

代谢木糖和葡萄糖的重组酿酒酵母的构建*

袁振宏¹ 潘亚平² 刘继开² 颜涌捷¹ 杨秀山^{2**}

(华东理工大学 上海 200237)¹ (首都师范大学 北京 100037)²

摘要:为使酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) YS58 代谢木糖产乙醇, 采用 PCR 方法克隆得到树干毕赤酵母 (*Pichia stipitis*) 木糖醇脱氢酶基因 *xyt2*, 并将该基因和克隆得到的休哈塔假丝酵母 (*Candida shehatae*) 缺终止子的木糖还原酶基因 *xyt1* 一起连接到酵母表达载体 pYES2 的强启动子 GAL 下, 得到融合表达载体 pYES2-P12。通过醋酸锂转化的方法将 pYES2-P12 转入 *S. cerevisiae* YS58 中, 得到 *S. cerevisiae* YS58-12。利用所构建的重组酿酒酵母进行木糖发酵实验, 结果表明该重组酵母能发酵木糖, 使木糖利用率得到进一步提高, 最高达到 81.3%, 而且能代谢木糖产生乙醇。

关键词: 重组酵母菌, 乙醇, 木糖, 葡萄糖, 木糖还原酶基因, 木糖醇脱氢酶基因

中图分类号: Q93-331 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 03-0104-05

Construction of Recombinant Yeast Converting Xylose And Glucose to Ethanol*

YUAN Zhen-Hong¹ PAN Ya-Ping² LIU Ji-Kai² YAN Yong-Jie¹ YANG Xiu-Shan^{2**}

(University of Science and Technology, Shanghai 200237)¹ (Capital Normal University, Beijing 100037)²

Abstract: *Candida shehatae* *xyt1* gene and *Pichia stipitis* *xyt2* gene were amplified by PCR and the *xyt1* and *xyt2* were both placed under the promoter GAL of vector pYES2 to produce the recombinant expression vector pYES2-P12. Subsequently the pYES2-P12 vector was transformed into *S. cerevisiae* YS58 by LiAc to produce the recombinant yeast YS58-12. It was indicate that the recombinant yeast YS58-12 could converse xylose to ethanol with the xylose consumption rate of 81.3%.

Key words: Recombinant *Saccharomyces cerevisiae*, *xyt1* gene, *xyt2* gene, Xylose, Glucose, Ethanol

随着经济的迅速发展, 对车用燃料需求迅猛增长, 化石燃料的大量消耗造成的环境污染加重和资源的匮乏。因此, 对可再生清洁能源的开发和利用已成为当务之急。目前储存在植物中的能量是世界上最充足的可再生能源, 大部分为木质纤维素类^[1]。木质纤维素是由纤维素、半纤维素和木质素等聚合物的复合物, 其中半纤维素约占 30%。用酸解或酶解法将木质纤维素转化为五碳糖 (木糖和阿拉伯糖) 和六碳糖 (葡萄糖、半乳糖和甘露糖), 其中六碳糖约占 2/3, 五碳糖约占 1/3。而在半纤维素的水解产物中, 木糖约占 90%^[2]。

酿酒酵母是传统工业生产乙醇的优良菌株, 与细菌相比具有较高的乙醇耐受力, 对纤维素水解液中的抑制物有较高的抗性^[3]。木质纤维素水解产物中的六碳糖可由传统酿酒酵母很容易地发酵成酒精, 但酿酒酵母缺乏木糖转化为木酮糖所需的酶, 因而

* 国家高技术研究发展计划项目 (“863” 项目) (No. 2002AA514010, 2001AA514024)

Project of Chinese National Programs for High Technology Research and Development (No. 2002AA514010, 2001AA514024)
北京市教委资助项目

** 通讯作者 Tel: 010-68902330, E-mail: cnu_xsyang@263.net

收稿日期: 2005-09-13, 修回日期: 2005-12-16

不能利用木糖,但能利用木酮糖。因此,如果能利用基因工程手段获得以混合糖为原料产乙醇的基因工程菌,理论上可使乙醇产量提高 25%,从而降低生产成本^[4]。为解决以上问题,人们在酿酒酵母中引入转化木糖形成木酮糖的代谢途径,使代谢木酮糖产乙醇。利用木糖的酵母及丝状真菌的代谢途径主要是通过丙酮酸脱羧酶(PDC)—乙醇脱氢酶(ADH)系统,首先是在依赖 NADPH 和 NADH 的木糖还原酶(XR)的作用下还原本糖成木糖醇,然后在依赖 NAD 的木糖醇脱氢酶(XDH)的作用下氧化形成木酮糖,或者在细菌的木糖异构酶(XI)的作用下将木糖异构化成木酮糖,后者在木酮糖激酶(XKS)的作用下磷酸化成 5-磷酸木酮糖,由此进入戊糖磷酸途径(PPP),形成的中间产物 3-磷酸甘油醛进入糖酵解途径(EMP)、通过酵解形成丙酮酸,再经丙酮酸脱羧酶、乙醇脱氢酶作用形成乙醇^[5]。

本文通过首次克隆木糖发酵酵母 *Candida shehatae* 木糖还原酶基因 *xyl1*, 并和 *Pichia stipitis* 木糖醇脱氢酶基因 *xyl2* 一起转入到酿酒酵母中进行表达,构建出的重组酿酒酵母能发酵木糖和葡萄糖产生乙醇。该重组酿酒酵母的构建为后续对该菌的进一步重组构建和改良奠定了良好的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和载体: 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) Top10, 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) YS58, 休哈塔假丝酵母 (*Candida shehatae*)、毕赤酵母 (*Pichia stipitis*) 均由本实验室保存。酵母表达载体 pYES2 由本实验室保存,带有 GAL 启动子。克隆载体 pMD18-T 购自宝生物工程有限公司。

1.1.2 培养基和培养条件: *E. coli* Top10 及转化子为 LB 培养基,37℃ 静止和振荡培养。酵母菌及转化子为 YPD 或 YNB 培养基,30℃ 静止或振荡培养。重组酿酒酵母的发酵培养基中糖浓度为 5% 木糖、5% 葡萄糖、3% 葡萄糖 + 2% 木糖。

1.1.3 酶、抗生素及试剂: 实验所用限制性内切酶购自宝生物工程有限公司和 Promega 公司。抗生素为北京经科宏达生物技术有限公司产品。DNA 提取试剂盒为上海华舜工程有限公司产品,Ex Taq 聚合酶、T4 DNA 连接酶购自宝生物工程有限公司。胶回收试剂盒为北京鼎国生物技术公司产品。基因序列测定由宝生物工程有限公司完成。所用试剂为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 *C. shehatae* 和 *P. stipitis* 总 DNA 提取: 根据上海华舜工程公司 DNA 提取试剂盒提取。

1.2.2 目的基因 *xyl1* 和 *xyl2* 的扩增: 根据公开的 *C. shehatae xyl1* 和 *P. stipitis xyl2* 序列信息设计 PCR 引物^[6,7]。引物如下:(1) 缺终止子 *xyl1* 基因,引物:上游 5'-ATCCCGGCT-TCTTCTGTAATCTACTAACT-3';下游 5'-TAGCTAGCTCCTCCACCTCCAACGAAGAT-3'。(2) *xyl2* 基因,上游引物:5'-CGGGATCCCTATGTCGTATGTTTCCTC-3'下游引物:5'-CGCCATGCATTATGCTGCTCTTTTCTTA-3'。其中扩增的 *xyl1* 两端分别加入酶切位点 *Bam*HI、*Hind*III, *xyl2* 两端分别加入酶切位点 *Bam*HI、*Sph*I。

PCR 扩增的条件^[8]: 50μL 反应体系:超纯水 34.75μL, 10 × Ex Taq Buffer 5μL, dNTP Mixture 4μL, 模板 DNA 4μL, 上游引物 1μL, 下游引物 1μL, Ex Taq DNase

0.25 μ L。反应温度及时间: (1) 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min; (2) 94 $^{\circ}$ C 变性 1min, 55 $^{\circ}$ C 退火 1min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2min, 35 个循环; (3) 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

1.2.3 目的基因的亚克隆、大肠杆菌转化及阳性转化子的筛选: 将 PCR 产物经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳分离回收, 分别直接和克隆载体 pMD18-T 连接, 将连接产物转化大肠杆菌 Top10, 在含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素、40 μ L X-gal 和 6.7 μ L IPTG 的 LB 平板上进行蓝白斑筛选检出白色菌落转化子, 接种到含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中培养, 分别进行菌落 PCR 和提取质粒, 分别利用 *Bam*HI、*Hind*III 和 *Bam*HI、*Sph*I 双酶切质粒, 菌落 PCR 和酶切的产物都由 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定。亚克隆产物由宝生物工程有限公司测序。

1.2.4 DNA 重组、大肠杆菌转化及阳性转化子的筛选: 分别用 *Bam*HI、*Hind*III 和 *Bam*HI、*Sph*I 双酶切亚克隆产物, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分离回收约 1.1kb 和 1.7kb 左右的酶切产物, 与经相同的限制性内切酶双酶切的酵母表达载体 pYES2 连接, 连接产物转化大肠杆菌 Top10, 在含有 100 μ g/mL Amp 的 LB 平板上检出转化子, 接种到含有 100 μ g/mL Amp 的 LB 液体培养基中振荡培养, 进行菌落 PCR, 同时提取质粒, 双酶切质粒, 菌落 PCR 和酶切的产物由 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定。提取质粒由宝生物工程有限公司测序。

1.2.5 酿酒酵母转化及重组子的筛选: 酵母转化按醋酸锂转化法进行^[9], 转化后涂布不含尿嘧啶的 YNB 葡萄糖平板, 挑选阳性重组子用于培养, 进行下一步的发酵实验。

1.2.6 重组酵母 YS58-12 的发酵实验: 分离的阳性重组子酿酒酵母 YS58-12 接种于 20mL YNB (不含尿嘧啶) 葡萄糖培养基, 30 $^{\circ}$ C, 80r/min 活化 24h。然后换新鲜培养基, 同样条件下增殖培养 24h, 测定其细胞含量 (*OD* 值), 选择在对数生长期 (*OD* = 0.3 ~ 0.5) 的菌株。将培养得到的菌液在 4 $^{\circ}$ C 离心 5min, 收集沉淀, 用 0.9% NaCl 溶液洗涤沉淀 2 次, 最后将得到的酵母菌平均分配到 3 种发酵培养基中, 作为最初接种物进行发酵实验^[10]。

将增殖培养后的菌种作为接种物, 分别接种到 100mL 5% 木糖、5% 葡萄糖和 3% 葡萄糖 + 2% 木糖发酵培养基中, 30 $^{\circ}$ C 80r/min, 每隔 12h 取样, 连续取样 72h, 测定乙醇含量和残糖量。

2 结果与讨论

2.1 *C. shehatae* *xy*1 和 *P. stipitis* *xy*2 基因的克隆

分别以 *C. shehatae* 和 *P. stipitis* 的总 DNA 为模板, 利用设计的引物进行 PCR 反应, PCR 产物电泳检测分别在 1.1kb 和 1.7kb 左右各有一明显条带, 且非特异性扩增不明显。

将 PCR 产物经纯化回收后分别和克隆载体 pMD18-T 连接, 连接产物转化宿主菌大肠杆菌 Top10, 利用蓝白斑筛选出阳性转化子。提取质粒分别利用 *Bam*HI、*Hind*III 和 *Bam*HI、*Sph*I 双酶切, 电泳验证酶切产物和 PCR 产物基本相同。利用阳性转化子液体培养进行菌落 PCR, 电泳验证结果和 PCR 产物基本相同, 说明 TA 克隆成功。将质粒进行测序, 测序结果表明, 克隆得到的基因 *xy*1 序列正确, 和基因库中的基因序列同源性 99%, 蛋白质同源性 100%。*xy*2 基因与基因库中的基因序列同源性 98%, 蛋白质同源性 100%。

2.2 重组酵母表达载体 pYES2-P12 的构建

从重组质粒 pMD18-T1 上用 *Bam*HI、*Hind*III 双酶切获得 *xyl1* 基因，经琼脂糖凝胶电泳回收纯化。同时利用同样的限制性内切酶双酶切酵母表达载体 pYES2，利用 T4 DNA 连接酶将 *xyl1* 基因和 pYES2 大片段连接，构建出带有 *xyl1* 的重组载体 pYES2-1。将重组载体 pYES2-1 转化大肠杆菌 Top10，涂布平板过夜培养菌体，用氨苄青霉素筛选阳性克隆。挑取阳性转化子单菌落，在 LB 液体培养基中振荡培养，从菌液中提取质粒，用于下一步连接 *xyl2* 基因。

利用内切酶 *Bam*HI 和 *Sph*I 分别双酶切 pMD18-T2、pYES2-1，经琼脂糖凝胶电泳回收纯化。利用 T4 DNA 连接酶将 *xyl2* 基因和 pYES2-1 大片段连接，构建出带有 *xyl1* 和 *xyl2* 的重组载体 pYES2-P12（见图 1）。构建出的重组载体用于下一步转化酿酒酵母。

2.3 *xyl1*、*xyl2* 在重组酿酒酵母 YS58-12 中的表达及重组酵母的乙醇发酵

将重组表达载体 pYES2-P12 用醋酸锂转化法转化宿主尿嘧啶营养缺陷型酿酒酵母 YS58，以不含有尿嘧啶的 YNB 平板筛选阳性重组子，重新划线分离后挑选重组子 YS58-12 培养后进行发酵实验。

将重组酵母 YS58-12 分别接种到 5% 木糖、5% 葡萄糖、3% 葡萄糖 + 2% 木糖培养基中进行发酵，发酵实验结果见图 2。结果表明，重组酿酒酵母 YS58-12 在 5% 木糖培养基上发酵 24h，木糖利用率达到 33.8%；48h，木糖利用率达到 67.6%；72h，木糖利用率达到了 72.4%。但是乙醇产量比较低，发酵 72h，乙醇产量达到 1.76g/L，相当于理论值的 9.6%。在 3% 葡萄糖 + 2% 木糖培养基上，重组 *S. cerevisiae* YS58-12 发酵

24h，木糖利用率达到 33.5%；24h，木糖利用比较迅速，发酵 48h，木糖利用率达到了 81.3%，说明葡萄糖作为共底物发酵时，木糖利用会有所提高，乙醇产量也明显提高，12h，乙醇产量为 10.03g/L；24h，达到 14.48g/L；72h 后，乙醇产量达到了 17.12g/L，相当于理论值的 67.14%。

2.4 讨论

同时表达 *C. shehatae xyl1* 和 *P. stipitis xyl2* 基因的重组酿酒酵母 *S. cerevisiae* YS58-12 能在以木糖为唯一碳源的培养基上生长，但不能有效发酵木糖产生乙醇，消耗的木糖除转化成乙醇外，可能部分转化成了木糖醇，同时还伴随着其它副产物的产生。*S. cerevisiae* YS58-12 在以葡萄糖和木糖为底物发酵时，葡萄糖在 24h 内消耗完毕，消耗的葡萄糖全用来产生乙醇，葡萄糖利用完后，木糖利用比较迅速，因此在以葡萄糖和

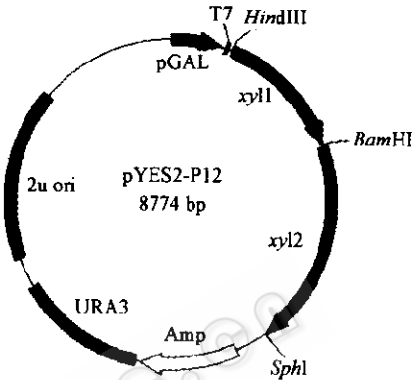


图 1 重组表达载体 pYES2-P12

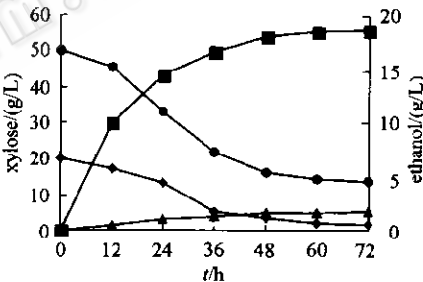


图 2 重组酵母 YS58-12 不同糖浓度的残糖量及其发酵不同糖浓度的乙醇产量

● 5% X 木糖利用率，○ 3% + 2% 木糖利用率，
▲ 5% X 乙醇产率，■ 3% G + 2% X 乙醇产率

木糖共底物发酵时, 优先利用葡萄糖, 然后是木糖的转化。在 *S. cerevisiae* YS58-12 菌株对木糖的利用中, 乙醇的产量仍然较低, 木糖的消耗可能伴随着木糖醇的提高, 这可能是因为木糖到乙醇整个代谢途径上的其它环节有障碍及发酵过程中一些还原力不平衡的结果。

利用基因工程技术构建和改良酿酒酵母, 提高对木糖乙醇发酵的能力在理论上是可行的, 并且已构建出的 *S. cerevisiae* YS58-12 菌株, 提高了发酵葡萄糖和木糖产乙醇的能力。但目前所获得的 *S. cerevisiae* YS58-12 菌株距实际商业应用还有相当大的差距, 木质纤维素水解液中六碳糖、五碳糖的乙醇发酵技术仍未能取得重大的突破。因此, 进一步研究微生物的木糖代谢机理, 构建性能更加优良的木糖发酵菌株, 提高其乙醇的生产性能, 进而降低生产成本, 是以木质纤维素为原料生物转化生产乙醇商业化生产的当务之急。在此基础上继续开展重组菌株构建和微生物木糖代谢工程的研究, 对以木质纤维素为原料生物转化生产乙醇具有十分重要的意义。

参 考 文 献

- [1] Bruce S D. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2000, **84** ~ **86**: 181 ~ 196.
- [2] Cong C S, Cao N J, Du J, *et al.* Adv Biochem Eng Biotechnol, 1999, **65**: 207 ~ 241.
- [3] 谢丽萍, 王正祥, 诸葛健. 食品与发酵工业, 2002, **27** (12): 63 ~ 68.
- [4] Aristos A, Merja P. Current Opinion in Biotechnology, 2000, **11**: 187 ~ 198.
- [5] Zaldivar J, Nielsen J, Olsson L. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, **56**: 17 ~ 34.
- [6] Hallborn J, Walfridsson M, Atraksinen U, *et al.* Bio Technology 1991, **9**: 1090 ~ 1095.
- [7] Kptter P, Amore R, Hollenberg C P, *et al.* Curr Genet, 1990, **18**: 493.
- [8] Sambrook J, Russell D W. 分子克隆实验指南 (第三版). 北京: 科学出版社, 2002.
- [9] Robert H, Schidst l, Andrew R, *et al.* Yeast, 1995, **11**: 355 ~ 360.