

稳定代谢葡萄糖和木糖产乙醇的重组酿酒酵母工程菌初步构建*

杨 恣 张金鑫 田 沈**

(首都师范大学生命科学学院 北京 100048)

摘 要 分别克隆了休哈塔假丝酵母(*Candida shehatae*)的木糖还原酶基因 $XYL1$ 和热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)的木糖醇脱氢酶基因 $XYL2$, 构建出重组表达质粒pACT2- $xy11$ 和pDR195- $xy12$, 并使其分别转化酿酒酵母受体细胞. 酶活测定结果显示, 转化子中木糖还原酶和木糖醇脱氢酶均在宿主菌中得到活性表达. 并将这两个基因连同各自重组表达质粒上的表达元件进行了克隆, 进而构建出重组酵母染色体整合质粒YIp5-kanR-x12, 以期今后通过同源重组的原理将上述基因整合到发酵性能良好的酿酒酵母基因组中, 得到稳定代谢葡萄糖和木糖产乙醇的重组酵母菌株. 图3 表1 参15

关键词 $XYL1$; $XYL2$; 重组酿酒酵母; 木糖; 乙醇

CLC Q78 : TQ920.1

Construction of Engineered *Saccharomyces cerevisiae* for Steadily Metabolizing Glucose and Xylose to Ethanol*

YANG Min, ZHANG Jinxin & TIAN Shen**

(College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100048, China)

Abstract This paper presents our studies on the cloning of gene $XYL1$ encoding xylose reductase (XR) from *Candida shehatae* and gene $XYL2$ encoding xylitol dehydrogenase (XDH) from *Candida tropicalis*, the establishment of recombinant expression plasmids pACT2- $xy11$ and pDR195- $xy12$. The two plasmids were used to transform the *Saccharomyces cerevisiae* host cell, respectively. The specific enzyme activities indicated that both the XR and XDH were functionally expressed in the host cell. The two genes and their expression elements were cloned from the recombinant expression plasmids to construct recombinant plasmid YIp5-kanR-x12 afterwards. It is expected that the above genes could be integrated into the genome of *S. cerevisiae* possessing good fermentation abilities by homologous recombination to acquire a recombinant yeast strain that could metabolize glucose and xylose to ethanol steadily. Fig 3, Tab1, Ref 15

Keywords $XYL1$; $XYL2$; recombinant *Saccharomyces cerevisiae*; xylose; ethanol

CLC Q78 : TQ920.1

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是工业上生产乙醇的优良菌株, 较之细菌, 具有较高的乙醇耐受力, 对木质纤维素水解液中的抑制物也有较高的抗性^[1]. 纤维素原料经预处理后有很大一部分半纤维素降解成木糖, 虽然酿酒酵母以其高效的产乙醇能力和较强的乙醇耐受性成为目前广泛使用的乙醇生产菌, 但由于它们都不能利用木糖, 故用作木质纤维素乙醇生产菌的优势并不明显^[2].

木糖在木质纤维素水解产物中含量可高达30%, 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%, 从而大大降低生产成本^[3]. 酿酒酵母不能利用木糖, 但能利用其异构体木酮糖, 所以构建利用木糖

产乙醇的酿酒酵母代谢工程菌株的重要策略之一是在酿酒酵母细胞中克隆并表达天然利用木糖的酵母菌的两个关键酶基因, 即木糖还原酶基因 $XYL1$ 和木糖醇脱氢酶基因 $XYL2$.

目前, 被人们研究最多、最具工业应用前景的可发酵木糖产乙醇的酵母菌有3种, 即嗜鞣管囊酵母(*Pachysolen tannophilus*)、树干毕赤酵母(*Pichia stipitis*)和休哈塔假丝酵母(*Candida shehatae*)^[4]. 目前, 国内外主要将天然利用木糖产乙醇的树干毕赤酵母(*P. stipitis*)的木糖还原酶基因($XYL1$)和木糖醇脱氢酶基因($XYL2$)在酿酒酵母中进行活性表达, 并以此为基础继续进行改造而使其能够利用木糖产乙醇. 本文克隆了同样可以利用木糖产乙醇的休哈塔假丝酵母(*C. shehatae*)的木糖还原酶基因以及热带假丝酵母(*C. tropicalis*)的木糖醇脱氢酶基因, 使其在酿酒酵母中强化表达并测定了相应的酶活水平. 之后, 又将这两个基因连同各自重组表达质粒上的表达元件进行了克隆, 连接到酵母染色体整合载体YIp5-kanR上, 构造出重组染色体整合质粒YIp5-kanR-x12, 以期今后通过转化此整合质粒将基因 $XYL1$ 、 $XYL2$ 整合到发酵性能良好的酿酒酵母Y5基因组中, 从而得到能够稳定发酵

收稿日期: 2008-11-25 接受日期: 2008-12-15

*国家高技术研究发展计划(863计划)项目(Nos. 2007AA100702-2, 2007AA05Z405), 北京市中青年骨干教师资助项目(No. 07531310499)和北京市优秀人才资助项目(No. 005400704)资助 Supported by the National High-tech R & D Program of China (863 Program, Nos. 2007AA100702-2, 2007AA05Z405), the Fund for Distinguished Middle-aged and Young Teachers of Beijing, China (No. 07531310499) and the Fund for Excellent Scholars of Beijing (No. 005400704)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: tianshen0606@163.com)

葡萄糖和木糖产乙醇的重组酵母菌株.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 大肠杆菌(*Escherichia coli*) Top10、酿酒酵母(*S. cerevisiae*) YS58、休哈塔假丝酵母(*C. shehatae*)和热带假丝酵母(*C. tropicalis*)均为本实验室保存. 质粒pACT2、pDR195以及YIp5-kanR也均由本实验室保存. 克隆载体pGM-T购自天根生化科技(北京)有限公司.

1.1.2 培养基及培养条件 大肠杆菌及转化子用LB培养基培养, 使用时可补加100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨卞青霉素作为选择培养基用于选择转化子, 于37 $^{\circ}\text{C}$ 静止或摇瓶振荡培养. 酵母菌用YEPD培养基, 酵母菌转化子用合成培养基(SC), SC选择培养基根据质粒的选择标记去掉对应的氨基酸或碱基, 于30 $^{\circ}\text{C}$ 静止或摇瓶振荡培养.

1.1.3 酶、抗生素和试剂 实验所用限制性内切酶购自宝生物工程(大连)有限公司. 分子生物学操作所用试剂盒、Taq DNA聚合酶、Pfu高保真DNA聚合酶购自天根生化科技(北京)有限公司. 抗生素与生化试剂购自北京鼎国生物技术有限责任公司, 所用化学试剂为分析纯. 引物由上海生工生物技术有限公司合成, 基因序列的测定由上海英骏生物技术有限公司完成.

1.2 方法

1.2.1 基因XYL1和XYL2的PCR扩增 分别提取*C. shehatae*和*C. tropicalis*的基因组DNA为模板, 根据GenBank中*C. shehatae*木糖还原酶基因XYL1 (AF278715)和*C. tropicalis*木糖醇脱氢酶基因XYL2 (DQ220745)的序列信息设计引物, PCR扩增得到XYL1和XYL2.

1.2.2 重组酵母表达质粒pACT2-xyl1和pDR195-xyl2构建及酿酒酵母转化 XYL1和XYL2分别与酵母表达载体pACT2和pDR195连接, 形成重组酵母表达质粒pACT2-xyl1和pDR195-xyl2, LiAc完整细胞转化法^[5]转化*S. cerevisiae* YS58.

1.2.3 粗酶液制备和酶活测定 粗酶液的制备以及木糖还原酶、木糖醇脱氢酶的酶活测定完全参照文献^[6]进行. 用Coomassie Blue法^[7]测定蛋白质含量.

1.2.4 重组酵母整合质粒YIp5-kanR-x12构建 分别以重组酵母表达质粒pACT2-xyl1和pDR195-xyl2为模板设计引物, PCR扩增得到XYL1和XYL2连同各自载体上表达元件的大片段X1和X2. 再将X1、X2依次连入酵母整合载体YIp5-kanR, 构建出重组酵母染色体整合质粒YIp5-kanR-x12.

2 结果与分析

2.1 基因XYL1和XYL2的PCR扩增

分别以*C. shehatae*和*C. tropicalis*的基因组DNA为模板, 利用设计的引物进行PCR反应, PCR产物经电泳检测, 发现在989 bp和1107 bp处分别有一个明显条带(图1). 亚克隆产物测序结果表明, XYL1与基因库中的基因序列同源性达99%, 蛋白质同源性达100%. XYL2与基因库中的基因序列同源性达100%, 蛋白质同源性达100%. 证明克隆得到的基因XYL1和XYL2序列正确.

2.2 重组酵母表达质粒pACT2-xyl1和pDR195-xyl2构建及酿酒酵母转化

分别用HindIII单酶切或XhoI、BamHI双酶切亚克隆产

物, 经琼脂糖凝胶电泳回收纯化获得XYL1和XYL2基因. 将XYL1连接在pACT2的HindIII位点, 构建出重组酵母表达质粒pACT2-xyl1. 将XYL2连接在pDR195的XhoI与BamHI位点, 构建出重组酵母表达质粒pDR195-xyl2.

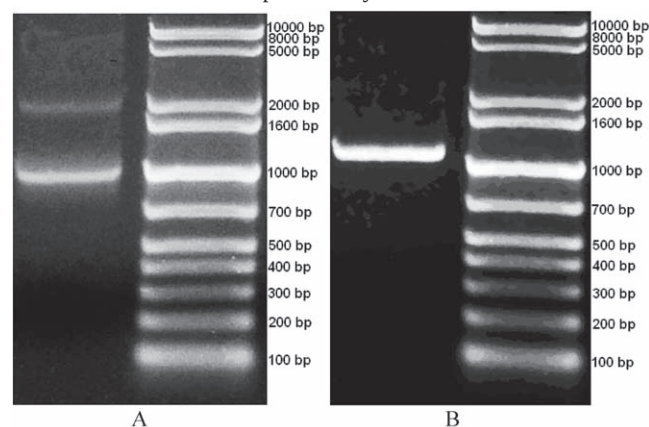


图1 PCR扩增XYL1 (A)和XYL2 (B)

Fig. 1 Amplification of gene XYL1 (A) and XYL2 (B) by PCR
A: 左, PCR扩增XYL1基因; 右, DNA分子量标准. B: 左, PCR扩增XYL2基因; 右, DNA分子量标准

A: Left, Amplification of gene XYL1; Right, DNA ladder; B: Left, Amplification of gene XYL2; Right, DNA ladder

采用LiAc完整细胞转化法将pACT2-xyl1和pDR195-xyl2分别转入营养缺陷型酵母受体菌株*S. cerevisiae* YS58, 在分别缺少Leu和Ura的SC平板上筛选得到阳性转化子. 提取酵母阳性转化子中的质粒, 经反转化大肠杆菌验证正确后分别命名为转化子YS58-xyl1和YS58-xyl2.

2.3 重组酿酒酵母木糖还原酶、木糖醇脱氢酶酶活测定

分别测定酿酒酵母转化子YS58-xyl1与YS58-xyl2粗酶液中木糖还原酶(XR)和木糖醇脱氢酶(XDH)的比活力水平, 结果见表1.

表1 木糖还原酶、木糖醇脱氢酶酶活水平测定

Table 1 Specific enzyme activities of XR and XDH

菌株 Strain	XR比活力 ($\mu\text{U mg}^{-1}$) Specific enzyme activity of XR	XDH比活力($\mu\text{U mg}^{-1}$) Specific enzyme activity of XDH
YS58	0.0016	0.0216
YS58-xyl1	0.3202	/
YS58-xyl2	/	0.6680

从酶活测定结果可以看出, 宿主菌株*S. cerevisiae* YS58中基本没有木糖还原酶和木糖醇脱氢酶酶活. 转化子YS58-xyl1的木糖还原酶比活力为0.320 2 U/mg, 为宿主菌株的200倍. 转化子YS58-xyl2的木糖醇脱氢酶的比活力为0.668 0 U/mg, 为宿主菌株的31倍. 来源于*C. shehatae*的木糖还原酶基因XYL1和来源于*C. tropicalis*的木糖醇脱氢酶基因XYL2在宿主菌株*S. cerevisiae* YS58中均得到了高效表达.

2.4 重组酵母整合质粒YIp5-kanR-x12构建

分别以重组酵母表达质粒pACT2-xyl1和pDR195-xyl2为模板, 利用设计的引物进行PCR反应, PCR产物经电泳检测, 发现在1 770 bp和2 300 bp处分别有一个明显条带(图2). 亚克

隆产物测序结果表明, X1、X2与各自PCR模板的基因序列同源性、蛋白质同源性均达100%, 克隆得到的基因X1和X2序列正确。

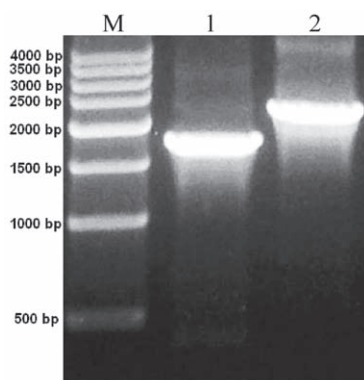


图2 PCR扩增大片段X1与X2

Fig. 2 Amplification of gene X1 and X2 by PCR

M: DNA分子量标准. 1: PCR扩增X1大片段; 2: PCR扩增X2大片段
M: DNA ladder; 1: Amplification of large X1 fragment; 2: Amplification of large X2 fragment

分别用EcoRI、BamHI双酶切或XmaIII、SphI双酶切亚克隆产物, 经琼脂糖凝胶电泳回收纯化获得X1和X2基因。将X1连接在 YIp5-kanR的EcoRI与BamHI位点, 再将X2连接在YIp5-kanR的XmaIII与SphI位点, 构建出重组酵母染色体整合质粒YIp5-kanR-x12 (图3)。

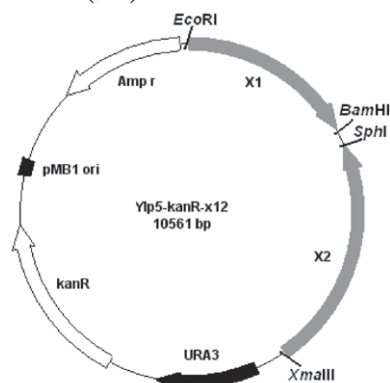


图3 重组酵母整合质粒YIp5-kanR-x12

Fig. 3 Recombinant integration plasmid YIp5-kanR-x12

3 讨论

木糖还原酶需要以NADPH或NADH作为辅因子才能正常工作, 而木糖醇脱氢酶则只能以NAD⁺为辅因子, 氧化木糖醇形成木酮糖。但木糖还原酶对NADPH的亲合力更大, 因此当两种酶协同作用时容易造成胞内氧化还原的不平衡, 进而导致木糖醇积累。国内外之所以广泛采用*P. stipitis*作为木糖还原酶的基因来源, 主要在于其使用不同辅因子时的酶活比为0.65 (NADH/NADPH)^[9], 较其它酵母的这一比值更高。因此将其木糖还原酶基因和木糖醇脱氢酶基因共同表达于受体酿酒酵母细胞中时, 将减轻胞内氧化还原不平衡情况, 从而增加乙醇产量, 减少木糖醇积累^[9]。与*P. stipitis*相似, *C. shehatae*的木糖还原酶在使用不同辅因子时其酶活比为0.40 (NADH/NADPH), 这一比值较其它可以代谢木糖的酵母, 如

嗜鞣管囊酵母(*Pachysolen tannophilis*)的木糖还原酶的值高很多^[10], 因此也可作为构建代谢木糖的重组酿酒酵母的木糖还原酶的基因来源。另外, *C. shehatae*与*P. stipitis*一样, 是天然利用木糖产乙醇的最佳酵母菌, 其最高乙醇产量接近理论值0.51 g乙醇/g木糖^[11, 12]。Govinden等克隆了*C. shehatae*的XR基因, 并将其在*S. cerevisiae*中过表达, 结果表明, 该重组酵母能表现出与过表达*P. stipitis*的XR基因的重组酵母相似的特性, 也能高效将木糖转化为木糖醇^[13]。作者所在研究组也将此基因与*P. stipitis*的木糖醇脱氢酶基因融合表达于酿酒酵母细胞中, 此重组酵母获得了以木糖为唯一碳源生长的能力, 木糖与葡萄糖混合发酵时木糖的总利用率达81.3%^[14]。

*C. tropicalis*是工业上代谢木糖生产木糖醇的重要菌株, 能很好地利用木糖, 同时有研究证明它也可以代谢木糖产乙醇。2006年巴西学者克隆到了*C. tropicalis*的XYL2基因, 同时指出其木糖醇脱氢酶在功能上与*P. stipitis*的有84%的相似性, 同样属于中链脱氢酶家族成员并只以NAD⁺为辅因子, 并提出可利用其来构建代谢木糖产乙醇的重组酿酒酵母^[15]。基于此, 本文研究探索性地将*C. shehatae*的木糖还原酶基因XYL1和*C. tropicalis*的木糖醇脱氢酶基因XYL2作为木糖代谢关键酶的基因来源, 以此为基础构建稳定代谢木糖和葡萄糖产乙醇的重组酿酒酵母。

附加体型载体虽然转化效率高, 操作简单, 但必须在有相应选择压力的条件下才能够稳定表达所携带的基因, 否则极易丢失, 导致受体细胞表达外源基因的能力丧失。在乙醇工业生产中, 生产菌株不可能长期处于具选择压力的环境中。对工业酿酒酵母菌株进行基因工程改造一般选择染色体整合型载体YIp, 通过同源重组而将外源基因整合到酵母染色体上, 从而使目的基因得以高度稳定地表达。本研究将来自*C. shehatae*和*C. tropicalis*的两个基因连同各自表达载体上的表达元件一起连接到YIp5-kanR上, 构建出重组酵母染色体整合质粒YIp5-kanR-x12, 以期今后将此载体转化到在木质纤维素水解液中发酵性能良好、但不能利用木糖的酿酒酵母菌株Y5 (本实验室保存)中。本研究为最终构建出能稳定发酵木质纤维素水解液中木糖和葡萄糖产乙醇的工业酿酒酵母菌株奠定了重要的基础。

References

- 1 Tang YQ, An MZ, Liu K, Nagai S, Shigematsu T, Morimura S, Kida K. Ethanol production from acid hydrolysate of wood biomass using the flocculating yeast *Saccharomyces cerevisiae* strain KF- 7. *Process Biochem*, 2006, **41** (4): 909~914
- 2 Li K (李科), Jin YL (靳艳玲), Gan MZ (甘明哲), Liu XF (刘晓凤), Zhao H (赵海). Progress in research of key techniques for ethanol production from lignocellulose. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2008, **14** (6): 877~884
- 3 Nigam JN. Development of xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis* for ethanol production through adaptation on hardwood hemicellulose and prehydrolysate. *J Appl Microbiol*, 2001, **90** (2): 208~215
- 4 Yin CM (阴春梅), Liu Z (刘忠), Qi HS (齐宏升). Research progress in ethanol production by biomass fermentation. *Liquor-making Sci & Technol* (酿酒科技), 2007, **151** (1): 87~90

- 5 Gietz RD, Woods RA. Transformation of yeast by the LiAC/ss carrier DNA/PEG method. *Method Enzymol*, 2002, **350** (1): 87~96
- 6 Bao XM (鲍晓明), Gao D (高东), Qu YB (曲音波), Wang ZN (王祖农), Walfridsson M, Hahn-hägerdal B. Effect on product formation in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains with expressing different level of xylose metabolic genes. *Chin J Biotechnol* (生物工程学报), 1997, **13** (4): 355~361
- 7 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248~254
- 8 Skoog K, Hahn-Hägerdal B. Effect of oxygenation on xylose fermentation by *Pichia stipitis*. *Appl Environ Microbiol*, 1990, **56** (11): 3389~3394
- 9 van Maris AJA, Abbott DA, Bellissimi E, van den Brink J, Kuyper M, Luttik MAH, Wisselink HW, Scheffers WA, van Dijken JP, Pronk JT. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2006, **90**: 391~418
- 10 Bruinenberg PM, de Bot PHM, van Dijken, JP, Scheffers WA. NADH-linked aldose reductase: the key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose by yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1984, **19** (4): 256~260
- 11 Chu BCH, Lee H. Genetic improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation. *Biotechnol Adv*, 2007, **25**: 425~441
- 12 Slininger PJ, Bothast RJ, Okos MR, Ladisch MR. Comparative evaluation of ethanol production by xylose-fermenting yeasts presented high xylose concentrations. *Biotechnol Lett*, 1985, **7** (6): 431~436
- 13 Govinden R, Pillay B, van Zyl WH, Pillay D. Xylitol production by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing the *Pichia stipitis* and *Candida shehatae* *XYL1* genes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **55** (1): 76~80
- 14 Zhang JX, Tian S, Zhang YZ, Yang XS. Construction of a recombinant *S. cerevisiae* expressing *XYL1* and *XYL2* and study on the effect of converting xylose and glucose to ethanol. *Appl Biochem Biotechnol*, 2008, **150** (8): 185~192
- 15 Lima LHA., Pinheiro CGA, Moraes LMP, Freitas SM, Torres FAG.. Xylitol dehydrogenase from *Candida tropicalis*: molecular cloning of the gene and structural analysis of the protein. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, **73** (3): 631~639