(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2012 年 8 月 30 日 (30.08.2012)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2012/113120 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 15/61 (2006.01) *C12P 5/02* (2006.01)
C12N 9/90 (2006.01) *C12P 7/20* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) *C12P 35/00* (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) *C12P 37/00* (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) *C12P 7/06* (2006.01)
C12P 7/54 (2006.01) *C12P 19/24* (2006.01)
C12P 7/56 (2006.01) *C12R 1/85* (2006.01)
C12P 7/50 (2006.01) *C12R 1/645* (2006.01)
C12P 13/00 (2006.01) *C12R 1/01* (2006.01)
C12P 7/18 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2011/001014

(22) 国际申请日: 2011 年 6 月 20 日 (20.06.2011)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201110042170.2 2011 年 2 月 22 日 (22.02.2011) CN

(71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): **山东大学 (SHAN DONG UNIVERSITY)** [CN/CN]; 中国山东省济南市历城区山大南路 27 号, Shandong 250100 (CN)。

(72) 发明人; 及

(75) 发明人/申请人 (仅对美国): **鲍晓明 (BAO, Xiaoming)** [CN/CN]; 中国山东省济南市历城区山大南路 27 号, Shandong 250100 (CN)。 **沈煜 (SHEN, Yu)** [CN/CN]; 中国山东省济南市历城区山大南路 27 号, Shandong 250100 (CN)。 **葛瑞蕾 (GE, Ruilei)** [CN/CN]; 中国山东省济南市历城区山大南路 27 号, Shandong 250100 (CN)。

(74) 代理人: **济南圣达知识产权代理有限公司 (JINAN SHENGDA INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY**

[见续页]

(54) **Title**: NUCLEIC ACID MOLECULE ENCODING XYLOSE ISOMERASE AND XYLOSE ISOMERASE ENCODED THEREOF

(54) **发明名称**: 一种编码木糖异构酶的核酸分子及其编码的木糖异构酶

(57) **Abstract**: A new nucleotide sequence of xylose isomerase obtained from the metagenomic library of cattle rumen liquor and the amino acid sequence encoded thereof, vectors and transformants containing the said nucleotide sequence are provided. The said xylose isomerase which expresses in Saccharomyces cerevisiae with high-activity is mesophilic, and its optimum temperature is 60℃. Uses of the said xylose isomerase in producing fuel ethanol and high fructose corn syrups are also provided.

(57) **摘要**:

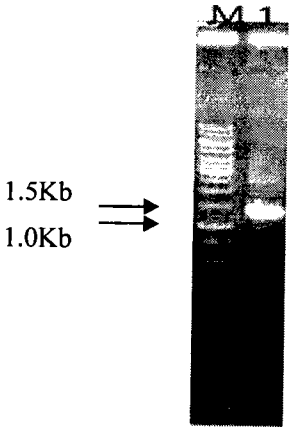


图 1 / FIG. 1

M:1kb DNA Ladder

1:RuXI

提供一种从牛瘤胃液宏基因组文库中获得的新的木糖异构酶核苷酸序列及其编码的氨基酸序列，以及含有所述核苷酸序列的载体及转化体。所述木糖异构酶在酿酒酵母内高活性表达，且该酶为嗜温性酶，最适酶活温度为60℃。还提供了所述木糖异构酶在生产燃料乙醇、高果糖浆中的应用。

WO 2012/113120 A1

CO., LTD); 中国山东省济南市历下区千佛山路 3 号, Shandong 250061 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则 4.17 的声明:

— 关于申请人有权申请并被授予专利(细则 4.17(ii))

— 发明人资格(细则 4.17(iv))

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

— 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

一种编码木糖异构酶的核酸分子及其编码的木糖异构酶

技术领域

本发明涉及一种新的编码木糖异构酶的核酸分子及其编码的木糖异构酶。本发明涉及木糖异构酶酶学性质的研究。本发明涉及木糖异构酶在酶基因工程技术领域的应用。本发明还涉及用编码木糖异构酶的核酸序列转化的宿主细胞。

背景技术

石油价格的持续上涨和温室效应引起的全球变暖，使得人们越来越重视可再生能源的开发和利用。生物质能便是一种重要的可再生能源，以生物质为原料生产燃料乙醇具有广阔的发展空间。长期以来，人们利用淀粉和糖类发酵生产乙醇。这些原料成本较高，大大限制了生物质燃料乙醇产业的发展。在全球每年光合作用生产的高达 1500 亿吨～2000 亿吨的生物质中80%以上为木质纤维素类物质，它十分廉价且容易获得，因此以木质纤维素为原料生产燃料乙醇，具有重要的实践意义。木质纤维素是纤维素、半纤维素和木质素等的聚合物。利用酸解或酶解的方法可将木质纤维素转化为大量的五碳糖(木糖和阿拉伯糖) 和六碳糖(葡萄糖、半乳糖和甘露糖)。木糖在大多数木质纤维素水解物中是含量仅次于葡萄糖的一种单糖，可达 30%。分析表明，充分利用木质纤维素原料中的木糖发酵生产乙醇能使乙醇产量在原有基础上提高 25%(Nigam et al., J Appl Microbiol, 2001, 90(2): 208-215)。但是，大部分能够进行乙醇发酵的酿酒酵母(*Saccharomyce cerevisise*)不能够以木糖作为碳源。所以，如何通过对已有菌株进行改造使其能高效利用木糖产乙醇已成为使木质纤维素资源得以充分利用的关键问题之一。

自然界利用木糖的酵母菌同化木糖的最初两步反应是在木糖还原酶(xylose reductase, XR)及木糖醇脱氢酶(xylitoldehydrogenase, XDH)催化下完成的。木糖首先在 XR 的催化下，还原成木糖醇，随后由 XDH 氧化成木酮糖(Träff et al., Appl Environ Microbiol, 2001, 67: 5668-5674)。在大多数细菌，如 *E. coli* 和 *Bacillus* 等中，木糖通过木糖异构酶(XI)直接转化为木酮糖(Träff et al., Appl Environ Microbiol, 2001, 67: 5668-5674)。然后，木酮糖在木酮糖激酶(XK)的作用下转变成 5-磷酸木酮糖，进入磷酸戊糖途径。酿酒酵母(*Saccharomyce cerevisise*)具有高的酒精产量和产率，对抑制因子以及发酵过程中的不利因素的高耐受性，对高浓度酒精的耐受以及非致病性等优良特性。但由于缺乏木糖代谢的最初两个酶 XR 和 XDH 而不能代谢木糖。为了使酿酒酵母具有发酵木糖的能力，将依赖 NAD(P)H 的 XR 及依赖 NAD+的毕赤酵母 XDH 克隆到其中，得到能够发酵木糖生产酒精的重组菌

确认本

(Walfridsson et al.,Appl Environ Microbiol, 1995, 61: 4184-4190 ;Sedlak et al.,Appl Biochem Biotechnol, 2004,113-116: 403-416)。但同时带来的问题是: XR 对 NADPH 的亲和性远远大于 NADH, 这就导致在 XDH 催化的木糖醇氧化成木酮糖的过程中, 辅因子的不平衡,其直接后果就是副产物木糖醇的积累和甘油等的生成,从而影响终产物酒精的产量。木糖异构酶因不需要辅助因子, 因此它再次受到研究者们的注意(Kuyper et al.,FEMS Yeast Research, 2004, 4: 655-664)。

木糖异构酶(Xylose isomerase, XI) (EC5.3.1.5)可以催化五碳糖 D-木糖转化为 D-木酮糖，微生物体内的糖代谢工程起着重要的作用；在体外亦能催化 D-葡萄糖到 D-果糖的异构化反应，所以又称为葡萄糖异构酶。在基础研究方面, 由于该酶的结构非常稳定, 是研究蛋白质结构与功能关系较好的模型之一(Bhosale et al., Protein Eng Des Sel,12004, 17(12) : 861- 869)。更重要的是，木糖异构酶所具有的极其重要的工业应用价值, 使它和蛋白酶及淀粉酶并称为重要的工业用酶(田沈等微生物学通报，2007, 34(2) : 355- 358; Bhosale et al., Microbiol Rev, 1996, 60 (2) :280 - 300）而引起科学家们的关注, 并对其开展了较为广泛的研究。从上个世纪 70 年代以来, 木糖异构酶的应用主要集中在高果糖浆生产和燃料乙醇产生两个方面。然而, 近几年，科学家研究发现, 在一定条件下木糖异构酶可以转化生产许多制药工业重要的原料稀有糖, 如核糖、甘露糖、阿拉伯糖、来苏糖等(Karimaki et al.,Protein Eng Des Se,12004, 17(12) : 861- 869)。这些发现为木糖异构酶的研究注入新的活力。

据报道,虽然多种细菌来源的木糖异构酶基因都曾被插入到酿酒酵母中,但是常见嗜温性原核生物的 XI 在酿酒酵母中不能表达有活性的 XI。在目前已公布的约 450 个木糖异构酶氨基酸序列中，两种来自嗜热细菌的 XI 在酿酒酵母中表达产物在 85℃下具有 1U/mg 的木糖异构酶特异活性，但是，在酿酒酵母的生理温度（30℃）仅仅保留这种活性的极少部分。其他来源的能够在酿酒酵母中活性表达的木糖异构酶基因来源包括真菌 *Piromyces sp*-E2, *Orpinomyces sp*-Ukk1, *Cyllamyces aberensis* 和细菌 *Clostridium phytofermentans*, *Clostridium difficile*, *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium-mortiferum* 及 *Ciona intestinalis*。其中，仅仅有真菌 *Piromyces sp*-E2, 细菌 *Clostridium phytofermentans* 来源的木糖异构酶在酿酒酵母中得到较高活性表达，尤其是前者的活性更高。

发明内容

针对上述现有技术，本发明提供了一种新来源的嗜温性木糖异构酶，及编码该酶的基因，以及表达该酶的宿主细胞。

本发明是通过以下技术方案实现的：

一种编码木糖异构酶的核酸分子，其序列为以下核苷酸序列之一：

（1）SEQ ID NO. 1所示的核苷酸序列；

（2）SEQ ID NO. 1 所示的核苷酸序列添加、取代、缺失或插入一个或多个核苷酸的具有至少40%序列一致性的同源序列；

（3）在严格条件下，与(1)或（2）的核苷酸序列杂交的核苷酸序列；

（4）由于遗传密码子的简并性区别于（3）的核苷酸序列的核苷酸序列。

一种木糖异构酶，其序列为以下氨基酸序列之一：

（1）SEQ ID NO. 2所示的氨基酸序列；

（2）SEQ ID NO. 2 所示的氨基酸序列添加、取代、缺失或插入一个或多个氨基酸的具有至少40%序列一致性的同源序列。

本发明的编码木糖异构酶的核苷酸编码的氨基酸不包括选自以下各组的氨基酸序列：

（1）*Piromyces sp*-E2木糖异构酶 在WO 03/062340中公开的序列；

（2）*Bacteroides thetaiotaomicron*木糖异构酶 在WO 04/099381和WO 06/009434中公开的序列；

（3）*Cyllamyces aberensis*木糖异构酶 在WO 04/099381中公开的序列；

（4）*Orpinomyces sp*-Ukk1 木糖异构酶在 Madhavan et al.(2008,supra) 中公开的序列；

（5）*Clostridium difficile*，*Fusobacterium-mortiferum*及*Ciona intestinalis*的木糖异构酶在WO 2010/074577中公开的序列。

本发明的编码木糖异构酶的核苷酸编码的氨基酸序列,其序列不包括选自以下各组的氨基酸序列：序列一致性高于选自以下各组的氨基酸序列的99，98,97,96,95,94,93,92,91,90,89,88,87,86,85,84,83,82,81,80,79,78,77,76,75,74,73,72,71或70%的氨基酸序列。

（1）*Piromyces sp*-E2木糖异构酶 在WO 03/062340中公开的序列；

（2）*Bacteroides thetaiotaomicron*木糖异构酶 在WO 04/099381和WO 06/009434中公开的序列；

（3）*Cyllamyces aberensis*木糖异构酶 在WO 04/099381中公开的序列；

（4）*Orpinomyces sp*-Ukk1 木糖异构酶在 Madhavan et al.(2008,supra) 中公开的序列；

（5）*Clostridium difficile*，*Fusobacterium-mortiferum* 及 *Ciona intestinalis* 的木糖异构酶在 WO 2010/074577 中公开的序列。

所述木糖异构酶在化工、食品和医疗等领域的应用。

本发明的木糖异构酶具有的极其重要的工业应用价值，其应用主要集中在高果糖浆生产和燃料乙醇产生两个方面。在一定条件下木糖异构酶还可以转化生产许多制药工业重要的原料稀有糖，如核糖、甘露糖、阿拉伯糖、来苏糖等。在基础研究方面，由于该酶的结构非常稳定，是研究蛋白质结构与功能关系较好的模型之一。

一种重组载体，其含上述的编码木糖异构酶的核酸分子的完整编码阅读框序列。

一种重组细胞，其宿主细胞为细菌、酵母或丝状真菌，优选具有厌氧乙醇发酵能力的酵母；宿主细胞内含有上述的重组载体，编码木糖异构酶的核苷酸序列被可操作地连接于宿主细胞中引起木糖异构酶充分表达的启动子，从而赋予了宿主胞将木糖异构化木酮糖的能力。

所述宿主细胞优选含有主动糖酵解、戊糖磷酸途径和含有木酮糖激酶活性使得从木糖异构得到的木酮糖可以被代谢为丙酮酸的宿主细胞。

所述宿主细胞优选含有将丙酮酸转化为期望的分解代谢物如乙醇、乙烯或乳酸的酶的宿主细胞。

所述宿主细胞优选具有厌氧乙醇发酵能力的酵母；

所述宿主细胞还优选对乙醇和有机酸如乙酸、乳酸或蚁酸及糖分解代谢物如糠醛和羟甲基糠醛具有耐受能力的宿主细胞。

上述宿主细胞的这些特征或活性之一可以是天然存在于宿主细胞或通过遗传修饰被引入或改进。

所述宿主细胞包含一种遗传修饰，该遗传修饰降低非特异性醛糖还原酶活性。

所述宿主细胞具有将 L-阿拉伯糖转化为 D-木酮糖 5-磷酸的能力。

所述宿主细胞包含一种或多种遗传修饰，该遗传修饰产生选自如下一组的特征：

（1）增加木糖转运到宿主细胞内；

（2）木酮糖激酶活性增强；

（3）戊糖磷酸途径的流量增加；

（4）对分解代谢物阻遏的敏感性降低；

（5）对乙醇、渗透性或有机酸的耐受力增强；

（6）副产物生成下降；

（7）细胞电子链传递和氧化呼吸链阻断。

所述副产物被理解为是指含碳分子而不是期望的发酵产物，包括如木糖醇、甘油或乙酸。

所述遗传修饰由过度表达内源基因、表达异源基因或其组合组成，且所述基因选自下列基因：己糖或戊糖转运蛋白基因、木酮糖激酶基因、来自戊糖磷酸途径的酶的基因、糖酵解酶的基因或/和乙醇发酵相关的酶的基因。

所述宿主细胞表达一种或多种酶，所述的酶赋予宿主细胞产生乳酸、乙酸、琥珀酸、氨基酸、1,3-丙二醇、乙烯、甘油、β-内酰胺抗生素或/和头孢菌素等系列代谢产物的能力。

一种利用上述重组细胞生产发酵产物的方法：宿主细胞发酵含有木糖原料或/和葡萄糖原料的培养基，然后分离纯化发酵产物，所述发酵产物为乳酸、乙酸、琥珀酸、氨基酸、1,3-丙二醇、乙烯、甘油、β-内酰胺抗生素或/和头孢菌素。

上述被转化的宿主细胞异构木糖为木酮糖的能力是直接将木糖异构化为木酮糖，不同于木糖通过木糖醇过度两步转化为木酮糖，其分别由木糖还原酶和木糖醇脱氢酶催化。

本发明的编码木糖异构酶的核苷酸序列以活性形式在被转化的宿主细胞中表达，因此，核苷酸序列在宿主细胞中表达生成具有特定活性的木糖异构酶。在被转化的宿主细胞中表达的木糖异构酶特异性活性在此定义为宿主细胞的无细胞溶解产物如酵母的无细胞溶解产物中的每 mg 蛋白的木糖异构酶活性单位量。木糖异构酶活性的确定、蛋白含量和无细胞溶解产物的制备在下述实施例 2 中描述。新木糖异构酶在酿酒酵母中高活性表达。30℃下，采用 XI-SDH 一步法测定木糖异构酶酶活(Kuyper et al.,FEMS Yeast Research,2003, 4:69-78)，该酶酶活为 1.3U/mg,高于 *Piromyces sp*-E2 来源的木糖异构酶酶活 1.1U/mg（Kuyper et al.,FEMS Yeast Research,2003, 4:69-78）。但是新来源的木糖异构酶是一种嗜温性木糖异构酶，最适酶活温度在 60℃（图 3）。

附图说明

图 1：验证重组细胞中含有木糖异构酶基因 RuXI。以反提重组酵母质粒为模板，特异性引物 BamHI-GXI-F, SbfI-GXI-R（表 1）扩增 RuXI。M:Marker,1kbDNA ladder 1: RuXI；

图 2：验证重组细胞中含有木糖异构酶基因 RuXI。将反提质粒反转到大肠杆菌 DH5α 中，提取质粒，*Bam*HI 和 *Sbf*I 双酶切验证结果。M:Marker,1kbDNA ladder 1:约 1.3kb 为 RuXI，约 6kb 的为线性载体 pJFE3；

图 3：酿酒酵母转化子的新木糖异构酶最适酶活温度测定；

图 4：酿酒酵母转化子在含有 20g/L 葡萄糖、20g/L 木糖作为碳源的培养基中的生长曲线；

图 5：酿酒酵母转化子在含有 20g/L 木糖作为唯一碳源的培养基中的生长曲线；

图 6：酿酒酵母转化子在含有 20g/L 木糖作为唯一碳源的培养基中的限氧乙醇发酵结果分析。

具体实施方式

下面结合实施例对本发明作进一步的说明。

实施例 1　克隆来自牛瘤胃液宏基因组文库的木糖异构酶的 DNA 序列

木糖异构酶保守区域间的部分糖异构酶的 DNA 序列的克隆：

以构建好的牛瘤胃液宏基因组文库为模板，以简并引物 XIcF 和 XIcR（表 1）为引物，PCR 扩增，得到大约 400bp 的片段，将清晰的条带纯化并连接到 T 载体上，任意挑取 22 个采用通用引物验证的克隆送去测序。测序结果表明：22 个克隆的 DNA 插入片段的序列全属于木糖异构酶的特有序列。其中 21 个克隆的 DNA 插入片段的序列为大肠杆菌的木糖异构酶基因保守序列，只有一个克隆的 DNA 插入片段属于新来源的木糖异构酶基因保守序列。该片段命名为 2PXI-3，374bp。

表 1　所用的引物序列

Primer	Sequence(5'→3')
XIcF(18bp)	TGGGG(A/T/C/G)GG(A/T/C/G)CG(A/T/C/G)GA(G/A)GG(A/T/C/G)
XIcR(23bp)	GG(A/G)AA(T/C)TG(A/G)TC(A/T/C/G)GT(A/G)TCCCA(A/T/C/G)CC
pBK-F	GCCGCTCTAGAAGTACTCTCGAGA
pBK-R	ATGACCTTGATTACGCCAAGCTCG
pBK-R1	ATTAGGCACCCCAGGCTTTACACT
2PX I-F	CAGAAGCGTGAGAAGGAGCACATG
2PX I-R	GTGACCAGCCAATGTAGCGTGGTT
2PX I-F2	GATGCTGGGTATGGCTCGTGACTA
2PX I-R2	CAGCATACCAGCGTCAACAGCACA
BamHI-GXI-F	GCTCGGATCCATGGCAAAAGAATATTTTCCG
SbfI-GXI-R	CATACCTGCAGGTTATTTGCAGTGGAGGGCGA

木糖异构酶的 5' 和 3' DNA 序列的克隆：

根据载体 pBK-CMV 序列和 2PXI-3 序列，设计七个特异性引物：pBK-F，pBK-R，pBK-R1，2PXI-F，2PXI-R，2PXI-F2，2PXI-R2（表 1）。以牛瘤胃液宏基因组文库为模板，沿目的片段两侧分别进行 PCR 扩增。由引物 pBK-R1，2PXI-F 扩增得到基因的 3' DNA 片段 FT1；由引物 pBK-F，2PXI-R 扩增得到基因的 5' DNA 片段 PR。

木糖异构酶全长 DNA 序列的克隆：

将 *xylA* 基因 5'序列和 3'序列拼接，设计特异性引物 BamHI-GXI-F，SbfI-GXI-R(表 1)。以牛瘤胃液宏基因组文库为模板，PCR 扩增得到 1320bp xylA 基因，命名为 RuXI，如 SEQ

ID NO. 1 所示。

实施例 2 在酵母中表达新来源的木糖异构酶 RuXI

构建酵母表达载体：

木糖异构酶 RuXI 的 DNA 和 *pfu* 聚合酶用于 PCR 反应中。用木糖异构酶基因的 5' 和 3' 的序列设计引物，还含有 *Sbf*I 和 *BamH*I 限制性酶切位点。PCR 产物被克隆到 pJFE3 载体中，得到重组质粒 pJFE3-RuXI。

构建含有木糖异构酶基因的重组酿酒酵母：

将具有木糖异构酶基因的质粒 pJFE3-RuXI 转化到酿酒酵母中。宿主酿酒酵母菌主要特征为：超表达 *XKS*1 和 PPP 途径的 *RPE*1 *RKI*1 *TAL*1 *TKL*1； 敲除醛糖还原酶基因 *GRE*3；且经过特殊修饰，宿主酿酒酵母的呼吸途径被阻断。转化子在 SC-URA 平板上筛选，未被转化的细胞不能在这些平板上生长。

从重组酿酒酵母转化子中提取质粒验证重组细胞中表达的木糖异构酶为 SEQ ID NO. 2 所示的氨基酸序列：

采用试剂盒提取重组酵母菌中质粒，可以通过两方面验证重组细胞中表达的木糖异构酶为 SEQ ID NO. 2 所示的氨基酸序列：（1）以所提质粒为模板，特异性引物 BamHI-GXI-F, SbfI-GXI-R（表 1）扩增 RuXI，（2）用所提质粒转化大肠杆菌 DH5α 中，提取质粒，*Bam*HI 和 *Sbf*I 双酶切。同时将提取的质粒进行测序，确定目的基因的序列。

结果：

从重组酿酒酵母中提取的质粒测序结果表明：目的基因序列与 SEQ ID NO. 1 所示的核苷酸序列一致，该质粒 PCR（图 1）及酶切验证（图 2）的结果也表明：SEQ ID NO. 1 所示的核苷酸序列已被转入到酿酒酵母中，即重组细胞中表达的木糖异构酶为 SEQ ID NO. 2 所示的氨基酸序列。

表达：

被转化的酵母细胞在 30℃下，初始 OD =0.2 左右，在葡萄糖培养基中生长 12h。回收细胞。用玻璃珠（0.10-0.11mm）和裂解缓冲液（100mM Tris-HCl+蛋白酶抑制剂）溶解细胞。用机械震荡细胞破碎仪裂解细胞，破胞后，离心混合物（11,000xg,4℃,10min）。

澄清的上清液采用 XI-SDH(木糖异构酶偶联山梨醇脱氢酶)一步法测定木糖异构酶活性(100mM, pH7.5Tris- HCl, 500 mM xylose, 10 mM$MgCl_2$, 粗酶液 10 μ l, 1U SDH, 0.15 mM NADH, 在 340nm 下检测 NADH 被氧化的量，即在 340nm 下做时间扫描）(Kuyper et al., FEMS Yeast Research, 2003, 4:69-78) 。

由于木糖异构酶酶活测定方法中用到的山梨醇脱氢酶（SDH）需要合适的反应温度，因此，对木糖异构酶最适酶活温度的研究采用 XI-SDH(木糖异构酶偶联山梨醇脱氢酶)两步法测定（Lönn et al., European Journal of Biochemistry, 2002, 269(1): 157 - 163）。第一步反应：100mM, pH7.5Tris- HCl, 500 mM xylose, 10 mM$MgCl_2$, 粗酶液 10μl。50%三氯乙酸终止反应，2M 碳酸钠中和反应。第二步反应：取上一步反应液 100μl，100mM pH7.5 Tris- HCl, 1U SDH, 0.3 mM NADH, 在 340nm 下检测 NADH 被氧化的量，即在 340nm 下做时间扫描）。在 100mM pH7.5 Tris- HCl, 10 mM$MgCl_2$条件下，测定木糖异构酶在 20℃, 25℃, 30℃, 35℃, 40℃, 50℃, 60℃, 70℃, 80℃下的酶活变化（图 3）。蛋白含量的测定参照 Bradford(1976)的考马斯亮兰（Comassie Blue）法。

结论：本发明的木糖异构酶在酿酒酵母中高活性表达。本发明的木糖异构酶是一种嗜温性木糖异构酶，最适酶活温度在 60℃（图 3）。30℃下，采用 XI-SDH 一步法测定木糖异构酶酶活(Kuyper et al., FEMS Yeast Research, 2003, 4:69-78)，该酶酶活为 1.3U/mg, 高于 *Piromyces sp*-E2 来源的木糖异构酶酶活 1.1U/mg（这一数据来自于本发明筛选的木糖异构酶同一批次的测定实验，同时，该数据与文献 Kuyper et al., FEMS Yeast Research, 2003, 4:69-78 报道的一致）。

实施例 3　被转化的酵母菌株在木糖上生长和发酵实验

培养基成分：

酿酒酵母在具有下列成分的 SC 培养基中生长：0.67(w/v)%酵母氮源（yeast nitrogen base）；除尿嘧啶以外的氨基酸及嘌呤、嘧啶混合物（CSM-URA）。对于平板，培养基中添加 1.8%琼脂，调节 pH 至 6.5-7.0。

生长实验：

宿主酵母菌株 BSPX042（表型:ura3-251，超表达 *XKS1*；超表达 PPP 途径的 *RPE1* *RKI1* *TAL1* *TKL1*；敲除醛糖还原酶基因 *GRE3*；且经过特殊修饰，破坏呼吸途径，并经过驯化而得），分别用空载体 pJFE3 和插入新来源的木糖异构酶基因的载体 pJFE3-RuXI 转化，分别得到重组菌 BSGX000 和 BSGX001。将两重组菌株分别在 2%葡萄糖，2%木糖为共同碳源及 2%木糖为唯一碳源的 SC 液体培养基中生长。通过测定 600nm 下在分光光度计中光密度的升高来监控生长。

结果：

生长实验的结果在图 4 和图 5 中。在 2%葡萄糖，2%木糖为共同碳源的 SC 液体培养基中，在葡萄糖消耗阶段，重组菌 BSGX000 和 BSGX001 生长趋势差不多，μmax 均为 0.31。

葡萄糖耗尽后，BSGX001 较 BSGX000 生长良好（图 4）。在 2%木糖为唯一碳源的 SC 液体培养基中，不含木糖异构酶基因的重组菌 BSGX000 没有生长；含有木糖异构酶基因 Ru 的重组菌 BSGX001 生长较好，μmax 为 0.16（图 5）。

实施例 4　被转化的酵母菌株以木糖为唯一碳源的限氧乙醇发酵实验

培养基成分：

SC 液体培养基：0.67(w/v)%酵母氮源（yeast nitrogen base）；除尿嘧啶以外的氨基酸及嘌呤、嘧啶混合物（CSM-URA）；2%木糖。

重组菌 BSGX001 在 2%木糖为唯一碳源的 SC 液体培养基中限氧发酵实验。在 100mL 限氧瓶内进行发酵，发酵时间为 72h,HPLC 分析发酵底物木糖及产物乙醇的变化。

结果：

含有本发明的木糖异构酶的重组菌 BSGX001，在 2%木糖为唯一碳源的 SC 液体培养基中限氧发酵，乙醇产率达到 0.24 克每克生物量每小时，糖醇转化率达到 44%，基本没有副产物木糖醇生成（图 6）。

1. 一种编码木糖异构酶的核酸分子，其特征在于，其序列为以下核苷酸序列之一：

（1）SEQ ID NO. 1 所示的核苷酸序列；

（2）SEQ ID NO. 1 所示的核苷酸序列添加、取代、缺失或插入一个或多个核苷酸的具有至少 40%序列一致性的同源序列；

（3）在严格条件下，与(1)或（2）的核苷酸序列杂交的核苷酸序列；

（4）由于遗传密码子的简并性区别于（3）的核苷酸序列的核苷酸序列。

2. 一种木糖异构酶，其特征在于，其序列为以下氨基酸序列之一：

（1）SEQ ID NO. 2 所示的氨基酸序列；

（2）SEQ ID NO. 2 所示的氨基酸序列添加、取代、缺失或插入一个或多个氨基酸的具有至少 40%序列一致性的同源序列。

3. 一种重组载体，其特征在于：所述重组载体含有权利要求 1 所述的编码木糖异构酶的核酸分子的完整编码阅读框序列。

4. 一种重组细胞，其特征在于：所述宿主细胞为细菌、酵母或丝状真菌，宿主细胞内含有权利要求 3 所述的重组载体。

5. 根据权利要求 4 所述的重组细胞，其特征在于：所述宿主细胞包含一种遗传修饰，该遗传修饰降低非特异性醛糖还原酶活性。

6. 根据权利要求 4 所述的重组细胞，其特征在于：所述宿主细胞包含一种或多种遗传修饰，该遗传修饰产生选自如下一组的特征：

（1）增加木糖转运到宿主细胞内；

（2）木酮糖激酶活性增强；

（3）戊糖磷酸途径的流量增加；

（4）对分解代谢物阻遏的敏感性降低；

（5）对乙醇、渗透性或有机酸的耐受力增强；

（6）副产物生成下降；

（7）细胞电子链传递和氧化呼吸链阻断。

7. 根据权利要求 5 所述的重组细胞，其特征在于：所述遗传修饰由过度表达内源基因、表达异源基因或其组合组成，且所述基因选自下列基因：己糖或戊糖转运蛋白基因、木酮糖激酶基因、来自戊糖磷酸途径的酶的基因、糖酵解酶的基因或/和乙醇发酵相关的酶的基因。

8. 根据权利要求 5、6 或 7 所述的重组细胞，其特征在于：所述宿主细胞表达一种或多种酶，所述的酶赋予宿主细胞产生乳酸、乙酸、琥珀酸、氨基酸、1,3-丙二醇、乙烯、甘油、β

一内酰胺抗生素或/和头孢菌素的能力。

9. 利用权利要求 8 所述的重组细胞生产发酵产物的方法，其特征在于：所述宿主细胞发酵含有木糖原料或/和葡萄糖原料的培养基，然后分离纯化发酵产物，所述发酵产物为乳酸、乙酸、琥珀酸、氨基酸、1,3-丙二醇、乙烯、甘油、β 一内酰胺抗生素或/和头孢菌素。

10. 权利要求 2 所述的木糖异构酶在燃料乙醇生产或高果糖浆生产中的应用。

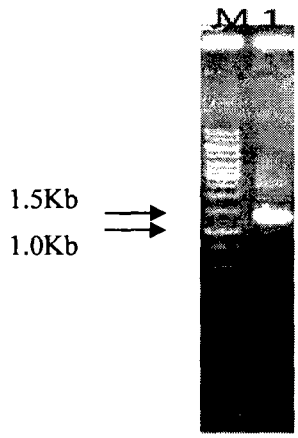


图 1

M:1kb DNA Ladder

1:RuXI

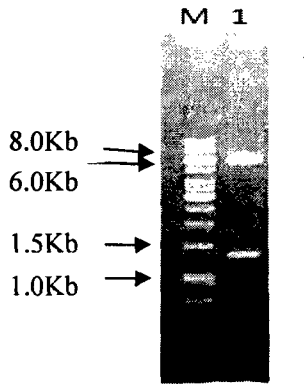


图 2

M:1kb DNA Ladder

1: *Bam*HI 和 *Sbf*I 双酶切质粒 pJFE-RuXI

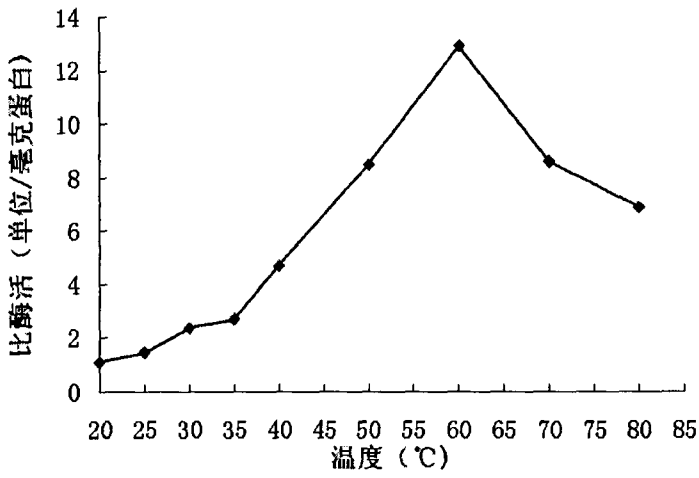


图 3

替换页（细则第26条）

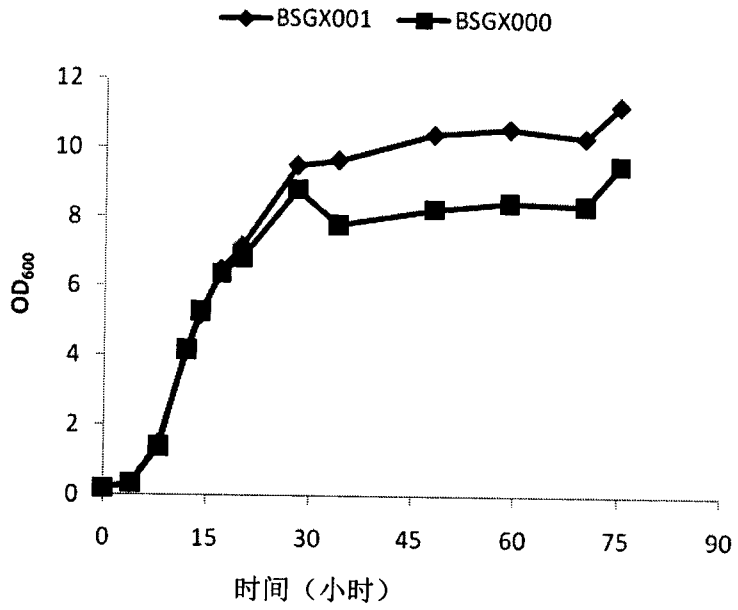

BSGX001
BSGX000
12
10
8
6
4
2
0
OD600
0
15
30
45
60
75
90
时间（小时）

图 4

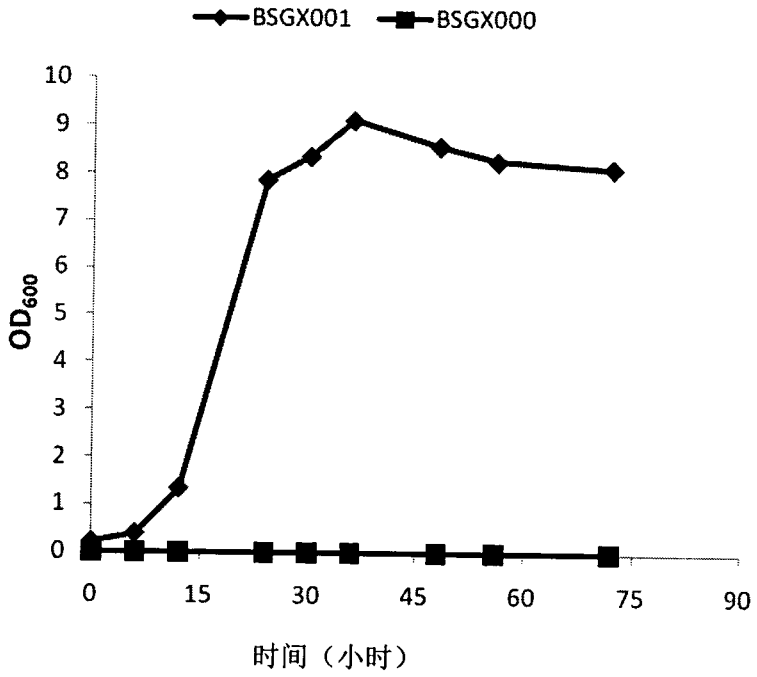

BSGX001
BSGX000
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
OD600
0
15
30
45
60
75
90
时间（小时）

图 5

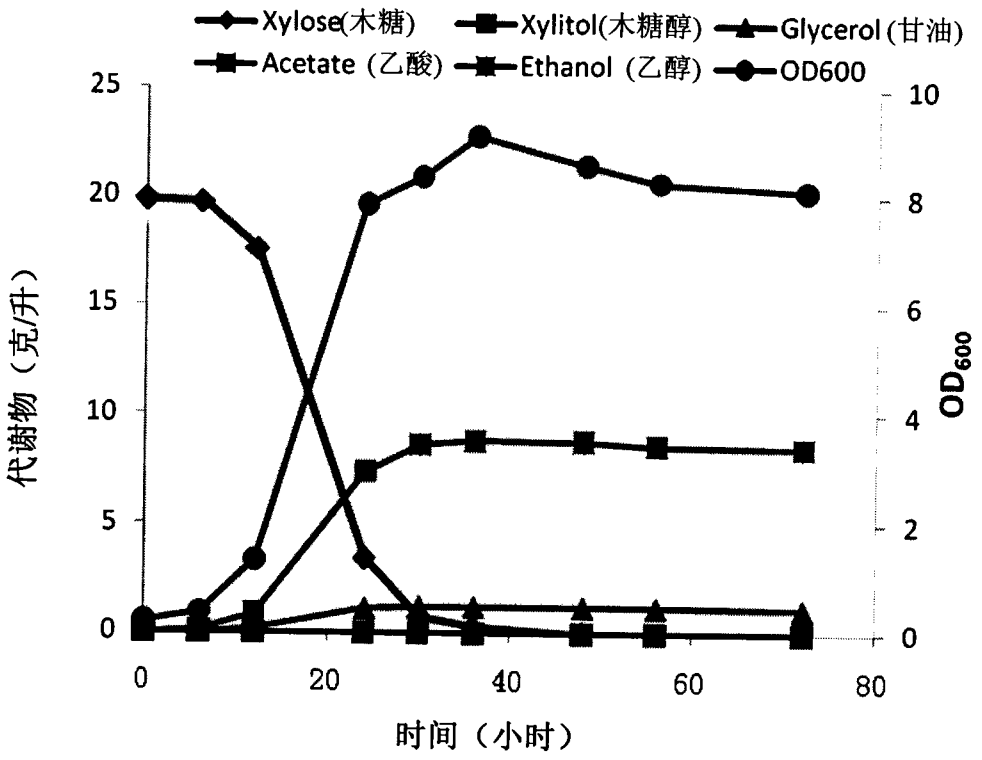

Xylose(木糖)
Xylitol(木糖醇)
Glycerol (甘油)
Acetate (乙酸)
Ethanol (乙醇)
OD600
代谢物（克/升）
OD_{600}
时间（小时）
0
5
10
15
20
25
0
2
4
6
8
10
0
20
40
60
80

图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2011/001014

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C12N, C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

DATABASES: CPRSABS, CNABS, CJFD, CSCD, SIPONPL, CNKI, DWPI, SIPOABS, CPEA, ISI WEB OF KNOWLEDGE, CA, BA, MEDLINE, PUBMED, GENBANK+EMBL+DDBJ

SEARCH TERMS: xylose isomerase, glucose isomerase, c12n, nucleic acid, amino acid, sequences search on the sequences of SEQ ID NOs: 1-2

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	DATABASE Genbank [Online], Database accession no. ZP_07883886, 29 December 2010(29.12.2010) , "Xylose isomerase [Prevotella buccae ATCC 33574]"	2 10
X Y	DATABASE Genbank [Online], Database accession no. ZP_06420872, 09 June 2010(09.06.2010), Ward,D., et al.,"Xylose isomerase [Prevotella buccae D17]"	2 10
X Y	DATABASE Genbank [Online], Database accession no. ZP_06006100, 10 December 2010(10.12.2010), "Xylose isomerase [Prevotella bergensis DSM 17361])	2 10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
22 Sep. 2011 (22. 09. 2011)	**27 Oct. 2011 (27.10.2011)**
Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451	Authorized officer YU Na Telephone No. (86-10)62411084

Form PCT/ISA /210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2011/001014

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	DATABASE Genbank [Online], Database accession no. CAB76571, 15 April 2005(15.04.2005), Harhangi, H.R., et al., "Xylose isomerase [Piromyces sp. E2]"	2 10
Y	CN1703514A (ROYAL NEDALCO BV), 30 November 2005(30.11.2005) , see claims 1-21	10
Y	CN1966678A(UNIV NANJING TECHNOLOGY), 23May 2007(23.05.2007) , see claims 1-9	10
Y	CN101283096A(CARGILL INC), 08 October 2008(08.10.2008) , see claims 1-22	10
A	DATABASE Genbank [Online], Database accession no. GU942940, 15 November 2010(15.11.2010), Tasse, L., et al., "Uncultured organism clone 23 genomic sequence"	1-10
A	CN101323858A(UNIV SHANDONG et al.), 17 December 2008(17.12.2008) , see the whole document	1-10
A	CN1712528A(ZHANG Lipin), 28 December 2005(28.12.2005) , see the whole document	1-10
A	Bao Xiaoming et al., Expression of Xylose Isomerase (xylA) in Saccharomyces Cerevisiae from Clostridium Thermohydrosulfuricum, ACTA MICROBIOLOGICA SINICA, 28 February 1999(28.02.1999), Vol. 39, No. 1, pages 49-54, ISSN: 1005-7021, see the whole document	1-10
A	ZHU Guo Ping et al., Progress in Biological Engineering of D-Glucose Isomerase, PROGRESS IN BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, 31 December 2000(31.12.2000), Vol.27, No.2, pages 127-131, ISSN: 1000-3282, see the whole document	1-10
A	Anjali Madhavan et al., Xylose isomerase from polycentric fungus Orpinomyces: gene sequencing, cloning, and expression in Saccharomyces cerevisiae for bioconversion of xylose to ethanol, Appl Microbiol Biotechnol, 03 December 2009 (03.12.2009), Vol. 82, No. 6, pages 1067-1078, ISSN: 0175-7598, see the whole document	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2011/001014

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN1966678A	23.05.2007	CN100445376C	24.12.2008
CN101283096A	08.10.2008	WO2007028811A1	15.03.2007
		EP1857552A1	21.11.2007
		EP1922408A1	21.05.2008
		US2010234581A1	16.09.2010
CN1703514A	30.11.2005	DE60325457D1	05.02.2009
		EP1468093A1	20.10.2009
		US7622284B2	24.11.2009
		BR0306740A	28.12.2004
		EP1468093B1	24.12.2008
		JP2009213481A	24.09.2009
		CN100448996C	07.01.2009
		WO03062430A1	31.07.2005
		JP2005514951T	26.05.2005
		US2008014620A1	17.01.2008
		JP4334352B2	30.09.2009
		US2010035306A1	11.02.2010
		ES2319757T3	12.05.2009
		AU2003238075A1	02.09.2003
CN101323858A	17.12.2008	CN101323858AB	02.06.2010
CN1712528A	28.12.2005	NONE	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2011/001014

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/61 (2006.01) i
C12N 9/90 (2006.01) i
C12N 15/63 (2006.01) i
C12N 1/19 (2006.01) i
C12N 1/21 (2006.01) i
C12P 7/54 (2006.01) i
C12P 7/56 (2006.01) i
C12P 7/50 (2006.01) i
C12P 13/00 (2006.01) i
C12P 7/18 (2006.01) i
C12P 5/02 (2006.01) i
C12P 7/20 (2006.01) i
C12P 35/00 (2006.01) i
C12P 37/00 (2006.01) i
C12P 7/06 (2006.01) i
C12P 19/24 (2006.01) i
C12R 1/85 (2006.01) n
C12R 1/645 (2006.01) n
C12R 1/01 (2006.01) n

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2011/001014

A. 主题的分类

参见附加页

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: C12N, C12P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用）)

数据库：CPRSABS, CNABS, CJFD, CSCD, SIPONPL, CNKI, DWPI, SIPOABS, CPEA, ISI WEB OF KNOWLEDGE, CA, BA, MEDLINE, PUBMED, GENBANK+EMBL+DDBJ

检索词：木糖异构酶，木糖酮异构酶，葡萄糖异构酶，c12n, xylose isomerase, glucose isomerase, nucleic acid, amino acid, 对序列 SEQ ID NO: 1-2 的检索

C. 相关文件

类　型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X Y	DATABASE Genbank [Online]，登录号：ZP_07883886，29.12 月 2010(29.12.2010)，“xylose isomerase [Prevotella buccae ATCC 33574]”	2 10
X Y	DATABASE Genbank [Online]，登录号：ZP_06420872，09.6 月 2010(09.06.2010)，Ward，D.，等，“xylose isomerase[Prevotella buccae D17]”	2 10
X Y	DATABASE Genbank [Online]，登录号：ZP_06006100，10.12 月 2010(10.12.2010)，“xylose isomerase [Prevotella bergensis DSM 17361]”	2 10

☒ 其余文件在 C 栏的续页中列出。　　☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
22.9 月 2011(22.09.2011)	**27.10 月 2011 (27.10.2011)**
ISA/CN 的名称和邮寄地址： 中华人民共和国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号：　(86-10)62019451	受权官员 于娜 电话号码：(86-10) **62411084**

C(续). 相关文件

类 型	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X Y	DATABASE Genbank [Online]，登录号：CAB76571， 15.4 月 2005(15.04.2005)，Harhangi，H.R.，等，“xylose isomerase [Piromyces sp. E2]”	2 10
Y	CN1703514A（皇家奈达尔科股份有限公司），30.11 月 2005(30.11.2005) ，参见权利要求 1-21	10
Y	CN1966678A（南京工业大学），23.5 月 2007(23.05.2007) ，参见权利要求 1-9	10
Y	CN101283096A（卡吉尔公司），8.10 月 2008(08.10.2008) ，参见权利要求 1-22	10
A	DATABASE Genbank [Online]，登录号 GU942940， 15.11 月 2010(15.11.2010)，Tasse，L.，等，“Uncultured organism clone 23 genomic sequence”	1－10
A	CN101323858A（山东大学等），17.12 月 2008(17.12.2008) ，参见全文	1－10
A	CN1712528A（张力彬），28.12 月 2005(28.12.2005) ，参见全文	1－10
A	鲍晓明等，嗜热细菌木糖异构酶基因 xylA 在酿酒酵母中的高效表达，微生物学报，28.2 月 1999(28.02.1999)，第 39 卷，第 1 期，第 49-54 页，ISSN：1005-7021，参见全文	1－10
A	朱国萍等，葡萄糖异构酶的生物工程研究进展，生物化学与生物物理进展，31.12 月 2000(31.12.2000)，第 27 卷，第 2 期，第 127-131 页，ISSN：1000-3282，参见全文	1－10
A	Anjali Madhavan 等，Xylose isomerase from polycentric fungus Orpinomyces: gene sequencing, cloning, and expression in Saccharomyces cerevisiae for bioconversion of xylose to ethanol，Appl Microbiol Biotechnol，3.12 月 2009(03.12.2009)，第 82 卷，第 6 期，第 1067-1078 页，ISSN：0175-7598，参见全文	1－10

国际检索报告

关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2011/001014

检索报告中引用的专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN1966678A	23.05.2007	CN100445376C	24.12.2008
CN101283096A	08.10.2008	WO2007028811A1	15.03.2007
		EP1857552A1	21.11.2007
		EP1922408A1	21.05.2008
		US2010234581A1	16.09.2010
CN1703514A	30.11.2005	DE60325457D1	05.02.2009
		EP1468093A1	20.10.2009
		US7622284B2	24.11.2009
		BR0306740A	28.12.2004
		EP1468093B1	24.12.2008
		JP2009213481A	24.09.2009
		CN100448996C	07.01.2009
		WO03062430A1	31.07.2005
		JP2005514951T	26.05.2005
		US2008014620A1	17.01.2008
		JP4334352B2	30.09.2009
		US2010035306A1	11.02.2010
		ES2319757T3	12.05.2009
		AU2003238075A1	02.09.2003
CN101323858A	17.12.2008	CN101323858AB	02.06.2010
CN1712528A	28.12.2005	无	

A. 主题的分类

C12N 15/61 (2006.01) i
C12N 9/90 (2006.01) i
C12N 15/63 (2006.01) i
C12N 1/19 (2006.01) i
C12N 1/21 (2006.01) i
C12P 7/54 (2006.01) i
C12P 7/56 (2006.01) i
C12P 7/50 (2006.01) i
C12P 13/00 (2006.01) i
C12P 7/18 (2006.01) i
C12P 5/02 (2006.01) i
C12P 7/20 (2006.01) i
C12P 35/00 (2006.01) i
C12P 37/00 (2006.01) i
C12P 7/06 (2006.01) i
C12P 19/24 (2006.01) i
C12R 1/85 (2006.01) n
C12R 1/645 (2006.01) n
C12R 1/01 (2006.01) n