



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03815229.0

[43] 公开日 2005 年 9 月 7 日

[11] 公开号 CN 1665919A

[22] 申请日 2003.4.25 [21] 申请号 03815229.0
[30] 优先权
[32] 2002.4.27 [33] US [31] 10/134,655
[86] 国际申请 PCT/US2003/012726 2003.4.25
[87] 国际公布 WO2004/037973 英 2004.5.6
[85] 进入国家阶段日期 2004.12.27
[71] 申请人 米德韦斯特研究院
地址 美国密苏里州
[72] 发明人 张 敏 周逸珍 威廉·豪
克里斯廷·埃迪 肯特·埃文斯

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
代理人 过晓东

权利要求书 4 页 说明书 51 页 附图 42 页

[54] 发明名称 发酵戊糖的发酵单胞菌菌株及其应用

[57] 摘要

一种能够发酵戊糖生成乙醇的发酵单胞菌整合体。通过两步整合方法即同源重组和转座将编码戊糖发酵酶的操纵子整合入发酵单胞菌的基因组内。每种操纵子可以包括一种以上戊糖还原酶的编码序列。在一些实施例中，整合体包括编码木糖异构酶、木酮糖激酶、转酮酶和转醛酶的序列。发酵单胞菌整合体高度稳定，在 80-160 代时仍保留产生戊糖发酵酶的活性。整合体还对醋酸盐的抑制作用具有抗性，即使在每升培养基含有 8 克醋酸盐的条件下，整合体仍然表现出足够的生产乙醇的能力。

ISSN 1008-4274

1. 一种利用基因修饰的发酵单胞菌整合体从戊糖生产乙醇的方法，所述方法包括：

制备含有编码一种以上戊糖发酵酶的序列的发酵单胞菌整合体，所述戊糖发酵酶包括木糖异构酶，木酮糖激酶，转酮酶和转醛酶；

在适当的发酵条件下，将整合体发酵单胞菌加入到含有戊糖的原料中；以及

发酵戊糖从而提供包括乙醇的混合物，

所述编码戊糖发酵酶的序列是通过第一步整合和第二步整合结合到所述整合体发酵单胞菌中的。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其中第一步整合是转座，第二步整合是同源重组。
3. 如权利要求 2 所述的方法，其中第一步整合包括含有编码一种以上戊糖发酵酶序列的第一操纵子的转座整合。
4. 如权利要求 3 所述的方法，其中第一操纵子包括编码转醛酶和转酮酶的序列。
5. 如权利要求 3 所述的方法，其中第一操纵子进一步包括 Penotaltkt 或者 Pgaptaltkt。
6. 如权利要求 2 所述的方法，其中第二步整合包括含有编码一种以上戊糖发酵酶序列的第二操纵子的同源重组。

7. 如权利要求 6 所述的方法, 其中第二操纵子进一步包括 PgapxylAB。
8. 如权利要求 6 所述的方法, 其中第二操纵子包括编码木糖异构酶和木酮糖激酶的序列。
9. 如权利要求 1 所述的方法, 其中发酵单胞菌整合体是 ATCC31821-5C Penotaltkt/PgapxylAB。
10. 如权利要求 1 所述的方法, 其中发酵单胞菌整合体是 ATCC31821-5C Pgaptaltkt/PgapxylAB。
11. 如权利要求 1 所述的方法, 其中第一步整合包括同源重组并且第二步整合包括转座方法。
12. 一种制备能够发酵含有戊糖的原料并生成乙醇的发酵单胞菌整合体的方法, 所述方法包括:

对天然发酵单胞菌菌株实施第一步整合以结合含有编码戊糖发酵酶的序列的第一操纵子, 从而提供发酵单胞菌部分整合体;

对发酵单胞菌部分整合体实施第二步整合以结合第二操纵子, 所述第二操纵子含有编码除第一操纵子的酶之外的一种以上的戊糖发酵酶的序列, 从而提供能够发酵含有戊糖的原料并生成乙醇的发酵单胞菌整合体。
13. 如权利要求 12 所述的方法, 其中发酵单胞菌整合体含有编码至少四种戊糖发酵酶的序列, 所述戊糖发酵酶包括木糖异构酶、木酮糖激酶、转酮酶和转醛酶。

14. 如权利要求 12 所述的方法，其中第一操纵子进一步包括 PgapxylAB。
15. 如权利要求 12 所述的方法，其中第二操纵子进一步包括 Penotaltkt 或者 Pgaptaltkt。
16. 根据权利要求 12 的方法制备的能够发酵戊糖的发酵单胞菌整合体。
17. 如权利要求 12 所述的方法，其中发酵单胞菌整合体是 ATCC31821-5C Penotaltkt/PgapxylAB。
18. 如权利要求 12 所述的方法，其中发酵单胞菌整合体是 ATCC31821-5C Pgaptaltkt/PgapxylAB。
19. 一种发酵单胞菌整合体，其能在每升培养基含有 8 克醋酸盐/醋酸的环境下生长。
20. 一种用于戊糖发酵的生物催化剂，其含有权利要求 16 的发酵单胞菌整合体。
21. 一种能够发酵戊糖生成乙醇的发酵单胞菌整合体，其染色体或天然质粒整合了编码一种以上戊糖发酵酶的序列，其中所述整合体至少稳定 80 代。
22. 如权利要求 21 所述的发酵单胞菌整合体，进一步能在醋酸盐存在时发酵戊糖生成乙醇。
23. 如权利要求 22 所述的发酵单胞菌整合体，进一步能在每升培养基含有 8 克醋酸盐/醋酸的环境下发酵戊糖。

24. 如权利要求 21 所述的发酵单胞菌整合体，进一步包括编码甘露糖发酵酶的序列。
25. 发酵单胞菌整合体 Z. Mobilis 8b。
26. 发酵单胞菌整合体 Z. Mobilis 2032。

发酵戊糖的发酵单胞菌菌株及其应用

发明背景

本申请是申请日为 2000 年 5 月 1 日的美国专利系列申请 No.09/565,233 的部分继续申请。本申请与申请日为 2001 年 4 月 6 日的 PCT 申请 PCT/US01/11334 相关，并要求了美国系列申请 No.09/565,233 的优先权。

发明的项目来源

依照美国能源部与中西部研究所分部国家可再生能源实验室之间的合同 No.DE-AC36-99G010337，美国政府对本发明享有权利。

技术领域

本发明涉及纤维素类物质向燃料和化学物质的生物转化，特别涉及可将木糖、阿拉伯糖和甘露糖以及以上三种糖类发酵转化为乙醇的运动发酵单胞菌菌株（*Zymomonas mobilis*）。

背景技术

发酵技术对于可再生的生物纤维素类物质转化为化学物质例如乙醇是非常有用的。典型的纤维素类物质包括 35-45%的纤维素，30-40%的半纤维素和 15%的木质素。水解成分含有葡萄糖聚合物，半纤维素的水解成分大部分是木糖。阿拉伯糖也是存在于生物材料例如 switchgrass 草和谷物纤维中的重要的可发酵底

物。因此，在戊糖发酵中达到较高的特定产物的形成速率和转化效率对于利用可再生物质工业化生产燃料和化学物质是至关重要的。

现有技术广泛报道了运动发酵单胞菌在较低的 pH、厌氧培养和含有抑制性化合物特别是与木质纤维素水解产物有关的抑制性化合物的培养基中，具有将葡萄糖底物快速、有效地转化为乙醇的能力。然而利用运动发酵单胞菌最明显的缺点是它不能发酵戊糖。为了克服这一缺点，现有技术使用可催化木糖和阿拉伯糖代谢的外源基因来构建重组运动发酵单胞菌菌株，它能发酵葡萄糖和木糖或阿拉伯糖的混合物或者上述三种糖的混合物。这些菌株和克隆载体都基于具有抗生素抗性标记的多拷贝质粒的使用。

美国专利 No.5514583 公开了一种转化了外源基因的发酵木糖的运动发酵单胞菌菌株 (CP4/pZB4 和 pZB5)，编码木糖异构酶、木酮糖激酶、转醛酶和转酮酶的质粒载体 (pZB4 和 pZB5)，进一步包括被发酵单胞菌识别的至少一种启动子 (P_{gap} 和 P_{eno})，其可以调节至少一种所述基因的表达。该微生物能够生长于以木糖为唯一碳源的培养基中，发酵木糖转化为乙醇，最大理论产率 88%。美国专利 No.5712133 和 No.5726053 公开了一种发酵阿拉伯糖的转化运动发酵单胞菌 (39676/pZB206)，含有编码 L-阿拉伯糖异构酶、L-核酮糖激酶和 L-核酮糖-5-磷酸-4-差向异构酶、转醛酶和转酮酶的外源基因，上述酶可影响阿拉伯糖向乙醇转化的发酵能力。此外，还描述了质粒载体 (pZB206) 以及利用转化子发酵葡萄糖和阿拉伯糖底物的方法。美国专利 No.5843760 公开了一种发酵木糖和阿拉伯糖的转化运动发酵单胞菌 (206C/pZB301)，含有编码木糖异构酶、木酮糖激酶、L-阿拉伯糖异构酶、L-核酮糖激酶、L-核酮糖-5-磷酸-4-差向异构酶、转醛

酶和转酮酶的外源基因，进一步包括被发酵单胞菌识别的至少一种启动子，其可以调节至少一种所述基因的表达，所述微生物能够生长于以阿拉伯糖或木糖为唯一碳源或者两者结合作为碳源的培养基中，发酵阿拉伯糖和木糖转化为乙醇。此外，还描述了转化子结合质粒载体（pZB301, pZB401, pZB402, pZB403）使用的方法。虽然在控制条件的单一培养物中杂交质粒更容易保留在运动发酵单胞菌里，但当宿主生物生长于缺乏维持质粒的选择压力即存在抗生素时，杂交质粒开始变得不稳定。例如，上面所述菌株的外源基因能够稳定的表达约四十代。当运动发酵单胞菌生长于混合培养物例如纤维素同时糖化发酵过程中，它将与其它微生物竞争，此时质粒的不稳定性就会加剧。此外，对于工业应用例如乙醇的大规模生产而言，抗生素抗性标记是不受欢迎的。因此，最好能将克隆基因插入运动发酵单胞菌的基因组中，使其保持在一个较低的天然拷贝数水平，不会过表达，而且同基因组DNA一样稳定。

在大肠杆菌中，将外源基因插入基因组的经典方法是使用在溶原状态下能够稳定存在的噬菌体载体。基因的插入也可以通过同源重组，如果基因能够克隆到转座子允许的位点，也可以通过转座来实现。虽然已经证实在运动发酵单胞菌中存在转座（Pappas, K. M., et al., (1997) *Journal of Applied Microbiology*, 82: 379-388），但仅限于随机辅助源营养的小 Mm 或者 Tn5 的多转座或者用于基因分析的抗生素抗性表型。据报道，通过 Tn5 衍生物插入的基因仅能稳定 5-15 代（Pappas, K. M., et seq. P. 383, FIG. 1.）。而且，在运动发酵单胞菌中通过同源重组来实现定点插入并未被证实，从发酵单胞菌中没有分离到噬菌体。

转座子 Tn5 和 Tn10 是本领域所熟知的，广泛用于诱变和各种革兰氏阴性菌的克隆 DNA 的插入，Herrero, M., 等人（1990）

(J.Bacteriol. 172: 6557-6567)描述了结合两套质粒将外源基因克隆并稳定插入革兰氏阴性真细菌染色体中的过程, (i) Tn10 和 Tn5 的转座特性, (ii) 对某些化合物的抗性, (iii) 基于 R6K 的质粒 pGP704 自杀传递性质。最终构建物含有 Tn10 或者 Tn5 反向重复序列内的 NotI 或者 SfiI 位点。借助于两个附加的特定克隆质粒 pUC18Not 和 pUC18Sfi, 这些位点用于克隆 DNA 片段。新衍生的构建物只保留在受体宿主菌株中并产生 R6K 特异 p 蛋白, 其是 R6K 及其衍生的质粒的基本复制蛋白。含有杂交转座子的受体质粒与染色体整合 RP4 转化入特定溶原性大肠杆菌例如 E. coli Sm10(lpir)中, 所述染色体整合 RP4 提供了广泛的宿主范围接合转移功能。通过与目标菌株接合, 受体质粒转移到选择的宿主细菌中。位于转座子外部的质粒编码的关联转座酶介导杂交转座子从传递自杀质粒到目标复制子的转座。由于转座酶的功能在目标细胞中不能保持, 这些细胞对进一步的转座免疫。在同一菌株的多次插入因此仅受明显选择标记的限制。

Herrero, M., 等人 (1990) (Journal of Bacteriol. 172(11): 6568-6572) 描述了 Tn5 衍生的小转座子例如 Tn5Tc 集合体的构建。有可能利用 Tn5 衍生的小转座子例如 Tn5Tc 结合外源 DNA 片段进入各类革兰氏阴性菌的基因组中。小转座子由对卡那霉素有特异抗性的基因、作为选择标记的四环素和侧接了 Tn5 末端重复序列 19 个碱基对的 NotI 克隆位点组成。转座子定位在基于 R6K 的自杀传递质粒上, 该质粒提供了 IS50R 转座酶 tnp 基因但位于转移元件的外部, 其向受体的接合转移由受体中的 RP4 转移功能介导。由于不存在转座酶介导的次级转座、缺失和倒置, 这些元件产生的插入通常更加稳定。也可参见 Berg et al., (1989) Transposable elements and the genetic engineering of bacteria, p.p. 879-926, in D. E. Berg, Mobile DNA, American Society of Microbiology, Washington, DC. 通过这种方法, 衍生自 Tn10 的

元件也能获得稳定的插入。Way, J. C. et al., (1984) (Gene 32: 369-379)。

Herrero 等 seq., p. 6569 描述了小 Tn5Tc 的结构, 其用于诱变插入或者作为转座子载体用于侧接了 NotI 位点的 DNA 片段的克隆 (克隆 DNA 片段首先进入 pUC18 衍生物 pUC18Not 和 pUC18Not 分离)。使用标准的重组 DNA 技术体外构建小 Tn5Tc 元件 (Maniatis, T., et al., (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.)。质粒的 EcoRI 片段将它们作为插入子忍受时, 就可确定其四环素抗性 (Fellay, R., et al. (1987) Interposon mutagenesis of soil and water bacteria: a family of DNA fragments designed for in vitro insertion mutagenesis of Gram-negative bacteria. Gene 52: 147-154)。片段克隆到 pUC18Sfi 单一的 EcoRI 位点上, 作为 SfiI 片段被切除, 并插入到 pUT 里 Tn5 末端的 19 个碱基对之间, 从而在任何情况下转移单元都会作为转移质粒 XbaI-EcoRI 部分存在。最终元件是小 Tn5Tc。

基于 Tn10 的转座子载体传递系统描述于 Herrero, M. et seq. 172: 6557-6567, IRP167 的衍生物噬菌体 1 携带有 5.1kb 的含有小 Tn10Km 元件的 EcoRI 插入片段, IS10R 的转座酶基因定位于移动元件反向重复序列的外侧和 PTac 启动子的下游。为了获得可独立于宿主调节其转座的转座子转移质粒, EcoRI 插入片段与 pBOR8 连接, 它衍生于 pGP704, 含有来源于质粒 pMJR1560 的 lacIq 基因。这一质粒由于缺乏 pir 基因的 R6K 特异性 p 蛋白产物, 因此不能在宿主菌株内复制。pGP704 含有 RP4 质粒的接合转移来源 (oriT 序列), 所以当被赋予移动功能时, 就可以转移到革兰氏阴性菌中。含有小 Tn10 的起始卡那霉素抗性基因的起始特异性 p 蛋白产物的 MluI 片段在反向重复序列内, 并被含有 SfiI-Pttz 组件的片段取代, 通过加入 NotI 位点和 MluI 结合体使

之被适当修饰，产生 pLODPtt。这一构建体在小 Tn10 的反向重复序列之间具有 SfiI, NotI 和 XbaI 克隆位点。pLODPtt 的 Ptt 抗性标记 (Ptt') 转变为卡那霉素抗性以生成质粒 pLOFKm。

为了形成含有戊糖发酵生产乙醇所必需的遗传成分的遗传稳定菌株，需要对运动发酵单胞菌进行遗传操作，然而这一操作仍然存在困难，使发酵单胞菌能够利用戊糖的遗传成分编码木糖异构酶、木酮糖激酶、转醛酶和转酮酶。

由于上述原因，需要构建稳定的重组运动发酵单胞菌菌株，其能够发酵戊糖例如木糖和阿拉伯糖或者二者从而生成乙醇。因此，需要编码戊糖代谢的酶的基因的稳定插入。同时还需要稳定的工业运动发酵单胞菌菌株，这类菌株具有抗生素抗性，在非选择性培养基中至少稳定 40 代以上。有价值的工业菌株最好还具有较高的接近与最大理论值的产物生成速率。现有技术中乙醇的微生物生产所存在的缺陷在本发明中得以克服。

发明内容

本发明的目的之一是提供一种制备含有编码利用和发酵戊糖所需酶的外源结构基因的稳定的发酵单胞菌整合体的方法。在一些实施例中，这些酶选自由 xylAB、tal/tkt 和 araBAD 组成的组。在另一些实施例的构建体中，至少包括一种调节基因以诱导结构基因进入运动发酵单胞菌的基因组中。

本发明的另一个目的是提供一种改进的运动发酵单胞菌菌株，它能够稳定的表达编码在非选择培养基（即缺乏抗生素或抗生素抗性标记）中利用戊糖所必需的酶的结构基因。

本发明的另一个目的是提供一种改进的染色体或天然质粒修饰的运动发酵单胞菌菌株，它能稳定的表达结构基因，快速生成特定产物并具有较高的转化效率。本发明的稳定的发酵单胞菌整合体在 80 到 160 代以后仍然具有稳定性。在另一实施中，本发明提供一种改进的用于纤维素水解产物反应混合物的生物催化剂。这些生物催化剂是重组的发酵单胞菌，其构成本发明的部分内容。

本发明还提供一种对外源基因稳定插入细菌基因组非常有用的转座子。在一个实施例中，转座子包括：至少一个具有编码酶的结构基因的操纵子，所述酶选自由 xylAB、araBAD 和 tal/tkt 组成的组；至少一个用于在细菌中表达结构基因的启动子；一对反向插入序列；操纵子包含在插入序列内，转座酶基因位于插入序列的外侧。在另一方面，本发明提供一种能够使戊糖发酵酶编码基因转化到发酵单胞菌基因组的质粒穿梭载体。在一些实施例中，质粒穿梭载体包括至少一个具有编码酶的结构基因的操纵子，所述酶选自由 xylAB、araBAD 和 tal/tkt 组成的组；至少一个用于在细菌中表达结构基因的启动子；与被转化的细菌基因组基因具有同源性的至少两段 DNA 片段。在另一个实施例中，本发明提供了整合至少两个含有戊糖发酵酶编码基因的操纵子的方法。在一个实施例中，这两个操纵子是 PgapxylAB 和 Penotaltkt 或者 Pgaptaltkt。在本发明的另一个实施例中，运动发酵单胞菌 ATCC31821 菌株的复合限制系统可以用来生成稳定的戊糖发酵菌株。在另一个实施例中，转座子和穿梭质粒用来构建改进的稳定的能够发酵含有戊糖的底物从而生成乙醇的运动发酵单胞菌。此外，还提供了一种使用在非选择性培养基中稳定表达的遗传修饰的发酵单胞菌来将来源于纤维素的戊糖转化为燃料和化学物质的方法。

本发明的一方面特别提供了一种使用遗传修饰的发酵单胞菌由戊糖生产乙醇的方法。

在一个实施例中，该方法包括：制备整合的发酵单胞菌菌株，其稳定的插入了编码至少四种戊糖发酵酶即木糖异构酶、木酮糖激酶、转醛酶和转酮酶的基因，所述整合包括至少两步整合，第一步为同源重组，第一操纵子结合第一和第二戊糖发酵酶的编码基因，第二步为转座，第二操纵子结合第三和第四戊糖发酵酶的编码基因，把整合的发酵单胞菌菌株加入到含有戊糖的原料中，通过发酵戊糖从而获得含有乙醇的混合物。

在一些实施例中，戊糖包括木糖、阿拉伯糖或者两者的混合物。因此，在一些实施例中，戊糖进一步被描述为来源于生物量。方法的一个特别方面在于使用了运动发酵单胞菌菌株（*Z. Mobilis*）ATCC31821。本发明的整合运动发酵单胞菌菌株被定义为整合的运动发酵单胞菌 ATCC31821 Penotaltkt/PgapxylAB。在实施例中，特定的整合菌株被称作 int2/321, int2/1821, x9t(enott)Pi#4, x9t(enott)Pi#8, 321(5), 481, 2032, 2122, 8b 和 321-a。

在一些实施例中，本发明提供了在相对高浓度的醋酸盐或者醋酸的存在下，能够发酵戊糖（木糖，阿拉伯糖）生成乙醇的整合的发酵单胞菌及其衍生物。在实施例中，本发明提供了在醋酸盐或者醋酸浓度为 2g/L、4g/L、8g/L、10g/L、12g/L 甚至高达 16g/L 时能够生产乙醇的整合的菌株。

本发明的另一个实施例提供了能够发酵戊糖原料生成乙醇的整合的发酵单胞菌。这些整合菌株的具体例子是 int2/321, int2/1821, x9t(enott)Pi#4, x9t(enott)Pi#8, 321(5), 481, 2032, 2122, 8b 和 321-a。

在另一个实施例中,构建了携带有利用甘露糖的基因(*manA*)的载体并将载体转化运动发酵单胞菌 ATCC31821 和 39676,从而得到发酵甘露糖的发酵单胞菌菌株。同样的转化方法用于本发明的整合的菌株,以产生能够发酵生物物质中的木糖和甘露糖或者木糖、阿拉伯糖和甘露糖的发酵单胞菌菌株。

在另一个实施例中,利用甘露糖的基因(*manA*)和利用甘露糖所需的任何其他基因被整合入运动发酵单胞菌 ATCC31821 和 39676 及其衍生物和所述的各种整合菌株的基因组中,产生能够发酵生物物质中木糖和甘露糖或者木糖、阿拉伯糖和甘露糖的整合菌株。

本发明的其他优点将在下面部分作进一步描述,通过描述和实施本发明,其优点是显而易见的。通过所附的权利要求中所描述的方法,将能够理解并达到本发明的优点。

附图的简要说明

附图与说明书结合在一起构成说明书的一部分,其描述了发明的至少一个实施例,与说明书一起阐述了发明的实质。

图 1 是根据本发明的 pGP704 中的小 Tn5 的质粒图谱,其含有木糖同化酶操纵子。

图 2 是根据本发明的小 Tn5 系列构建物的质粒图谱。

图 3 描述了形成 pUCtal_{tk}tSfi 质粒图谱的一系列构建。

图 4 是 tal/*tk*-xylA_{xyl}B 运动发酵单胞菌转接合子与 Tal 探针 Southern 杂交分析的结果。C 是控制质粒 Tn5 tal/*tk*-xylA_{xyl}B。 λ /H 是 DNA 大小标记。

图 5 是 tal/tkt-xylA_{xylB} 运动发酵单胞菌转接合子与 Tnp 探针 Southern 杂交分析的结果。C 是控制质粒小 Tn5 tal/tkt-xylA_{xylB}。λ/H 是 DNA 大小标记。

图 6 是根据本发明的稳定的发酵木糖的运动发酵单胞菌菌株的几种分离物的酶活性的示意图。

图 7 是图 6 的四种分离物 (nos.21,22,5 和 11) 的发酵曲线示意图, 并与包含质粒菌株 39673/pZB4 和 BC1/pZB4L 进行比较。

图 8 描述了根据本发明的稳定的发酵木糖的运动发酵单胞菌菌株 C25 和 D92 的稳定性。图表以乙醇的产率和木糖利用参数为指标, 表明了包含质粒菌株和基因组整合的木糖发酵菌株的稳定性。本发明的菌株 C25 和 D92 在 90 代以后仍然保持稳定。发酵培养基包括含有 1 葡萄糖和 5%木糖的 RM, 温度恒定为 30℃。

图 9 描述了生物量浓度(a)、乙醇浓度(b), 木糖利用率(c), 根据本发明的基因组整合的木糖发酵菌株 C25 和 D92 在含有 4.5%葡萄糖和%木糖的 RM 培养基中间歇发酵的产率和%木糖利用结果的比较, 发酵条件是 pH5.0 和 pH5.5, 温度 30℃。

图 10 是整合质粒 pZB1862-ldh-ara 的图谱。araBAD 插入到 ldhL 的 NotI 位点从而切断 ldh。构建是以运动发酵单胞菌的复制质粒 pZB1862 为基础的。

图 11 是 Tn10G 的质粒图谱。IS10_R 是转座酶基因。IR 是转座子的反向重复序列。AraBAD 被插入到两段反向重复序列之间的 NotI 位点。

图 12 显示了通过同源重组得到的基因组整合的发酵木糖/阿拉伯糖的运动发酵单胞菌菌株与 DIG-ara 和 DIG-ldh 探针

Southern 杂交分析的结果。AX1,13,23,101,104 和 107 是 araBAD 整合体。C25 是对照宿主。PZB1862-ldhL-ara 是分离自 DH5 α 的对照质粒。λ/H 是分子量标记: 23,9.4,6.6,4.3,2.3 和 2.0kb。

图 13 代表了通过转座子整合得到的基因组整合的发酵木糖/阿拉伯糖的运动发酵单胞菌菌株与 DIG-tnp 和 DIG-ara 探针 Southern 杂交分析的结果。G5,6,11,15,17,14 和 19 是 araBAD 整合体。C25 是对照宿主。Tn10G 是对照质粒。λ/H 是分子量标记: 23,9.4,6.6,4.3,2.3 和 2.0kb。图 13(a)是 tnp 探针和 PstI 消化,图 13(b)是 ara 探针和 PstI 消化。

图 14 代表了基因组整合菌株的转酮酶、转醛酶、木糖异构酶和木酮糖激酶的酶活性的条线图。206C/pZB301 是对照质粒。206C 是对照宿主。C25 是木糖发酵整合体。G8 是源自 Tn10 转座的木糖/阿拉伯糖发酵整合体。AX1 和 AX101 是源自同源重组的木糖/阿拉伯糖发酵整合体。

图 15 代表了基因组整合菌株的 L-阿拉伯糖异构酶、L-核酮糖激酶和 L-核酮糖-5-磷酸-4-差向异构酶的酶活性的条线图。206C/pZB301 是对照质粒。206C 是对照宿主。C25 是木糖发酵整合体。G8 是源自 Tn10 转座的木糖/阿拉伯糖发酵整合体。AX1 和 AX101 是源自同源重组的木糖/阿拉伯糖发酵整合体。

图 16 代表了基因组整合的发酵木糖和阿拉伯糖的发酵单胞菌菌株在 RMGXA(1:2:2%)上乙醇产率的条线图,发酵条件是 30℃,不控制 pH。这些菌株在不同的代数时从培养物中接种到非选择性培养基上。

图 17 代表了基因组整合的发酵木糖和阿拉伯糖的发酵单胞菌菌株在 30℃、控制 pH 下在含有 1%葡萄糖,2%木糖和 2%阿

拉伯糖的 RM 上木糖和阿拉伯糖利用结果的条线图。这些菌株在不同的代数时从培养物中接种到非选择性培养基上。

图 18 代表了基因组整合的发酵木糖和阿拉伯糖的发酵单胞菌菌株在 30℃、pH5.5 时在含有 4%葡萄糖, 4%木糖和 2%阿拉伯糖的 RM 上发酵能力的折线图。

图 19 是用于同源重组到运动发酵单胞菌菌株 31821 的 pZB510XTc(19A)和 pZB512XTc(19B)的质粒图谱。

图 20 是用于整合转座到运动发酵单胞菌菌株 31821 的 pMODP_{eno}taltktCm 的质粒图谱。

图 21A 和 B 代表了运动发酵单胞菌 31821 整合体的 Southern 杂交印迹。实验中使用探针 xylB(21A)和 tkt(21B)。对照质粒包括 pMODP_{eno}taltktCmpZB510XTc 和 pZB512XTc, 并注明了 int2/321 中的 P_{gap}xylAB 来自 pZB512XTc。int2/1821 中的 P_{gap}xylAB 来自 pZB510XTc。λ /H 作为分子量标记。

图 22 代表了 x9t(inott)Pi#4、x9t(inott)Pi#8、int2/321 和 int2/1821 以及对照菌株酶活性的条线图。

图 23 代表了 x9t(inott)Pi#4、x9t(inott)Pi#8、int2/321 和 int2/1821 在 RMX 培养基中生长适应的折线图。

图 24 是用于整合转座到运动发酵单胞菌菌株 31821 的 pMODP_{gap}taltktCm 的质粒图谱。

图 25 代表了#20和#21在 RMX 培养基中生长适应的折线图。

图 26 A 和 B 代表了运动发酵单胞菌 31821 整合体的 Southern 杂交印迹。实验中使用探针 xylB(26A)和 tkt(26B)。对照质粒包括 pMODP_{eno}taltktCm、pMODP_{gap}taltktCm 和 pZB512XTc, 并注明了 321(5)中的 P_{gap}xylAB 来自 pZB512XTc。λ /H 作为分子量标记。

图 27A 到 C 描述了发酵单胞菌整合体在 RMGX 中的木糖(27A)和葡萄糖(27B)的利用以及乙醇产量(27C)。

图 28A 和 B 描述了发酵单胞菌整合体在 RMX 中的木糖(28A)的利用以及乙醇产量(28B)。

图 29A 到 C 描述了发酵单胞菌整合体在 RMGX (1%: 6%) 中的控制 pH 发酵的葡萄糖(29A)和木糖(29B)的利用以及乙醇产量(29C)。

图 30A 到 C 描述了发酵单胞菌整合体在 RMGX(3.5%: 3.5%) 中的控制 pH 发酵的葡萄糖(30A)和木糖(30B)的利用以及乙醇产量(30C)。

图 31 描述了稳定性测试实验。

图 32A 和 B 代表了根据本发明的稳定的发酵木糖的运动发酵单胞菌菌株 2032、8b、481 和 2/321-2 的稳定性的条线图。图中用木糖的利用率(32A)和乙醇产率(32B)来表示基因组整合的发酵木糖菌株的稳定性。本发明的菌株 2032、8b、481 和 2/321-2 在 80 代以后仍然保持稳定。发酵培养基包含 2%葡萄糖和 2%木糖的 RM 并且温度恒定为 30℃。

图 33A 和 B 代表了根据本发明的稳定的发酵木糖的运动发酵单胞菌菌株 8b、2032、481 和包含质粒菌株(31821/pZB5)的稳定性的条线图。图中用木糖的利用率(33A)和乙醇产率(33B)

来表示基因组整合的发酵木糖菌株的稳定性。本发明的菌株 2032、8b 和 481 在 80 代以后仍然保持稳定。发酵培养基包含 2% 葡萄糖和 2% 木糖的 RM 并且温度恒定为 30℃。

图 34A 到 F 描述了在 pH 为 5.0、5.5 和 6.0 且存在醋酸盐的情况下，葡萄糖利用（34A）、木糖利用（34B）、阿拉伯糖利用（34C）、生长（34D）、乙醇产量（34E）和乙醇产率（34F）的曲线。

图 35A 和 B 描述了从葡萄糖和木糖连续恒定的生成乙醇（35A），和在醋酸盐浓度提高时副产物的形成（35B）。

图 36A 和 B 是在醋酸盐浓度为 0、2、4 和 6g/L 时木糖利用（36A）和乙醇产率（36B）的条线图。

图 37A 和 B 是在醋酸盐浓度为 0、8、12 和 16g/L 时木糖利用（37A）和乙醇产率（37B）的条线图。

图 38 是含有甘露糖利用基因的 pZB701 的质粒图谱。

图 39A 和 B 是#2、4、6、13 和 19 在 RMM 培养基中的生长适应图。

发明的最佳实施方式

除非特别说明，这里所使用的技术术语或者科学术语与本领域技术人员所公知的具有相同的含义。尽管任何与这里描述的类似的或者等同的方法和材料都可以用于本发明的实施和检验，但这里描述了较佳的方法和材料。所有提及到的美国专利都作为参考并收入本篇。

为了获得能够利用戊糖的遗传稳定的运动发酵单胞菌 ATCC31821, 使用两种整合方法, 包括同源重组和转座。构建两个操纵子 $P_{gapxylAB}$ 和 $P_{enotaltkt}$ (或者 $P_{gaptaltkt}$), 每个都可以作为单一组件进行整合。优选的, 每个操纵子都含有用于筛选整合体的抗生素抗性基因。

对于同源重组, $P_{gapxylAB}$ 操纵子整合入菌株 31821 的 ldh 使用了 4kb 的 DNA 片段, 其具有 1kb 的 ldh 区域并侧接了 pgm 和 $adhI$ 基因。这一同源 DNA 片段被称作 $ldhL4$ 。以 31821DNA 为模板, 使用 Pfu 聚合酶, 将片段 $ldhL4$ 扩增为两个 DNA 片段 ($5'ldhLR$ 和 $3'idhL4$), 通过载体 pZB1861 的克隆进行重排。在 PCR 反应中引入 NotI 和 SfiI 位点, 用于接下来的 $P_{gapxylAB}$ 和 Tc^r 的克隆(见下面的实施例)。根据运动发酵单胞菌 CP4 的 DNA 序列设计引物 (Yamano et al (1993) J. Bact. 175:3926-3933)。

对于转座, 发现菌株 31821 具有一种限制系统, 其可以降解导入宿主细胞中的甲基化的 DNA。使用 MiniTn5Tc via E. coli. Sm10(λ pir)作为供体宿主的转座是不成功的。因此, $P_{enotaltkt}$ 或者 $P_{gaptaltkt}$ 操作子的整合是通过使用 EZ::TNTM 插入试剂盒 (Epicentre, Wisconsin) 实现的, 该试剂盒提供了高效的转座酶 (基于 Tn5) 和携带有遗传改进的插入序列 (Mosaic 末端) 的载体 (pMOD)。使用该试剂盒, 用转座子 (转座酶束缚的 $P_{enotaltkt}$ 或者 $P_{gaptaltkt}$) 对宿主细胞进行转化, 在这里, 通过甲基化缺陷型宿主或者整合了 $P_{enotaltkt}$ 的天然运动发酵单胞菌 31821 质粒来制备 DNA。

虽然下面的描述和实施例是关于两个操纵子整合到运动发酵单胞菌的基因组中的, 但本发明的方法可以经过适当修饰从而用于四种戊糖利用基因中的每一种基因在其启动子控制下的整合。此外, 任意数目的启动子都可用于本发明中进行目标基因的

表达，只要该启动子能够使利用木糖的基因在运动发酵单胞菌中直接表达。

下面将对本发明的优选实施例作详细的描述，同时以附图作必要的说明，在下面描述的实施例中，“包含质粒菌株”与相关领域已审美国专利中所描述的菌株和载体相同或者相关。“运动发酵单胞菌基因组或基因”是指所有已经在给定运动发酵单胞菌中表达或者具有潜在表达可能性的基因。

实施例

菌株，质粒和培养基

大肠杆菌 *E.coli* 菌株 C118 λ (pir), CC118(pir) (mini-tn5Tc), SM/0 λ (pir)和含有小转座子 Tn5 和 Tn10 的质粒 pUC19, pLOF/Km, pUC18sfi, pUT/Tc 和 pUC18 由 K.Timmis 博士 (GBF-Gesellschaft Fur Biotechnologische Forschung mbH, Mascheroder weg 1 D-38124 Braunschweig, 联邦德国) 惠赠。E.coliDH5 α (生命技术) 作为构建质粒的宿主。E.coliSM10 λ pir 在接合试验中作为供体菌株使用。运动发酵单胞菌菌株 ATCC39676 及其变异株 206C (美国专利 No.5843760) 在本发明中作为受体使用。构建基于 Tn10 的质粒并包含在 E.coliCC118 中。整合质粒在转化运动发酵单胞菌 ATCC31821 宿主或其变异株 5C 之前, 先转化甲基化缺陷型 E.coli 宿主例如 JM110 和 DM1, 整合质粒是通过消除质粒 31821/Pzb5 得到的。在 LB 培养基中于 37°C 条件下振荡(200rpm)培养 E.coli。除非特别说明, 运动发酵单胞菌菌株保存于 RM (10g/L 酵母提取物, 2g/L KH₂PO₄) 中并添加 20g/L 葡萄糖、D-木糖或者 L-阿拉伯糖。所有包含质粒的菌株都生长于适当抗生素存在的条件下, 例如四环素 (Tc), 对于运动发酵单胞菌和 E.coli 来说, 在液体培养基中的浓度为 10ug/ml, 在琼脂培养基中, 对于运动发

酵母单胞菌是 20ug/ml, 对于 E.coli 是 10ug/ml。氨苄青霉素 (Ap), 对于 E.coli 是 100ug/ml。氯霉素 (Cm), 对于运动发酵单胞菌是 120ug/ml, 对于 E.coli 是 100ug/ml。为了再生和筛选运动发酵单胞菌转化体或者转接合子, 使用接合平板 (MMG 或者 MMX; 10g/L 酵母提取物, 5g/L 蛋白胨, 2.5g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.2g/L K_2HPO_4 和 50g/L 糖) 并添加四环素或萘啶酮酸 (20ug/ml)。所有的琼脂平板都用 15g/L 琼脂来制备。

在一些实施例中, 含有所有四种基因 (xylA, xylB, tal 和 tkt) 的整合体生长于木糖培养基中。整合体从 RMGTcCm 转移到 RMX (1:50), 并于 30℃ 条件下进行培养。为了适应 RMX, 在木糖培养基中生长的培养物在达到指数生长期时即转移到新鲜的 RMX 中。生长情况通常是由 Spectronic 601 (Milton Roy) 的 OD600 测量来监控的。

通过将含有 PpdcmanA 的 DNA 片段克隆至穿梭载体 pZB188 来构建质粒 pZB701。用 PCR 对 Ppdc 和 ManA 结构基因分别进行扩增, 然后通过第三次 PCR (重叠延伸 PCR) 结合在一起, 从而使 PDC 基因的包括 RBS 启动子的 5' 转录和翻译调节区域和起始密码子与 manA 结构基因精确的融合。

重组 DNA 技术

质粒 DNA 分离、限制性内切酶消化、连接和转化、琼脂糖凝胶电泳和其他的重组 DNA 技术的操作参见公开出版物: Sambrook 等人, (1989), Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor laboratory press, Cold Spring Harbor, NY, 或者各类试剂产品的说明书, 这是本领域所熟知的。细胞重悬浮在 250ml 的 50mM Tris-50mM EDTA 缓冲液中过夜, 从三毫升的悬浮细胞中提取运动发酵单胞菌的基因组 DNA。在 37℃ 下 100ml

的 5%SDS 溶液中用溶酶体处理细胞 30 分钟，然后加入 RNA 酶（终浓度等于 20ng/ml）再培养 30 分钟。酚-三氯甲烷提取操作两次，以除去蛋白。乙醇沉淀回收基因组 DNA。可选择的，也可使用 Pruegen 试剂盒（GentraSystem, MN）提取运动发酵单胞菌基因组总 DNA，利用 Qiaprep Spin Miniprep 试剂盒（Qiagen, CA）提取质粒 DNA。

接合，转座和转化

采用过滤接合技术（Conway 等，1987）将质粒从供体菌株 E.coliSM10 λ pir 或者 S17-1 转移到运动发酵单胞菌中。

在一些实施例中，使用商品试剂盒 EZ::TNTM 插入试剂盒来生成用于转座的转座子。根据生产说明书的内容并稍作变化用转座酶处理质粒 pMODP_{eno}taltktCm。对于体外转座，在运动发酵单胞菌 31821 天然质粒（目标 DNA）存在的情况下，用转座酶在 37℃ 下处理整合质粒 2 小时。在转化到运动发酵单胞菌 31821 之前，反应在 0.1%SDS 和反渗析 5%甘油以及 5mMTris（pH7.6）中加热至 70℃ 并维持 10 分钟。对于体内转座，用转座酶在室温下处理整合质粒 1 小时随即进行电穿孔（Bio-Rad 基因脉冲发生器，0.1cm 间隙容器，1.6kV，200ohms，25 μ FD）。在 OD600=0.4-0.6 时收集细胞从而制备电感受态运动发酵单胞菌或者大肠杆菌细胞。用冰预冷的无菌水清洗细胞一次随即用 10%甘油处理，并浓缩至约 1000 倍。将细胞等分并保存于 -80℃ 下。

也可根据 Zhang 等人，（1995）Science 267:240-243 所描述的电穿孔的方法将质粒 DNAs 转化到运动发酵单胞菌 39676 或大肠杆菌细胞中。

Southern 印迹分析

采用 Stratagene Posi 印迹压力吸纸将 DNA 转移到尼龙膜上。通过聚合酶链反应 (PCR) 对 DNA 探针 Tc,xylB,Tnp 和 Tal 进行地高辛-UTP 标记。用于 DNA 标记的引物如下所示:

Tc: 5'-TTGCTAACGCAGTCAGGC-3' (SEQ ID NO:1)

5'-GAATCCGTTAGCGAGGTG-3' (SEQ ID NO:2)

xylB 5'-TATGGGTTCAGCGGCATGAG-3' (SEQ ID NO:3)

5'-ATGGGCATGAGATCCATAGCC-3' (SEQ ID NO:4)

Tnp 5'-TCCTAACATGGTAACGTTC-3' (SEQ ID NO:5)

5'-CCAACCTTACCAGAGGGC-3' (SEQ ID NO:6)

Tal: 5'-CGTCTAAAAGATTTTAAGAAAGGTTTCGATATGACGGACA
AATTGACC-3' (SEQ ID NO:7)

5'-CATTTTGACTCCAGATCTAGATTACAGCAGATCGCCGATCA
TTTTTTCC-3' (SEQ ID NO:8)

预杂交和杂交都是按照 Boehringer Mannheim 杂交试剂盒的说明书描述的内容来进行。

聚合酶链反应 (PCR) 扩增

为了构建用于基因整合的整合质粒, 使用 Pfu 聚合酶 (Stratagene, La Jolla, CA) PCR 扩增以下片段, 其引物对也如下所示:

1. 5'IdhL4(1.9kb)

模板：运动发酵单胞菌 31821 DNA

引物：

P16(F)5'CCATCGATTCTAGAATCTCGCGTAATAAACT
ATCAGGCGCAATCG3' (SEQ ID NO:9)

P17(R)5'CGCGGATCCAGATCTGGCCTAGGCGGCCTCA
TAATATGGGCAAAGACACTCCCG3' (SEQ ID NO:10)

2. 3'IdhL4 (2.4kb)

模板：运动发酵单胞菌 31821 DNA

引物：

P18(F)5'GAAGATCTGCGGCCGCGTTTTGGTGCCAATG
TTATCGCC3' (SEQ ID NO:11)

P19(R)5'GAAGATCTAAGCTTGGATAGCGGCTTATAGC
AACGAGTG3' (SEQ ID NO:12)

3. Tc^r (1.5kb)

模板：pBR322

引物：

Tc(F) 5'AAAGGCCGCTAGGCC3'(SEQ ID NO:13)

Tc(R) 5'AAAGGCCGCTAGGCCG3' (SEQ ID NO:14)

4. Cm^r (1kb)

模板: pZB186

引物:

Cm(F, Eag) 5'CCGAATAAATACGGCCGCCTGTGACGG
AAGATCACTTC3' (SEQ ID NO:15)

Cm(R, Eag) 5'TAACGACCCTGCCGGCCGCCTGAACC
GACGACCGGGTTCG3' (SEQ ID NO:16)

构建 pZB512XTc 和 pZB510xTc 用于同源重组

将 P_{gapxylAB} (来自 pZB4) 和 Tc^r (PCR 产物) 插入到 5'IdhL4(1.9kb)和 3'IdhL4 (2.4kb)片段之间的 NotI 和 SfiI 位点之间, 从而构建得到整合质粒 pZB510xTc (见图 19(A))。质粒 pZB512XTc (见图 19(B)) 的构建途径与此相似, 只是 P_{gapxylAB} 的定位与 pZB510xTc 中相反。

构建 pMODP_{enotaltkt}Cm 用于转座

PCR 产生的 Cm^r 片段克隆到载体 pMOD(Epicentre, WI)的 SmaI 位点, 获得 pMODCm。来自 pUCtaltk (zhang 等人, (1995) Science 267:240-243) 的 BglII 片段克隆至 pMODCm 的 BamHI 位点形成 pMODP_{enotaltkt}Cm (见图 20)。克隆到 pMOD 的片段两端侧接了 19bp 的 Mosaic 末端 (IS), 其可以被转座酶识别从而进行转座。

从同源重组消除质粒以获得 xylAB

将生长于 RMGTcCm (30 °C) 的运动发酵单胞菌 5C/pZB512XTc 的过夜培养物每天转移到 5ml 的 37°C 的 RMG 试管中进行继代培养 (1:100), 共转移 10 次。每次转移中, 测量培养物中质粒的损失并与 RMG 和 RMGCm 平板的克隆数目进行比较。当包含质粒细胞的数量低于总数的 10%, 将培养物接种 (1:100) 到 RMGTc 使潜在的 $P_{gap}xylABTc$ 整合体富集生长。RMGTc 富集培养物转入 RMGTc 平板上并在 RMGTc 和 RMGCm 平板上影印培养。具有 TcrCms 表型的克隆应作进一步分析从而确定整合体。

酶分析

在一些实施例中, 根据 Zhang 等人, (1995) Science 267: 240-243 的方法稍作改变, 用运动发酵单胞菌整合体的无细胞提取物和控制菌株对木糖异构酶 (XI)、木酮糖激酶 (XK)、转醛酶 (TKT) 和转酮酶 (TAL) 进行分析。收集处于迟滞后期的培养物 (30 °C, OD600 约 1.2) 用超声处理缓冲液 (10mM Tris-Cl, pH7.6, 10mM $MgCl_2$) 清洗一次随即进行超声处理以制备运动发酵单胞菌的无细胞提取物。离心 (14,000 rpm, 45 分钟, 4 °C) 除去细胞碎片。

实施例 1

以下实施例描述了含有编码木糖同化酶基因的小 Tn5Tc 的构建以及该构建物接合转移到运动发酵单胞菌 206C 和 ATCC39676。将 $P_{gap}-xylAxylB$ 操纵子插入到质粒 pGP704 中小 Tn5Tc 的特异性 NotI 位点上, 从而构建含有编码木糖同化酶基因

的小 Tn5Tc。参见图 1。Pg_{ap}-xylA_{xylB} 操纵子取自质粒 pZB4 或 pZB5，美国专利 Nos.5712133 和 5726053。最终质粒命名为小 Tn5Tc xylA/xylB(X4)和小 Tn5Tc xylA_{xylB}(X5)，通过电穿孔将其转化到供体菌株 E.coli SM10λpir 中并与运动发酵单胞菌 ATCC39676 或者 206C 菌株进行接合。运动发酵单胞菌 206C 公开于美国专利 No.5843760，此处纳入作为参考。在含有 Tc 和萘啶酮酸的培养基中，挑选含有小 Tn5Tc xylA_{xylB}(X4)和小 Tn5Tc xylA_{xylB}(X5)的 SM10λpir 供体获得九个发酵单胞菌 Tc^r 转接合子。参见图 2(b)。

然后对九个运动发酵单胞菌 Tc^r 转接合子的基因组和质粒 DNA 进行 Southern 印迹分析。来自转接合子的基因组和质粒 DNA 用 SphI 消化，在杂交转座子和木糖操纵子内进行切割，并使印迹与 Tc 探针、XylB 探针或者转座酶 Tnp 探针杂交。通过放射自显影可以确定：(1)木糖操纵子 Pg_{ap}-xylA_{xylB} 与 Tc^r 基因一起插入发酵单胞菌的基因组中；(2)每个转接合子只有一个插入；(3)每个插入都在基因组的显著位置；(4) Tc^r 基因与 XylB 不存在于质粒部分；(5) tnp 转座酶基因不存在于转接合子中。

对发酵单胞菌 Tc^r Pg_{ap}-xylA_{xylB} 转接合子进行酶分析以确定发酵单胞菌 Tc Pg_{ap}-xylA_{xylB} 转接合子中木糖异构酶 (XI) 和木酮糖激酶 (XK) 得以表达。分析表明，所有转接合子的木糖异构酶水平大约为相应质粒酶水平的一半。类似的，包含质粒的菌株的木酮糖激酶活性的一半也与整合体的酶活性相当。在发酵单胞菌基因组中通过基因单拷贝表达的 XI 和 XK 的活性与包含质粒菌株的每个细胞 10 个拷贝相比，明显要高得多。

实施例 2 (C25)

实施例描述了如何构建表达四种戊糖发酵基因的发酵单胞菌整合体。通过该方法可以构建一种在缺乏抗生素选择的情况下基因稳定性提高的发酵单胞菌整合体。为了制备戊糖发酵菌株，需要用小 Tn5 将几种酶基因转入运动发酵单胞菌基因组中，这些酶基因是：木糖同化基因 *xylA* 和 *xylB*，编码木糖异构酶和木酮糖激酶；戊糖磷酸途径基因 *talB* 和 *tktA*，编码转醛酶和转酮酶。含有 *Pgap-xylA**xylB* 和 *Peno-talB/tktA* 的两个操纵子在小 Tn5 中进行配置，得到的质粒结合到运动发酵单胞菌中。在位于小 Tn5 组件外侧的转座酶的作用下，单拷贝的 *Pgap-xylA**xylB* 和 *Peno-talB/tktA* 插入到运动发酵单胞菌基因组中，这通过 Southern 杂交可以显示出来。对木糖异构酶、木酮糖激酶、转醛酶和转酮酶的酶分析显示，所有基因都得到表达，整合菌株表现出包含质粒菌株 30-70% 的酶活性。这些酶水平足以使机体生长并将特定的戊糖如木糖发酵生成乙醇。

为了简化克隆步骤，含有操纵子 *Peno-talB/tktA* 的 *Bg/II* 片段插入到新构建的辅助质粒 *pUSCfiMCS* 的 *BamHI* 位点（如图 3 所示）。将含有来自 *pUC19* 的多克隆位点的 *EcoR I-Hind III* 片段插入到 *pUCSfi* 中，从而构建得到辅助质粒 *pUSCfiMCS*。

参见图 2，*Peno-talB/tktA* 作为 *SfiI* 片段从 *pUCtal/tktSfi* 上切除，并克隆到小 *tn5-Tc-xylA**xylB* 上。如图所示，在 *tn5-Tc-xylA**xylB* 上，*Tc^r* 基因侧接了 *SfiI* 位点。用 *Sfi I* 对小 *tn5-Tc-xylA**xylB* 进行部分或者完全消化并与 *Peno-talB/tktASfi* 片段连接，如图 2(c) 所示。部分消化生成含有 *Tc^r* 基因的质粒，命名为小 *tn5-Tc tal/tkt-xylA**xylB*（图 2(c)），而完全消化产生的质粒不含 *Tc^r* 基因，命名为小 *Tn5-Tc tal/tkt-xylA**xylB*，见图 2(d)。

以上两种质粒都转化到供体菌株 *E.coli*, S17-1 中并与运动发酵单胞菌 206C 接合。在含有葡萄糖、Tc 和茶啉酮酸的接合培养基中筛选小 Tn5-Tc tal/tkt-xylA_{xylB} 的转接合子, 对于小 tn5-Tc tal/tkt-xylA_{xylB}, 直接在含有木糖和茶啉酮酸的接合培养基中筛选转接合子。获得大量的生长于葡萄糖的小 tn5 tal/tkt-xylA_{xylB}-Tc 的 Tc^r 转接合子。获得若干生长于木糖的小 tn5 tal/tkt-xylA_{xylB} 转接合子。

在 80ml 含有 2%木糖的 RM 中, 于 30℃ 不控制 pH 的条件下, 静态检测初始间歇培养物, 以确定其发酵动力学。将 RM+2%木糖平板上的克隆转移到 RM2%木糖培养基上过夜培养, 温度为 30℃, 直到培养物达到稳定的生长期(光密度 600 在 500nm 处为 0.1)。它们作为接种物使用。使用 P1047 装配的 Hewlett-Packard 1090L 高效液相色谱对木糖和乙醇进行分析。在 65℃ 条件下操作折射率检测仪和 Biorad HPX-87H 有机酸分析柱, 以 0.01N 的硫酸作为流动相, 流速为 0.6ml/min。通过发酵的糖的重量或者培养基中的总糖量来计算乙醇产量。最大理论产量为 0.51g 乙醇/g 木糖。

对来自运动发酵单胞菌转接合子的基因组和质粒 DNA 样品进行 Southern 杂交分析, 从而确定小 tn5 tal/tkt-xylA_{xylB} 组件是否发生了转座。从小 tn5 tal/tkt-xylA_{xylB} 的四个转接合子制备基因组和质粒 DNA, 用 SphI 消化。SphI 在组件内切割两次, 产生具有 Tal 探针同源性的一个片段。印迹与 Tal 探针或者 Tnp 探针进行杂交。图 4 的放射自显影显示了一条大于 4kb(Peno-talB/tktA 的大小) 的带, 它与运动发酵单胞菌的 DNA 相邻, 所有制备的 DNA 与 Tal 探针杂交时都能检测到。三个样品(可能同源的 nos. 22, 23 和 24) 在质粒部分也显示出一条带, 这表明天然质粒中发生了整合。样品 no.21 的运动发酵单胞菌基因组内也发生了整合,

并且只插入了一个拷贝。这些转接合子的基因组合质粒 DNA 样品与 Tnp 探针的杂交（图 5）表明样品 DNA 与 Tnp 探针之间没有同源性。这些结果表明，木糖同化和戊糖磷酸途径基因与 Tc^r 基因一起转座到运动发酵单胞菌的基因组内，每个转接合子只进行了一个插入，插入位于基因组中不同的位置。

发酵单胞菌转接合子的木糖异构酶、木酮糖激酶、转醛酶和转酮酶的活性的测定方法如前所述（Zhang 等人，1995）。前面已经提及，单一 Pgap-xylA_{xylB} 拷贝在基因组的表达量大约为包含质粒菌株的 XI 和 XK 酶量的一半。不过，为了确定转醛酶（TAL）和转酮酶（TKT）是否已经在运动发酵单胞菌 tal/tkt-xylA_{xylB}-Tc 和 tal/tkt-xylA_{xylB} 转接合子内进行表达，进行了酶分析，如图 6 所示，对于所有的转接合子（nos.4, 5, 17, 18, 21, 23 和 24）而言，其 TAL 的酶水平大约为其对应质粒的 50-70%。整合体中 TKT 的活性大约为包含质粒菌株的 30-70%。通过发酵单胞菌基因组内单拷贝基因的表达，质粒整合体的 TAL 和 TKT 的活性虽然只是稍有增加，但与包含质粒菌株每个细胞 10 个拷贝相比，活性明显提高。

所有四个 tal/tkt-xylA_{xylB} 发酵单胞菌整合体（nos.21, 22, 5 和 11）都能在木糖上生长。以 2%的木糖为底物，温度为 30℃，研究这些整合体的初始发酵，发酵曲线如图 7 所示。从图中可以看出，运动发酵单胞菌整合体 no.21 的生长速率和糖利用速率比包含质粒菌株 39676/pZB4 慢。不过，大多数的运动发酵单胞菌整合体（nos.22, 5, 和 11）与包含质粒菌株相当。所有的整合体都能通过木糖生产乙醇，最大理论产率为 92%。

在非选择性培养中，对这些基因组整合菌株和三个包含质粒菌株的稳定性进行测量。所有的菌株都培养于 RMG 培养基中，每天连续大约每 10 代转移一次。40 代以后，接种到含有 1%葡

葡萄糖和 5%木糖的 RM 培养基的摇瓶中，以测量其将木糖转化为乙醇的能力。乙醇的产率和木糖的利用速率是衡量稳定性的重要标志。有两个基因组整合菌株（C25 和 D92）的稳定性显示超过 90 代，而包含质粒菌株（206/pZB4, 206/pZB4L 和 BclpZB4L）只能稳定约 40 代。参见图 8。

在含有不同葡萄糖和木糖总浓度（1%葡萄糖和 5%木糖；3%葡萄糖和 3%木糖；4.5%葡萄糖和 4.5%木糖）的 RM 培养中，同时控制 pH，分析菌株 C25 和 D92 的发酵行为。如图 9 所示，在 pH 为 5 和 5.5 且含有 4.5%葡萄糖和 4.5%木糖的 RM 培养基中，菌株 C25 显示出比菌株 D92 更高的木糖利用能力和乙醇产率。在下面的实施例中，阿拉伯糖同化基因被整合到 C25 基因组中。

实施例 3 (AX)

以下实施例描述了通过同源重组将阿拉伯糖同化酶引入到 C25 的基因组中，这是通过 *ldh* 和使用小转座子 Tn10 的转座来实现的。下面将要描述质粒 pZB1862-*ldhL*-*ara*，通过电穿孔被转化到运动发酵单胞菌或者大肠杆菌中。在添加了葡萄糖和四环素的接合平板上筛选转化体。Tc^r 克隆能够生长在添加了木糖或者阿拉伯糖的 RM 培养基（RMX 和 RMA），因此确定其为 Ara⁺Xyl⁺。下面还会提及质粒 Tn10G，采用过滤接合技术（Conway 等人，1987）使其从大肠杆菌 SM10 λ pir 供体中转移到运动发酵单胞菌 C25。产生的转接合子在含有阿拉伯糖的接合平板上进行筛选。

A. 构建 pZB1862-*ldhL*-*ara* 并通过同源重组整合入 C25

过去曾经尝试，利用 1kb 的 *ldh* 片段作为同源区域，将 *araBAD* 整合入发酵单胞菌的基因组内，但没有成功。为了提高重组频率，需要有更大的同源区域。通过 PfuPCR，包含 *ldh* 和侧接区域的

2.5kb 的 DNA 片段得到扩增。根据 Yamano I., (1993) Journal of Bacteriology, Vol.175, 3926-3933 公开的运动发酵单胞菌 CP4 的 DNA 序列设计引物。通过 PCR 没有得到所预想的 2.5kb 的片段, 而是 3.4kb 的片段。用 BamHI 消化 3.4kb 片段, 得到 2.5 和 0.9kb 两个片段。两个片段都通过 PCR 检测, 使用设计的引物退火至只有 ldh。2.5kb 的片段产生了大小适当的 PCR 产物, 而 0.9kb 片段却没有, 这说明前者含有 ldh 序列。因此, 克隆 2.5kb 的 BamHI 片段 (命名为 ldhL) 并将其作为基因整合到 C25 的同源区域。

使用 Pfu (Stratagene, La Jolla, CA) DNA 聚合酶 (Qiagen, Valencia, CA) PCR 扩增 ldhL 片段。采用如下引物序列:

ldhL: 5'-TCGCGGATCCTCTATCCCTTTATTTTCTATCCCC
ATCACCTCGG-3'(SEQ ID NO:17)

5'-TCGCGGATCCGCGGCTGACATACATCTTGCGAA
TATAGGG-3' (SEQ ID NO:18)

为了克隆的目的, 需要将 NotI 位点引入 ldhL, 使寡核苷酸 5'-CATGCGCGGCCGCC-3'(SEQ ID NO:19)插入 NcoI 位点, 其位于 ldh 基因的中部。新的 NotI 位点距离 ldhL 两端分别为 1.4 和 1.1kb。含有 NotI 位点的 ldhL 的 BamHI 片段 (2.5kb) 连接到 pZB1862 的 BclI 位点。最后, 分离自 pZB206 (美国专利 Nos.5712133 和 5726053) 的 4.4kb 的 Pgap-araBAD 克隆到 ldhL 的 NotI 位点, 从而形成整合质粒 pZB1862-ldhL-ara。如图 10 所示。

含有三个阿拉伯糖同化基因的 Pgap-araBAD 操纵子, 通过同源重组整合到 C25 基因组的 ldh 位点。为了使 araBAD 基因整合到 C25 的基因组中, 在大肠杆菌 DH5 α 内构建 pZB1862-ldhL-ara。通过电穿孔将质粒 pZB1862-ldhL-ara 转移到 C25 内。筛选和检测

Tc 抗性转化体以生长于阿拉伯糖上。在转化体的增殖过程中，可以使 *ldhL'*-*araBAD*-*ldhL'* 组件代替 *IdhL* 通过同源重组使 *Pgap-ara-BAD* 整合到 C25 基因组中。

为了富集和分离转化体，对转化体的质粒进行消除。质粒 *pZB1862-ldhL-ara* 将在运动发酵单胞菌中进行复制。不过，运动发酵单胞菌在次最优生长条件下(例如 37℃)容易丢失外源基因。利用这一性质，将 C25 转化体在 37℃、缺乏 Tc 的情况下亚培养，经过几次转移，就可以消除 *pZB1862-ldhL-ara*。每一次转移，都检测培养物中质粒的消除情况。在第三次转移时，100%的细胞变为 Tc^S ，说明质粒已经消除。将第三次、第四次、第五次和第六次转移的培养物接种到含有阿拉伯糖 (RMA) 的 30℃ 的 RM 中，使潜在的 *Pgap-araBAD* 整合体富集生长。富集的细胞转移到 RMG 平板然后复制挑选到 RMA、RMX 和 RMGTc 平板上。对一些具有 $Xyl^+Ara^+Tc^S$ 表型的整合体 (AX) 作进一步分析，具体说明如下。这些整合体能够将木糖和阿拉伯糖作为唯一的碳源来使用。

B. 构建 Tn10G 并接合到 C25

使用小 Tn5 来构建带有 *Peno-tal/tkt* 和 *Pgap-xylAB* 操纵子的 C25。尽管 C25 中不存在转座酶基因，但利用小 Tn10 来进行后面的 *Pgap-araBAD* 的整合，以避免相同转座子之间任何的不相容性。以基于 Tn10 的传递质粒 *pLOFKm* 来构建质粒 Tn10G(图 11)。 Km^r 基因被分离自 *pZB206* 的 *Pgap-araBAD* 的 *NotI* 片段取代。构建 Tn10G 并保留在大肠杆菌 C118 内。然后将质粒转移到接合供体大肠杆菌 SM10 λ pir 从而与运动发酵单胞菌接合。由于 Tn10G 在运动发酵单胞菌中是自杀性质粒，所以只有整合了 *araBAD* 的转接合子才能在添加了阿拉伯糖的接合平板上生长。由于平板中有茶啉酮酸的存在，大肠杆菌 SM10 λ pir 供体受到抑制。在 7 天

内平板上可以看到转接合子。在 RAM 和 RMX 上复制筛选克隆以确定其表型。筛选的克隆有 86% 是 Xyl^+Ara^+ 。来自筛选平板的 20 个克隆交叉转移到不同的平板(例如从木糖平板转移到阿拉伯糖平板,反之亦然)。这些克隆有 60% 仍然保持 Xyl^+Ara^+ 的表型。初始 Southern 杂交对 20 个克隆进行分析。使用 tnp 探针,大约 50% 的菌株其基因组内含有转座酶基因。用 Southern 杂交对 8 个整合体作进一步分析。通过 Southern 杂交,确定 Pgap-araBAD 整合到 C25 的 Idh 内,因为 pZB1862-ldhL-ara 使用了 DIG 标记的 ara 和 Idh 探针。如图 12 (a) 和 (b) 所示。使用 TaqDNA 聚合酶 (Qiagen, Valencia, CA) PCR 扩增地高辛 (DIG) 标记的 ldh, ara 和 tnp 探针。DIG-UTP 购自 Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN。tnp 探针用来筛选 IS10_R, 其为 Tn10 的转座酶基因。ldh, ara 和 tnp 的 PCR 产物分别为 1, 1.4 和 0.8kb。使用以下引物序列:

DIG-ldh: 5'-TCGCGGATCCGTCTATGCGCGCGTCGCAATA
TTCAGTTCC-3' (SEQ ID NO:20)

5'-TCGCGGATCCGTCTGCTTGTCTATTAAACAAG
CGCATCCGGC-3' (SEQ ID NO:21)

DIG-ara: 5'-CTAACATGTTGACTCCTTCTCTAGACTTAGC
G-3' (SEQ ID NO:22)

5'-GTTGAAACCGCTGGGCACCACGC-3' (SEQ ID
NO:23)

DIG-tnp: 5'-CGCACTACACGGTCGTTCTGTTAC-3' (SEQ ID
NO:24)

5'-GGTTGCAGCCACGAGTAAGTCTTC-3' (SEQ ID
NO:25)

从印迹中可以看出, pZB1862-ldhL-ara 只有一个 PstI 位点, 并且定位于 Pgap-araBAD。因此, 使用 ara 探针, 从 PstI 消化的质粒可以预计到一条 12.9kb 的杂交条带。随着 Pgap-araBAD 整合到基因组中, 可以预计到两条带, 分别由 Pgap-araBAD 的 PstI 位点和定位于 Pgap-araBAD 外侧的基因组附属 PstI 位点产生。图 13 (a) 的结果清楚的显示了制备的总 DNA 与 ara 探针杂交所形成的两条带, 表明了 Pgap-araBAD 的整合。发酵单胞菌整合体的质粒 DNA 没有杂交条带说明整合发生于基因组内而不是天然质粒中。为了显示由于 Pgap-araBAD 整合而使 Idh 断开, 转移相同的 DNA 并与 ldh 探针杂交。和预计的一样, 整合体的两个杂交图谱印迹都相同, 除了 C25 以外, 如图 12 (b) 所示。C25 是 Pgap-araBAD 整合的宿主菌株, 其总 DNA 中有完整的 ldh, 其只显示了一条带。这一结果确定了 araBAD 是整合到 C25 的 ldh 中。

图 13 (a) 和 (b) 显示了用 DIG 标记的 Tnp 和 ara 探针对八个 Pgap-araBAD 转座子的 Southern 杂交, 这八个转座子是通过 Tn10 转座产生的。用 PstI 限制性酶消化 DNA。PstI 将 Tn10G 切割成两个片断, 与 ara 探针杂交。通过印迹分析, 只有 G8、G11、G15 和 GH17 是 ara 阳性和 tnp 阴性的。不同的图谱表明 Pgap-araBAD 整合到基因组的不同位置。虽然不希望转座酶基因留在整合体基因组内, 上述八个菌株之外的四个菌株 (G5、G6、G14 和 G19) 仍然含有转座酶基因。此外, G14 和 G19 含有的转座酶基因在质粒上。使用 ara 探针, 预计通过整合体可看到两条带, 然而只观察到一条带。为了进一步明确, 以 ara 作为引物, 对整合体进行 PCR 操作, 结果证明, 所有八个整合体的基因组内都含有 Pgap-araBAD。

根据 Zhang 等人, 1995 和 Deanda 等人, 1996 描述的方法并稍作变化, 使用运动发酵单胞菌整合体和控制菌株的无细胞提取

物对木糖异构酶(XI)、木酮糖激酶(XK)、L-阿拉伯糖异构酶(L-AI)、L-核酮糖激酶(L-RK)、L-核酮糖-5-磷酸-4-差向异构酶(L-Repi)、转酮酶(TKT)和转醛酶(TAL)进行分析。收集处于对数生长后期(30℃, OD₆₀₀ 大约 1.2)的培养物, 超声缓冲液(10mM Tris-HCl, pH7.6, 10mM MgCl₂)洗涤一次, 然后进行超声处理, 从而制备无细胞提取物。通过离心(14,000rpm, 45min 4℃)除去细胞碎片。在L-AI分析中, 定时样品的体积按比例减少一半(50 μl), 加入 70%H₂SO₄ 和 0.12% 吡唑(50 μl)。在 70%H₂SO₄ 加入之前和加入之后, 所有的试管都保温在 25℃ 的水浴中, 然后读取吸光度。分别在反应 0、5、10 和 20 分钟时取出样品。无论是通过同源重组还是转座子整合得到的整合体都能在 D-木糖和 L-阿拉伯糖上生长。通过测量酶活性来确定整合基因的表达水平。选择 C25/AX1, C25/AX101 和 C25/G8 用来进行酶分析, 因为它们是最稳定的整合体, 这是通过下面的稳定性分析确定的。酶分析的结果总结于图 14 和 15。在所有的分析中(无论是否有木酮糖激酶), 与控制菌株(C25 和/或 206C)相比, 整合体都表现出活性。在大多数分析中(不包括 L-核酮糖激酶和木糖异构酶), 整合体比包含质粒菌株(206C/pZB301)的活性低。这可能与基因的拷贝数有关。

为了作稳定性分析, 培养物被接种到含有 RMG 的试管中, 30℃ 下过夜培养, 并转移到 RMG 试管中, 每天一次。对接种物进行控制, 使得每 10 代转移一次。每过 40 代, 将细胞接种于含有各类糖的混合物的摇瓶中, 30℃, 不控制 pH, 检测细胞对糖类的发酵能力。间歇发酵分析在 Bio-StatQ^R 恒化器中进行, 30℃ 并控制 pH, 以 500ml 作为工作体积。用 2N NaOH 自动控制 pH。每一批次的初始糖浓度和 pH 有所差别, 取决于培养条件。所有使用的糖均为试剂纯。发酵过程中定时取样, 通过 HPLC 分析糖、乙醇和副产物, 方法如前所述(Zhang 1995)。测量 600nm 时的

光密度 (OD600), 以监测细胞的生长情况。乙醇产量以可利用的总糖量为基础。

用同源重组和转座的方法获得一些基因组整合的发酵木糖和阿拉伯糖的运动发酵单胞菌菌株, 分析其在非选择性培养基 (RMG) 中的稳定性。这些菌株培养在 RMG 培养基中并依次进行转移, 每天一次, 大约经过了 10 代。每 40 代以后, 将细胞接种到含有 1%葡萄糖和 2%木糖以及 2%阿拉伯糖的摇瓶中, 检测其发酵木糖和阿拉伯糖生成乙醇的能力。乙醇产量、木糖和阿拉伯糖的利用速率作为菌株稳定性的标志。有两个分离株在 160 代时仍然保持稳定性。参见图 16 和 17。对三个整合菌株和一个包含质粒菌株的发酵过程作进一步检测, 培养基含有 4%葡萄糖、4%木糖和 2%阿拉伯糖的混合物, pH5.5, 温度为 30℃。如图 18 所示, 所有三株菌在 72 小时内都利用了葡萄糖、木糖和阿拉伯糖, 而包含质粒菌株仍然残留了 6g/L 的阿拉伯糖。不过, 整合菌株产生的木糖醇要比包含质粒菌株多, 分别为 4g/l 和 1g/L。两个同源重组 AX1 和 AX101 菌株不产生乳酸, 因为在基因整合过程中乳酸脱氢酶基因失活。整合菌株的产量 (理论值大约 83%) 与包含质粒菌株非常接近。而且, 整合菌株生长后具有更大的细胞密度, 这反映了由于七种基因的单拷贝数, 菌株的代谢负担减小。

实施例 4

以下实施例描述了通过同源重组将 PgapxylAB 整合到运动发酵单胞菌 31821-5C 的 *ldh* 中。前面已经表明, 运动发酵单胞菌 31821 对高含量的糖类进料、高温和醋酸具有增加的耐受力。因此, 对于四种利用木糖的基因 (*tal*, *tkt*, *xylA* 和 *xylB*) 而言, 运动发酵单胞菌 31821 是非常优良的用来整合的目标菌株。然而, 通常的大肠杆菌宿主的 DNA 很难转化菌株 31821。该菌株表现出

一种独特的基因特性，即限制甲基化宿主的 DNA。已有的方法即使用小 Tn5Tc 以大肠杆菌 Sm10(λ pir)作为供体菌株的转接在 31821-5C 中不起作用。因此尝试了不同的整合方法。小 Tn5 和小 Tn10 系统并不适用，因为缺少甲基化缺陷型大肠杆菌，而这又是 31821 菌株中转座质粒转接所必需的。做了两个尝试，将小 Tn5（在插入序列之间含有 Tc^r 基因）接合入 31821-5C 内，没有获得转接合子。考虑到像 Tc^r 这样的小片段（1.5kb）通过小 Tn5 转座都不能接合并整合到 31821-5C 的基因组中，那么更大的片段例如 PgapxylABTc 或者 PenotaltktCm 的整合或许也不可行。因此采用了一种基于转化而不是接合到宿主中的转座方法（使用了 EZ::TN 插入试剂盒，见下），并提供了更大的用于同源重组的同源区域，因为菌株 31821 的重组效率低。

通过多次努力，使用 EZ::TN 试剂盒将所有四种基因（排列在两个操纵子——PgapxylAB 和 Penotaltkt 内）整合到 31821 的基因组中，但都不成功。这是由于两个潜在的问题。第一，插入序列的长度对于整合到基因组而言太大；第二，在木糖培养上直接筛选不能使基因能够及时表达从而使整合体得以生长。为了克服这些问题，必须设计不同的方法使基因整合到 31821 中。与所有四种基因整合不同，同一时间只整合两种基因（采用一个操纵子 PgapxylAB 或 Penotaltkt）。两个操纵子依次整合到同一个宿主中。每个操纵子连接一个抗生素标记（Tc^r 或者 Cm^r）用于整合体的初始筛选。通过这一方法，利用抗生素抗性就可以筛选整合体。两次整合方法用于木糖利用基因整合到 31821-5C 中（同源重组和转座）。使用 2kb 的包括 ldh 的同源区域（即 ldhL）将 Tc^r 基因整合到 31821-5C 的 ldh 内。在将 PenotaltktTc 片段整合到 2kb 的 ldh 基因座的两次尝试中，花费了相当长的时间才获得整合体，因为有冗长的切割和富集过程（至少需要 14 天）。然而，含有 PgapxylAB 的质粒转化到整合体时，整合体不能在木糖上生长。

使用 *ldh* 特异性引物并以整合体基因组 DNA 为模板, 获得 PCR 片段, 对其 DNA 序列进行分析。结果显示, 在 *Penotaltkt* 操纵子中并没有引入突变。有两个问题要考察。第一, *taltkt* 基因的定位与 *pgm* 基因相反, *pgm* 基因在基因组中紧接 *ldh* 并在其上游。*Pgm* 基因具有很强的启动子, 它可能会抵消 *taltkt* 的表达。第二, 在发酵单胞菌中, *Peno* 是相对较弱的启动子。*Penotaltkt* 在整合体中的单拷贝对于基因的表达是不够的。所以尝试通过转座来整合 *Penotaltkt* (因为 *ldh* 位点带来了上游强启动子的问题) 以及利用同源重组来实现 *PgapxylAB* 的整合。更重要的是, 整合所需的同源区域被扩大至超过 2kb *ldhL* 区域从而提高了重组的效率。新的同源区域延伸至包括了 *ldh* 的侧接区域 (*pgm* 和 *adhI* 基因)。总的同源区大小约为 4kb (称为 *ldhL4*)。

为了将 *PgapxylAB* 操纵子整合到 31821 的基因组内, 以复制质粒 pZB1861 为基础, 构建了 pZB510XTc 和 pZB512XTc (参见图 19A 和 19B), 和两个更相似的质粒 pZB511XTc 和 pZB513XTc, 其中基因的构建方式不同。通过两次 PCR 反应, 产生同源片段 *ldhL4*, 包括 5' 和 3' 片段。PCR 产生的片段 5'*ldhL4*(1.9kb) 和 3'*ldhL4*(2.4kb) 随后插入到穿梭载体 pZB1861 的 *Bam*HI-*Xba*I 位点和 *Bam*HI 位点。在 PCR 过程中, *Not*I 和 *Sfi*I 限制性位点被引入 5'*ldhL4* 和 3'*ldhL4* 之间。插入 *P_{gapxylAB}* (来自 pZB4) 和 *Tc^r* (PCR 产物) 到 *Not*I 和 *Sfi*I 位点从而构建整合质粒 pZB510xTc。质粒 pZB512XTc 的构建方法相似, 只是 *P_{gapxylAB}* 的定位与 pZB510XTc 中的相反。

使用电穿孔将质粒导入菌株 31821-5C。质粒 pZB510XTc、pZB512XTc、pZB511XTc 和 pZB513XTc 被用来转化 31821-5C。经过数次尝试, pZB510XTc 和 pZB512XTc 的转化获得成功。pZB511XTc 和 pZB513XTc 却没有实现转化。

整合组件包含 Tc^r 标记, 其用于整合体的筛选。不过 Cm^r 却位于质粒中该组件之外。筛选 $Tc^r Cm^r$ 转化体并在 Tc 存在的条件下培养, 每天转移 2 到 4 次。在转化体繁殖过程中, $PgapxylABTc$ 通过同源重组整合到宿主的 ldh 内。消除质粒, 使整合体富集并进行分离。将转化体在抗生素缺乏的条件下 $37^\circ C$ 亚培养 7 到 14 天, 每天转移一次, 从而实现质粒的消除。持续检测每一次转移的培养物中质粒的消除情况。经过三次转移后, 大于 99% 的细胞都变为 Cm^s , 说明质粒已经消除。使第三次、第四次、第五次和第六次转移的培养物 $30^\circ C$ 下接种到 $RMGTc$, 使潜在的 $PgapxylAB$ 整合体富集生长。富集的培养物接种到 $RMGTc$ 平板上, 复制挑选到 $RMGCm$ 和 $PMGTc$ 平板上。整合体 ($Tc^r Cm^s$) 与野生型 ($Tc^s Cm^s$) 和包含质粒 ($Tc^r Cm^r$) 细胞有明显的不同, 因为其具有抗生素抗性的表型。分离可能的 $PgapxylAB$ 整合体并作进一步分析。将来自整合体的质粒 DNA 后转移到大肠杆菌 $DH5a$ 从而除去包含质粒菌株。分别使用 Tc 、 $xylAB$ 和 Cm^r 引物对克隆进行 PCR 分析, 以测定整合体的基因型。四个分离株 $x4i$ 、 $x6i$ 、 $x9i$ 和 $x10i$ 证实为整合体, 因为在后转化中没有得到转化体, 并且 PCR 结果显示 $xylAB$ 和 Tc 条带而没有 Cm^r 条带。用发酵单胞菌复制质粒 $pZB192$ 转化 $PgapxylAB$ 整合体 ($x4i$ 、 $x6i$ 、 $x9i$ 和 $x10i$), 该质粒携带了 $Penotaltkt$ 而不是 $PgapxylAB$ 。转化体能够在 RMX 上生长, 说明当 tal 和 tkl 基因以多拷贝数提供到质粒上时, 单拷贝数的整合的 $PgapxylAB$ 为木糖的利用提供了足够的木糖异构酶和木酮糖激酶活性。这一结果也保证了我们可以进一步将 $Penotaltkt$ 整合到 $PgapxylAB$ 整合体中, 从而构建完全的木糖发酵整合菌株 31821 (见实施例 6)。

实施例 5

以下实施例描述了通过转座将 Penotaltkt 整合到运动发酵单胞菌 31821-5C 的基因组中。小 Tn5 和小 Tn10 都不适合 31821，因为缺少用于接合的甲基化缺陷型供体宿主。因此采用一种新的转座方法（EZ::TN 插入试剂盒）。当电穿孔进入细胞以后，转座酶连接到 PenotaltktCm 侧接的 Mosaic 末端并对片段进行切割，同时仍然与末端连接。在细胞内，转座酶引发 DNA 片段转座到宿主的基因组内。整合质粒 pMODPenotaltktCm（见图 20）是发酵单胞菌内的非复制型质粒，通过甲基化缺陷型大肠杆菌宿主制备得到。细胞被电穿孔后接种到 MMGCm 平板上。Cm^r 转化体就应是整合体。通过这种转座方法得到的三个 Cm^r 整合体在这里分别称为 int1、int2 和 int3。使用 tal 或者 Cm 的引物进行 PCR 筛选可以进一步确认整合体。或者使质粒从整合体后转化到大肠杆菌以确定 PenotaltktCm^r 没有在质粒 pMOD 上，这样也可以确认整合体。用质粒 pZB188-xyl 转化整合体，该质粒携带 PgapxylAB（而不是 Penotaltkt）。电穿孔细胞直接接种到 MMX 平板上。在这一互补实验中，没有得到转化体。Penotaltkt 的单一拷贝数不能够提供足够的用于在木糖平板上初始生长的转醛酶和转酮酶活性。发酵单胞菌的强启动子如 Ppdc（丙酮酸脱羧酶基因）和 Pgap（甘油醛磷酸脱氢酶基因）可以弥补低拷贝数对 tal tkt 表达的影响。

实施例 6

以下实施例描述了 Penotaltkt/PgapxylAB 整合体的构建。尝试将四种木糖利用基因整合，然而无论是采用转座还是同源重组都没获得成功。因为当木糖同化基因提供到质粒上时，单一拷贝数的 Penotaltkt 整合到 31821-5C 的基因组不能使菌株在木糖上生

长。申请人通过在体外将 pMODPenotaltktCm 转座到菌株 31821 的天然质粒上，从而提高整合 Penotaltkt 的拷贝数。转座后的天然质粒通过电穿孔进入 PgapxylAB 整合体 x9i。用 Tc^rCm^r 筛选，最终得到的整合体称为 x9t(enott)Pi。从整合体分离出的质粒用于运动发酵单胞菌 31821-5C 和大肠杆菌 DH5a 的后转化。结果得到了运动发酵单胞菌的后转化体，而大肠杆菌则没有。这表明基因整合到 x9i 的天然质粒中。另一个方法是，从大肠杆菌 DM1 制备含有 PgapxylABTc^r 的整合质粒 pZB510XTc 和 pZB512XTc 并转化到 int2 中。经过多次电穿孔，最终获得 Tc^rCm^r 转化体。对转化体进行如前所述的质粒消化和富集处理。对上述两种方法制备得到的整合体进行检测，让其生长在含有木糖的培养基中 (RMX)。可以观察到有整合体在 RMX 上生长，但数量极少。经过在 PMX 中的一系列适应以后 (参见下面实施例)，每个整合组有两个整合体 (x9t(enott)Pi#4 和 #8; int2/321 和 int2/1821) 在 RMX 中表现出相对更好的生长情况，对其作进一步分析。对得到的潜在的 Penotaltkt/PgapxylAB 整合体进行 Southern 杂交分析以确定目标 DNA 的存在。从这些整合体制备总 DNA 和质粒 DNA，用 SphI 消化得到 xylB 探针，以进行杂交。预计质粒 pZB512XTc (作为对照) 有两条带，5.4 和 2.5kb，其中 2.5kb 的带与整合体 x9t(enott)Pi#4, #8 和 int2/321 的总 DNA 是共有的。预计质粒 pZB510XTc 有两条带，4.2 和 3.7kb，其中 3.7kb 的带与整合体 int2/1821 的总 DNA 是共有的。所有的整合体都以 x9i 为基础，其中 PgapxylAB 整合到基因组的 LDH 基因座上。

所有的整合体都有一条与其整合质粒共同的条带，而第二条带则与预计质粒产生的条带不同。所有的整合体含有总 DNApreps 中的带而不是质粒 DNApreps 中的，这说明 PgapxylAB 整合到 ATCC31821 染色体中而不是天然质粒中。在与 tkt 探针杂交中，从这些整合体制备的总 DNA 和质粒 DNA 用 BssHII 消化

(图 21B)。预计质粒 pMODP_{eno}taltktCm (作为对照) 有 4 条带包括 4.2, 1.5, 0.9 和 0.1kb, 其中 1.5 和 0.9kb 带是与所有整合体的总 DNA 所共有的。0.1kb 的带由于太小, 所以保留在凝胶上。如图 21B 所示, x9t(enott)Pi#4 和#8 所包含的 1.5 和 0.9kb 的带存在于总 DNA 和质粒 DNApreps 中, 从而证实 P_{eno}taltkt 整合到天然质粒中。#4 和#8 的印迹显示缺失第三条带, 可能是由于太小从而留在凝胶上。根据图谱(见图 20)可以看到, 这条带只有 0.4kb 大小。除了两条共有带以外, int2/321 和 int2/1821 还具有一条 6.4kb 的带, 其与质粒的不同, 说明 P_{eno}taltkt 整合到这两个整合体的染色体中。

实施例 7

以下实施例描述了整合发酵单胞菌的酶活性。分别将第 5 次 (对于 x9(enott)Pi#4 和#8) 和第 4 次 (对于 int2/321 和 int2/1821) 转移的培养物从 RMX 接种到 RMG, 生长 16 小时后, 再接种到新鲜的 RMG 上。在 OD₆₀₀=1.0 时收集生长在 RMG 上的细胞进行分析。结果如图 22 所示。

以 31821-5C 为基础的菌株 int2, 是染色体整合 P_{eno}taltkt 的菌株; 31821-5C/pZB112, 是在穿梭质粒 (衍生自 pZB1861) 上含有 P_{eno}taltkt 的包含质粒菌株; 以及宿主菌株 31821-5C, 都作为对照物包括在 TAL 和 TKT 分析中。对所有的整合体和对照菌株进行木糖异构酶、木酮糖激酶、转醛酶和转酮酶的酶分析。和预计的一样, 菌株 31821-5C/pZB112 显示出很高的转醛酶和转酮酶活性。从整合体中观察到不同的酶水平。而且, 即使采用相似的整合方法得到的整合体中所观察到的酶水平也是不同的。在所有的分析中, 菌株 x9t(enott)Pi#4 表现出最高的活性, int2/321 次之。这些菌株在 RMX 中生长得更好 (参见图 23)。值得注意的是, 天然质粒整合菌株 (x9t(enott)Pi#4 和#8) 并非必然就具有较高的 TAL、TKT 活性。

实施例 8

以下实施例描述了运动发酵单胞菌 38121-5C $P_{\text{eno}}\text{taltkt}/P_{\text{gap}}\text{xylAB}$ 整合体在 RMX 上经过一系列适应以后,能够将 D-木糖发酵生成乙醇。整合体接种到 RMX (含有 2%木糖) 试管里,并用石蜡膜密封以防止蒸发。采用 OD600 测量方法对生长情况进行监测。将处于对数生长期的培养物转移到新鲜的 RMX 中。如图 23 所示,对第 1 次和第 4 次转移的生长曲线作了比较。

经过一段适应时期后,生长速率和最终 OD600 读数都提高了。最后的 OD 从 0.08 (第 1 次转移) 提高到 0.6 (第 4 次转移)。经过 50 次转移后,生长速率和最大 OD 读数都趋于稳定。可以肯定的是,在适应过程中培养物发生了突变。RMX 为具有更有效的木糖利用能力的突变株提供了自然选择。在四种分析的整合体中, x9t(enott)Pi#4 和 int2/321 表现出最高的生长速率和 ODs。在 140 小时时间点,从第 4 次/第 3 次转移的培养物中取样进行 HPLC 分析。如表 1 所示,木糖的初始浓度为 20g/L,经过利用之后变为 4-14g/L,并生成了显著水平的乙醇,这说明运动发酵单胞菌 31821-5C $P_{\text{eno}}\text{taltkt}/P_{\text{gap}}\text{xylAB}$ 整合体能够发酵 D-木糖生成乙醇。

表 1: RMX 中运动发酵单胞菌 31821 $P_{\text{eno}}\text{tal}tkt/P_{\text{gap}}\text{xylAB}$ 整合体于 140 小时的 HPLC 分析

菌株	OD	木糖	乙醇	木糖消耗率
	600nm	g/L	g/L	%
x9t(enott)Pi#4- 第 4 次转移	0.441	4.24	7.70	86.08
x9t(enott)Pi#8- 第 4 次转移	0.206	12.46	3.53	74.27
Int2/xyl321-第 3 次转移	0.506	4.90	7.42	86.19
Int2/xyl1821- 第 3 次转移	0.208	14.76	2.59	72.34
RMX(作为对照, 不含菌株)	0.000	21.78	0.00	

实施例 9

本实施例描述了 pMODPgaptaltktCm 的构建用于转座到运动发酵单胞菌中。构建 pMODPenotaltktCm 的方法与之相似，除了引入两个 loxP 位点。通过 BglII/XbaI 消化从 pUCtal tkt 中分离出 2.2kb 的 tkt 片段并克隆至 pMOD 载体，用 BamHI/XbaI 消化，产生 pMODtkt。使 GAP（甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因）的发酵单胞菌启动子区域融合到 tal 的结构基因从而产生 PCR 片段 Pgaptal。用 XbaI 消化这一片段并克隆到质粒 pMODtkt 中。最后，含有侧接 Cm^r （ CmloxP ）的两段 loxP 序列（Palmeros 等人，2000，Gene 247:255-264）的 PCR 片段被插入到质粒的 SfiI 位点以形成整合质粒 pMODPgaptaltktCm（图 24）。侧接 Cm^r 的 loxP 序列可以作

为噬菌体 Cre 重组酶的结合靶，必要时，它可以将 Cmr 从整合体基因组中去除。类似的，这一方法可用于 Tc 抗性基因的去环。具有去除抗生素抗性基因的能力是很有利的。为了实现这一目的，申请人引入了 loxP/cre 系统。用于上述构建的 PCR 的寡核苷酸序列如下：

1. Pgap (0.3kb)

模板： pZB4

引物：

PgapXbSfi(F) 5'CAGTCTAGAGGCCGCCTAGGCCGTTCTGA
TCAACAACCCGAATCC3' (SEQ ID NO:26)

3'Pgap5'tal(R)5'CAATTTGTCCGTCATGTTTATTCTCCTAA
C3'(SEQ ID NO:27)

2. tal (1kb)

模板： pZB4

引物：

3'Pgap5'tal(F) 5'GTTAGGAGAATAAACATGACGGACAAA
TTG3' (SEQ ID NO:28)

talXb(R) 5'CCAGATCGTCTAGATTACAGCAGATCGCC3'(S
EQ ID NO:29)

3. Pgaptal (1.3kb)

模板： Pgap 和 tal

引物:

PgapXbSfi(F)5'CAGTCTAGAGGCCGCCTAGGCCGTTTCGAT
CAACAACCCGAATCC3'(SEQ ID NO:30)

talXb(R)5'CCAGATCGTCTAGATTACAGCAGATCGCC3'(SE
Q ID NO:31)

4. CmloxP (1.1kb)

模板: pZB186

Cmlox(F,sfi)

5'CAGGGCCGCCTAGGCCATAACTTCGTATAGCATACATT
ATACGAAGTTATCCTGTGACGGAAGATCACTTCGC3'(SE
Q ID NO:32)

Cmlox(R,sfi)

5'CAGGGCCTAGGCGGCCATAACTTCGTATAATGTATGCT
ATACGAAGTTATCCTGAACCGACGACCGGGTCG3'(SEQ
ID NO:33)

实施例 10

以下实施例描述了以运动发酵单胞菌 31821-5C 为基础的 Pgaptaltkt/PgapxylAB 整合体的构建。从大肠杆菌 DM1 或者 JM110 制备质粒 pMODPgaptaltktCm, 用 EZ::TN 转座酶处理以制备转座子。通过电穿孔使转座子混合物进入 PgapxylAB 整合体, x9i。在 RMGTcCm 上筛选获得 Pgaptaltkt/PgapxylAB 整合体 (Tc 抗性基因已经整合到 x9i 的基因组中)。对来自整合体的质粒 DNA 进行初始分析, 例如在大肠杆菌中进行后转化, 以鉴别是真正的

整合体还是包含质粒菌株。对几种整合体质粒 DNA 进行大肠杆菌后转化并去除假的整合体。潜在的 TcrCmr 整合体接种到以木糖为唯一碳源的 RM 上并在 30℃ 下培养。在 OD600 进行测量以监测生长情况。所有的菌株初始 OD0.3 时都能在 RMX 上缓慢生长。不过，在 RMX 中经过 6 次转移后，生长速率和最终 ODs 都提高了。生长最好的两个菌株（#20，#21）的生长曲线如图 25 所示。

实施例 11

以下实施例描述了 Penotaltkt/PgapxylAB 和 Pgaptaltkt/PgapxylAB 发酵单胞菌整合体的分离过程。为了在混合体中分离出更好的生长菌株，对细胞在 RMX 平板上进行划线分离。菌株 x9t(enott)Pi#4 和 x9t(enott)Pi#8 在 4 次转移后划线；int2/xyl321 和 int2/xyl1821 在 3 次转移后划线；#20 和 #21 在 6 次转移后划线。上述一轮分离称为第 1 次分离。在 RMX 平板上观察到不同大小的克隆。挑选大的克隆并在 RMX 平板上划线（第 2 次分离）。挑选一些明显大的克隆并接种到 RMX 液体培养基中以进行生长分析。有四株菌在 RMX 上表现出良好的生长态势，将其挑选出来并作进一步研究，包括 Southern 杂交、发酵和酶分析。这四株菌分别名为 321（5）（来源于 int2/xyl321）、481（来源于 x9tP(enott)Pi#4）、2032（来源于 #20）和 2122（来源于 #21）。采用与实施例 6 相同的方法进行 Southern 杂交。如图 26A（以 xylB 作为探针）和图 26B（以 tkt 作为探针）所示，在质粒 preps 中缺少杂交条带，从而证实了整合的实现，除了图 26B 中的菌株 481（来源于 x9tP(enott)Pi#4）例外，它是特意将 Penotaltkt 整合到运动发酵单胞菌 31821 的天然质粒中构建得到。481 和对照 pMODPenotaltktCm 在带型上的区别表明条带不是天然质粒的。相反，它们来自天然质粒中整合的 PentaltktCm。在图 26A 中，

和期望的一致,在 pZB512xTc 和所有四种整合体中观察到一个共同的 2.5kb 的条带。然而 pZB512xTc 和整合体的第二条带却存在区别,这说明 xylAB 整合到染色体中(推测是 ldh 基因)。2032 中出现更高分子量的条带,这可能是因为基因组接近 ldhL4 区域的 SphI 位点自发的发生改变。在图 26B 中, pMODPenotaltkCm 或者 pMODPgaptaltkt 和所有的整合体具有共同的 1.5, 0.9 和 0.1kb 的条带。不同的条带证实了 pMODPenotaltkCm 或者 pMODPgaptaltkt 整合到 31821-5C 的基因组内。

使四种整合体, 321 (5)、481、2032 和 2122 以及对照菌株, 31821/pZB5(包含质粒菌株)、C25 (基于 39676 的木糖发酵整合体) 和 31821-5C (宿主) 进行初步发酵。发酵条件是: 培养瓶中是 80mlRMX (2%木糖) 或者 RMGX (1%葡萄糖和 2%木糖), 不控制 pH, 30℃ 静态发酵。对发酵肉汤的上清液进行 HPLC 分析, 从而检测发酵情况。所有整合体都能在 RMGX 上生长, 并发酵木糖和葡萄糖以最大产率生成乙醇(图 27A,B 和 C)。所有整合体都能在 RMX 上生长, 并发酵木糖以最大产率生成乙醇(图 28A 和 B)。在两种培养基中, 整合体和包含质粒对照菌株 (31821/pZB5) 和 C25 整合体(基于 39676 的木糖整合体) 的乙醇生成图相似(图 27C 和 28B)。和预计的一样, 在 RMGX 培养基中, 宿主菌株只能发酵葡萄糖生成乙醇(图 27B)。

对四种整合体以及对照菌株, 31821/pZB5(包含质粒菌株)、C25 (基于 39676 的木糖发酵整合体) 和 31821-5C (宿主) 进行酶分析, 数据结果示于下表 2。所有的整合体都表现出比 31821/pZB5 和 C25 更低的活性。

表 2 整合体的酶活性

比活 ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ 蛋白)

	XI	XK	TAL	TKT
321(5)	0.06	0.17	2.10	0.91
481	0.04	0.23	2.27	0.74
2032	0.15	0.23	2.27	0.74
2122	0.04	0.19	1.56	0.51
int2	0.02	0.02	1.19	0.31
X9i	0.04	0.06	ND	0.03
31821/pZB5	0.06	0.55	2.52	1.78
C25	0.20	0.81	3.78	1.99
31821-5C	0.08	0.07	0.01	0.01

ND:未检测出

实施例 12

以下实施例描述发酵单胞菌整合体的诱变过程从而提高其在木糖培养基中的生长能力。整合体 int2/xyl321 和 x9t(Penott)Pi#8 的单一克隆接种到 RMG 并在 30℃ 下过夜培养。将生长的培养物接种到添加了 5% 葡萄糖的接合培养基 (OD=0.15~0.2) 中并在 30℃ 下培养至 OD=0.5~0.6。收集细胞,

用 25 μ g/ml 的化学诱变剂 1-甲基-3-硝基-1-亚硝基胍 (MNNG 或者 NTG) 对细胞进行处理。收集 NTG 处理过的细胞, 在 RMG 中洗涤两次, 重悬浮于 RMGX (0.5%葡萄糖和 1.5%木糖) 中生长。生长的培养物在同样的培养基中亚培养两次, 然后在 RMX 平板上划线。较大的克隆在 RMX 平板上再次划线。挑选最大的克隆并接种到 RMX 液体培养基中。生长的培养物于 RMX 平板再次划线分离。最后, 挑选最大的克隆并使其生长于 RMX 中。最大的两个生长菌株分别称作 8b 和 2/321-2。对其中一个菌株 8b 作进一步评价。通常情况下, 在葡萄糖和木糖的混合物中, 以及下面实施例所描述的醋酸盐存在的情况下, 突变体具有更高的利用木糖的能力。

实施例 13

以下实施例描述了以运动发酵单胞菌 ATCC31821-5C 宿主为基础构建的几个整合体的发酵情况。菌株 C25 和包含质粒菌株 31821/pZB 作为发酵评价的对照菌株。

在工作体积为 500ml 的 BioStat-Q 发酵罐和控制 pH 及温度的条件下进行发酵评估。通过滴定 KOH(2N)使 pH 控制在 5.5, 温度控制在 30℃。发酵培养基 RM 包含葡萄糖和木糖的混合物 (RMGX(1%:6%)和 RMGX(3.5%:3.5%))。生长培养基的所有组分都通过无菌过滤母液分别制备, RM(10X), 葡萄糖 (50%), 木糖 (50%)。对发酵罐进行高压灭菌, 并在无菌的条件下将生长培养基加入发酵罐中。在含有 200mL 培养基 RMGX(2%:2%)的 250mL 摇瓶中制备接种物。过夜生长后, 将培养物离心并在与发酵培养基相似的 10L 培养基中浓缩。计算 600nm 下 OD 为 0.1 时开始发酵所需要的培养物的体积并接种到发酵罐中。根据需要以一定的时间间隔从发酵罐中取样。通过 HPLC 分析样品中糖、乙醇以及副产物的量。

在控制 pH 的发酵中，所有的菌株都能够发酵葡萄糖和木糖生成乙醇，其中菌株 8b 和 2032 表现出最好的发酵能力（图 29 和 30）。整合菌株 8b 和 2032 显示出与包含质粒菌株 31821/pZB5 和以宿主 39676 为基础的整合体 C25 相似的能力。

实施例 14

以下实施例描述了发酵单胞菌整合体的稳定性。将培养物在非选择性培养基（RMG）中转移数次，使用含有 10mL 培养基的 15mL 的 Falcon 无菌试管作为进行测试（见图 31）。这些菌株培养于 RMG 培养基中，经过 10 代以后每天依次进行转移。每过 40 代，将细胞接种到含有 2%葡萄糖和 2%木糖的摇瓶中，以检测其发酵葡萄糖和木糖生成乙醇的能力。乙醇产率和木糖利用速率作为稳定性的标志。在温度为 30℃和 37℃下，无须选择，所有的整合体至少在 140-160 代时都能保持稳定（图 32 和 33）。而包含质粒菌株 31821/pZB5 在温度为 30℃和 37℃下，在 40 代内就丧失了利用木糖的能力（37℃时的数据示于图 33）。

实施例 15

以下实施例描述了醋酸浓度对生长和 AX101 木糖发酵的影响以及 pH 的影响作用。醋酸通常存在于预处理的生物饲料的水解产物中，对发酵微生物有抑制作用。在 pH5、pH5.5 和 pH6.0 时进行发酵，添加或不添加（pH5.5）2g/L 的醋酸盐从而对菌株 AX101 的发酵能力进行评价。使用的培养基是 RMGXA(4%:4%:2%)，并添加所需浓度的醋酸盐。结果（图 34）表明，2g/L 的醋酸盐对菌株的生长、木糖的利用和乙醇的产生都有抑制作用。与较高 pH（pH6.0）相比，pH 较低时（pH5.0），抑制作用更加明显。

实施例 16

以下实施例描述了 AX 发酵的添加和提取过程。设计一种测试方法，看菌株 AX101 对醋酸盐的逐步适应能否提高该菌株在高浓度醋酸盐的培养基中的发酵能力。首先，在 pH5.5、温度为 30℃ 时于 RMGXA (4%:4%:2%) 进行间歇发酵，在没有醋酸盐和醋酸盐为 2g/L 时进行比较。由于低水平 2g/L 的醋酸盐影响糖的利用，因此进行另一项测试，将含有 RMGXA(4%:4%:2%) 并分别添加了 0.5g/L 和 1g/L 的醋酸盐的发酵罐接种到另一个添加了 2g/L 醋酸盐的发酵罐，其糖浓度相同。结果表明菌株 AX101 在 2g/L 醋酸盐中的糖的利用能力并没有提高。

实施例 17

以下实施例描述了 AX101 的连续发酵。连续发酵在 MultiGen 发酵罐 (NewBrunswick Scientific,NJ,USA) 中进行，工作体积为 300mL，搅拌器转速 300rpm。分析所取的 pHs 为 4.5,5 和 5.5，采用 KOH(2N)来控制。温度始终保持为 30℃。间歇发酵开始时，起始 OD 在 600nm 时为 0.1。在发酵过程中，每个周期取一次样，通过 HPLC 分析糖、乙醇和副产物的含量。当充分利用葡萄糖并且发酵罐中的木糖约为 10g/L 以后，开始连续发酵，添加一定糖组成的培养基，稀释速率 (D) 低，为 0.02(1/hr)。经过 4 至 5 个稳定状态的循环后，所有的葡萄糖和 80% 的木糖都被利用，此时提高稀释速率 (图 35)。这一过程一直持续到洗出阶段，通过残留的木糖浓度升高和乙醇浓度减少显示出来。用最终乙醇生成的浓度除以最初加入到培养基中的总糖量计算出乙醇产率 (Y_p)。

菌株 AX101 能够在玉米浆培养基中发酵 80g/L 葡萄糖、40g/L 木糖和 15g/L 阿拉伯糖的混合物，添加的醋酸盐只能达到 6g/L，此后便观察到洗出阶段。

实施例 18

以下实施例描述了在高浓度醋酸盐存在的情况下能够发酵葡萄糖和木糖生成乙醇的整合体。醋酸盐是一种抑制性化合物，通常发现于预处理的生物饲料的水解产物中。

在有 35mL 培养基的 50mL 带挡板的摇瓶中进行评价，培养基包含添加了不同浓度醋酸盐的 RMGX(2%:2%)。醋酸盐添加到培养基 RMGX 中，用 KOH 颗粒将 pH 调解到 5.8。在含有 100mL 培养基 RMGX(2%:2%)的 125mL 摇瓶中制备接种物，起始 pH 为 5.8，温度为 30℃ 或 37℃。

过夜生长后测量 600nm 时的 OD，600nm 下 OD 为 0.1 时对每个摇瓶进行接种，并在所需的温度下于摇床中培养。在不同时间取样然后用 HPLC 分析糖、乙醇和副产物的含量。如图 36 所示，整合体 8b 和 2032 能够在不控制 pH 以及培养基中醋酸盐浓度为 2g/L 至 6g/L 时生长并且发酵木糖生成乙醇。在这些浓度下的醋酸盐对木糖利用的抑制作用是最小的。

如图 37 所示，甚至在醋酸盐浓度为 16g/L 和未对培养基的 pH 进行控制时，所有的整合体都能发酵葡萄糖和木糖生成乙醇。测量出生长培养基的最终 pHs 为 3.5-4.5 之间。前述以 39676 宿主为基础构建的菌株如 AX101 和 C25 却受到低浓度如 2g/L 的醋酸强烈的抑制作用。

实施例 19

以下实施例描述了在发酵单胞菌丙酮酸脱羧酶（PDC）启动子 Ppdc 的控制下，可以使含有大肠杆菌磷酸甘露糖异构酶基因 ManA 的质粒 pZB701（图 38）转化运动发酵单胞菌菌株 39676 和 31821。

如图 39 所示, 两种菌株的转化体都能够利用 D-甘露糖作为唯一碳源。为了确定 ManA 得到表达, 所有产生的中间构建体和最后构建体 (包括 pZB801) 都用来转化 manA(-) 宿主, 大肠杆菌 GMS407。转化体接种到以甘露糖为碳源的 McConkey 琼脂平板上。深粉红色菌落表明甘露糖被克隆子利用。从深粉红色菌落提取的质粒 pZB701 用来进一步转化运动发酵单胞菌 206C 或者 31821。在含有四环素 (Tc^r) 的结合培养基 (MMG) 上筛选运动发酵单胞菌转化体然后在含有甘露糖 (RMM) 的培养基中检测。如图 39 所示, 所有转化体初始都能在 RMM 中生长, 经过在 RMM 中的几次转移后, 其生长速率提高。

从大肠杆菌 JM110 制备 pZB701 用于运动发酵单胞菌 31821 的转化。这些 Tc^r 转化体也能在 RMM 中生长。对 RMM 生长培养物的上清液进行分析, 结果表明, 39676 和 31821 转化体都能产生乙醇。

含有甘露糖利用基因的质粒 pZB701 可以进一步转化申请人构建的基因组整合的木糖发酵和阿拉伯糖发酵菌株, 例如以 39676 和 31821 宿主菌株为基础的 C25, AX101, AX1, 321(5), 481, 8b, 2032, 2122。已经证实了 pZB701 (含有 ManA 基因) 成功转化到运动发酵单胞菌 39676 和 31821 中, 转化体发酵甘露糖生成乙醇。上述发酵单胞菌整合体可以被质粒 pZB701 转化从而获得能够发酵木糖、阿拉伯糖、甘露糖和葡萄糖生成乙醇的运动发酵单胞菌菌株。预计转化的发酵单胞菌菌株能够利用生物饲料中的木糖、阿拉伯糖、甘露糖和葡萄糖并且能够发酵以上所有糖生成乙醇。

虽然通过实施例来描述本发明, 但应该理解, 在不背离本发明实质精神和范围的情况下可以作任意修改。

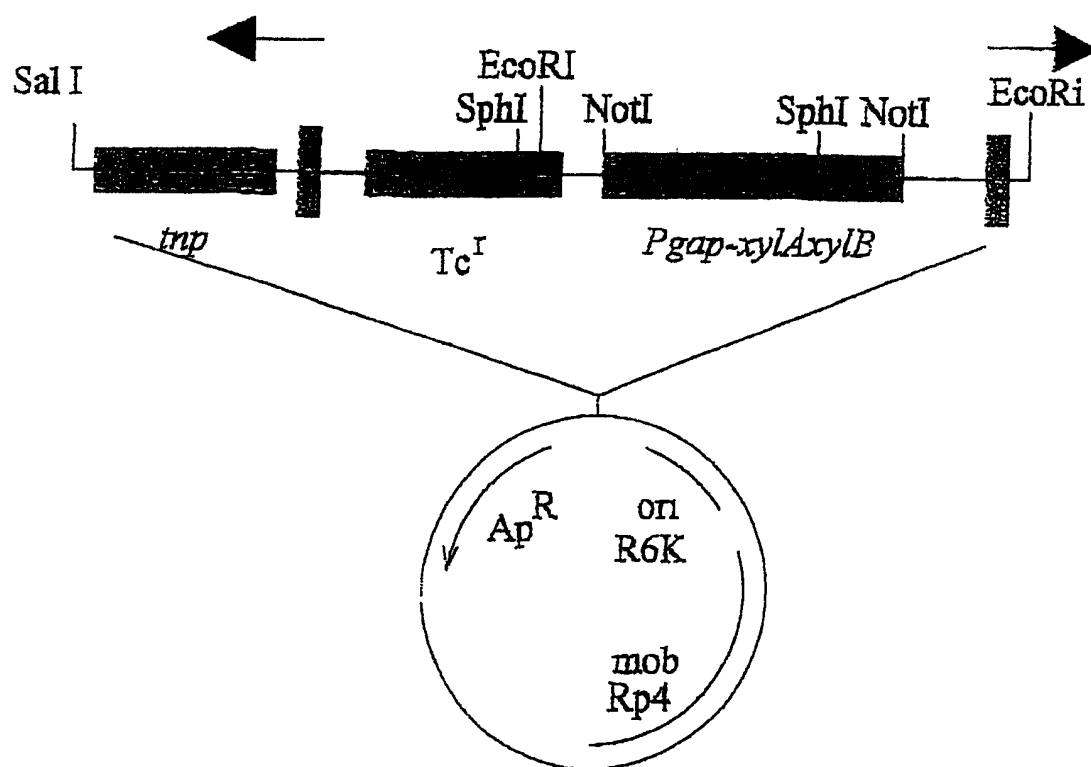


图 1

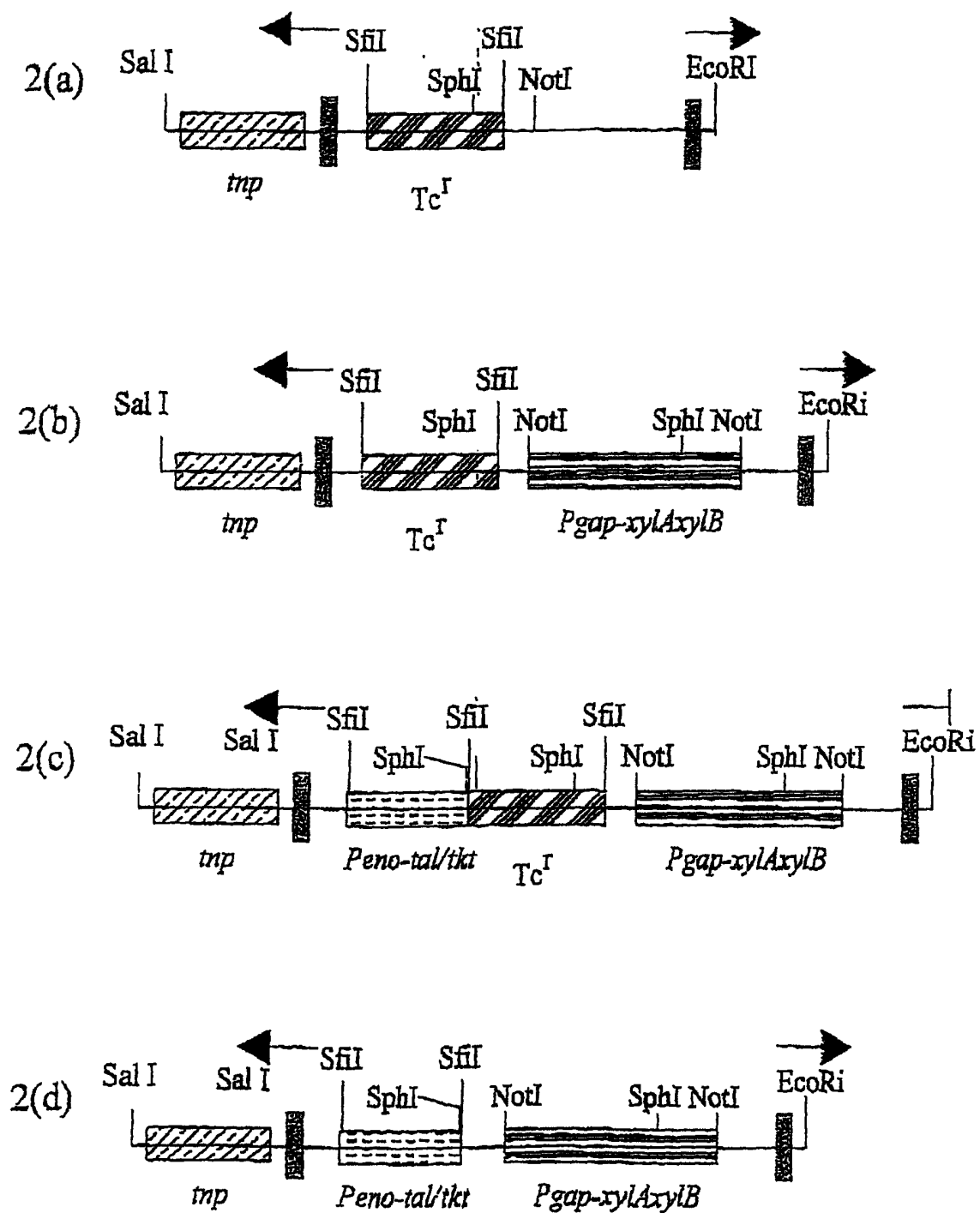


图 2

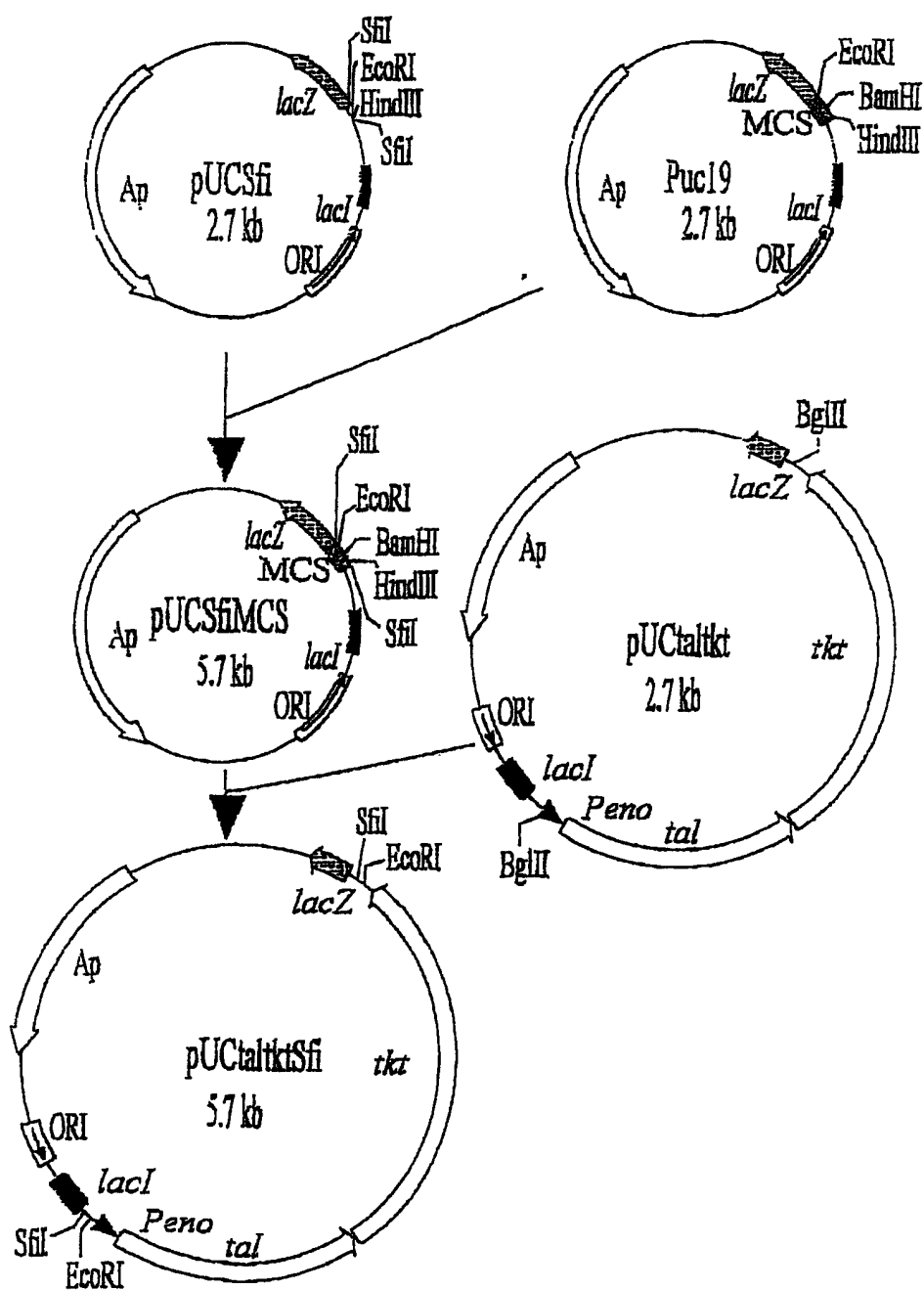


图 3

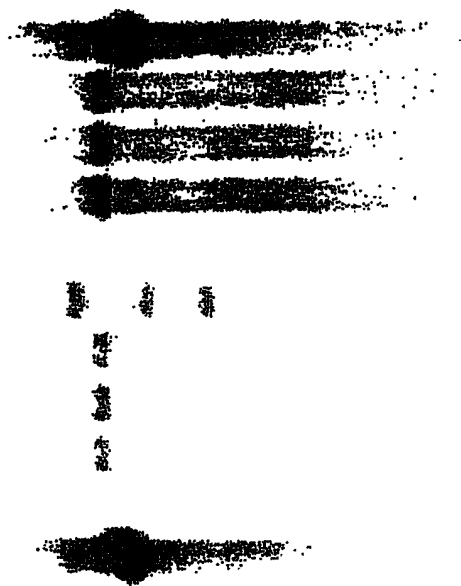


图 4

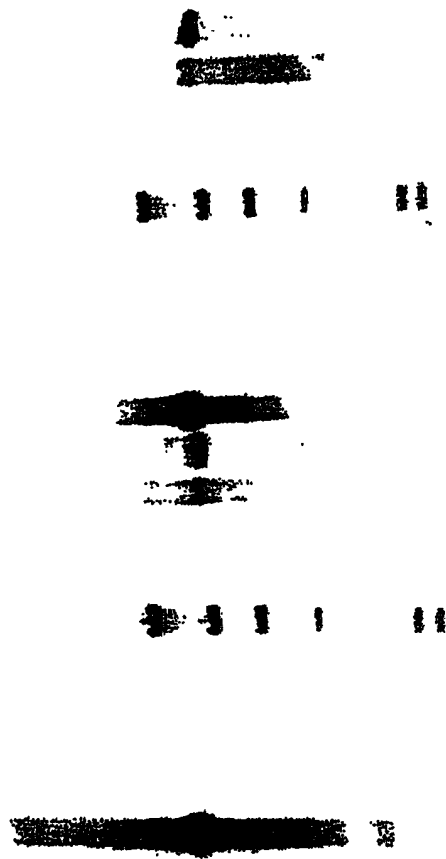
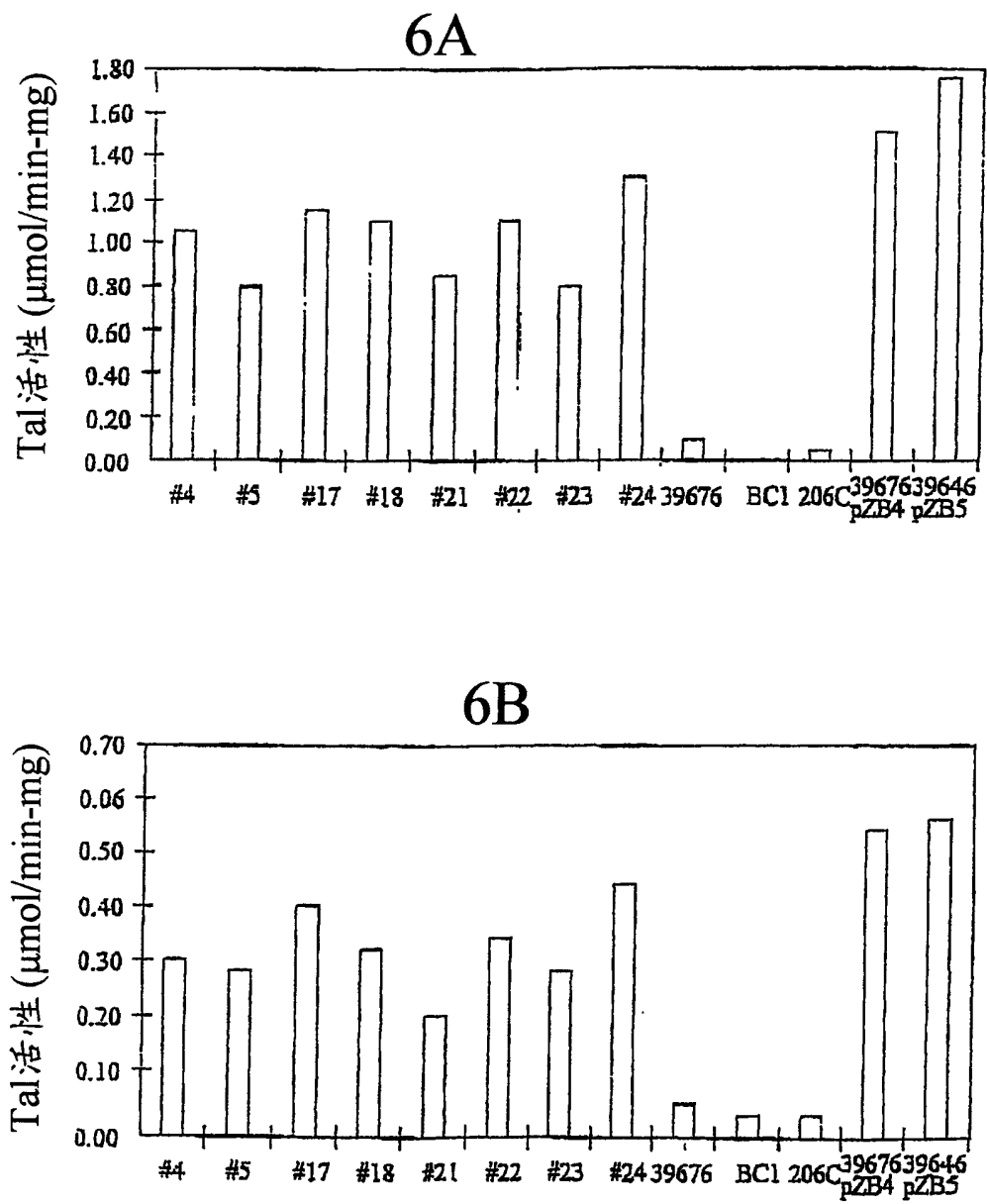


图 5



运动发酵单胞菌菌株

图 6

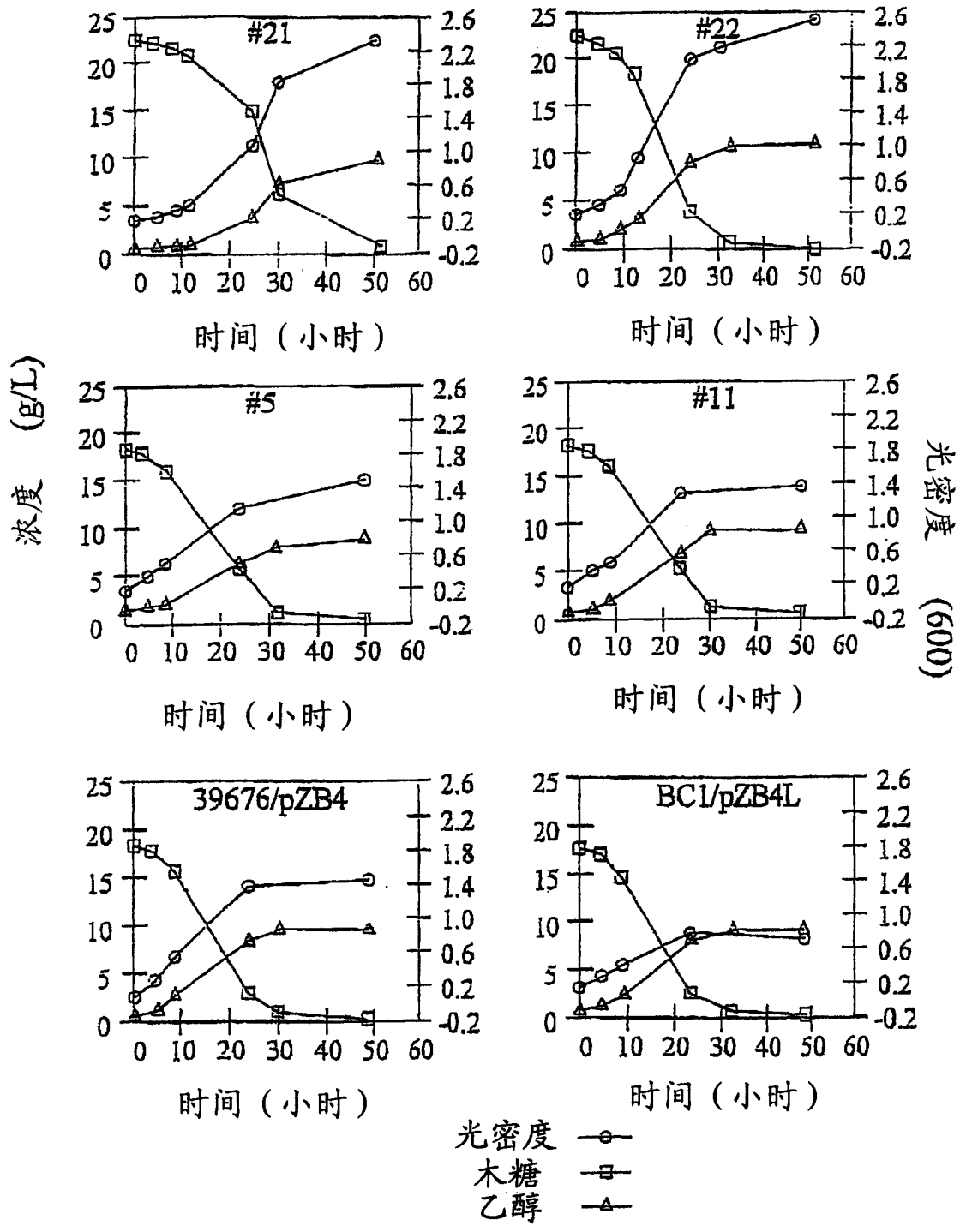


图 7

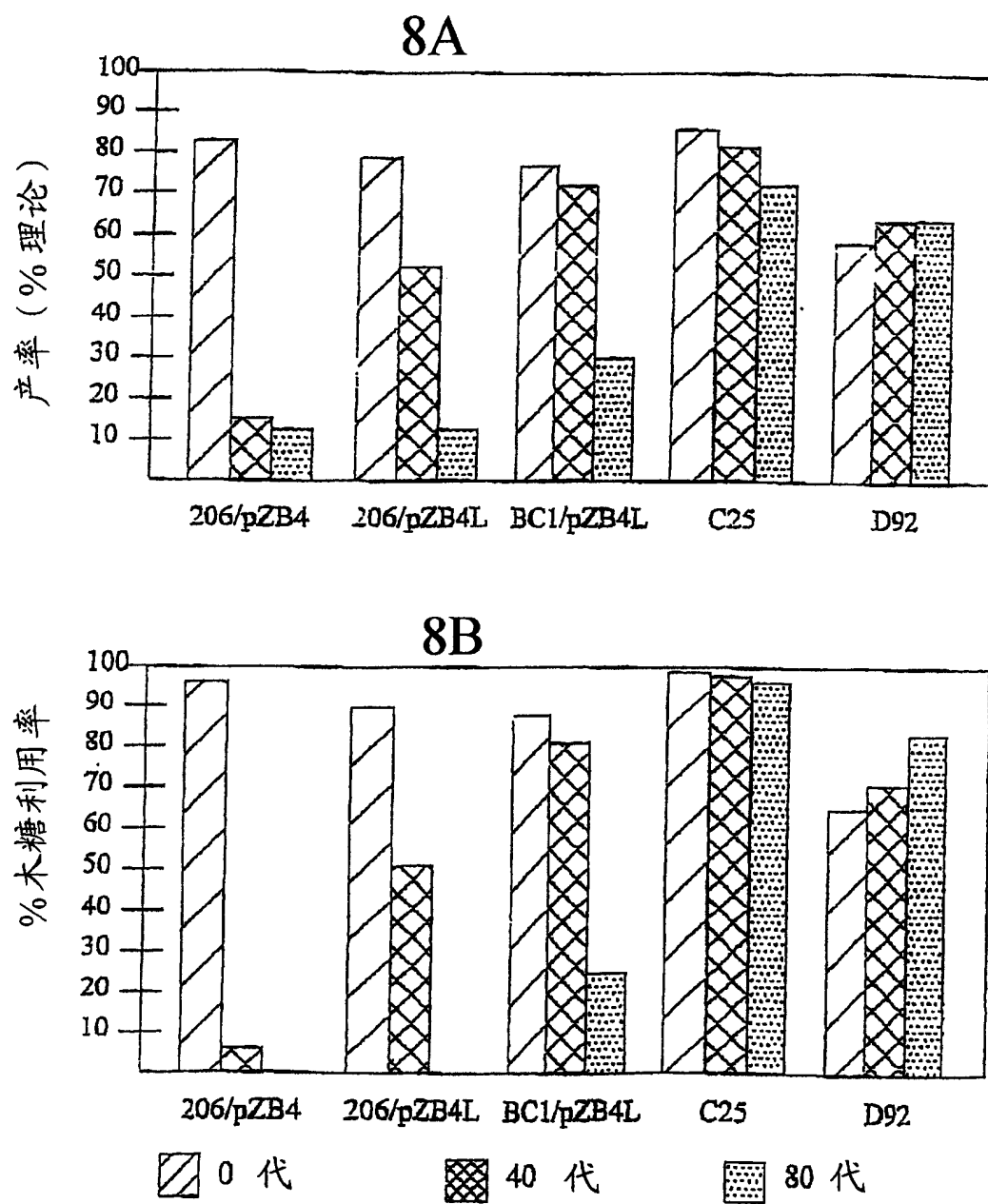


图 8

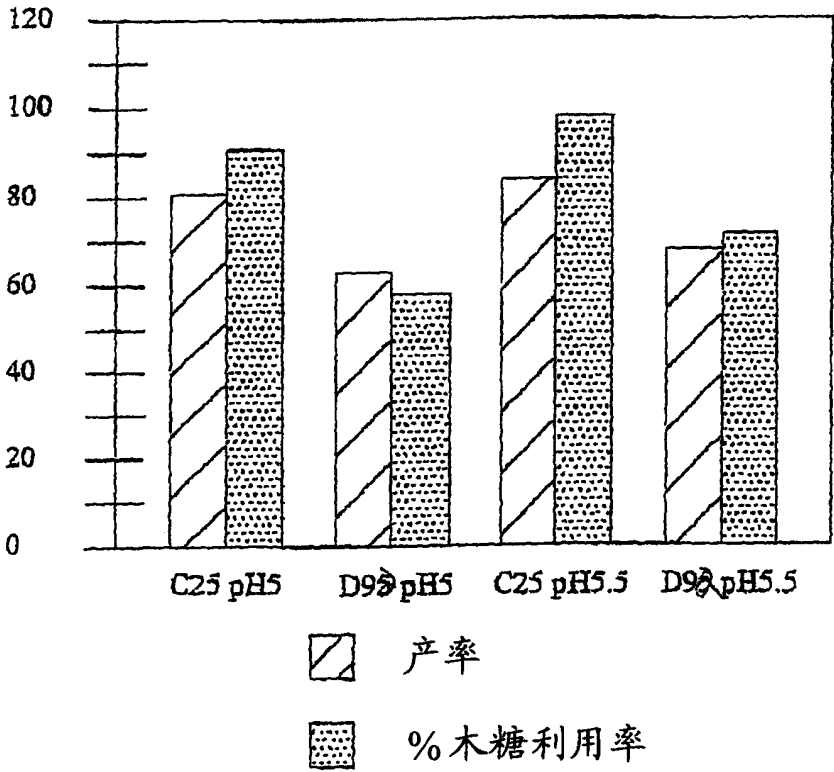


图 9

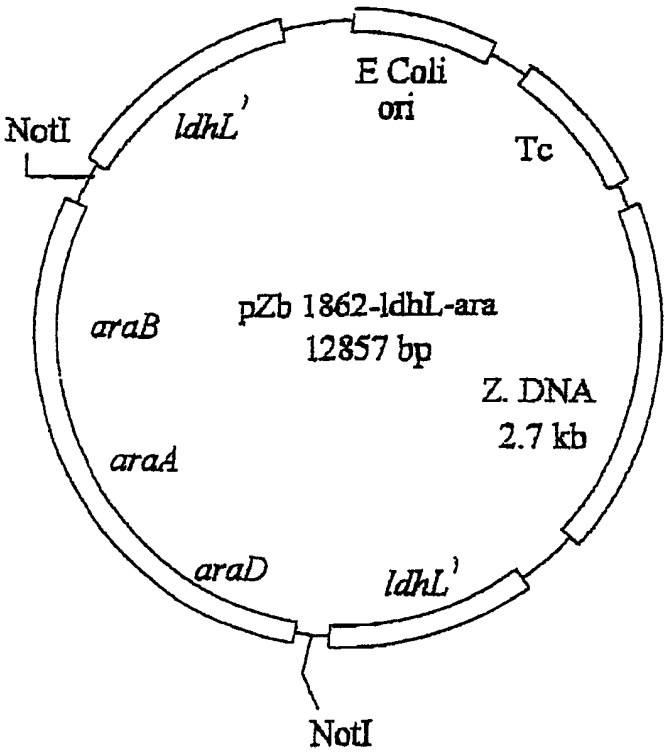


图 10

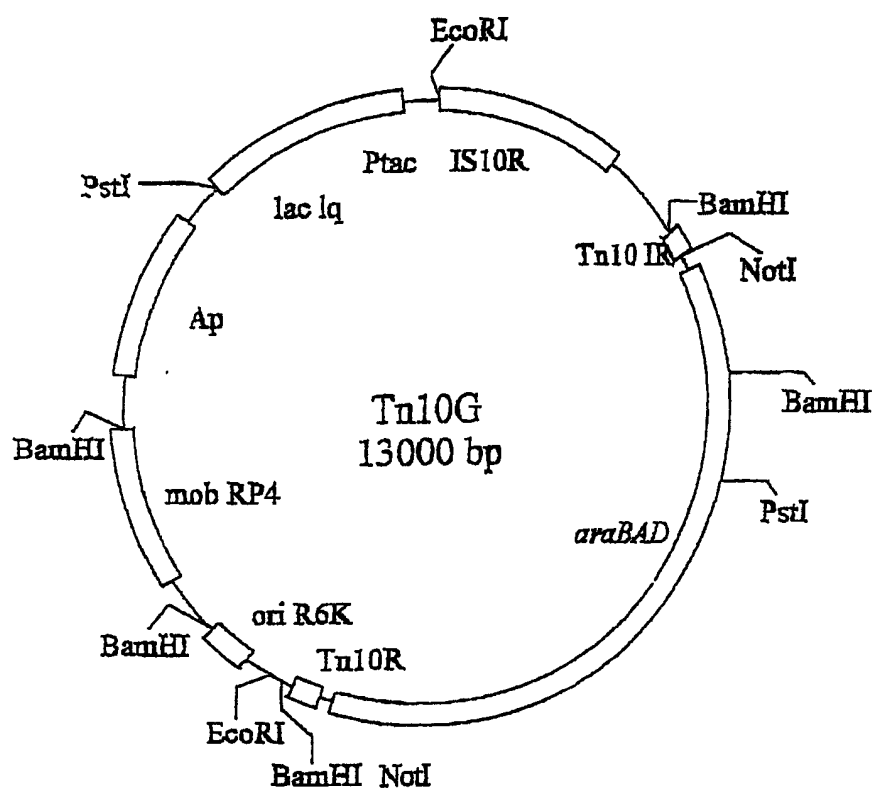


图 11

图12A

Probe: ara
PstI 消化

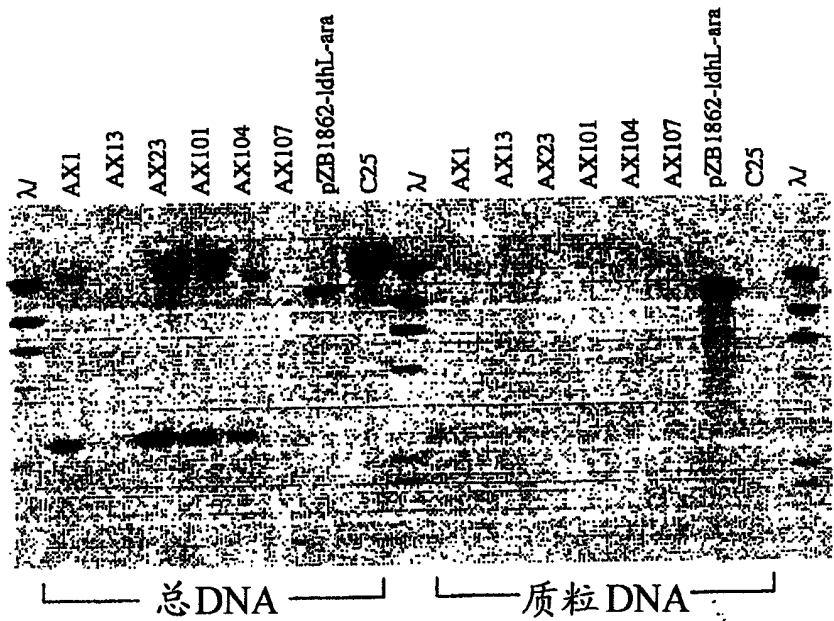


图12B

探针:ldh
PstI 消化

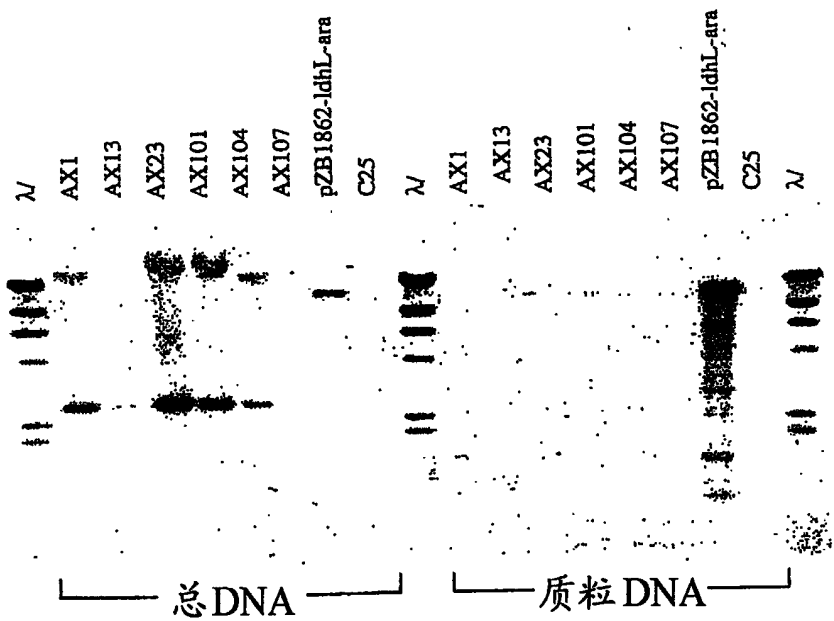


图 12

图 13A

探针:tnp
PstI消化

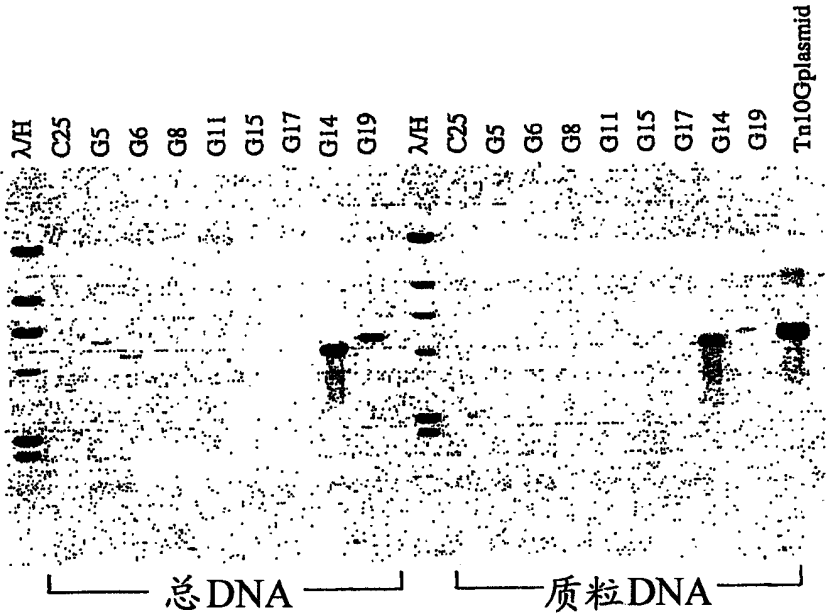


图 13B

探针:ara
PstI消化

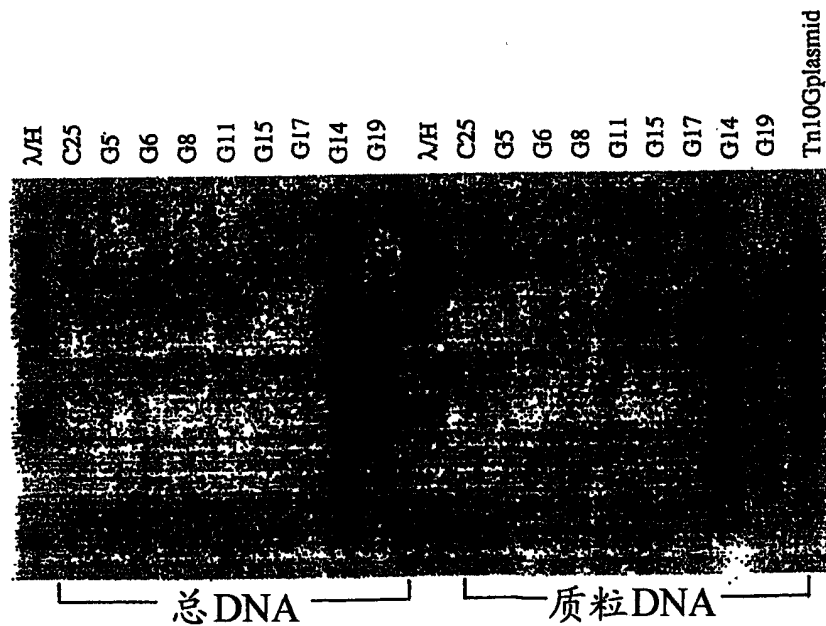


图 13

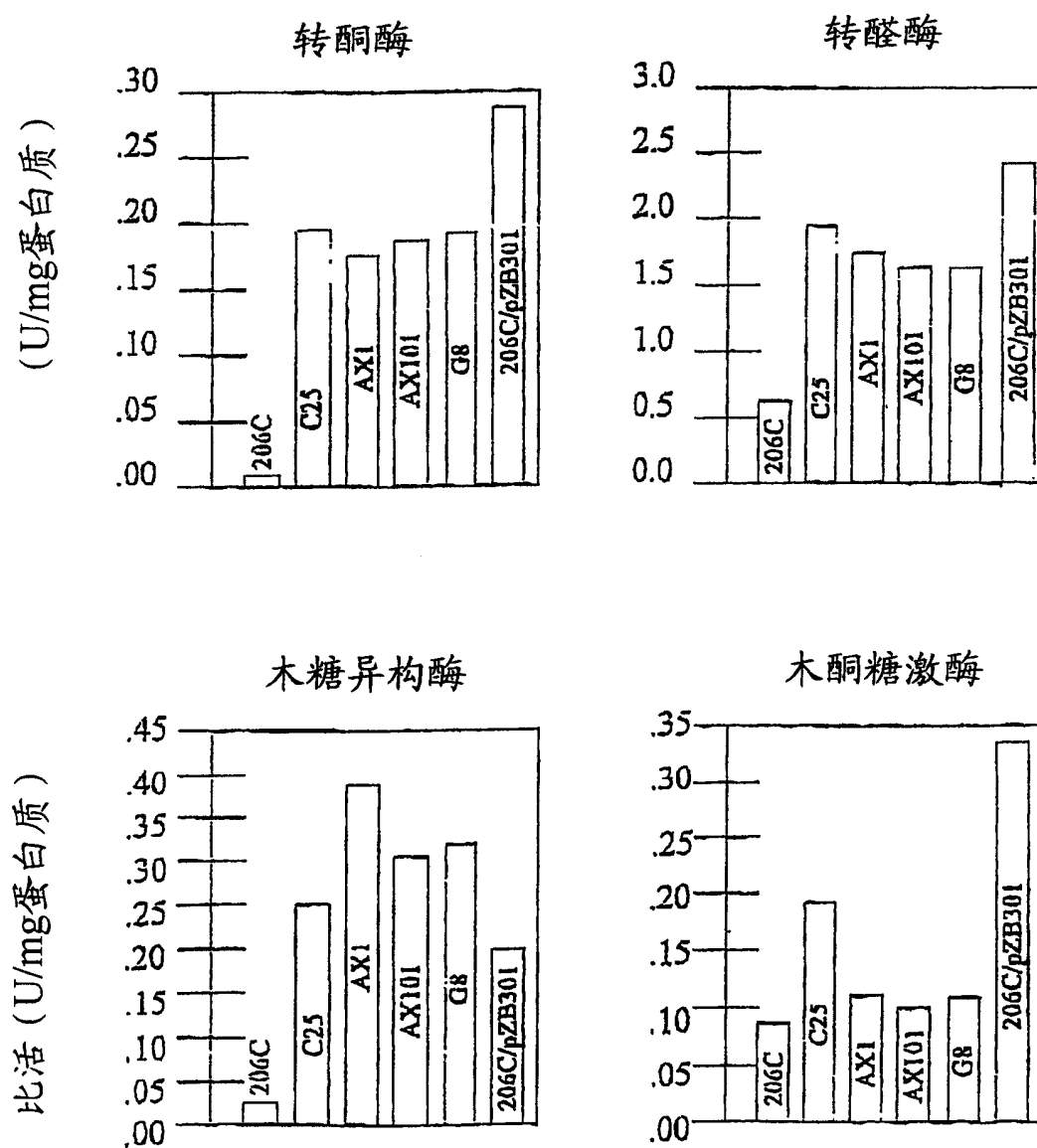


图 14

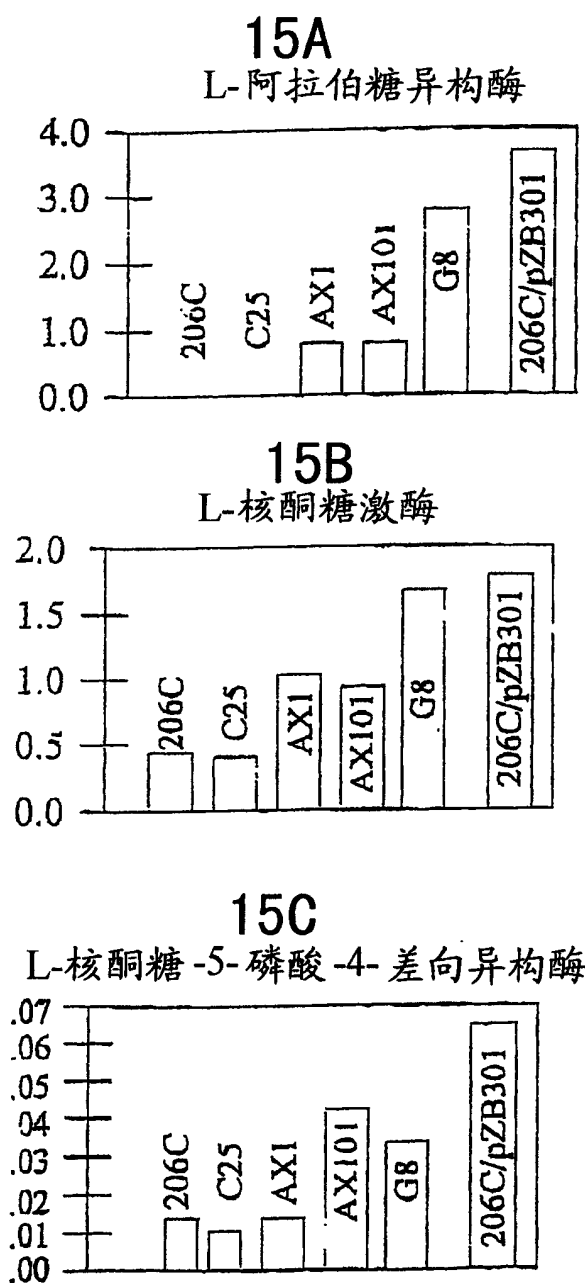


图 15

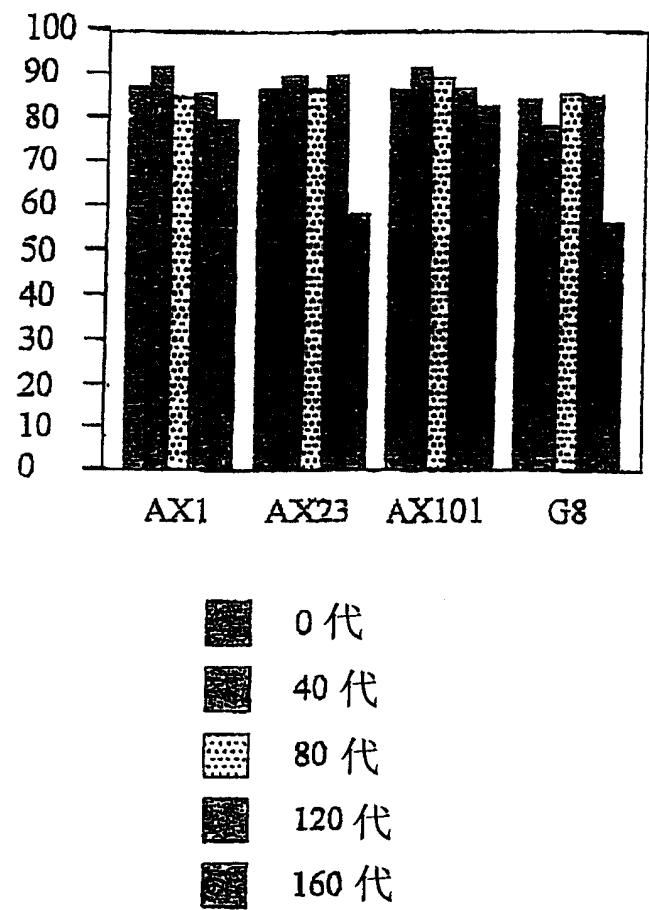


图 16

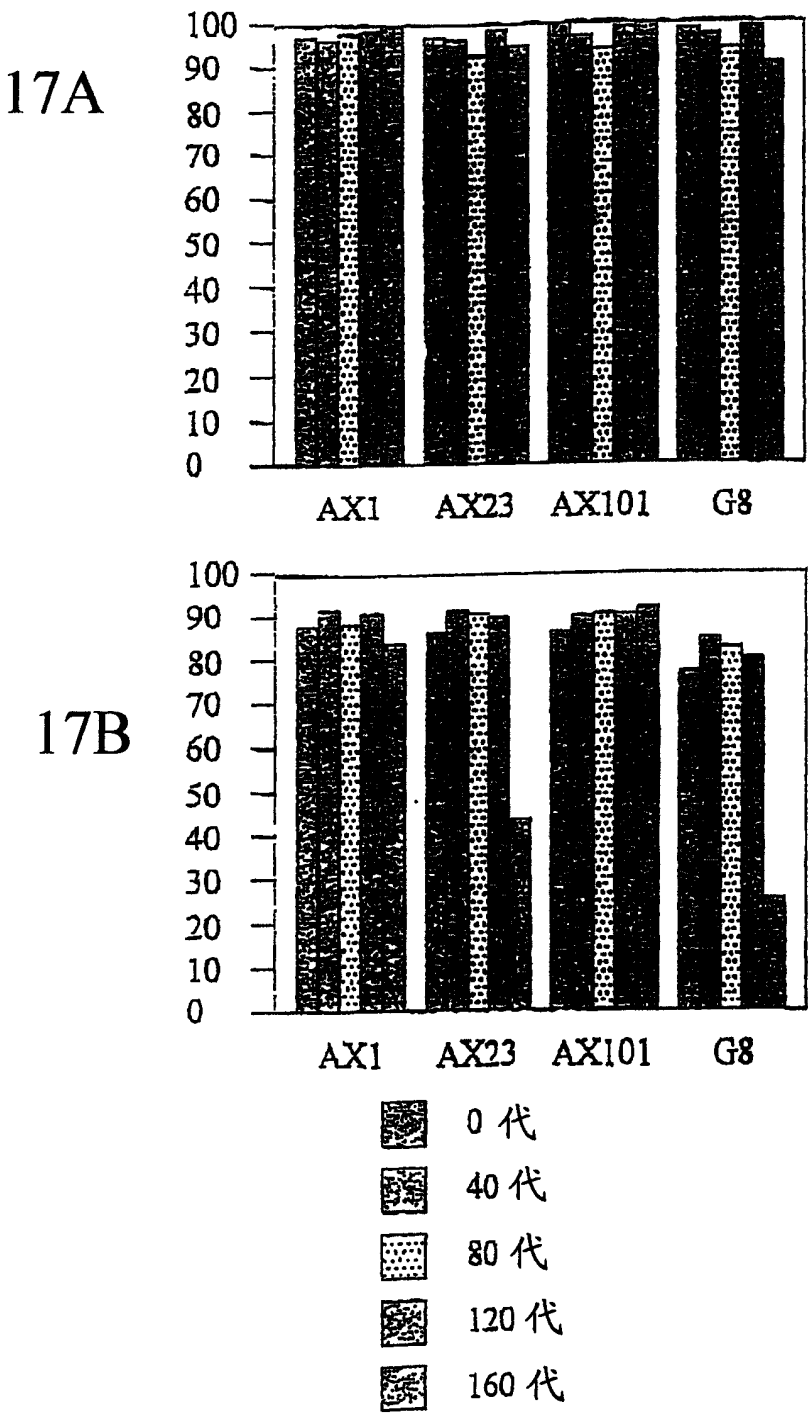


图 17

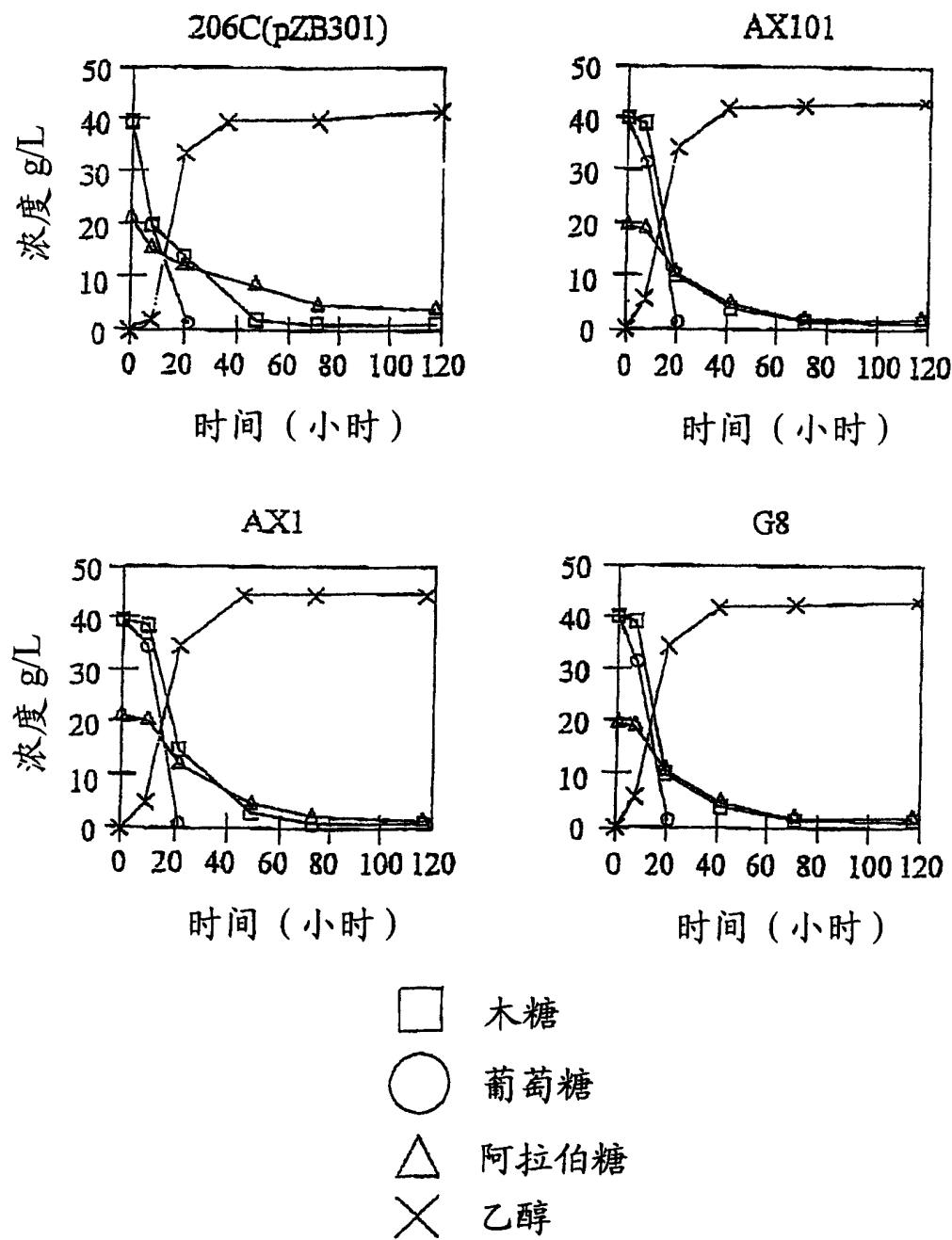


图 18

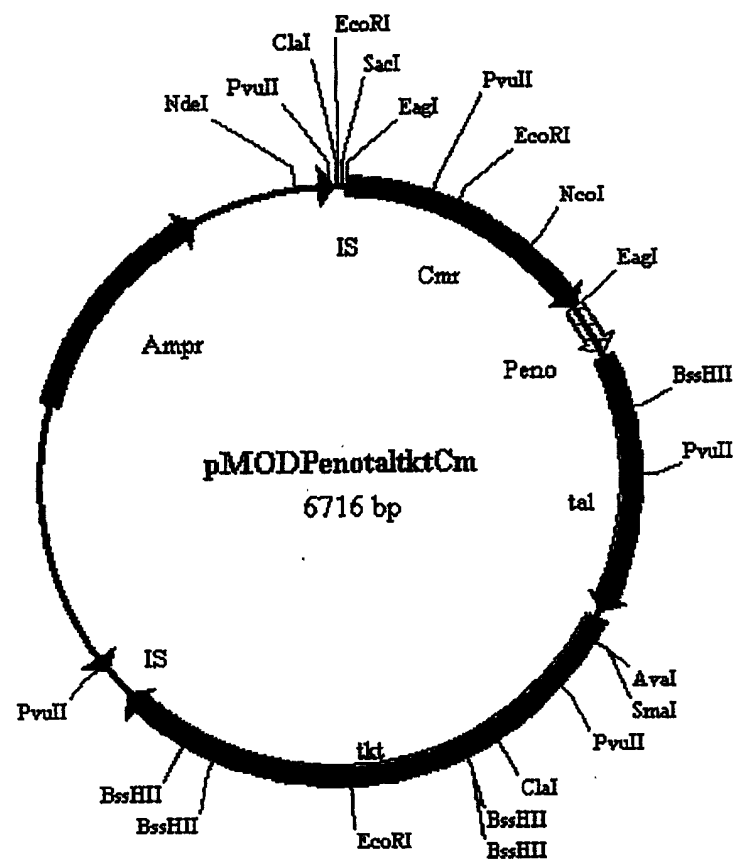


图20

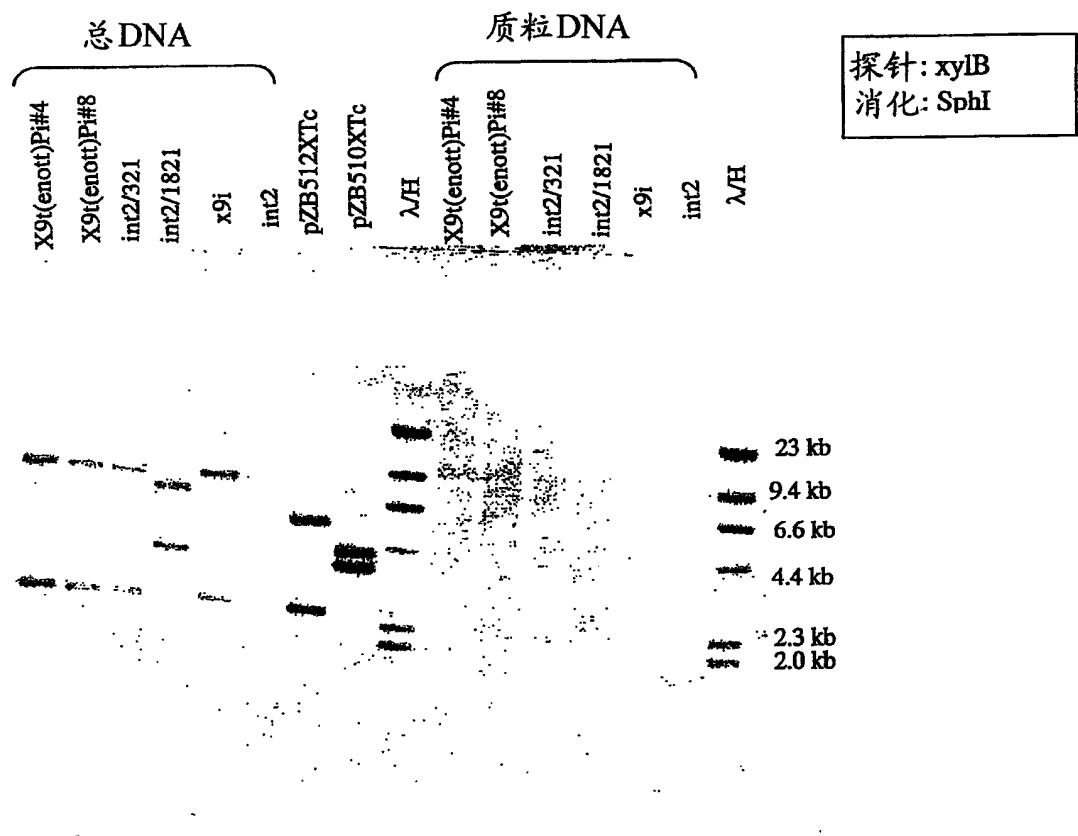


图 21A

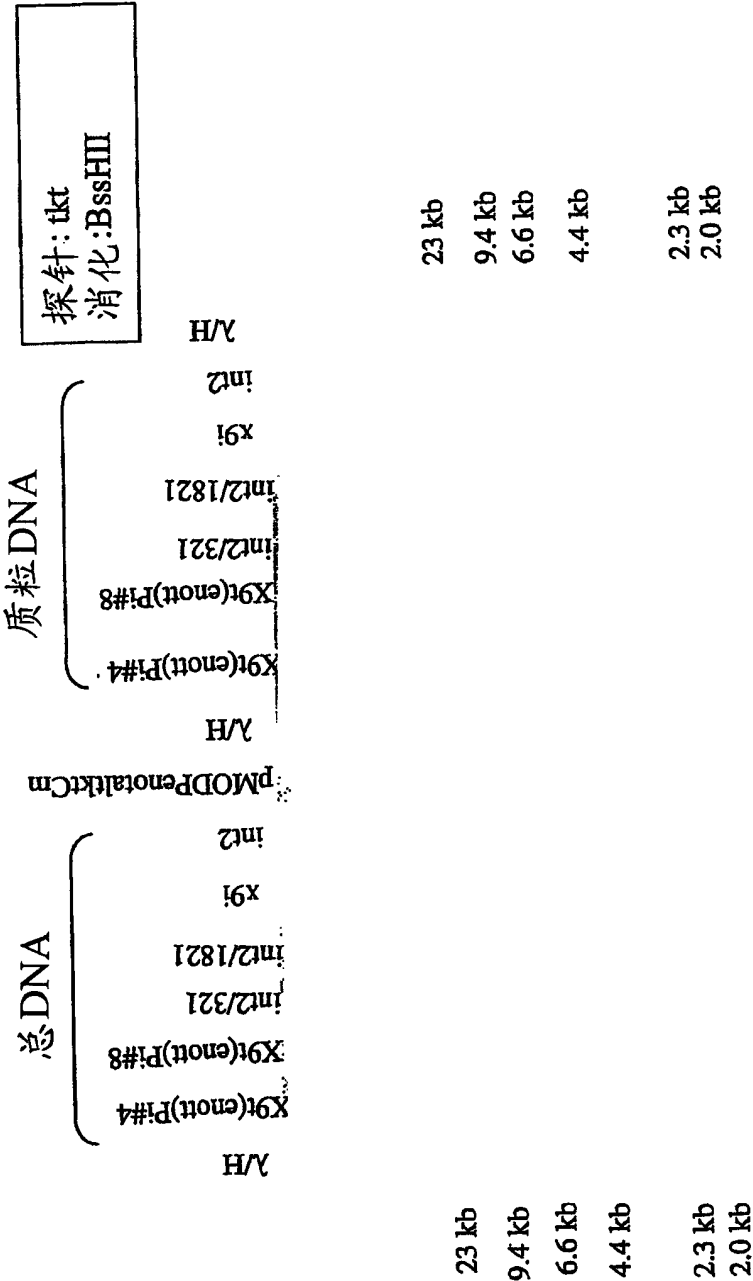


图 21B

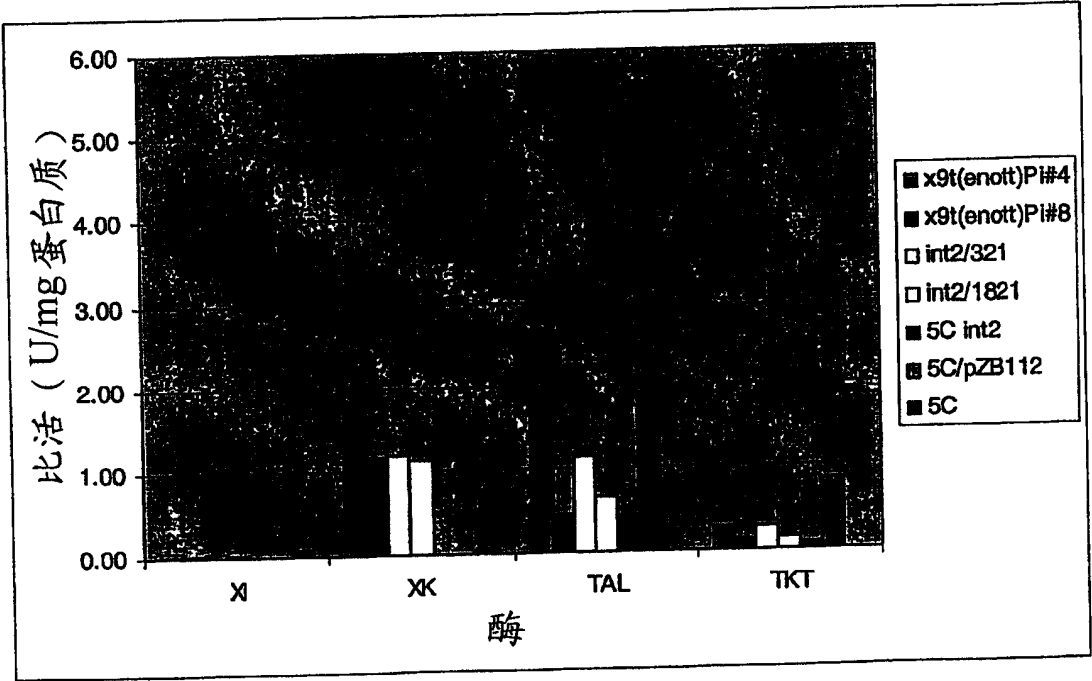


图 22

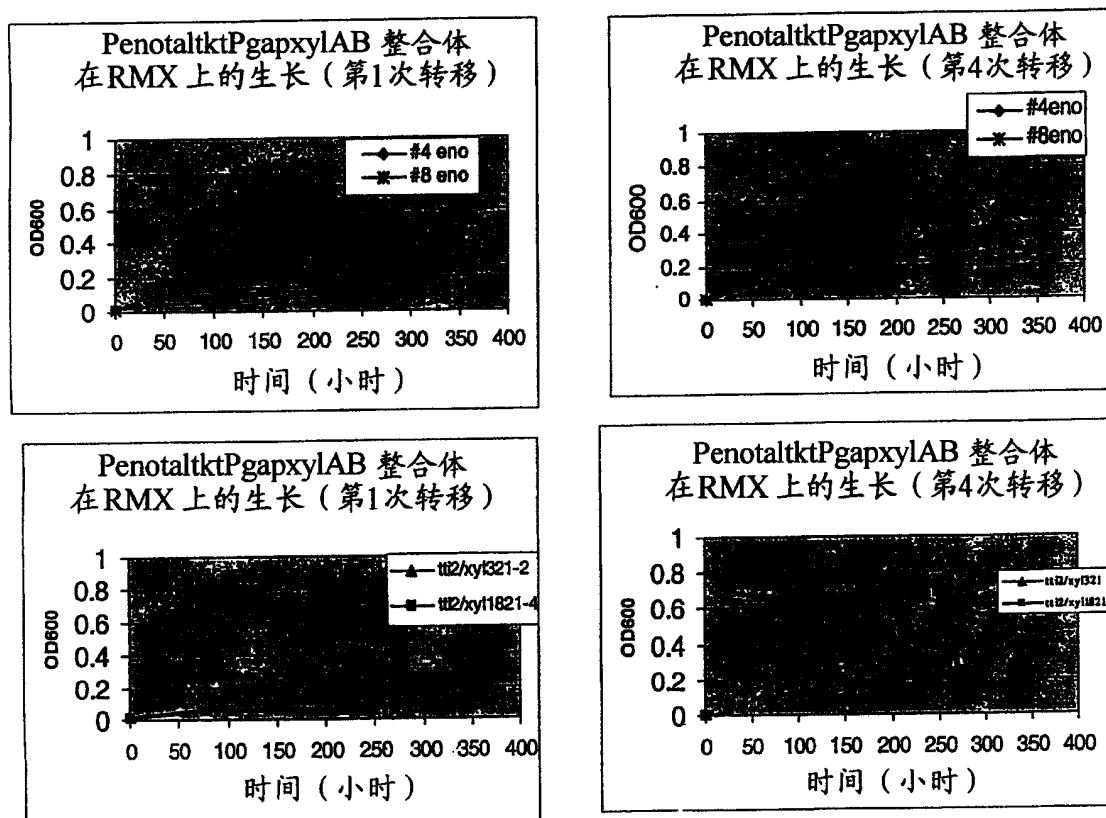


图 23

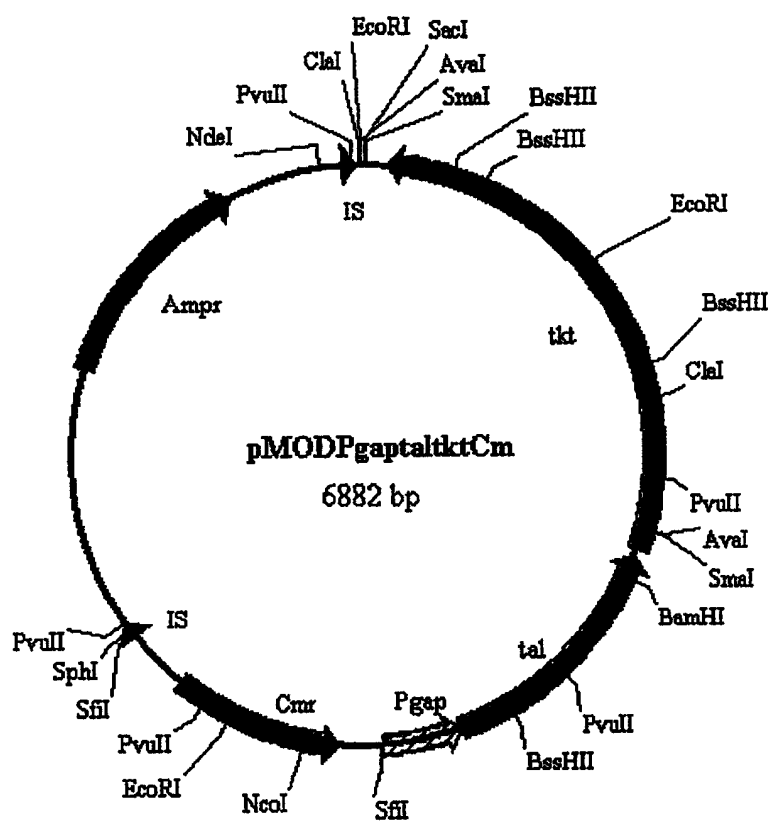
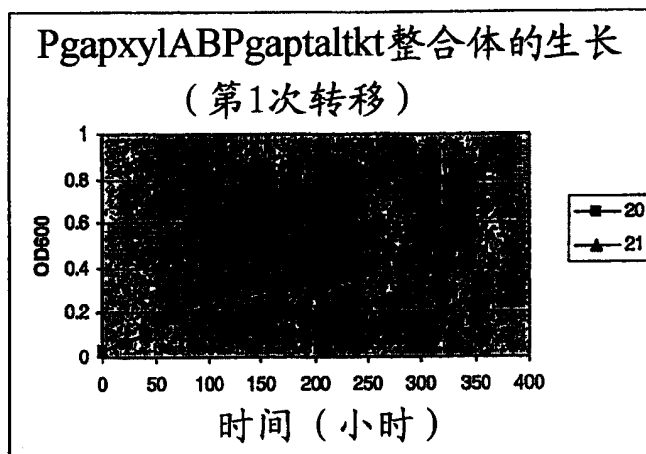


图 24

25A



25B

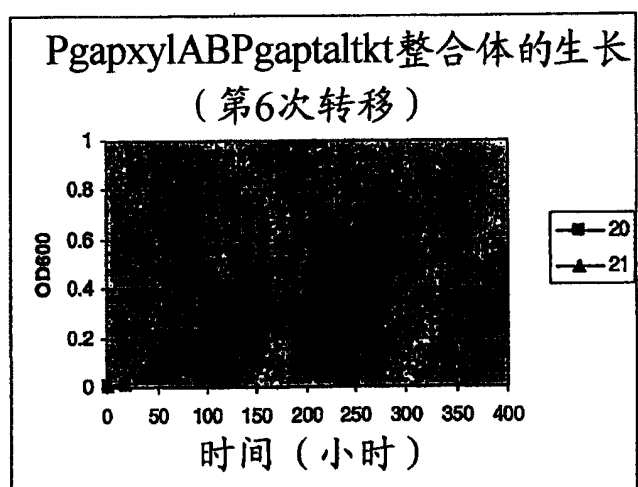


图 25

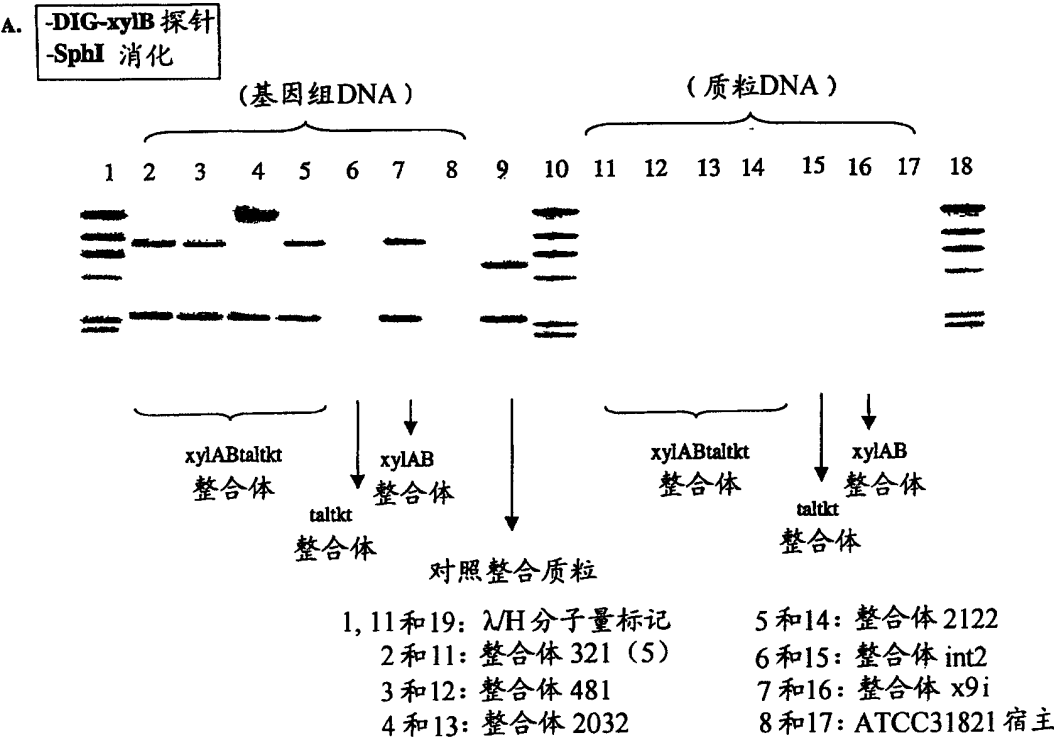


图 26A

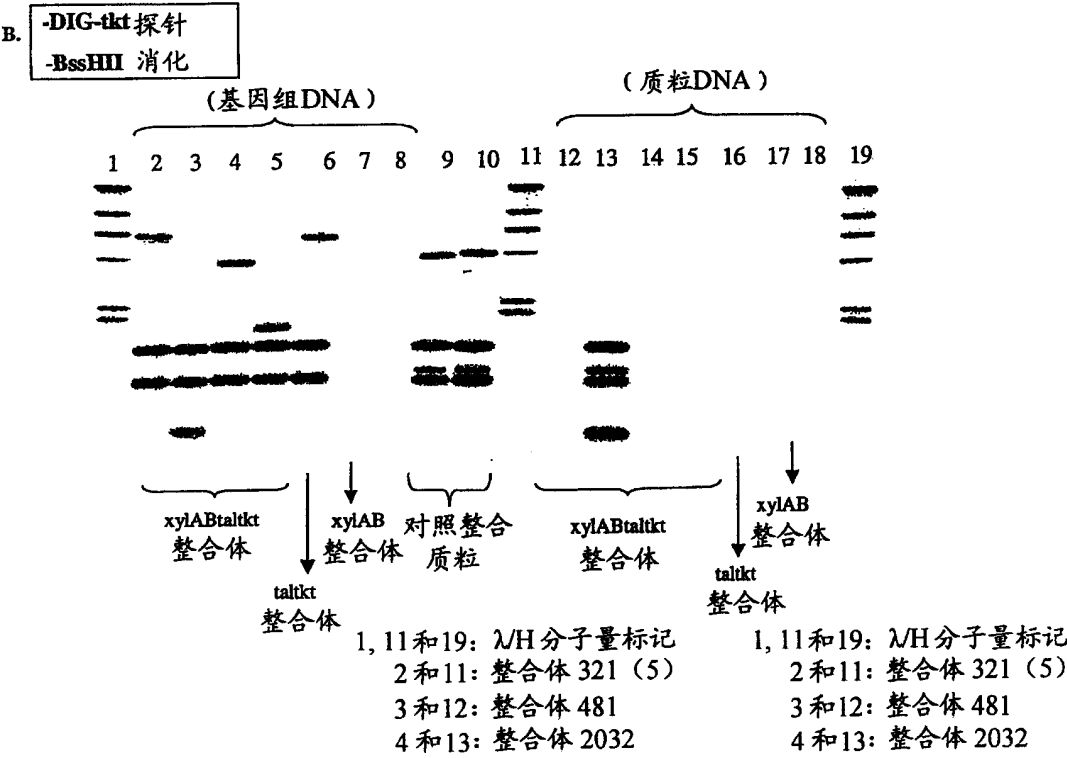


图 26B

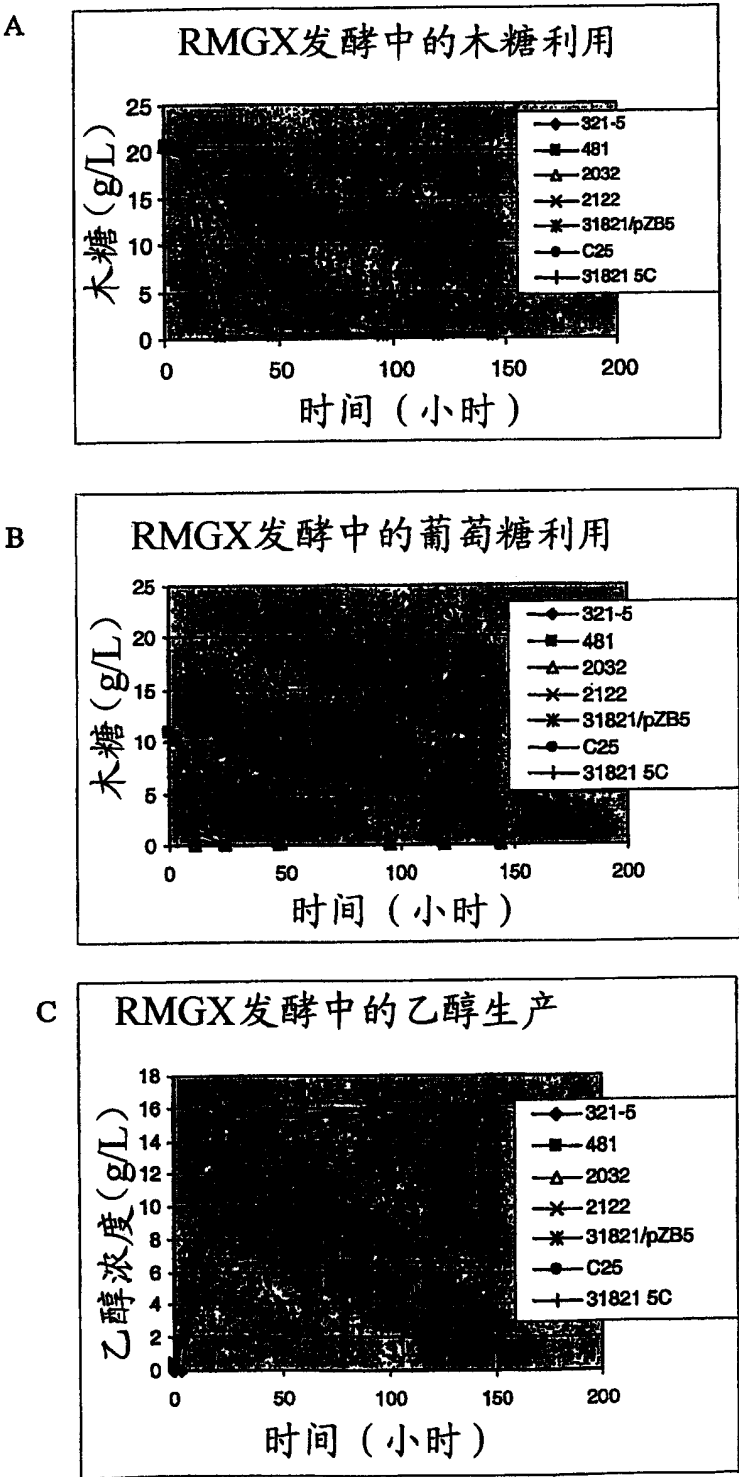


图 27

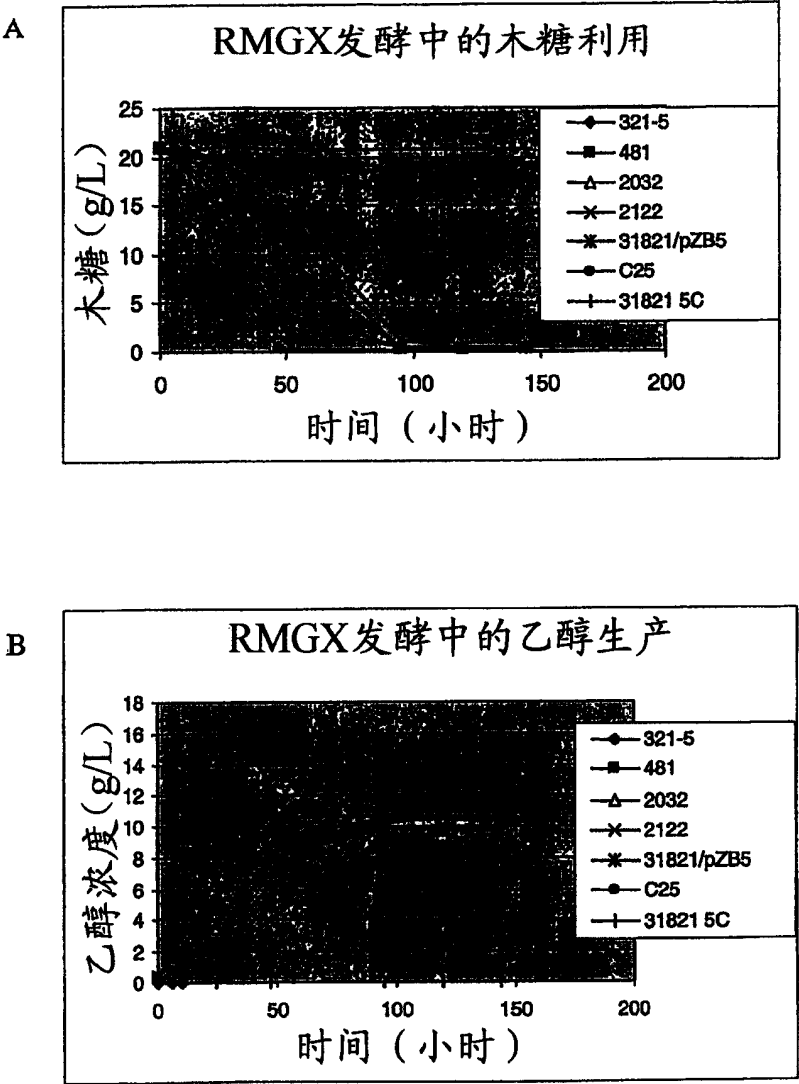


图 28

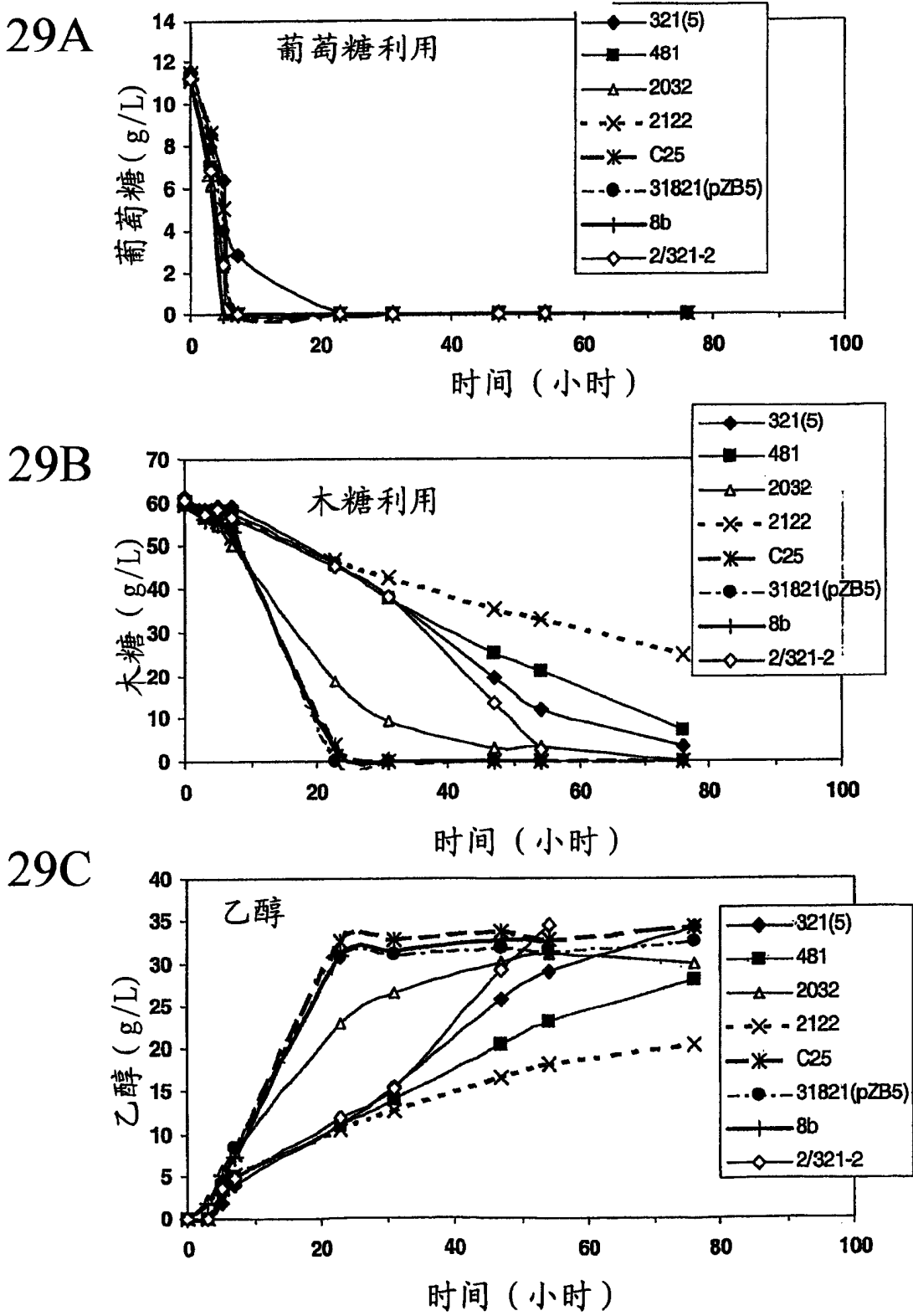


图 29

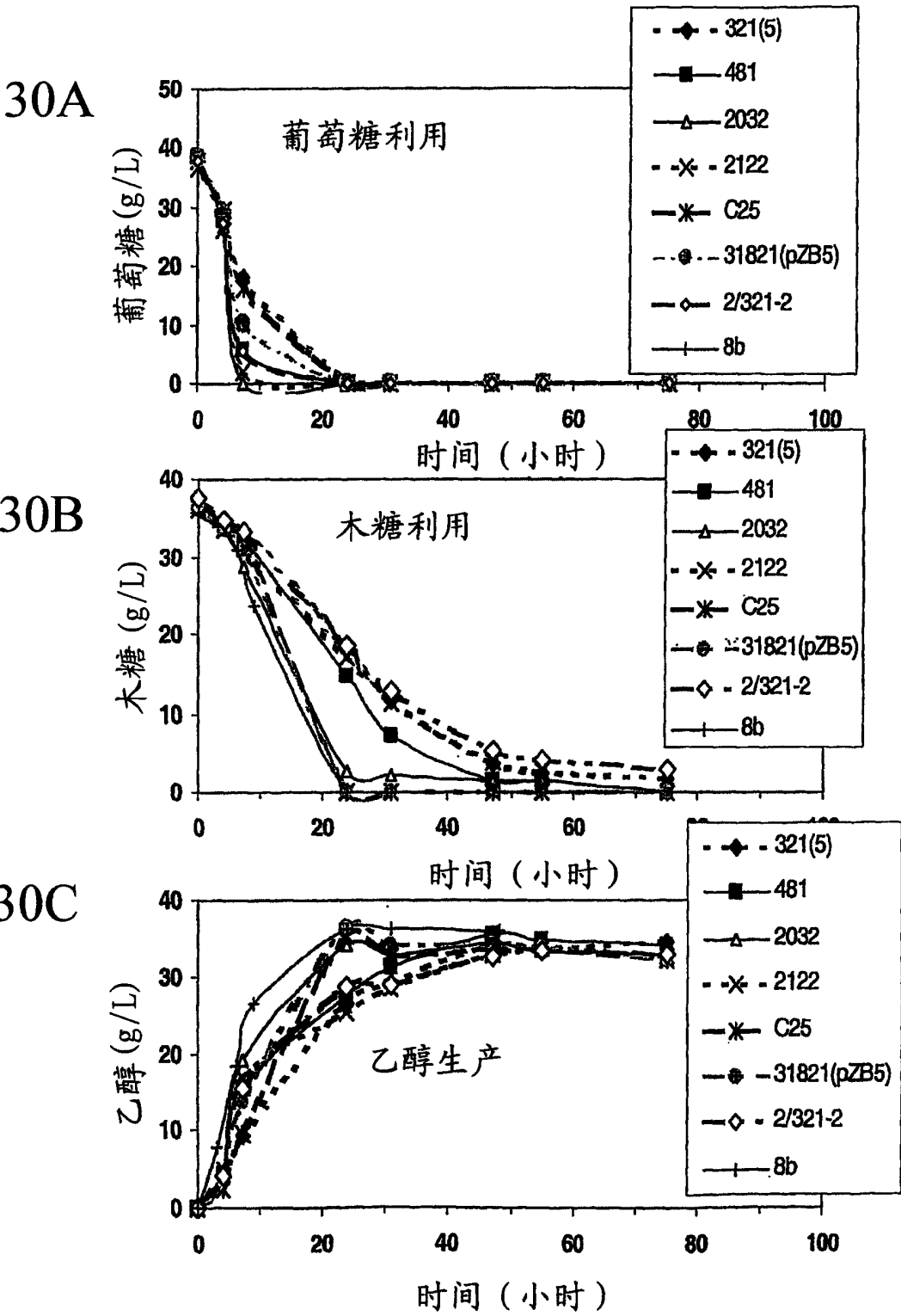


图 30

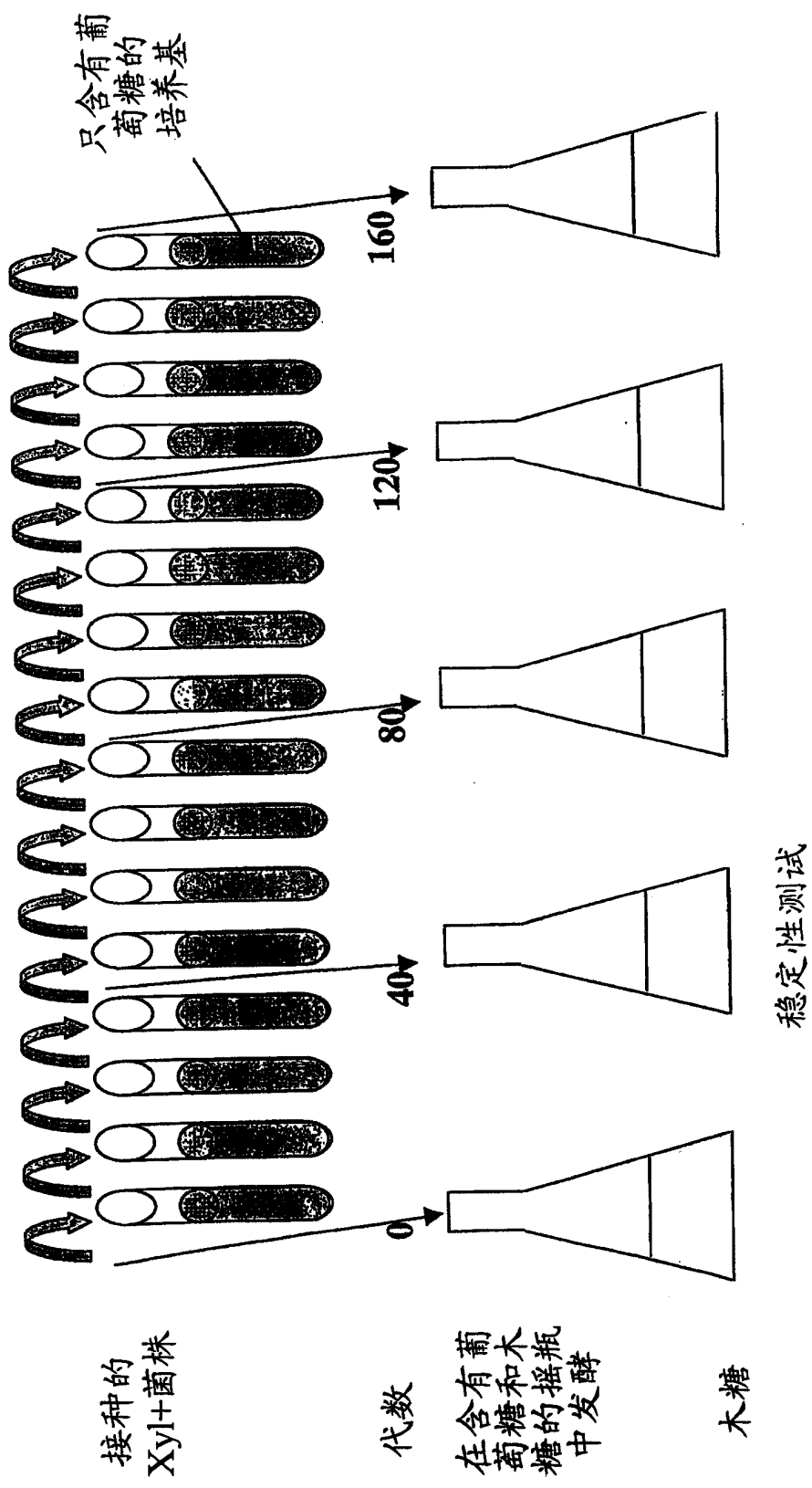


图 31

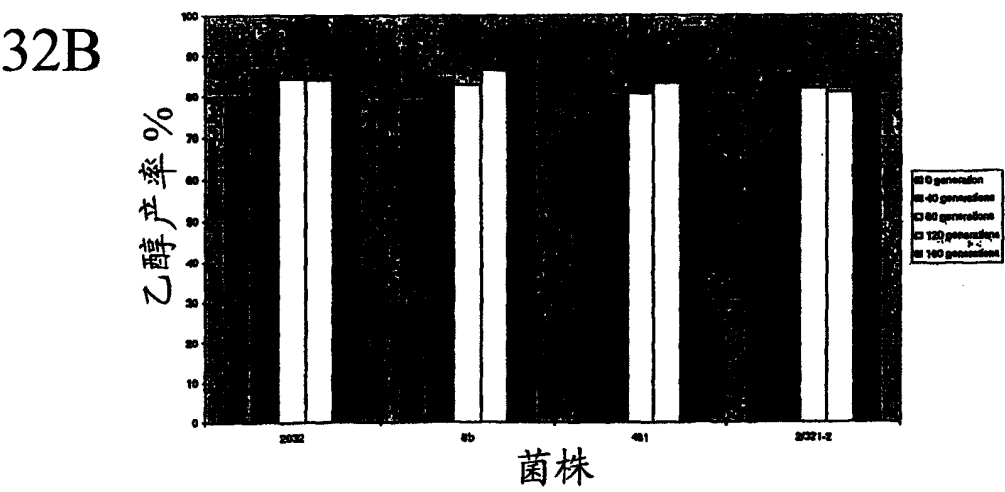
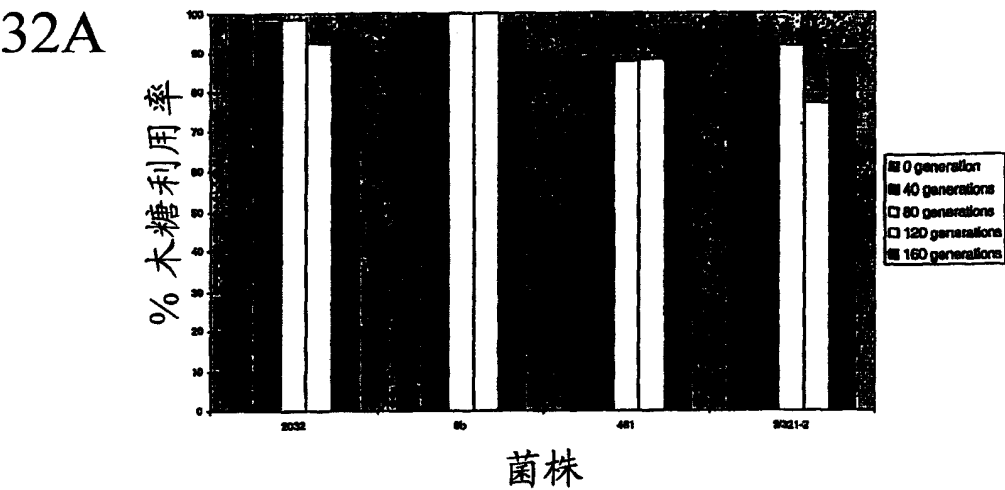


图 32

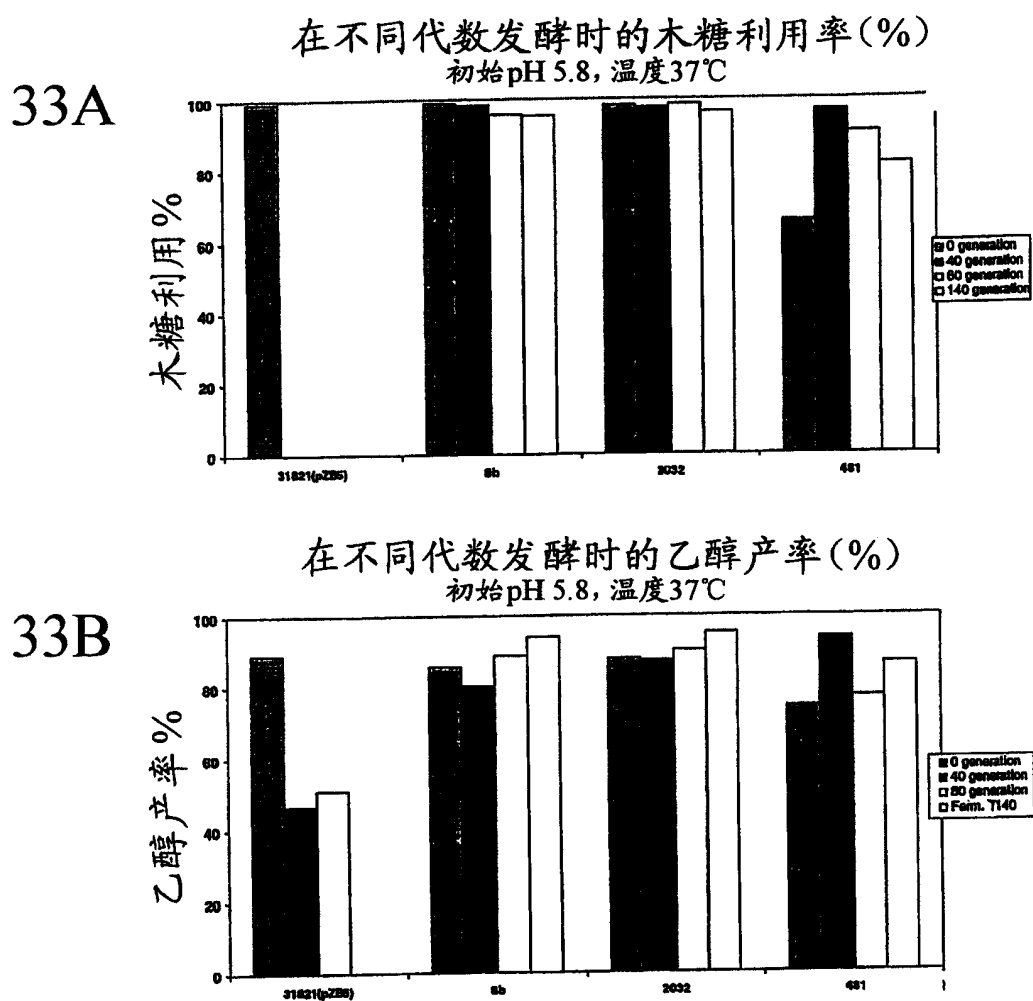
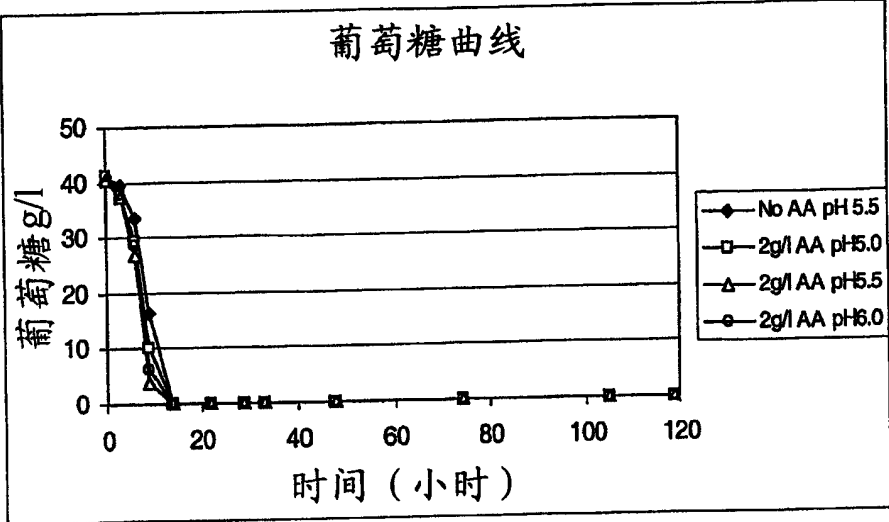
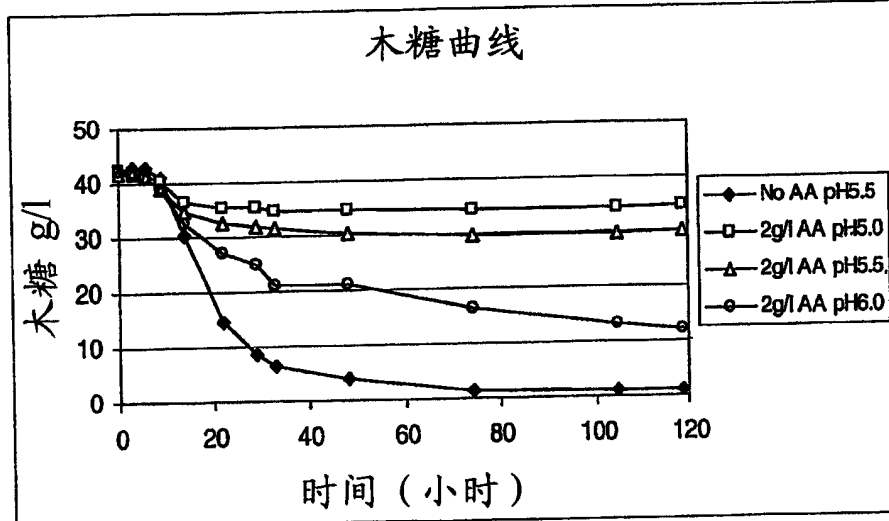


图 33

34A



34B



34C

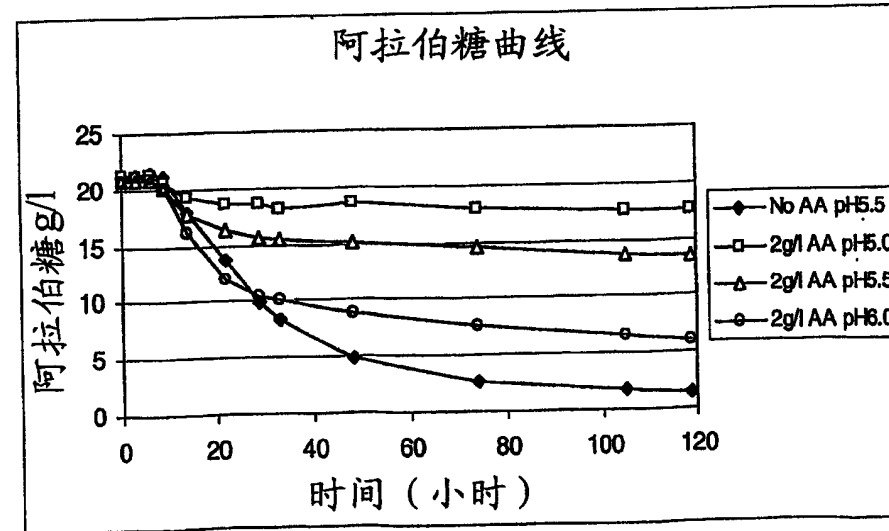
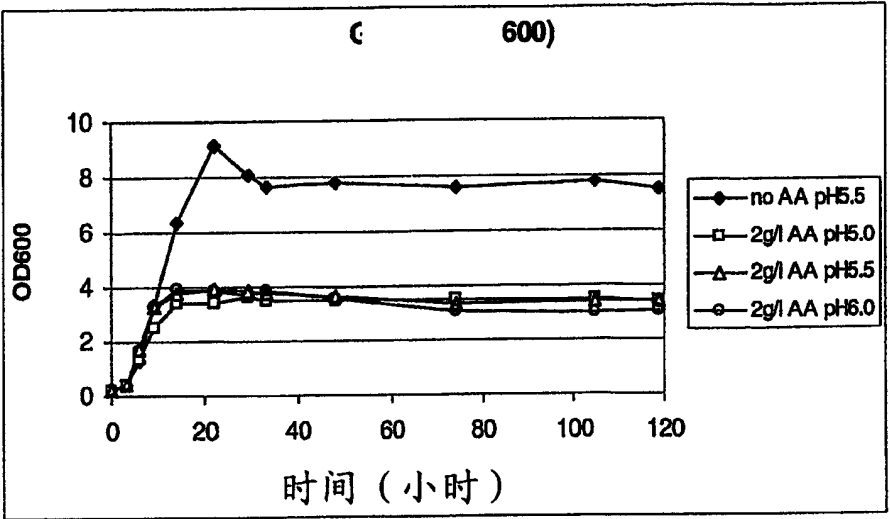
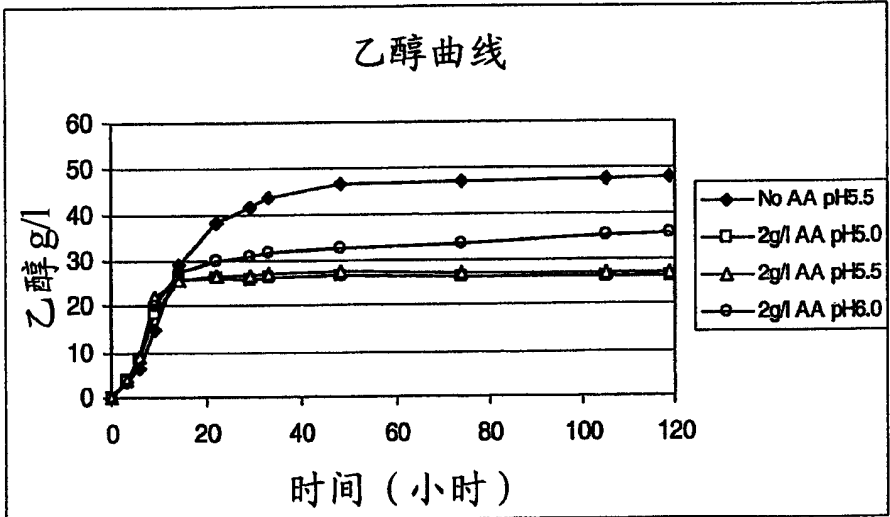


图 34A,B,C

34D



34E



34F

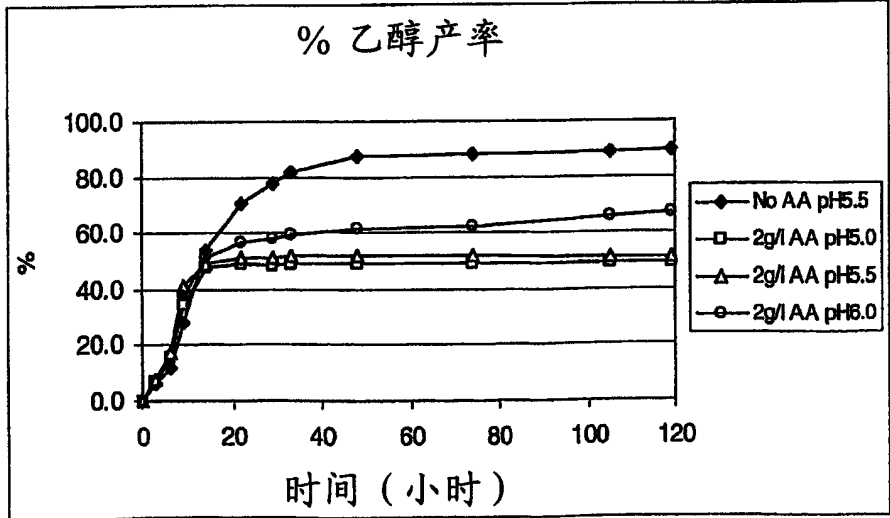


图 34D,E,F

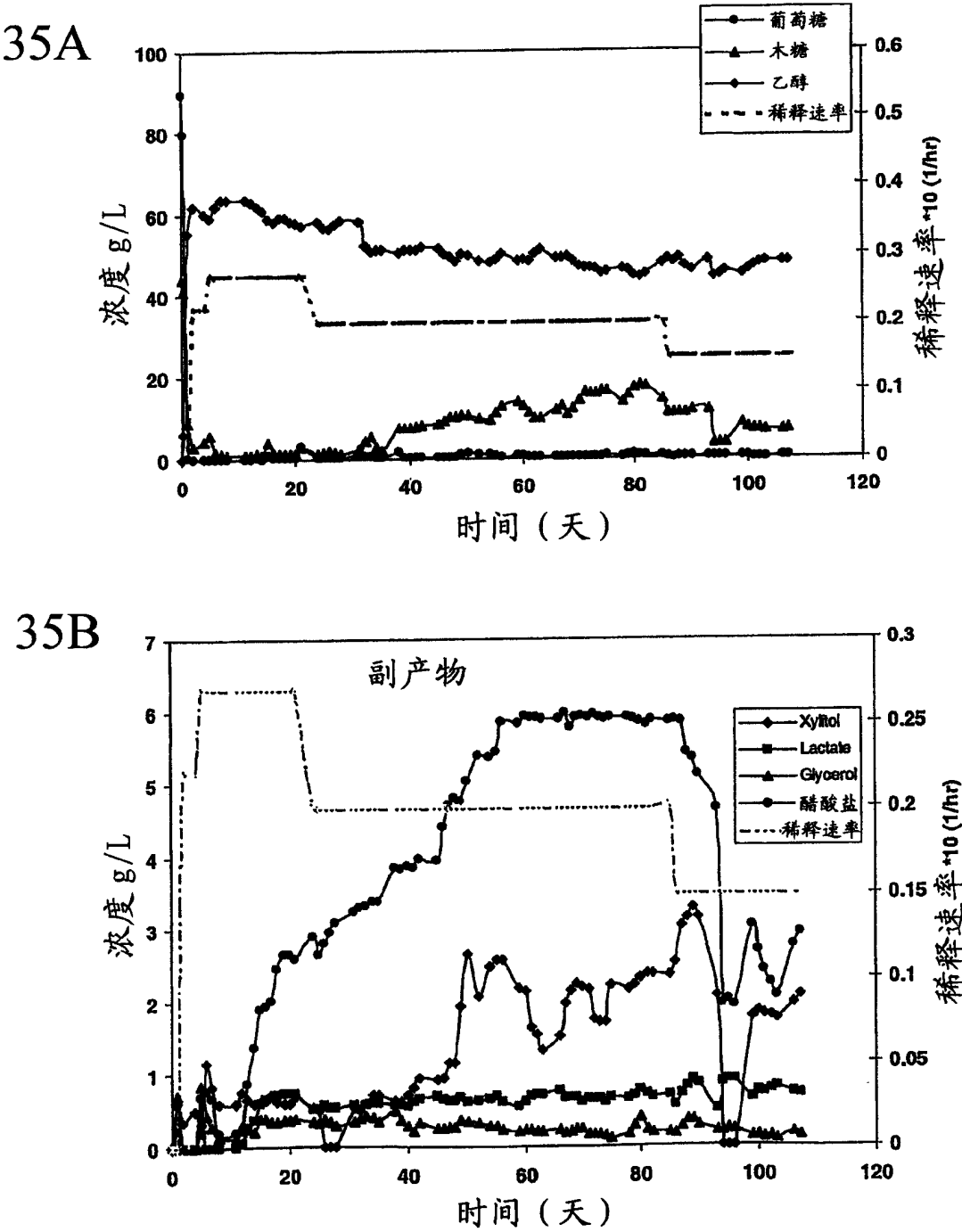
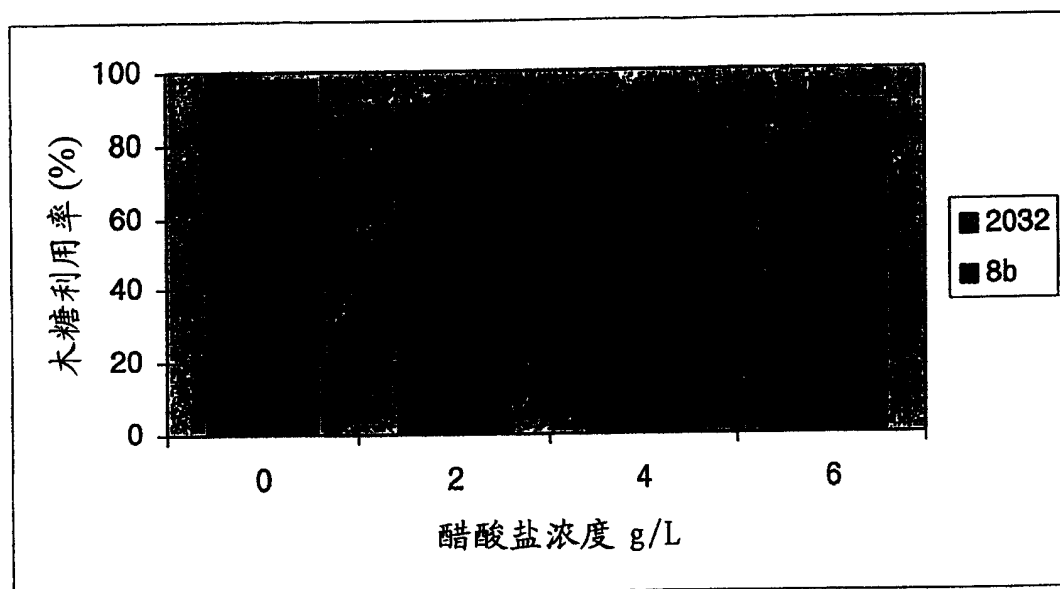


图 35

36A



36B

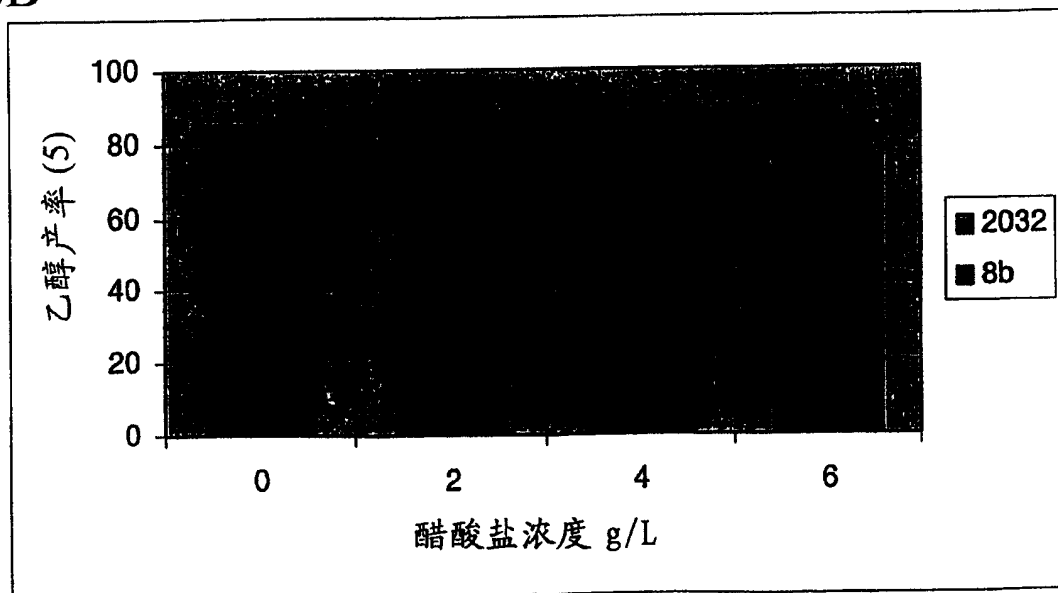
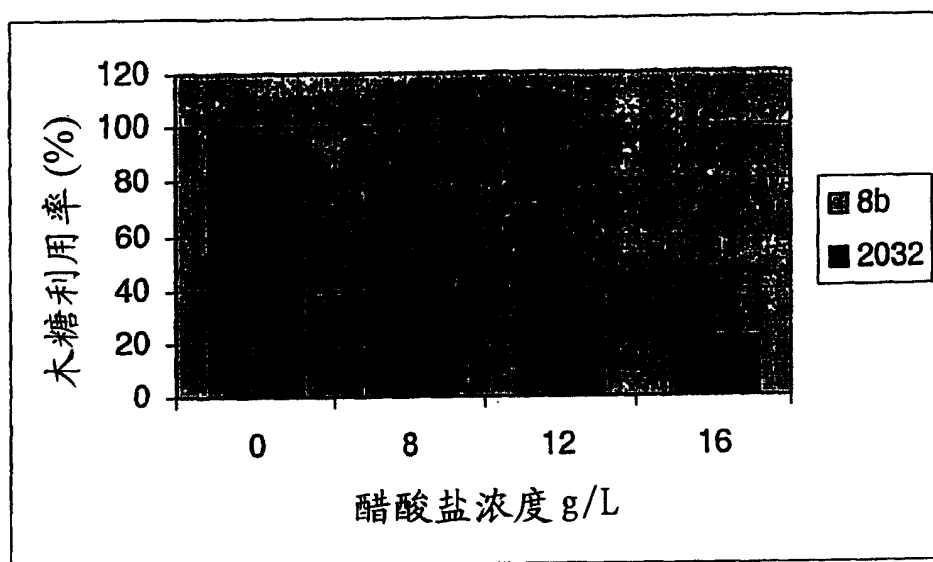


图 36

37A



37B

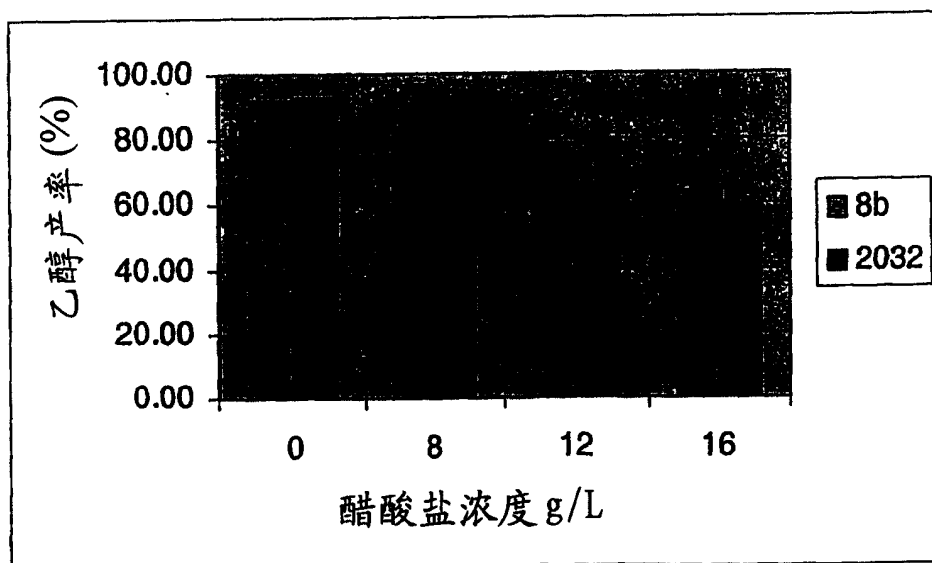


图 37

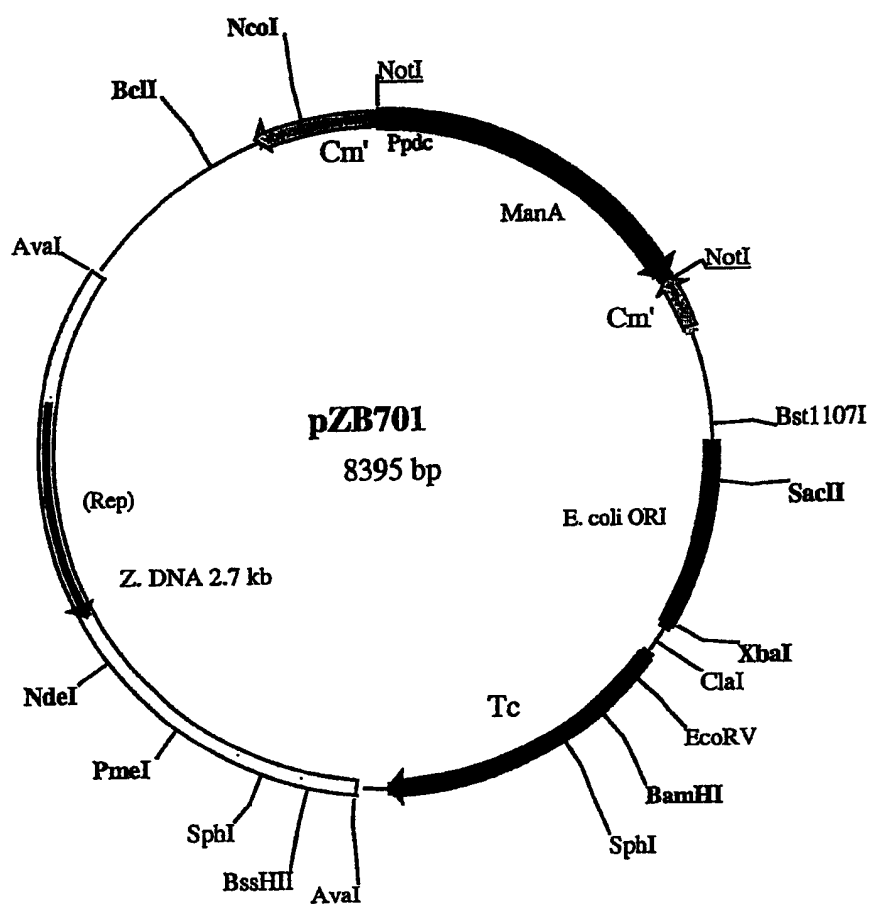
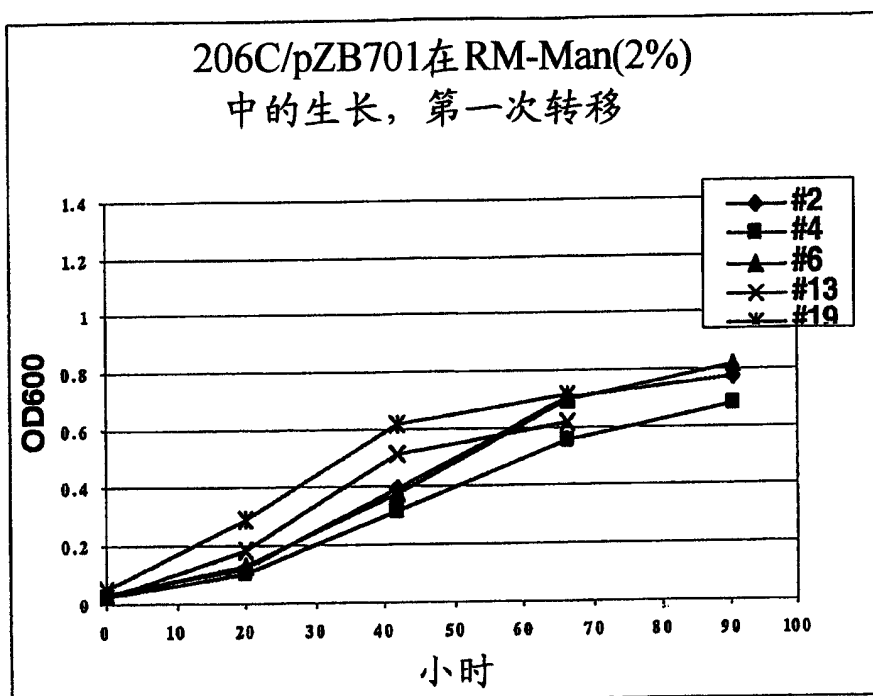


图 38

39A



39B

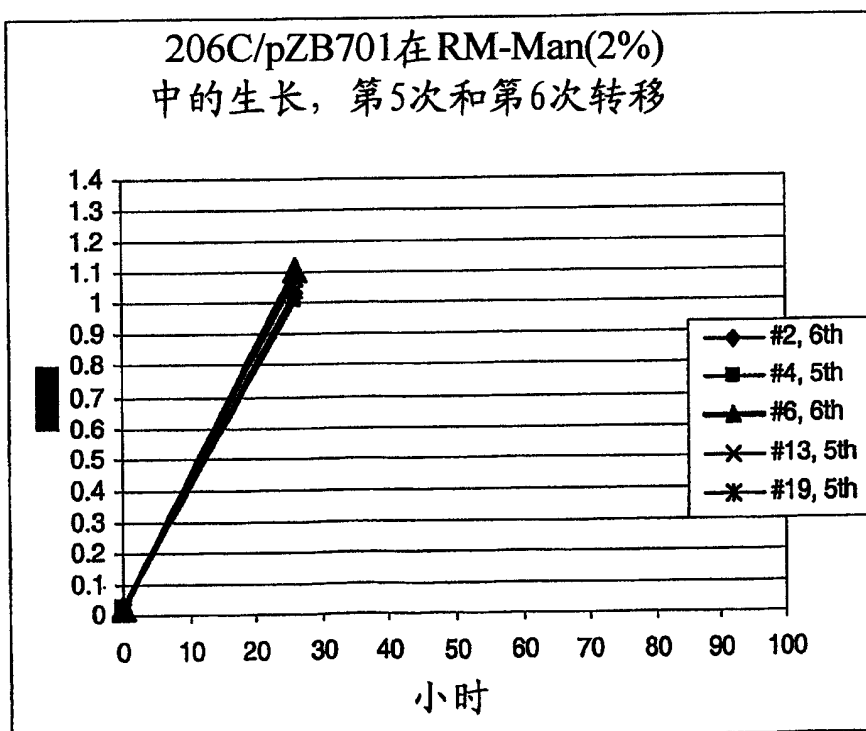


图 39