50-KAB	Cm ^R , Tc ^R , W50-EAB carrying pWL1-TKT	This Study
W50-CAB	Cm ^R , Tc ^R , W50-EAB carrying pWL1-CBBT2	This Study
W50-TAB	Cm ^R , Tc ^R , W50-EAB carrying pWL1-TAL	This Study
W50'-TAB	Cm ^R , Tc ^R , W50'-EAB carrying pWL1-TAL	This Study
Plasmids		
pMD19-T	T-vector, 2.7kb	TaKaRa Co.
pLMX1	Cm ^R , pBBR1MCS derivative carrying the P _{phaC1} gene	Xuemei Lu [13]
p1-AB	Cm ^R , pBBR1MCS derivative carrying the <i>xylAB</i> gene	Kai Liu [4]
pBBR1MCS-3	Tc ^R , LacZ- α <i>mob rep</i>	Kovach ME [14]
pJQ200mp18Tc	Tc ^R , <i>sacB mob</i>	Peplinski K [15]
pET30a-c (+)	Expression vector, 5.4kb, Kan ^R , 6* his-tag	Novagen
pWL1	Tc ^R , pBBR1MCS-3 derivative carrying the P _{phaC1} gene	This study
pWL1-TKT	Tc ^R , pWL1 derivative carrying the <i>tkl</i> gene	This study
pWL1-CBBT2	Tc ^R , pWL1 derivative carrying the <i>cbbt2</i> gene	This study
pWL1-TAL	Tc ^R , pWL1 derivative carrying the <i>tal</i> gene	This study
pWL2	Kan ^R , pET30a-c (+) derivative carrying the <i>epd</i> gene	This study
pWL3	Tc ^R , pJQ200mp18Tc derivative carrying the <i>h16_A3186</i> homologous arm	This study

表 2. 实验所用引物

Table 2. Primers in this study

Primers	Sequences (5'→3')	Size/bp	Restriction site
P1	CTCTAGATAGAGAGACAATCAAATCATGTCCGCCCTTGCCCATCC	47	<i>Xba</i> I
P2	ACTCTGCAGCCTGAGGATCGATTGAAACCG	30	<i>Pst</i> I
P3	CTCTAGATAGAGAGACAATCAAATCATGAACGCACCAGAACGCAT	47	<i>Xba</i> I
P4	AATGGTACCCTTAGCCATCAGCCCTCCTC	28	<i>Kpn</i> I
P5	CTCTAGATAGAGAGACAATCAAATCATGAACCGACTCGAACAACCT	47	<i>Xba</i> I
P6	ATAGGTACCCATCCTTACTTCGCAATCT	29	<i>Kpn</i> I
P7	CCACTGCAGACGAAGCTTTGACCGCGATC	29	<i>Pst</i> I
P8	AGCGGTACCAATTAAGAGCTCGCGCGGACTCGCCATAT	40	<i>Sac</i> I
P9	CTCTTAATTGGTACCGCTCGACCGCATCTTCCCG	34	<i>Kpn</i> I
P10	TACTCTAGATAAGGATCCCCCGCGCTGGC	29	<i>Xba</i> I
P11	AGGAGACATATGACCGTACCGGTAG	25	<i>Nde</i> I
P12	TATGCGGCCGCCCTGAAAGCAACAGTAGC	29	<i>Not</i> I

1.3 重组质粒的构建

用 *Sac* I, *Xba* I 双酶切含有 P_{phaC1} 启动子的质粒

pLXM1, 回收目的片段, 与同样双酶切的 pBBR1MCS-3 连接, 获得含有 P_{phaC1} 的表达载体, 命

名为 pWL1。

用 *Xba* I, *Pst* I 双酶切 PCR 扩增的 *tktA* 片段, 回收目的片段后与同样酶切的 pWL1 连接, 将 *tkt* 连接到 P_{phac1} 下游, 获得含有 P_{phac1} 组成型启动子控制下的转酮酶基因 *tkt* 的表达载体, 命名为 pWL1-TKT。

用 *Xba* I, *Pst* I 分别双酶切 PCR 扩增的 *cbt2* 片段和 *tal* 片段, 回收目的片段后分别与同样酶切的 pWL1 连接, 获得含有转酮酶基因 *cbt2* 的表达载体命名为 pWL1-CBBT2, 和含有转醛酶基因 *tal* 的表达载体命名为 pWL1-TAL。

用 *Nde* I, *Not* I 双酶切 PCR 扩增的 *epd* 片段, 与同样处理的 pET30a-c (+) 连接, 获得含有 4-磷酸赤藓糖脱氢酶基因 *epd* 的表达载体, 命名为 pWL2。

用 *Pst* I, *Xba* I 酶切重叠 PCR 扩增的 *h16_A3186* 同源臂片段, 与经过相同处理的 pJQ200mp18Tc 连接, 获得含有同源臂片段的敲除载体, 命名为 pWL3。

1.4 接合转移

将质粒 pWL3 导入大肠杆菌 S17-1^[12], 筛选得到 S17-1/pWL3。接合转移具体方法参考文献 [13]。

1.5 敲除菌株的筛选

接合转移后, 敲除菌株筛选方法参考文献 [13]。

1.6 酶活分析

1.6.1 粗酶液制备: 取培养 8 h 重组菌株 W50-KAB, W50-CAB, W50-TAB 和 W50'-E 的 PN 培养液 1 mL, 11100 × g 离心 2 min 收集菌体, 用 0.1 mol/L 的 Tris-HCl (pH 7.8) 缓冲液洗涤 2 次后, 用 500 μL 缓冲液悬浮, 缓冲液中加入终浓度为 0.02 mmol/L 的 DTT。置冰浴中超声波破碎, 离心, 上清液即为粗酶液。

1.6.2 转酮酶活性测定: 方法参考文献 [17], 在此反应体系中, 通过与 4-磷酸赤藓糖脱氢酶催化的反应偶联, 一个酶活力单位定义为每分钟由 NAD^+ 产生 1.0 μmol NADH 所需的酶量。

1.6.3 转醛酶活性测定: 方法参考文献 [18], 在此反应体系中, 一个酶活力单位定义为每分钟消耗 1.0 μmol NADH 所需的酶量。

1.6.4 4-磷酸赤藓糖脱氢酶的表达与纯化: 由于该酶没有商品供应, 所以我们表达纯化制备了 4-磷酸赤藓糖脱氢酶, 方法参考文献 [17], 纯化的酶用于

转酮酶活性的测定。

1.6.5 醛还原酶活性测定: 方法参考文献 [19], 在此反应体系中, 一个酶活力单位定义为每分钟消耗 1.0 μmol NADPH 所需的酶量。

1.7 发酵实验

1.7.1 摇瓶发酵: 将 W50-KAB, W50-CAB, W50-TAB, W50'-EAB 和 W50'-TAB 分别接种于培养基 ②, 30℃ 培养 18 h, 洗去培养基 ②, 用培养基 ④ 悬浮至适当浓度作为种子液。取适量 2 mol/L 木糖或葡萄糖加入发酵培养基 ④ 中, 配制成不同浓度的木糖发酵培养基以及混合糖培养基 (0.01 mol/L Glu + 0.09 mol/L Xyl)。按照 5% 的接种量接种, 30℃ 培养, 每隔 12 h 取样分析。

1.7.2 生物量的测定: 发酵液用蒸馏水适当稀释, 测定 600 nm 波长下的光密度。

1.7.3 D-木糖的测定: 方法参考文献 [20]。

1.7.4 PHB 含量测定: 分析条件见参考文献 [13]。

1.7.5 质粒稳定性测定: 定时取适量发酵液用生理盐水稀释到合适浓度, 取适量涂布在 PN 平板上, 于 30℃ 培养。挑取单菌落到 PN 平板上, 含有氯霉素抗性的 PN 平板和含有四环素抗性的 PN 平板上。培养 24 h, 计数。质粒保持率定义为在抗性平板上长出菌落数与在非抗性平板上长出菌落数的百分比。每一试验随机挑取菌落数大于 100 个。

2 结果和分析

2.1 重组菌株 W50-KAB, W50-CAB 和 W50-TAB 的构建以及转酮酶和转醛酶酶活测定

将重组质粒 pWL1-TKT, pWL1-CBBT2 和 pWL1-TAL 分别电击转化 W50-EAB, 涂布在含有氯霉素和四环素抗性的 PN 平板上, 根据菌落 PCR 验证筛选获得转化子分别命名为 W50-KAB, W50-CAB 和 W50-TAB。

为验证转酮酶和转醛酶基因在相应重组菌株内是否得到表达, 我们对重组菌 W50-KAB, W50-CAB 的转酮酶和 W0-TAB 的转醛酶分别进行酶活测定。结果显示 (表 3), W50-KAB 和 W50-CAB 的转酮酶比活力相比于含空载体 pBBR1MCS-3 (缩写为 p3) 的对照菌 W50-EAB/p3 分别提高了 4 倍和 5.4 倍, W50-TAB 的转醛酶比活力是对照菌株比活力的 7.8 倍。这说明 3 个代谢酶基因都得到了高效表达。

表 3. 重组菌 W50-KAB, W50-CAB 和 W50-TAB 的酶活测定

Table 3. The specific activities of enzyme in W50-KAB, W50-CAB and W50-TAB

Strain	Specific enzyme activities (U /mg)		
	transketolase/ <i>tktA</i>	transketolase/ <i>cbbT2</i>	transaldolase
W50-EAB/p3	0.25 ± 0.03	0.25 ± 0.03	0.18 ± 0.06
W50-KAB	1.22 ± 0.045	—	—
W50-CAB	—	1.59 ± 0.047	—
W50-TAB	—	—	1.40 ± 0.080

2.2 转酮酶基因过表达重组菌株 W50-KAB 和 W50-CAB 的发酵特性

以 W50-EAB/p3 作为对照菌株来研究转酮酶过表达菌株的发酵特性。将重组菌株 W50-EAB/p3, W50-KAB 和 W50-CAB 分别在含 0.01 mol/L, 0.1 mol/L 木糖以及混合糖 (0.01 mol/L Glu +

0.09 mol/L Xyl) 的发酵培养基中培养, 结果表明过表达转酮酶基因的重组菌株 W50-KAB, W50-CAB 在不同发酵培养基中的生长速率和木糖消耗速率都低于对照菌株 W50-EAB/p3, 表现出一定的负效应 (图 1, 图 2)。这与我们预期的结果相反, 但说明过表达转酮酶基因并不能有效提高木糖的利用。

—●— W50-KAB 0.01 mol/L Xyl; —○— W50-EAB/p3 0.01 mol/L Xyl; —■— W50-KAB 0.1 mol/L Xyl; —□— W50-EAB/p3 0.1 mol/L Xyl
—●— W50-KAB 0.01 mol/L Glu+0.09 mol/L Xyl; —○— W50-EAB/p3 0.01 mol/L Glu+0.09 mol/L Xyl

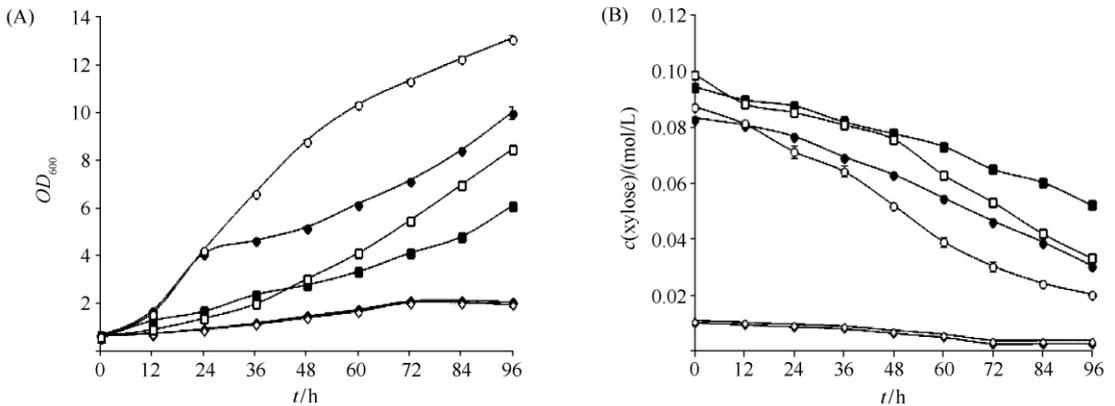


图 1. W50-EAB/p3 和 W50-KAB 在不同糖培养基的生长 (A) 和木糖消耗 (B)

Figure 1. Growth profile of W50-EAB/p3 and W50-KAB in different sugar medium (A) and the consumption of xylose.

—●— W50-CAB 0.01 mol/L Xyl; —○— W50-EAB/p3 0.01 mol/L Xyl; —■— W50-CAB 0.1 mol/L Xyl; —□— W50-EAB/p3 0.1 mol/L Xyl;
—●— W50-CAB 0.01 mol/L Glu+0.09 mol/L Xyl; —○— W50-EAB/p3 0.01 mol/L Glu+0.09 mol/L Xyl

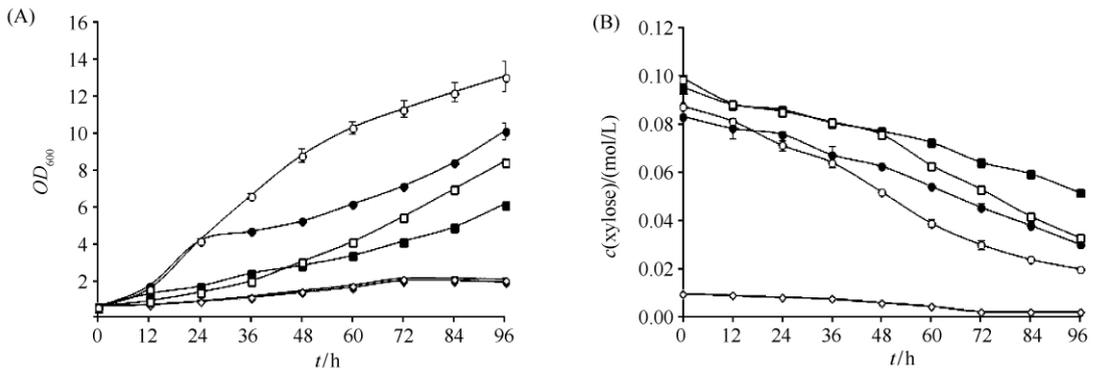


图 2. W50-EAB/p3 和 W50-CAB 在不同糖培养基的生长 (A) 和木糖消耗 (B)

Figure 2. Growth profile of W50-EAB/p3 and W50-CAB in different sugar medium (A) and the consumption of xylose (B).

2.3 转醛酶基因过表达重组菌株 W50-TAB 的发酵特性

转醛酶是磷酸戊糖途径非氧化阶段另一个关键酶, 我们进一步研究了过表达转醛酶基因 *tal* 对木糖代谢的影响。同样将重组菌株 W50-EAB/p3 和 W50-TAB 分别在含 0.01 mol/L 和 0.1 mol/L 木糖以及混合糖 (0.01 mol/L Glu + 0.09 mol/L Xyl) 的发酵培养基中培养, 在 0.01 mol/L 木糖培养基中菌体生长以及木糖消耗与对照菌 W50-EAB/p3 相当, 生长曲线和木糖消耗曲线几乎完全一致。而在 0.1 mol/L 木糖以及混合糖培养基下, 其最终生物量显著高于 W50-EAB/p3 并伴有明显的木糖消耗 (图 3)。在 0.1 mol/L 木糖培养时, 从 36 h 开始 W50-TAB 就表现出比对照菌株较快的生长速率和较高的生物量, W50-EAB 最大比生长速率为 0.035 h^{-1} 而 W50-TAB 最大比生长速率提高到了 0.039 h^{-1} , 最终生物量也提高了 28% (图 4); 在混合糖发酵中, W50-TAB 生长则略高于对照菌株 W50-EAB/p3, 从 48 h

才表现出明显的优势, 发酵 96 h 时 W50-TAB 菌体量 OD_{600} 达到 14.66, 相对对照菌株 OD_{600} 的 13.10, 其生物量提高了 11% (图 4)。这说明转醛酶基因在 W50-TAB 重组菌株内得到有效表达, 并且在一定程度上加快了磷酸戊糖途径非氧化阶段代谢流, 促进了重组菌对木糖的利用, 提高了对木糖的利用效率。

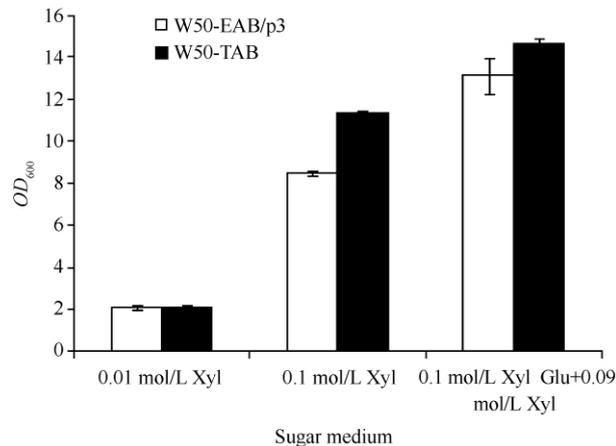


图 4. W50-EAB/p3 和 W50-TAB 在不同糖培养基的生物量

Figure 4. The biomass of W50-EAB/p3 and W50-TAB in different sugar medium.

2.4 醛还原酶基因敲除菌株 W50'-EAB 的构建以及发酵特性

以 W50-E 为出发菌株, 采用接合转移的方法将敲除载体 pWL3 导入 W50-E 中, 获得了醛还原酶基因 *h16_A3186* 敲除菌株 W50'-E。以引物 P7 和 P10 对 W50-E 和 W50'-E 进行菌落 PCR 验证 (图 5), 另外我们也对两种菌株的醛还原酶活力进行了测定, W50-E 的醛还原酶比活力为 $0.125 \pm 0.028 \text{ U/mg protein}$, 而未检测到敲除株 W50'-E 的醛还原酶活性。以上结果表明, W50-E 的醛还原酶基因敲除的菌株构建成功。然后将表达载体 p1-AB 电击转化 W50'-E, 筛选转化子命名为 W50'-EAB。

将重组菌株 W50-EAB 和 W50'-EAB 分别在含 0.01 mol/L 和 0.1 mol/L 木糖以及混合糖 (0.01 mol/L Glu + 0.09 mol/L Xyl) 的发酵培养基中培养。结果表明, 敲除株 W50'-EAB 在低浓度 0.01 mol/L 木糖发酵培养基生长和木糖消耗水平与对照菌株相当; 而在 0.1 mol/L 木糖和混合糖发酵培养基下生长速率和木糖消耗有了更进一步地提高。在 0.1 mol/L 木糖培养下, 从 24 h 开始则明显看出 W50'-EAB 生长速率高于对照菌株并且伴着明显的

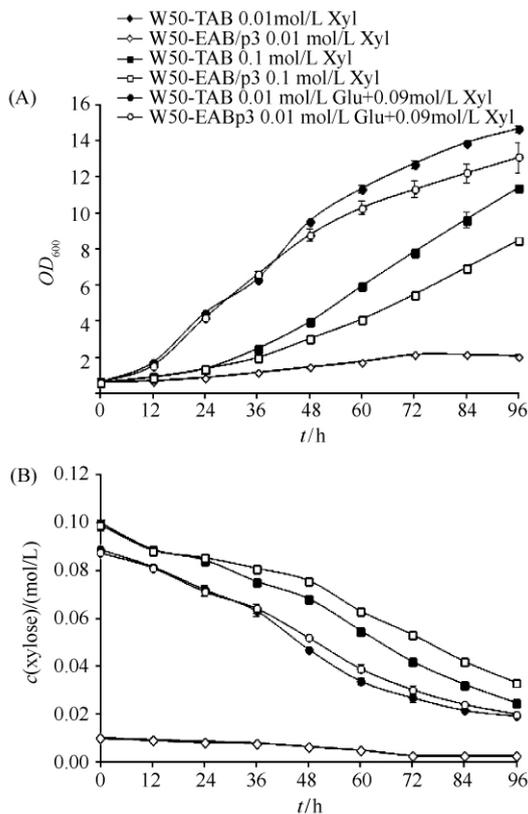


图 3. W50-EAB/p3 和 W50-TAB 在不同糖培养基的生长 (A) 和木糖消耗 (B)

Figure 3. Growth profile of W50-EAB/p3 and W50-TAB in different sugar medium (A) and the consumption of xylose (B).

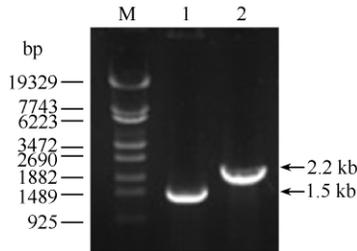


图 5. 敲除菌株 W50'-E 菌落 PCR 验证

Figure 5. Identification of mutant W50'-E by colony PCR using primers P7 and P10. M: λ /EcoT14 I digest DNA marker; lane 1: W50'-E; lane 2: W50-E.

木糖消耗, 24 h 后这种优势还在进一步扩大, 其最大比生长速率提高到 0.040 h^{-1} , 最终生物量也提高了 27.9%; 而在混合糖发酵下, 36h 内 W50'-EAB 表现出生长速率快的优势, 与对照菌相比最终生物量提高了 12.3%, 木糖消耗也从 36 h 开始有明显的差异, 培养到 96 h 时, W50'-EAB 发酵液中木糖浓度仅剩 0.01 mol/L (图 6, 表 4)。醛还原酶基因敲除后, 重组菌株在发酵初期就表现出生长优势, 在一定程度上缩短了发酵延迟期, 这说明醛还原酶对木糖代谢上游有抑制作用, 基因敲除后抑制解除, 木糖代谢速率得到了提高。

表 4. W50-EAB 和 W50'-EAB 在不同糖培养基的生物量的比较

Table 4. The comparison of biomass between W50-EAB and W50'-EAB

Medium	Biomass (OD_{600})	
	W50-EAB	W50'-EAB
0.01 mol/L Xyl	2.12 ± 0.07	2.22 ± 0.06
0.1 mol/L Xyl	8.48 ± 0.13	11.48 ± 0.13
0.01 mol/L Glu + 0.09 mol/L Xyl	13.8 ± 0.83	14.77 ± 0.22

2.5 重组菌 W50'-TAB 的发酵特性

过表达转醛酶基因可以加快磷酸戊糖途径非氧化阶段代谢流, 醛还原酶基因的敲除可以有效缩短发酵延迟期, 两种重组菌都表现出木糖利用能力的提高。因此我们将这两种优势组合起来, 希望进一步提高木糖的代谢速率。将表达载体 pWL1-TAL 电击转化 W50'-EAB, 筛选转化子命名为 W50'-TAB。

以 W50-EAB/p3 为对照菌株, 将 W50-EAB/p3 和 W50'-TAB 分别在 0.01 mol/L 和 0.1 mol/L 木糖以及混合糖 ($0.01 \text{ mol/L Glu} + 0.09 \text{ mol/L Xyl}$)

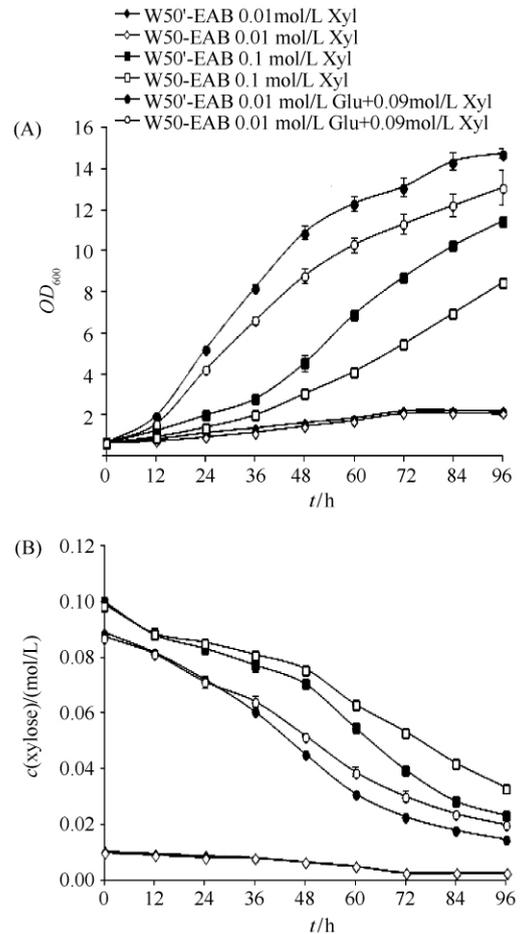


图 6. W50-EAB 和 W50'-EAB 在不同糖培养基的生长 (A) 和木糖消耗 (B)

Figure 6. Growth profile of W50-EAB and W50'-EAB in different sugar medium (A) and the consumption of xylose (B).

的发酵培养基中培养。结果表明, 两种优势的组合同时表现出进一步提高的生长速率和更加明显的木糖消耗。在低浓度木糖培养下, 仍然表现出与对照菌株相当的发酵水平, 而在 0.1 mol/L 木糖发酵培养基中, W50'-TAB 最大比生长速率提高到 0.042 h^{-1} , 延迟期进一步得到了缩短, 在 12 h 内就表现出生长速率的差异, 并且之后的发酵生长速率都远快于对照菌株, 最终生物量大约是对照菌株的 2.1 倍。在培养 36 h 后, 生物量甚至超过了对照菌株 W50-EAB/p3 在混合糖中对应时刻的水平, 而在发酵 48 h 后, 重组菌株 W50'-TAB 生长甚至慢慢趋近于自身在混合糖中的生长, 第 84 h 时, 菌体量几乎达到相同水平 (图 7, 表 5)。这充分说明两种优势的组合同时表现出更高的木糖利用能

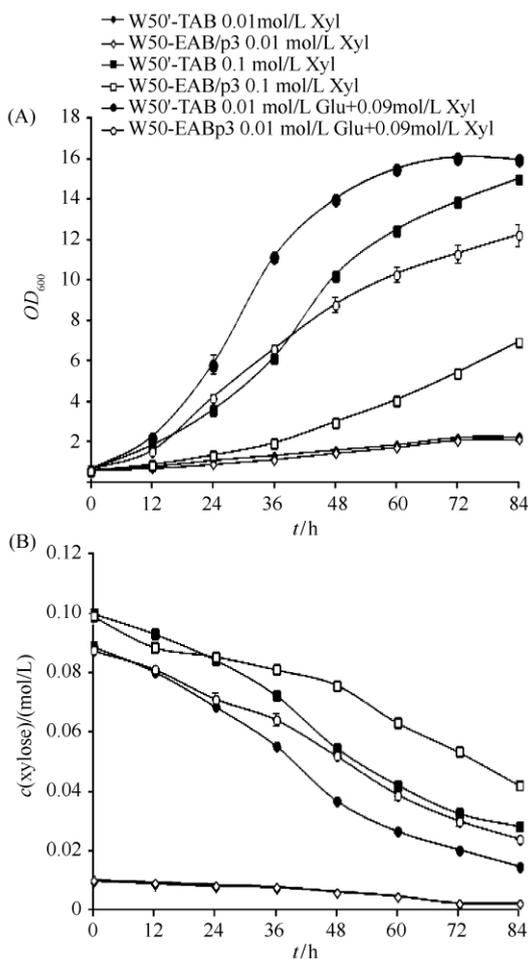


图 7. W50-EAB/p3 和 W50'-TAB 在不同糖培养基的生长 (A) 和木糖消耗 (B)

Figure 7. Growth profile of W50-EAB/p3 and W50'-TAB in different sugar medium (A) and the consumption of xylose (B).

表 6. 重组菌 W50-EAB, W50-TAB, W50'-EAB 和 W50'-TAB 在不同糖培养基的 PHB 含量的比较

Table 6. The comparison of PHB content between W50-EAB, W50-TAB, W50'-EAB and W50'-TAB

Medium	PHB (cell dry weight %)			
	W50-EAB	W50-TAB	W50'-EAB	W50'-TAB
0.01 mol/L Xyl	1.04 ± 0.01	1.16 ± 0.02	1.18 ± 0.11	1.23 ± 0.06
0.1 mol/L Xyl	16.2 ± 1.01	20.5 ± 0.76	19.8 ± 1.05	27.9 ± 0.47
0.01 mol/L Glu + 0.09 mol/L Xyl	25.4 ± 1.37	31.6 ± 1.05	30.1 ± 0.76	34.7 ± 0.65

力, 也进一步说明转醛酶和醛还原酶对木糖代谢的影响。质粒稳定性的试验结果表明, 发酵结束时, p1-AB 质粒保持率为 95%, pWL1-TAL 质粒保持率为 67%。

表 5. W50-EAB/p3 和 W50'-TAB 在不同培养基的生物量的比较

Table 5. The comparison of biomass between W50-EAB/p3 and W50'-TAB

Medium	Biomass (OD ₆₀₀)	
	W50-EAB/p3	W50'-TAB
0.01 mol/L Xyl	2.09 ± 0.05	2.26 ± 0.06
0.1 mol/L Xyl	6.97 ± 0.11	15.04 ± 0.13
0.01 mol/L Glu + 0.09 mol/L Xyl	12.23 ± 0.83	15.77 ± 0.22

2.6 PHB 含量测定

上述结果表明, 转醛酶基因的过表达和醛还原酶基因的敲除明显提高了重组菌对木糖的利用能力。我们进一步考察了重组菌 W50-TAB, W50'-EAB 以及 W50'-TAB 利用木糖积累 PHB 的能力。结果显示重组菌株在低浓度木糖培养下, PHB 积累与对照菌株水平相当, 而在高浓度木糖和混合糖培养下, PHB 积累量都得到了明显的提高, 在 0.1 mol/L 木糖培养下, 相比于对照菌株, W50-TAB, W50'-EAB 以及 W50'-TAB 的 PHB 含量分别提高了 26.5%, 22.2% 和 72.2%, 在混合糖培养下, W50-TAB, W50'-EAB 以及 W50'-TAB 的 PHB 含量分别提高了 24.4%, 18.5% 和 36.6% (表 6)。

3 讨论

本文首次研究了 *R. eutropha* 木糖利用的相关限速靶点。对具有木糖代谢能力的重组菌株 W50-

EAB 磷酸戊糖途径非氧化阶段和醛还原酶靶点进行修饰, 最终获得的重组菌株 W50-TAB, W50'-EAB 以及 W50'-TAB 木糖代谢能力得到了进一步提高。

磷酸戊糖途径非氧化阶段是木糖代谢的必经阶段, 而转醛酶和转酮酶是磷酸戊糖途径非氧化阶段

的两个关键酶, *R. eutropha* 含有这两种酶, 但是酶活测定结果表明重组菌 W50-EAB 中这两种酶的活性都比较低, 我们从 *R. eutropha* 克隆了转酮酶和转醛酶基因, 并置于组成型启动子 $P_{phac}^{[21]}$ 控制之下, 导入 W50-EAB 得到重组菌株 W50-KAB, W50-CAB 以及 W50-TAB。发酵分析发现, 转醛酶基因的过表达对重组菌株 W50-TAB 木糖代谢有明显的促进作用, 相比于对照菌, 最大比生长速率和木糖消耗速率以及 PHB 积累量都有了一定提高。有趣的是转酮酶基因的过表达反而引起了重组菌生长缓慢, 生物量低, 以及木糖消耗速率慢的现象。相似的结果也出现在酿酒酵母木糖发酵研究中, Metzger MH 在含有木糖还原酶基因和木糖脱氢酶基因的酿酒酵母重组菌中引入来自毕赤酵母的转酮酶基因, 但是转酮酶基因的过表达并没有加快木糖的利用, 反而发现新的中间产物 7-磷酸景天庚酮糖的积累, 7-磷酸景天庚酮糖是转醛酶的底物, 所以 Metzger 和 Hollenberg 推测转醛酶是磷酸戊糖途径非氧化阶段的限制因素^[22]。Walfridsson 等根据 Metzger 和 Hollenberg 的推测在研究含有转酮酶和转醛酶以及木糖还原酶、木糖醇脱氢酶基因的酿酒酵母重组菌株利用木糖的影响时发现, 过表达转酮酶基因 *TKL1* 对木糖的利用影响不大而转醛酶基因 *TAL1* 的过表达可以增强重组菌株对木糖的利用, 同时过表达 *TKL1* 和 *TAL1* 基因的重组酿酒酵母菌株利用木糖的能力略强于仅提高转醛酶活性的菌株^[23]。我们的实验结果以及对酿酒酵母重组菌株的研究在一定程度上都说明以木糖为碳源发酵时, 转醛酶在磷酸戊糖途径非氧化阶段起着关键作用。而对于转酮酶基因过表达结果无作用或产生负作用, 我们初步推测是因为转酮酶催化两个可逆反应, 涉及 4 对中间产物的相互转化, 其中有 1 对中间产物是转醛酶的催化底物, 我们希望木糖代谢流能经过磷酸戊糖途径后进入糖酵解或者 ED (Entner-Doudoroff) 途径, 在重组菌株 W50-KAB 和 W50-CAB 利用木糖发酵时, 提高转酮酶酶活性能加快中间产物的生成, 但是转醛酶活性如果不够则会导致中间产物在细胞内积累, 木糖代谢流就在磷酸戊糖途径非氧化阶段会受到阻碍, 这从另一个方面也说明转醛酶对磷酸戊糖途径非氧化阶段更为重要。本工作研究了单独过表达转醛酶基因对

重组菌木糖利用能力的影响, 但是转酮酶, 转醛酶基因协同表达能否对 *R. eutropha* 重组菌提高木糖利用能力还在研究中。另外, Björn Johansson 研究比较了酿酒酵母单独过表达磷酸戊糖途径非氧化阶段所有代谢酶基因 (转酮酶, 转醛酶, 5-磷酸核酮糖差向异构酶, 5-磷酸核酮糖异构酶) 和同时共表达这四种基因对木糖发酵的作用, 结果发现单独过表达代谢基因重组菌株中, 只有转醛酶基因过表达重组菌株有效促进木糖的代谢, 但是 4 种代谢酶基因的共表达更进一步加快了磷酸戊糖途径非氧化阶段的代谢流^[11]。在 *R. eutropha* 重组菌中是否存在四种酶基因的协同效应尚需进一步验证。

R. eutropha H16 的全基因组测序已于 2006 年完成, 通过对其基因组的研究发现, 只有一个与木糖代谢直接相关的醛还原酶, 催化醛糖转化成糖醇的反应。目前还没有对此酶的相关报道, 我们对重组菌 W50-EAB 木糖发酵后的产物进行液相分析, 发现重组菌胞外并没有木糖醇的积累。醛还原酶基因敲除株 W50'-EAB 发酵结果表明, 在 PN 培养基培养时生长与对照菌一致, 而在发酵培养基中则表现出增强的木糖利用和 PHB 积累, 这说明醛还原酶对木糖代谢有一定的阻碍作用。酿酒酵母中也含有类似代谢酶, 通过氨基酸序列比对, 两种酶同源性达到 61.9%。Träff 报道酿酒酵母菌中 *GRE3* 基因编码一种非特异性醛还原酶, 同样可以将木糖转化成木糖醇, 并且这种酶可以导致木糖发酵过程中木糖醇副产物的积累。Träff 和 Marko Kuyper 等进一步研究发现 *GRE3* 基因敲除株引入木糖代谢基因进行发酵, 发酵产物中乙醇含量明显提高而木糖醇含量明显降低^[24-25]。Träff 推论醛还原酶会导致木糖醇的积累, 过多的木糖醇会抑制木糖异构酶催化木糖转化成木酮糖^[25]。而本工作中重组菌株 W50-EAB 发酵产物中并没有检测到木糖醇的积累, 并且生物信息学分析显示 *Ralstonia eutropha* 没有木糖醇相关代谢基因, 醛还原酶如何影响 *R. eutropha* 重组菌株木糖代谢尚需进一步研究。另一方面, 醛还原酶催化木糖转化成木糖醇的反应需要消耗 NADPH 还原力, 醛还原酶可能与 *R. eutropha* 维持细胞平衡有关, 而 *R. eutropha* 中 PHB 是在细胞处于不平衡的状态下积累的, 并且 PHB 的合成也需要消耗 NADPH。

所以我们推测这可能是醛还原酶敲除株 W50⁻EAB 的 PHB 积累量提高的原因。

转醛酶基因的过表达和醛还原酶基因的敲除都可以增强重组菌对木糖的利用, 将两种优势结合起来则表现出更进一步的增强。但是这种增强作用只是表现在高浓度木糖发酵和混合糖发酵下, 在低浓度 0.01 mol/L 木糖培养下, W50-TAB, W50⁻EAB 和 W50⁻TAB 的生物量, 木糖消耗以及 PHB 积累量都与对照菌株表现出同样的水平, 这说明有限制因素影响了低浓度木糖的转运和吸收, 这就需要更高亲和力的特异性木糖转运蛋白。相比于 H⁺ 共转运体蛋白 XylE, *E. coli* W3110 木糖特异转运蛋白复合物 XylFGH 有更高的木糖转运活性^[26]。推测导入更高亲和力的木糖转运蛋白将能进一步提高菌株对木糖的利用效率, 这部分工作正在进行中。

木质纤维素水解液含有多种糖类, 所以重组菌株需高效共利用水解液中的碳源。刘凯研究发现少量葡萄糖的存在可以促进重组菌株 W50-EAB 对木糖的利用, 并且不存在葡萄糖效应^[4]。但是实际水解液中的葡萄糖含量是木糖的 3 倍, 关于在此比例下重组菌的生长以及对这两种糖的共利用情况正在研究中。

参考文献

- [1] 陈国强, 罗荣聪, 徐军, 吴琼. 聚羟基脂肪酸酯生态产业链—生产与应用技术指南. 北京: 化学工业出版社, 2008: 1-19.
- [2] Lee J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Biotechnology*, 1997 (56) : 1-24.
- [3] Yi Z, Huang H, Weng W, Chen Q, Chen D, Zheng P. Studies on poly- β -hydroxybutyrate by the mutant 65-7 of *Alcaligenes eutrophus*. *Microbiology China*, 1995, 22 (1) : 29-31. (in Chinese)
易祖华, 黄和容, 翁维琦, 陈琦, 陈东, 郑平弟. 真氧产碱杆菌突变株 65-7 产聚羟基丁酸的研究. 微生物学通报, 1995, 22 (1) : 29-31.
- [4] Liu K, Liu G, Zhang Y, Ding J, Weng W. Engineering of a D-xylose metabolic pathway in *Ralstonia eutropha* W50. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54 (1) : 42-52. (in Chinese)
刘凯, 刘桂明, 张英姿, 丁久元, 翁维琦. 罗氏真养菌 W50 的 D-木糖代谢途径工程改造. 微生物学报, 2014, 54 (1) : 42-52.
- [5] Aparna VS, Betty LM, Lobo Z, Joseph AS, Clement EF, Benjamin DH. Expression of the *Escherichia coli* xylose isomerase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1987, 53 (9) : 1996-2000.
- [6] Catharine JM, Isak SP, Willem HV. Cloning and expression of the *Clorstridium thermosulfurogenes* D-xylose isomerase gene (*xylA*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 1996, 18 (3) : 269-274.
- [7] Kathleen AB, Willem EL, Brian SH. Molecular cloning, DNA structure and expression of the *Escherichia coli* D-xylose isomerase. *The EMBO Journal*, 1984, 3 (3) : 611-616.
- [8] Kuyper M, Harhangi H, Stave AK, Winkler AA, Jetten M, Delaat W, Denridder J, Opdenkamp H, Vandijken J, Pronk J. High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: the key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae*? *FEMS Yeast Research*, 2003, 4 (1) : 69-78.
- [9] Walfridsson M, Bao X, Anderlund M, Lilius G, Bülow L, Hahn-Hägerdal B. Ethanolic fermentation of Xylose with *Saccharomyces cerevisiae* harboring the *Thermus thermophilus xylA* Gene, which expresses an active Xylose (Glucose) Isomerase. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62 (12) : 4648-4651.
- [10] Amore R, Wilhelm M, Hollenberg CP. The fermentation of xylose - an analysis of the expression of *Bacillus* and *Actinoplanes* xylose isomerase genes in yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1989, 30: 351-357.
- [11] Johansson B, Hahn-Hägerdal B. The non-oxidative pentose phosphate pathway controls the fermentation rate of xylulose but not of xylose in *Saccharomyces cerevisiae* TMB3001. *FEMS Yeast Research*, 2002, 2 (2002) : 277-282.
- [12] Simon R, Prierer U, Pühler A. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Nature Biotechnology*, 1983, 1 (9) : 784-789.
- [13] Lu X, Liu G, Wang Y, Ding J, Weng W. Engineering of an L-arabinose metabolic pathway *Ralstonia eutropha* W50. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53 (12) : 1267-1275. (in Chinese)
卢雪梅, 刘桂明, 王宇, 丁久元, 翁维琦. 罗氏真养菌

- W50 的 L-阿拉伯糖代谢途径工程改造, 微生物学报, 2013, 53 (12) : 1267-1275.
- [14] Kavach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop II RM, Peterson KM. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*, 1995, 166 (1) : 175-176.
- [15] Peplinski K, Ehrenreich A, Döring C, Bömeke M, Reinecke F, Hutmacher C, Steinbuechel A. Genome-wide transcriptome analyses of the 'Knallgas' bacterium *Ralstonia eutropha* H16 with regard to polyhydroxyalkanoate metabolism. *Microbiology*, 2010, 156 (Pt 7) : 2136-2152.
- [16] Chen Q, Yi Z, Huang H. Breeding of glucose utilizing mutants for poly- β -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.
- [17] Christina N, Alibu VP, Brock JM, Veitch NJ, Burchmore R, Barrett MP. A new erythrose 4-phosphate dehydrogenase coupled assay for transketolase. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2008, 70 (6) : 1185-1187.
- [18] Bruinenberg PM, Vandijken JP, Scheffers WA. An enzymic analysis of NADPH production and consumption in *Candida utilis*. *General Microbiology*, 1983 (129) : 965-971.
- [19] Das B, Satish KS. Purification and properties of aldose reductase and aldehyde reductase II from human erythrocyte. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1985, 238 (2) : 670-679.
- [20] Desai TA, Rao CV. Regulation of arabinose and xylose metabolism in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76 (5) : 1041-1052.
- [21] 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.
- [22] Metzger MH, Hollenberg CP. Isolation and characterization of the *Pichia stipitis* transketolase gene and expression in a xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae* transformant. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1994, 42 : 319-325.
- [23] Walfridsson M, Hallborn J, Penttilä M, Keränen S, Hahn-Hägerdal B. Xylose-metabolizing *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressing the *TKL1* and *TAL1* genes encoding the pentose phosphate pathway enzymes transketolase and transaldolase. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61 (12) : 4184-4190.
- [24] Kuyper M, Hartog MM, Toirkens MJ, Almering MJ, Winkler AA, van Dijken JP, Pronk JT. Metabolic engineering of a xylose-isomerase-expressing *Saccharomyces cerevisiae* strain for rapid anaerobic xylose fermentation. *FEMS Yeast Research*, 2005, 5 (4-5) : 399-409.
- [25] Tr äff KL, Otero Cordero RR, van Zyl WH, Hahn-Hägerdal B. Deletion of the *GRE3* aldose reductase gene and its influence on xylose metabolism in recombinant strains of *Saccharomyces cerevisiae* expressing the *xylA* and *XKS1* genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67 (12) : 5668-5674.
- [26] Jojima T, Omumasaba CA, Inui M, Yukawa H. Sugar transporters in efficient utilization of mixed sugar substrates: current knowledge and outlook. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85 (3) : 471-480.

Limiting metabolic steps in the utilization of D-xylose by recombinant *Ralstonia eutropha* W50-EAB

Lu Wang^{1, 2}, Guiming Liu¹, Yingzi Zhang¹, Yu Wang¹, Jiuyuan Ding¹, Weiqi Weng^{1*}

¹Key Laboratory of Microbial Physiological and Metabolic Engineering, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100449, China

Abstract: [Objective] To further improve the efficiency of xylose fermentation by modifying the pentose phosphate pathway (PPP) and the aldehyde reductase gene *h16_A3186* in *Ralstonia eutropha* W50-EAB. [Methods] The transketolase (*tktA*, *cbbT2*) and transaldolase (*tal*) gene were cloned from *R. eutropha* chromosome by PCR and inserted into expressing vector pBBR1MCS-3. The resulting recombinant plasmids were transformed into W50-EAB to generate W50-KAB, W50-CAB and W50-TAB, respectively. The aldehyde reductase gene *h16_A3186* was shortened from 834 bp to 135 bp by in-frame deletion from strain W50-E in which the *xytE* gene coding for xylose transporter was chromosomally integrated to construct recombinant strain W50'-E. Then the *xytAB* gene coding for xylose isomerase and xylulokinase from *Escherichia coli* were expressed in W50'-E to generate recombinant strain W50'-EAB. Recombinant plasmid pWL1-TAL was transformed into W50'-EAB to construct the strain W50'-TAB. The fermentation characteristics of the engineered strains were investigated. [Results] The expression of *tktA*, *cbbT2* and *tal* genes in *R. eutropha* W50-EAB was confirmed by enzyme assay. The deletion of *h16_A3186* gene was confirmed by PCR analysis and enzyme assay. Amplification of transketolase activity in *R. eutropha* W50-EAB showed negative effect on cell growth and D-xylose consumption. The recombinant strain W50-TAB and W50'-EAB exhibited a faster growth than W50-EAB with the maximum specific growth rate of 0.039 h⁻¹ and 0.040 h⁻¹, respectively, when cultivated on 0.1 mol/L D-xylose. And the PHB accumulation of W50-TAB and W50'-EAB reached 16.2 ± 1.01% and 19.8 ± 1.05% on the basis of cell dry weight, respectively. Furthermore, recombinant strain W50'-TAB exhibited better fermentation performance with the maximum specific growth rate of 0.042 h⁻¹ and PHB content of 27.9 ± 0.47%, respectively. Meanwhile, the recombinant strains W50-TAB, W50'-EAB and W50'-TAB showed higher biomass and more PHB accumulation when using glucose (0.01 mol/L) and D-xylose (0.09 mol/L) mixed sugars as fermentative substrate. [Conclusion] Overexpression of the *tal* gene resulted in increased D-xylose consumption. Deficiency of the aldehyde reductase relieved inhibition to D-xylose metabolism. Combination of the two strategies contributed to a higher efficiency of D-xylose utilisation and more PHB accumulation of the engineered *R. eutropha* strain.

Keywords: *R. eutropha* W50-EAB, D-xylose metabolism, poly-β-hydroxybutyrate, pentose phosphate pathway, aldehyde reductase

(本文责编: 张晓丽)

* Corresponding author. Tel: +86-40-64807360; E-mail: wengwq@im.ac.cn

Received: 14 April 2014/Revised: 3 June 2014