

研究报告

枯草芽孢杆菌基因修饰生产核黄素

张续¹ 班睿^{1*} 刘露¹ 张然²

(1. 天津大学化工学院 系统生物工程教育部重点实验室 天津 300350)

(2. 天津医学高等专科学校 天津 300222)

摘要:【目的】研究枯草芽孢杆菌核黄素合成途径、木糖代谢相关基因修饰对核黄素合成的影响。【方法】单独过表达或共同过表达核黄素操纵子中的基因、过表达木糖代谢相关基因构建相应的重组菌株。通过测定和比较重组菌株摇瓶发酵的核黄素产量和生物量,表征各个基因修饰的效应。采用摇瓶和 5 L 罐发酵,考察木糖作为主要碳源以及木糖与蔗糖共代谢对核黄素发酵的影响。【结果】*ribA* 基因单独过表达,使核黄素产量提高 99%,但生物量降低 30%,出现细胞自溶现象。*ribA-ribH* 基因共表达,使核黄素产量提高 280%,并且无细胞自溶和生物量下降现象。1.5%蔗糖与 6.5%木糖作为碳源,5 L 发酵罐发酵 70 h,核黄素产量达到 3.6 g/L,与 8%蔗糖为碳源的发酵相比,核黄素产量提高 80%。木糖代谢相关基因过表达,均明显降低核黄素产量。【结论】与 *ribA* 基因单独过表达相比,*ribA-ribH* 基因共表达可有效避免细胞自溶现象,并能进一步提高核黄素产量。蔗糖与木糖共代谢,能够改善前体物供给,有利于提高核黄素产量。

关键词: 枯草芽孢杆菌,核黄素, *ribH* 基因,基因表达,木糖,共代谢

Riboflavin production by a genetically modified *Bacillus subtilis*ZHANG Xu¹ BAN Rui^{1*} LIU Lu¹ ZHANG Ran²

(1. Key Laboratory of Systems Biotechnology of Ministry of Education, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300350, China)

(2. Tianjin Medical College, Tianjin 300222, China)

Abstract: [Objective] We modified genes responsible for xylose metabolism and riboflavin biosynthesis in *Bacillus subtilis*. [Methods] Genes responsible for riboflavin biosynthesis were overexpressed or co-overexpressed with genes of xylose metabolism in *Bacillus subtilis*. Recombinant strains were evaluated by measuring the riboflavin yield and biomass. Fermentation was done in shake flask and fermenter to produce riboflavin with sucrose as sole carbon source or a mixture of sucrose/xylose. Meanwhile, riboflavin yield, xylose consumption and biomass were analyzed. [Results] Overexpression of *ribA* gene increased riboflavin yield by 99% and reduced maximum biomass by 30% because of autolysis. With *ribA* and *ribH* genes co-overexpression,

Foundation item: National High-Tech R&D Program of China (863 Program) (No. 2012AA02A701)

*Corresponding author: E-mail: banrui@tju.edu.cn

Received: March 31, 2016; **Accepted:** May 18, 2016; **Published online** (www.cnki.net): June 21, 2016
基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划) (No. 2012AA02A701)

*通讯作者: E-mail: banrui@tju.edu.cn

收稿日期: 2016-03-31; 接受日期: 2016-05-18; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-06-21

riboflavin yield increased by 280% without biomass decrease and autolysis. Through a 70 h batch fermentation with 6.5% xylose and 1.5% sucrose as carbon source in a 5 L fermenter, riboflavin yield of 3.6 g/L was obtained, 80% higher than that with 8% sucrose as carbon source. Riboflavin yield decreased significantly by overexpressing the genes involved in xylose metabolism. **[Conclusion]** Co-overexpression of *ribA* and *ribH* genes avoided the cytotoxicity effectively and further increased riboflavin production.

Keywords: *Bacillus subtilis*, Riboflavin, *ribH* gene, Gene expression, Xylose, Co-metabolism

核黄素(Riboflavin)属于B族维生素,作为药物、动物饲料营养强化剂和食品添加剂,在医药、农业和食品等行业具有重要的应用价值。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)发酵生产核黄素早已实现了产业化^[1-2],但相关的理论和技术研究持续至今。野生型枯草芽孢杆菌需要经过遗传修饰才能成为核黄素生产菌,即核黄素操纵子(*ribDEAHT*)组成型高表达^[3],大幅度降低黄素激酶活性(*ribC*)^[4],解除嘌呤合成途径的末端产物反馈调节机制^[5]。

枯草芽孢杆菌中核黄素合成途径包括7步反应,由*ribDEAHT*操纵子编码的4个酶催化^[6]。*ribA*基因编码GTP环水解酶II/3,4-二羟基-4-磷酸丁酮合成酶是核黄素合成途径的限速酶^[3,7]。单独过表达*ribA*基因,能够使核黄素产量提高25%。最近的动力学分析显示^[8],*ribH*基因编码的6,7-二甲基-8-(D-核糖醇基)二氧四氢蝶啶合成酶也可能是核黄素合成途径的限速酶,但尚无实验证据。

枯草芽孢杆菌核黄素合成的主要前体物是5-磷酸核酮糖,其胞内水平受磷酸戊糖途径代谢调控机制的控制。前体物的供给可能是核黄素合成速率的限制因素^[9],或许也是导致实际核黄素合成收率远低于最大理论收率的原因^[10]。在枯草芽孢杆菌中,木糖能够经过几步简单的异构和磷酸化反应生成5-磷酸核酮糖(图1)^[11-13]。木糖作为发酵碳源,可能有利于核黄素合成速率和收率的进一步提高。木糖来源于秸秆等农业废弃中半纤维素的酸水解,利用木糖作为微生物发酵原料,具有农业废弃物综合利用的重要意义。

本研究以产核黄素的枯草芽孢杆菌LXZ1为出发菌,通过对*rib*操纵子中各基因的单独表达、组合表达,研究枯草芽孢杆菌核黄素合成途径的限速

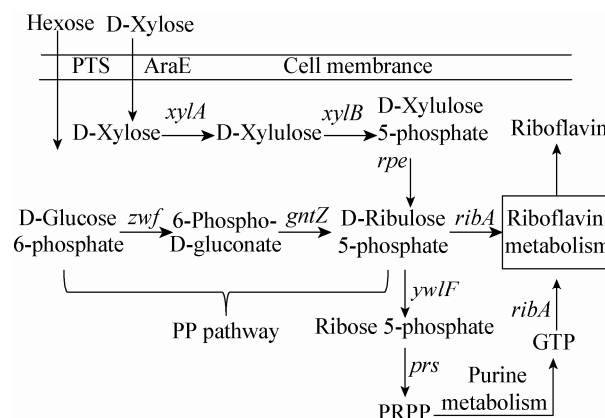


图1 枯草芽孢杆菌中5-磷酸核酮糖合成与核黄素合成途径

Figure 1 Ribulose-5-phosphate synthesis and riboflavin synthesis pathway in *B. subtilis*

因素;通过对木糖代谢相关基因的修饰以及木糖发酵实验,考察木糖与蔗糖共代谢对核黄素过量合成的影响。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和引物

菌株和质粒详见表1,PCR引物(表2)委托北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成。

1.2 主要试剂和仪器

Taq酶,北京索莱宝科技有限公司;Hifi DNA聚合酶,北京全式金生物技术有限公司;限制性内切酶、dNTPs和cDNA第一链合成试剂盒,Thermo scientific公司;细菌总RNA提取试剂盒,TIANGEN公司;RT-PCR试剂盒,Roche公司;核黄素标准品,Sigma公司;酵母粉YP101,安琪酵母股份有限公司;木糖等其余生化试剂为进口或国产分析纯试剂。

表 1 菌株
Table 1 Strains

菌株 Strains	遗传标记及说明 Genetic markers and instructions	来源 Source
<i>B. subtilis</i> LXZ-1	<i>trpC2</i> , Δ <i>araR</i> :: <i>P</i> _{ara-neo} , <i>rib</i> +(<i>gsiB</i>), Δ <i>guaC</i> , Δ <i>purA</i> , Δ <i>purR</i> , <i>pur</i> +(<i>cryIIIa</i>), <i>ribC</i> ⁻	Laboratory
<i>B. subtilis</i> TD-234m	<i>trpC2</i> , Δ <i>araR</i> :: <i>P</i> _{ara-neo} , Δ <i>hom</i> :: <i>P</i> _{cdd-pyrH-DN-cat-araR} , Δ <i>xylR</i> :: <i>P</i> _{AE-prs-DN-cat-araR}	Laboratory
<i>B. subtilis</i> LXZ-2	<i>B. subtilis</i> LXZ1, Δ <i>sacB</i> :: <i>P</i> _{cdd-ribA}	This work
<i>B. subtilis</i> LXZ-3	<i>B. subtilis</i> LXZ1, Δ <i>sacB</i> :: <i>P</i> _{cdd-ribA-ribH}	This work
<i>B. subtilis</i> LXZ-31	<i>B. subtilis</i> LXZ1, Δ <i>sacB</i> :: <i>P</i> _{cdd-ribE-ribA}	This work
<i>B. subtilis</i> LXZ-32	<i>B. subtilis</i> LXZ1, Δ <i>sacB</i> :: <i>P</i> _{cdd-ribH}	This work
<i>B. subtilis</i> LXZ-4	<i>B. subtilis</i> LXZ3, Δ <i>yolA</i> :: <i>P</i> _{cdd-araE}	This work
<i>B. subtilis</i> LXZ-5	<i>B. subtilis</i> LXZ3, <i>xyl</i> ⁺ (<i>P</i> _{AE})	This work
<i>B. subtilis</i> LXZ-6	<i>B. subtilis</i> LXZ3, Δ <i>hom</i> :: <i>P</i> _{AE-rpe}	This work
<i>B. subtilis</i> LXZ-3/pMX45	<i>B. subtilis</i> LXZ1, Δ <i>sacB</i> :: <i>P</i> _{cdd-ribA-ribH}	This work
pMX45	<i>rib</i> 操纵子表达质粒	Laboratory

表 2 PCR 引物
Table 2 PCR primers

Primers	Primer sequences (5'→3')	Location
Au1	CTCCTCCAGCAAGATGATT	<i>pbpE</i>
Au2	CAAGAGCGTGATGTTTGTCTGGTAGCCGTGATAGTT	<i>sacB</i>
Ap1/Ap2	GACAAACATCACGCTCTTG/GTGTAATTCCTCCCTTACCT	<i>pyrH</i>
ribA1	AGGTAAGGGAGGAATTTACACATGTTTCATCCGATAGAAGAAG	<i>ribA</i>
ribA2	CAAGCCACATCAATGTCATT	<i>ribH</i>
Ad1	AATGACATTGATGTGGCTTGCTTGATCCTAACGATGTAACC	<i>sacB</i>
Ad2	GAAGAATCCGCTTGTTGTA	<i>yveB</i>
Ac1	TTACACAAGCGGATTCTTCTCTCAACTAAAGCACCCAT	<i>cat</i>
Ac2	TTATTCATTCAGTTTTCGTG	<i>araR</i>
Ag1	CACGAAAACCTGAATGAATAACAGCCACATTTACATCTGAC	<i>sacB</i>
Ag2	CGTAATGCCGTCAATCG	<i>sacB</i>
AH2	AGGTTACATCGTTAGGATCAAGAATGTCCAGTCTGCTATTAAC	<i>ribT</i>
EA1	AGGTAAGGGAGGAATTTACACATGTTTACAGGAATTATCGAAGA	<i>ribE</i>
UPA2	ATTCTCTCTTTTGTCTTATTGATTAGAAATGAAGTAAATGACCTAG	<i>ribA</i>
ribD1	CAATAAGGACAAAAGGAGGAAT	<i>ribD</i>
ribD2	AGGTTACATCGTTAGGATCAAGTCGCCAAGATGAACATCC	<i>ribA</i>
Aupa1	TGTTCTGCTGTCTCTAATCTT	<i>yraL</i>
araE1	AGGTAAGGGAGGAATTTACACATGAAGAATACTCCAATCAAT	<i>araE</i>
araE2	CCGTAGAAAGGGCTGTTT	<i>araE</i>
Adcrg1	AAACAGCCCTTCTACGGGGACCTTGCGGATTTCAT	<i>csn</i>
Adcrg2	TTGTTCTCCTTGCGGATAG	<i>csn</i>
Rupa1	TACGGCATTACATCAGG	<i>yutH</i>
Rupa2	GAATAGATGGAGCAACCTTTATCATTCTTTACCCTCTCCTTT	<i>pyrH</i>
rpe1/rpe2	ATAAAGGTTGCTCCATCTATTCT/GTGTTTCATCCGTATAGCC	<i>rpe/yloS</i>
Rdcrg1	CGGCTATACGGATGAACACAACCTGTACGCAGCACATATC	<i>hom</i>
Rdcrg2	ACTTCTTGAACGACTTCCA	<i>hom</i>
Xu1/Xu2	GCGGTAACGATGTTGAATC/GCTCAATCTCATTCCAGTTC	<i>xylA</i>
Xp1	GAAGTGAATGAGATTGAGCCATTCTTTACCCTCTCCTTT	<i>prs</i>
Xp2	ATGGAGTGGATGAAGTGA	<i>prs</i>
Xdcrg1	TCCACTTCATCCACTCCATTGTCTCCATTGTGATTGAT	<i>xylR</i>
Xdcrg2	CTATTCTGTGCTGATACTTAC	<i>xylR</i>
RT-ribA1/RT-ribA2	TTGGCTCTCATCGCTGTG/TCATTGGCTTCTACGGTGTC	<i>ribA</i>
RT-araE1/RT-araE2	TCCTGTAAACAAGAAGCCATT/CCACAACCTCCTCAATCATA	<i>araE</i>
RT-rpe1/RT-rpe2	AAGGTTGCTCCATCTATTCT/GGACCGCTTCTACAATCA	<i>rpe</i>
RT-xylA1/RT-xylA2	GCTCAATCTCATTCCAGTTC/TCGCGGATTACTTCTTG	<i>xylA</i>
RT-ccpA1/RT-ccpA2	ACGAGCAGTGGCGGAAT/GATAGCGACTGACGGTGT	<i>ccpA</i>

PCR 仪, DNAEngine 公司; Light Cycler 480 荧光定量 PCR 仪, Roche 公司; Thermo Scientific Q Exactive Focus Orbitrap 高分辨率质谱仪, Thermo Scientific 公司; 紫外分光光度计, Bio Quest 公司; BIOTECH-2002 型发酵罐, 上海保兴生物工程设备有限公司。

1.3 培养基

LB 培养基(g/L): 蛋白胨 15.0, 酵母粉 10.0, NaCl 15.0, pH 7.5。固体培养基加入 1.5% 的琼脂 A, 需要时加入新霉素 15 mg/L 或氯霉素 6 mg/L。

核黄素发酵种子培养基(g/L): 蔗糖 10.0, 酵母粉 20.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, pH 7.2。

核黄素发酵培养基(g/L): 蔗糖(或木糖, 或混合糖) 80.0, 酵母粉 30.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, 尿素 2.0, pH 7.2。

1.4 基因的整合过表达方法

在枯草芽孢杆菌染色体指定位点, 采用无标记基因修饰方法^[14]整合表达目的基因。操作以 *ribA* 基因在染色体上非必需基因 *sacB* 位点整合表达为例进行说明。首先, 以枯草芽孢杆菌 TD-234m 的染色体为模板, 分别 PCR 扩增 *ribA* 基因编码序列(A, 1 384 bp), *cdd* 基因的串联启动子及前导区(P_{cdd} , 232 bp)^[15], *sacB* 基因上游同源臂(U, 1 078 bp)、下游同源臂(G, 581 bp)、正向选择标记盒(CR, 2 069 bp)和内部同源片段(D, 958 bp)。PCR 体系(50 μL): 无菌水 37.5 μL , $10\times\text{Buffer}$ 5 μL , dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μL , 染色体模板 1 μL , 引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL , *TransTaq* HiFi DNA polymerase (5 U/ μL) 0.5 μL 。PCR 条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 退火温度 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min/kb, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。最后采用重叠 PCR 方法^[16]拼接出 $\text{UP}_{cdd}\text{ADCRG}$ 片段(6 302 bp)。将 $\text{UP}_{cdd}\text{ADCRG}$ 片段转化枯草芽孢杆菌 LXZ-1 感受态细胞, 感受态细胞的制备及转化均采用 Spizizen 方法^[17]。在氯霉素抗性平板上筛选抗性菌落, 经 PCR 验证为正确转化子后, 转接至装有 5 mL LB 培养基的试管中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 振荡培养 4.5 h, 通过枯草芽孢杆菌内部同源片段重组,

使其失去抗性标记基因。上述培养液适当稀释后涂布新霉素抗性平板, 筛选新霉素抗性菌落; 抗性菌株经 PCR 扩增和 DNA 测序验证, 得到 $P_{cdd}\text{-ribA}$ 整合到染色体 *sacB* 基因位点的重组菌 LXZ-2。

采用同样的方法, 在枯草芽孢杆菌染色体 *sacB* 基因位点整合表达 $P_{cdd}\text{-ribH}$ 基因, 构建了菌株 LXZ-32, 分别共同表达 $P_{cdd}\text{-ribA-ribH}$ 、 $P_{cdd}\text{-ribE-ribA}$ 和 $P_{cdd}\text{-ribA-ribD}$ 基因, 构建了菌株 LXZ-3、LXZ-31; 在枯草芽孢杆菌染色体的 *csn* 位点整合表达 $P_{cdd}\text{-araE}$ 基因, 构建了菌株 LXZ-4; 在枯草芽孢杆菌染色体 *hom* 位点整合表达 *rpe* 基因, 构建了菌株 LXZ-6; 在枯草芽孢杆菌 LXZ-3 染色体上的 *xyI* 操纵子原位, 用来自枯草芽孢杆菌 TD-234 m 的 P_{AE} 表达盒^[18]替换了其原有的启动子和前导区序列, 构建了 *xyI* 操纵子过表达菌株 LXZ-5。

1.5 qRT-PCR 分析

使用罗氏公司 Light Cycler 480 荧光定量 PCR 仪, 采用荧光定量 PCR (qRT-PCR) 方法, 对目的基因的胞内 mRNA 相对水平进行测定, 以此表征目的基因的相对表达水平。使用枯草芽孢杆菌的碳分解代谢全局调控蛋白 CcpA 的编码基因 *ccpA* 作为 qRT-PCR 的参比基因。同时对出发菌株和目的基因表达菌株的相同基因进行 qRT-PCR 测定, 扩增片段的大小控制在 100–300 bp 之间。使用 LB 培养基进行摇瓶发酵, 在发酵 16、22 和 28 h 分别取样测定。细胞总 RNA 的提取、cDNA 第一链的扩增及 qRT-PCR 反应条件, 均按照相应试剂盒所提供的方法进行。分别测定出发菌和重组菌的目的基因和参比基因的 C_t 值, 根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算重组菌相对于出发菌的目的基因 mRNA 的相对倍数^[19]。取 3 个发酵时间点的相对倍数的平均值, 表示目的基因的表达水平。

1.6 胞内代谢物的质谱检测方法

取细胞的 LB 指数期培养液 10 mL, 迅速进行真空抽滤(–40 至 –50 kPa 压强, 0.45 μm 孔径有机滤膜), 并用 2 mL 2.6% NaCl 溶液冲洗 30 s, 然后用 –20 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 1.5 mL 提取剂(甲醇:乙腈:水=40:40:20, 体积比), 将滤膜上的菌体洗下并混匀。菌悬液轮流置于液氮中和冰浴中反复冻融 3 次

后, 4 °C、13 000 r/min 离心 5 min, 上清移至离心管中, 沉淀用 0.5 mL 提取剂重悬, 4 °C、13 000 r/min 离心 5 min, 合并上清液为枯草芽孢杆菌胞内代谢物提取液, 置-80 °C 冷冻保存^[20]。采用 Thermo Scientific Q Exactive Focus Orbitrap 高分辨率质谱仪, 对胞内代谢物提取液直接进样分析, 得到总离子流图。依据待检测分子的质核比, 在总离子流图中提取质谱图以定性分析出发菌和重组菌胞内代谢物提取液中的待测分子。

1.7 发酵方法

摇瓶发酵: 挑取新活化的平板单菌落接入 30 mL/250 mL 三角瓶种子培养基中, 200 r/min、37 °C 振荡培养 14 h。然后, 按 3%接种量转接 30 mL/250 mL 发酵培养基, 37 °C、220 r/min 振荡培养 60 h, 分别在 24、36、48 和 60 h 取样 0.5 mL, 用于核黄素、生物量、木糖等的测定。

发酵罐发酵: 用种子培养基进行种子液的摇瓶培养, 培养条件与摇瓶发酵相同。然后, 按 5%接种量接种至发酵罐中, 在 37 °C、500 r/min、通气量 1.5 VVM、pH 6.5、罐压 0.05 MPa 的条件下发酵。

1.8 定量分析方法

采用 3,5-二硝基水杨酸法(DNS 法)^[21]进行发酵液中木糖的定量分析。采用平板菌落计数法测定发酵液中的生物量。核黄素定量分析采用分光光度法进行, 发酵液用 0.05 mol/L 的 NaOH 溶液稀释

10 倍后, 12 000 r/min 离心 2 min; 取上清液用乙酸-乙酸钠缓冲溶液(pH 5.0)稀释 10 倍, 以乙酸-乙酸钠缓冲溶液为空白对照, 测量 444 nm 下的吸光度值, 用核黄素(g/L)=稀释倍数 \times ($OD_{444}-0.0057$)/32.1 计算核黄素浓度。

2 结果与分析

2.1 *ribA* 和 *ribH* 基因单独表达对核黄素合成的影响

以产核黄素枯草芽孢杆菌 LXZ-1 为受体菌, 分别整合表达 *ribA* 和 *ribH* 基因构建的重组菌 LXZ-2 和 LXZ-32, 其 qRT-PCR 分析显示, LXZ-2 菌株 *ribA* 基因 mRNA 胞内水平相对 LXZ-1 提高了 34 倍, LXZ-32 菌株 *ribH* 基因相对提高了 25 倍, 表明采用这种方式能够有效过表达靶基因。摇瓶发酵显示(图 2A), LXZ-2 菌株发酵 60 h 的核黄素产量达到 0.47 g/L, 比 LXZ-1 菌株提高了 99%; 而 LXZ-32 的核黄素产量没有明显变化。结果表明, *ribA* 基因的编码产物对于核黄素合成具有限速效应, 而 *ribH* 基因编码产物则没有限速效应。摇瓶发酵的生物量测定结果显示(图 2B), LXZ-2 菌株的最大生物量为 9×10^8 CFU/mL, 明显低于 LXZ-1 和 LXZ-32 的 1.3×10^9 CFU/mL。而且, 在多次的重复发酵中, LXZ-2 菌株发酵液会频繁出现颜色发暗的现象, 根据 LXZ-2 生物量显著下降判断, 其发酵液颜色发暗, 是由于部分细胞自溶所造成。

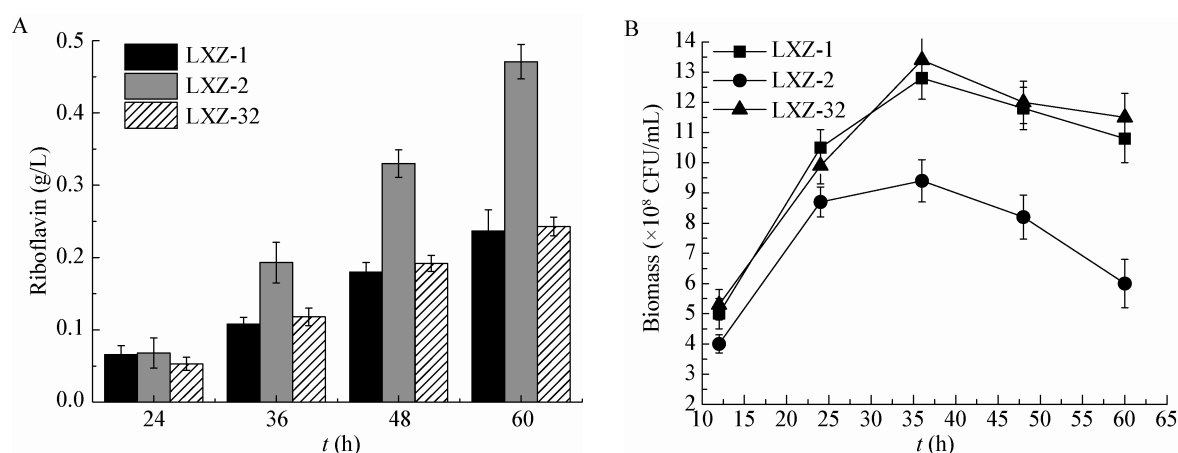


图 2 *ribA* 和 *ribH* 基因分别过表达对核黄素产量(A)及生物量(B)的影响

Figure 2 The effect of *ribA* and *ribH* genes overexpression on riboflavin production (A) and biomass (B)

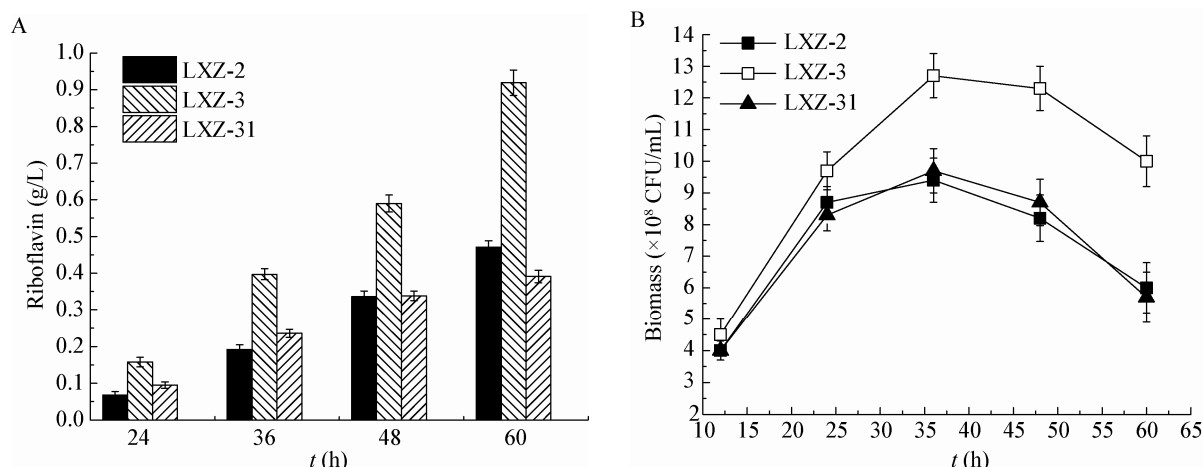


图3 两个基因共同过表达对核黄素产量(A)及活菌数(B)的影响

Figure 3 The effect of genes co-overexpression on riboflavin production (A) and biomass (B)

2.2 *ribA* 与 *ribH* 基因共表达的效应

在枯草芽孢杆菌 LXZ-1 中分别整合共表达 *ribA-ribD*、*ribA-ribH* 和 *ribA-ribE* 基因, 经过筛选和验证, 分别得到了 *ribA-ribH* 共表达菌株 LXZ-3 及 *ribA-ribE* 共表达菌株 LXZ-31。但是未能得到正确的 *ribA-ribD* 共表达菌株, 所获得的都是 *ribD* 编码序列发生了严重突变的重组菌。这一现象说明, *ribA-ribD* 共表达可能导致中间代谢物 5-氨基-6-(D-核糖氨基)尿嘧啶的胞内水平过高, 产生了致死效应。

摇瓶发酵结果显示, LXZ-3 菌株的核黄素产量达到 0.9 g/L, 较 LXZ-1 提高了 280%, 较 *ribA* 基因单独过表达的 LXZ-2 菌株提高约 91% (图 3A); 而且最大生物量恢复到接近 1.3×10^9 CFU/mL 水平(图 3B), 发酵液颜色也不再出现发暗现象。而 *ribA-ribE* 基因共表达的 LXZ-31 菌株, 产量基本与 *ribA* 基因单独过表达相同。分别对 LXZ-2 和 LXZ-3 菌株的胞内代谢物进行了质谱分析, 在负离子模式下的总离子流图中, LXZ-2 菌株能够提取到与 5-氨基-6-(D-核糖氨基)尿嘧啶核比(m/z) 275.089 相对应的质谱图(图 4), 而 LXZ-3 菌株没有相应 m/z 的质谱图。结果表明, 单独过表达 *ribA* 导致胞内 5-氨基-6-(D-核糖氨基)尿嘧啶积累, 并发生细胞自溶; 共表达 *ribA-ribH* 基因可消除 5-氨基-6-(D-核糖

氨基)尿嘧啶积累和细胞自溶现象, 从而进一步提高了核黄素产量。

2.3 木糖作为碳源对核黄素发酵的影响

将低拷贝 *rib* 操纵子表达质粒 pMX45 转化到菌株 LXZ-3 中, 筛选出菌株 LXZ-3/pMX45。分别以葡萄糖、蔗糖、木糖或不同比例的木糖和蔗糖的混合糖作为碳源, 总糖加入量均为 8% (质量体积比), 进行 60 h 的摇瓶发酵。结果显示(图 5A、B), 木糖作为碳源能显著提高核黄素产量。其中以 1.5%蔗糖和 6.5%木糖的混合糖发酵的核黄素产量最高, 达到 1.6 g/L。木糖作为唯一碳源, 核黄素产

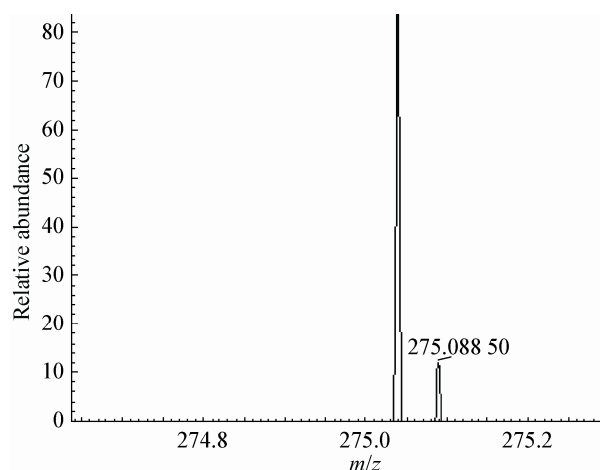


图4 5-氨基-6-(D-核糖氨基)尿嘧啶的质谱图

Figure 4 The mass spectrum of 5-amino-6-(1-D-ribitylamino)uracil

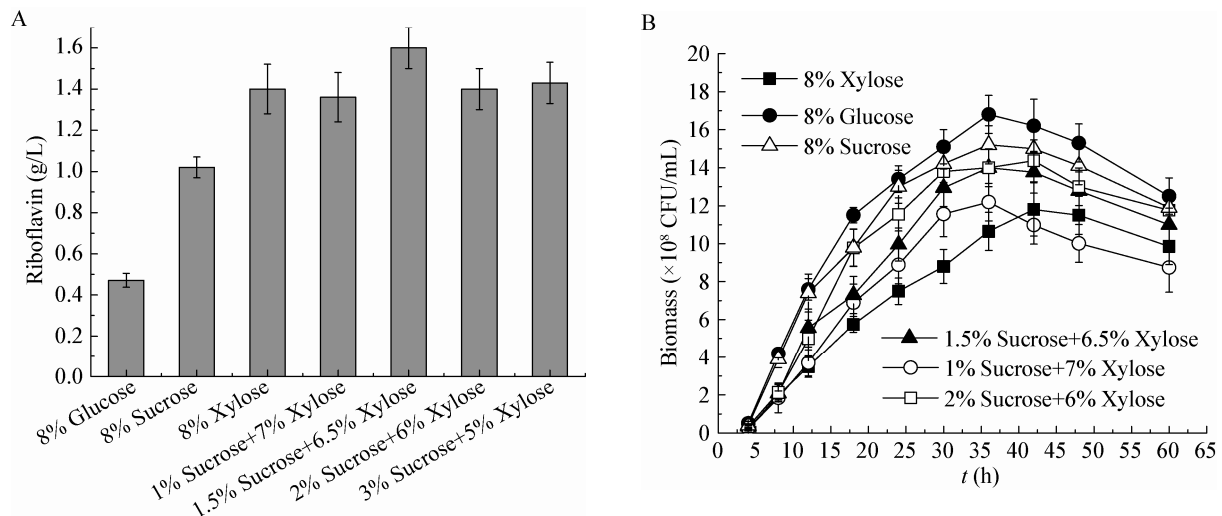


图5 不同碳源发酵 60 h 核黄素产量(A)及菌体生长曲线(B)

Figure 5 The yield (A) of riboflavin in 60 h and the biomass (B) with different carbon source

量达到 1.4 g/L, 最大生物量接近 1.2×10^9 CFU/mL, 且略有生长延迟。当蔗糖加入量达到 1.5% 时, 生物量在 1.4×10^9 CFU/mL 左右, 接近蔗糖和葡萄糖作为碳源所达到的生物量水平。结果表明, 蔗糖和木糖共代谢既能满足细胞生长需要, 又有利于核黄素的产量提高。

2.4 木糖代谢相关基因修饰及其效应

LXZ-3 菌株是阻遏蛋白 AraR 缺陷株, 其木糖吸收不受其它碳源存在的影响^[22]。在蔗糖和木糖共代谢条件下, LXZ-3 菌株其余木糖代谢相关基因对 5-磷酸核酮糖及核黄素合成的影响尚未有研究

报道。以菌株 LXZ-3 为受体菌, 分别整合表达木糖运输蛋白基因 *araE* 和磷酸核糖表异构酶基因 *rpe*, 构建了重组菌株 LXZ-4 和 LXZ-6, 用 P_{AE} 表达盒替换 *xyl* 操纵子原有启动子及前导区, 构建了重组菌 LXZ-5。qRT-PCR 分析显示, 在相应重组菌中, *araE*、*rpe* 和 *xyl* 操纵子的平均表达水平分别提高了 99、51 和 42 倍。

使用 1.5% 蔗糖和 6.5% 木糖的混合碳源分别进行摇瓶发酵的结果显示, 除了过表达 *araE* 基因导致木糖消耗速率及发酵液残糖量明显下降外(图 6B), *araE*、*rpe* 基因和 *xyl* 操纵子的过表达均导致核黄

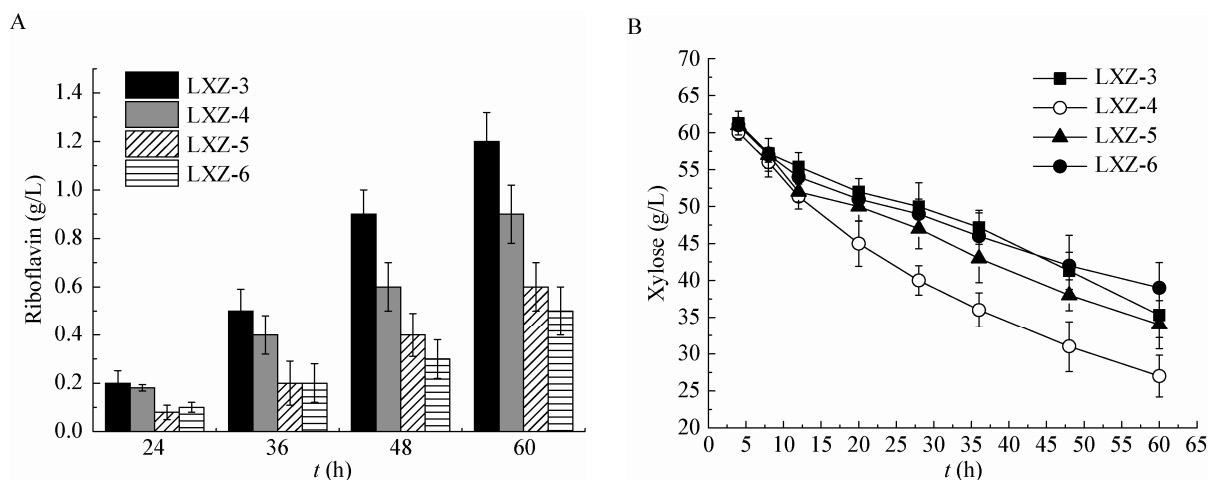


图6 木糖代谢相关基因过表达对核黄素产量(A)及木糖消耗(B)的影响

Figure 6 The effect of genes overexpression on riboflavin production (A) and xylose consumption (B)

素产量显著下降(图 6A)。因此,在 AraR 缺失背景下,再过表达 *araE*、*rpe* 基因和 *xyl* 操纵子均不利于核黄素合成。

2.5 木糖和蔗糖混合糖作为碳源的发酵罐发酵

根据摇瓶实验结果,采用 1.5%蔗糖和 6.5%木糖混合糖作为碳源,在 5 L 发酵罐中进行 LXZ-3/pMX45 菌株的发酵,同时也进行 8%蔗糖作为碳源的对比发酵。结果显示(图 7A),蔗糖发酵的过程平稳,核黄素产量高点出现在发酵 60 h,产量为 2 g/L。在木糖/蔗糖共代谢实验中,发酵 45 h 后,木糖消耗速率与核黄素合成速率同时出现加速现象;3.6 g/L 的核黄素产量高点出现在发酵 70 h,比蔗糖发酵提高了 80%。在蔗糖/木糖共代谢发酵过程中,生物量的增长较蔗糖发酵延后约 15 h,但最大生物量基本相同(图 7B)。结果表明,以木糖为主的木糖/蔗糖共代谢,对于提高核黄素发酵产量具有显著效应。

3 讨论

在枯草芽孢杆菌中,*ribA* 基因编码的 GTP 环水解酶 II/3,4-二羟基-4-磷酸丁酮合成酶是核黄素合成途径的限速酶,这已有明确的研究结论^[8]。但是,本研究观察到过表达 *ribA* 基因导致细胞自溶和生物量下降的现象。根据基因共表达效应以及胞内代谢物的质谱分析结果,可以证实中间代谢物 5-氨基-6-(D-核糖氨基)尿嘧啶具有细胞毒性,

ribA 基因单独过表达容易引起 5-氨基-6-(D-核糖氨基)尿嘧啶胞内积累,造成不同程度的细胞自溶。*ribA-ribD* 基因共表达,会导致胞内的 5-氨基-6-(D-核糖氨基)尿嘧啶水平进一步积累而产生致死效应。*ribA-ribH* 基因过表达有助于将胞内的 5-氨基-6-(D-核糖氨基)尿嘧啶及时转化为二氧四氢蝶啶,从而避免细胞毒性作用的发生。因此,当 *ribA* 基因过表达后,*ribH* 基因编码的二氧四氢蝶啶合成酶成为了核黄素合成途径的下一个限速酶。

木糖作为唯一碳源或者木糖/蔗糖共代谢都能显著提高核黄素的产量,说明核黄素合成前体物 5-磷酸核酮糖供给是影响核黄素产量及收率的关键因素。虽然木糖作为主要发酵碳源会导致菌株生长延迟和生物量降低,但是其吸收和转化为 5-磷酸核酮糖的代谢较少受到代谢调控机制的限制,相对保障了核黄素合成前体物的供给。而蔗糖作为碳源,需要经过 PP 途径生成 5-磷酸核酮糖,在一定程度上,PP 途径的代谢调控机制限制了 5-磷酸核酮糖的合成,进而限制了核黄素的合成。因此,采用木糖/蔗糖共代谢的方法,可能是解决核黄素发酵收率过低的有效手段。

枯草芽孢杆菌 LXZ-3 中,在调节蛋白 AraR 缺失的背景下,过表达 *araE*、*rpe* 基因和 *xyl* 操纵子均导致核黄素产量显著下降。这一现象可能暗示,

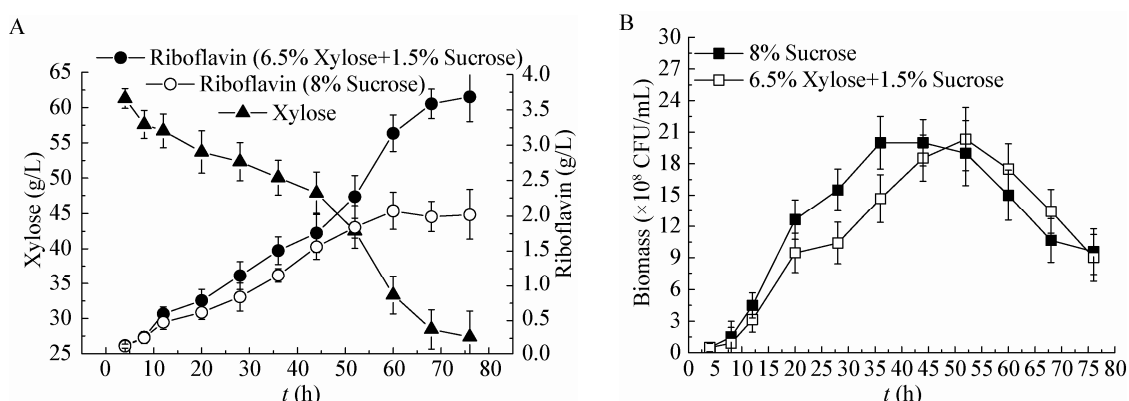


图 7 5 L 发酵罐中的核黄素发酵过程曲线
Figure 7 The riboflavin fermentation profile in fermenter

无论是提高木糖吸收, 还是提高 5-磷酸木酮糖或 5-磷酸核酮糖的胞内水平, 或许都会诱导转酮酶(*tkt*)及转醛酶(*ywjH*)的活性提高, 进而促进 PP 途径非氧化还原的碳架重排反应, 将过多的磷酸戊糖转化为 6-磷酸果糖或 3-磷酸甘油醛, 最终降低了 5-磷酸核酮糖的胞内水平, 从而导致核黄素产量降低。在 5 L 发酵罐中, 木糖/蔗糖共代谢中出现的发酵 45 h 后核黄素产量及木糖消耗量开始增速现象, 也可能与 PP 途径的碳架重排反应相关。曾有研究显示, 缺失 *tkt* 基因能够提高核黄素产量^[23]。在木糖/蔗糖共代谢条件下, 转酮酶与 5-磷酸核酮糖及核黄素合成的关系需要做进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Stahmann KP, Revuelta JL, Seulberger H. Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2000, 53(5): 509-516
- [2] Abbas CA, Sibirny AA. Genetic control of biosynthesis and transport of riboflavin and flavin nucleotides and construction of robust biotechnological producers[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2011, 75(2): 321-360
- [3] Perkins JB, Sloma A, Hermann T, et al. Genetic engineering of *Bacillus subtilis* for the commercial production of riboflavin[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 1999, 22(1): 8-18
- [4] Karelov DV, Kreneva RA, Lopes L É, et al. Mutational analysis of the *ribC* gene of *Bacillus subtilis*[J]. Russian Journal of Genetics, 2011, 47(6): 757-761
- [5] Shi SB, Shen Z, Chen X, et al. Increased production of riboflavin by metabolic engineering of the purine pathway in *Bacillus subtilis*[J]. Biochemical Engineering Journal, 2009, 46(1): 28-33
- [6] http://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?bsu00740
- [7] Hümbelin M, Griesser V, Keller T, et al. GTP cyclohydrolase II and 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase are rate-limiting enzymes in riboflavin synthesis of an industrial *Bacillus subtilis* strain used for riboflavin production[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 1999, 22(1): 1-7
- [8] Birkenmeier M, Neumann S, Röder T. Kinetic modeling of riboflavin biosynthesis in *Bacillus subtilis* under production conditions[J]. Biotechnology Letters, 2014, 36(5): 919-928
- [9] Duan YX, Chen T, Chen X, et al. Overexpression of glucose-6-phosphate dehydrogenase enhances riboflavin production in *Bacillus subtilis*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 85(6): 1907-1914
- [10] Sauer U, Cameron DC, Bailey JE. Metabolic capacity of *Bacillus subtilis* for the production of purine nucleosides, riboflavin, and folic acid[J]. Biotechnology & Bioengineering, 1998, 59(2): 227-238
- [11] Krispin O, Allmansberger R. The *Bacillus subtilis* AraE protein displays a broad substrate specificity for several different sugars[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(12): 3250-3252
- [12] Franco IS, Mota LJ, Soares CM, et al. Probing key DNA contacts in AraR-mediated transcriptional repression of the *Bacillus subtilis* arabinose regulon[J]. Nucleic Acids Research, 2007, 35(14): 4755-4766
- [13] Dahl M K, Schmiedel D, Hillen W. Glucose and Glucose-6-Phosphate Interaction with Xyl Repressor Proteins from *Bacillus* spp. May Contribute to Regulation of Xylose Utilization[J]. Journal of Bacteriology, 1995, 177(19): 5467-5472
- [14] Liu SH, Endo K, Ara K, et al. Introduction of marker-free deletions in *Bacillus subtilis* using the AraR repressor and the *ara* promoter[J]. Microbiology, 2008, 154(9): 2562-2570
- [15] Bai LL, Ma RJ, Yang SM, et al. Effect of TatAdCd translocases overexpression on the secretion of lipase in *Bacillus subtilis*[J]. Microbiology China, 2016, 43(1): 2-8 (in Chinese)
- [16] 白雷雷, 马然静, 杨绍梅, 等. 过表达 TatAdCd 转位酶对枯草芽孢杆菌脂肪酶分泌的影响[J]. 微生物学通报, 2016, 43(1): 2-8
- [17] Shevchuk NA, Bryksin AV, Nusinovich YA, et al. Construction of long DNA molecules using long PCR-based fusion of several fragments simultaneously[J]. Nucleic Acids Research, 2004, 32(2): e19
- [18] Anagnostopoulos C, Spizizen J. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Bacteriology, 1961, 81(5): 741-746
- [19] Zhu H, Yang SM, Yuan ZM, et al. Metabolic and genetic factors affecting the productivity of pyrimidine nucleoside in *Bacillus subtilis*[J]. Microbial Cell Factories, 2015, 14: 54
- [20] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR[J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29(9): e45
- [21] Bennett BD, Yuan J, Kimball EH, et al. Absolute quantitation of intracellular metabolite concentrations by an isotope ratio-based approach[J]. Nature Protocols, 2008, 3(8): 1299-1311
- [22] Wang JL, Nie GX, Cao XL, et al. Effects of different DNS reagents in determination of xylose content[J]. Food Research and Development, 2010, 31(7): 1-4 (in Chinese)
- [23] 王俊丽, 聂国兴, 曹香林, 等. 不同 DNS 试剂测定木糖含量的研究[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(7): 1-4
- [24] Mota LJ, Tavares P, Sá-Nogueira I. Mode of action of AraR, the key regulator of L-arabinose metabolism in *Bacillus subtilis*[J]. Molecular Microbiology, 1999, 33(3): 476-489
- [25] Gershanovich VN, Aia K, Galushkina ZM, et al. Transketolase mutation in riboflavin-synthesizing strains of *Bacillus subtilis*[J]. Molekuliarnaia Genetika Mikrobiologiya I Virusologiya, 2000(3): 3-7