

木酮糖激酶表达水平对酿酒酵母木糖代谢产物流向的影响*

沈煜¹⁾ 郑华军¹⁾ 王颖¹⁾ 鲍晓明¹⁾** 曲音波¹⁾ 白凤武²⁾

(¹⁾ 山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南 250100; ²⁾ 大连理工大学环境与生命学院, 大连 116023)

摘要 在酿酒酵母中分别引入真菌和细菌的木糖代谢关键酶, 木糖还原酶基因 *XYL1*、木糖醇脱氢酶基因 *XYL2* 和木糖异构酶基因 *xytA*. 并在此基础上以共转化策略超表达下游关键酶木酮糖激酶基因 *XKS1*. 与亲本菌株相比, 用 pMA91 和 YEp24 质粒表达 *XKS1* 的重组菌株, 木酮糖激酶 (xylulokinase, XK) 活性分别提高了 14 和 6.7 倍. 在限氧条件下, 重组菌株对木糖和葡萄糖的共发酵结果显示, 表达 *XYL1*, *XYL2* 以及 *XKS1* 的重组菌株 HSNY-251 木糖消耗为 12.4 g/L, 提高了 120.9%, 乙醇产量达到 9.4 g/L, 提高了 36%, 副产物木糖醇产量为 0.7 g/L, 下降了 84.9%.

关键词 木糖, 木酮糖激酶, 酿酒酵母, 乙醇

学科分类号 Q93

乙醇被公认为是最有发展前景的可再生清洁能源之一. 用乙醇来取代部分汽油, 对减轻环境污染、节省石油资源、促进农业产业化进程等, 具有重要的意义. 目前, 拓展乙醇生产的廉价底物原料和提高原料的利用率, 是燃料乙醇生产的关键技术之一.

木糖是木质纤维素水解物中含量仅次于葡萄糖的一种单糖^[1], 传统的乙醇发酵生产菌株酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 由于缺少木糖利用的最初代谢途径, 不能利用木糖, 而只能利用其异构体——木酮糖. 自然界中由木糖转化为木酮糖的代谢途径有 2 条 (图 1): a. 真菌中, 在木糖还原酶 (xylose reductase, XR) 和木糖醇脱氢酶 (xylitol

dehydrogenase, XDH) 的共同作用下完成, XR 和 XDH 分别需要 NADPH 和 NAD⁺ 作为辅酶. 木糖利用酵母 *Pichia stipitis* 的 XR 和 XDH 引入酿酒酵母, 均得到活性表达, 但工程菌株所消耗的木糖多用于副产物木糖醇积累^[2], 木糖代谢途径下游不畅及氧化还原不平衡是其可能的原因. b. 主要在细菌中, 通过木糖异构酶 (xylose isomerase, XI) 一步转化为木酮糖. 这一途径的引进最初被认为是最佳方案, 多种细菌来源 XI 被引入酿酒酵母中, 但目前只有嗜热细菌 *Thermus thermophilus* 的 XI 在酿酒酵母中得到活性表达. 重组菌株中表达的 XI 最适反应温度为 85℃, 而在乙醇发酵的常规温度 (30℃) 下, 其酶活性仅为最适条件下酶活性的 4%^[3].

木酮糖代谢流下游的疏通是促进木糖发酵生产乙醇的策略之一. 一般认为, 酿酒酵母自身具有木酮糖代谢的下游酶系, 但由于活性较低, 限制了木糖代谢流向磷酸戊糖途径 (pentose phosphate pathway, PPP), 进而影响乙醇的产生. Walfridsson 等^[4]的研究结果表明, 在木糖利用酿酒酵母重组菌株中超表达 PPP 中的转酮酶 (transketolase, TKL) 和转醛酶 (transaldolase, TAL) 可以增加木糖转化为乙醇的量, 并且, TAL 的高效表达对木酮糖代谢

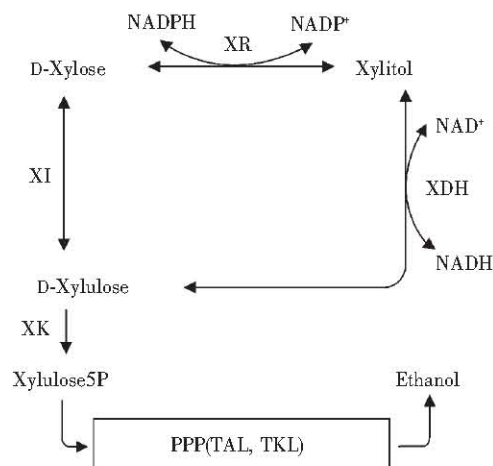


Fig. 1 The pathway of xylose utilization

* 国家自然科学基金委员会与中国节能投资公司联合研究基金资助项目 (50273019) 和山东大学微生物技术国家重点实验室开放基金项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0531-8364384-8105, E-mail: bxm@sdu.edu.cn

收稿日期: 2004-03-11, 接受日期: 2004-04-28

的影响较大. 木酮糖激酶 (xylulokinase, XK) 催化木酮糖转化为 5-磷酸木酮糖, 处于木糖代谢物进入 PPP 的节点, 是提高木糖代谢流向 PPP 途径的关键酶. 提高 XK 的表达量, 有利于木糖利用酿酒酵母重组菌中木酮糖向 5-磷酸木酮糖的转化^[5], 提高乙醇得率.

本文分别在酿酒酵母中引入真菌和细菌的木糖转化为木酮糖的两条代谢途径. 并在此基础上, 利用酿酒酵母组成型强启动子, 磷酸甘油激酶启动子 (phosphoglycerate kinase promoter, *PGKp*), 使木酮糖激酶基因 (*XKS1*) 分别在这两条代谢途径中超表达, 从而研究木酮糖激酶在这两条途径中对木糖代谢流的影响.

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

Escherichia coli DH5 α (F *recA1 endA1 hsdR17* [r_K m_K] *supE44* λ *thi-1 gyrA96 relA1*) 用于亚克隆. *S. cerevisiae* H158 (*MAT α leu2-3 leu2-112 ura3-52 trp1-289 his4-519 prb1 cir⁺*)^[6] 用于转化的酵母受体菌株. *T. thermophilus* HB8 (ATCC 27634)^[7], 用于克隆基因 *xylA*. *P. stipitis* NRRL Y-7124^[8], 用于克隆基因 *XYL1*, *XYL2*. *S. cerevisiae* NAN-27 (由天冠集团提供), 用于基因 *XKS1* 的克隆.

质粒 pKB102^[9], 携带酵母菌乙醇脱氢酶启动子 (alcohol dehydrogenase promoter, *ADHp*), pMA91^[10], 携带酵母菌 *PGKp*, 以及 YE24 分别用于 *XYL1*、*XYL2*、*xylA* 以及 *XKS1* 的克隆载体.

1.2 培养基及培养条件

E. coli 在 LB 培养基中于 37℃ 培养, 添加 50 g/L 氨卞青霉素以选择转化子. *P. stipitis* 和 *S. cerevisiae* 在 YPD 培养基中 30℃ 培养. 酿酒酵母完全合成培养基 (synthetic complete medium, SC) 为 1.7 g/L 无氨基酸的酵母基础氮源 (yeast nitrogen base, YNB)、5 g/L (NH₄)₂SO₄、20 g/L 葡萄糖, 再根据质粒的选择标记添加必要的氨基酸或其他营养成分造成选择压力, 用于筛选转化子. 发酵用培养基在 SC 的基础上, 加入不同浓度的木糖和葡萄糖.

1.3 基因的克隆

根据 GenBank 中的基因序列号, PCR 扩增所需基因, *XYL1*、*XYL2* (X59465、X55392) 克隆自 *P. stipitis* NRRL Y-7124, *xylA* (D90256) 克隆自 *T. thermophilus* HB8 (ATCC 27634). *XKS1*

(X82408) 克隆自 *S. cerevisiae* NAN-27. *XYL1* 连接于 pKB102 形成 pKB102-*xyl1*, *XYL2* 连接于 pMA91 形成 pMA91-*xyl2*, *xylA* 连接于质粒 pMA91 形成 pBXI, *XKS1* 连接于质粒 pMA91 形成 pMA-xy203.

1.4 粗酶液的制备

S. cerevisiae 转化子在 SC 选择压力培养基中培养至对数生长期, 离心收集菌体并用 100 mmol/L 磷酸缓冲液洗涤 2 次, 然后溶于新配制的裂解缓冲液 (100 mmol/L 磷酸缓冲液, 0.5 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF, pH 7.0). 菌悬液加入适量玻璃珠 (直径 0.5 mm), 在细胞破碎仪最大速度下处理 30 ~ 50 s, 冰浴 5 min. 破碎重复 3 ~ 5 次. 10 000 g 离心 10 min, 收集上清, 即为粗酶液, 用于酶活性测定分析.

1.5 酶活测定方法

木糖异构酶活性以转化果糖为葡萄糖的能力表示^[7]. 通过辅酶的变化测定木糖还原酶、木糖醇脱氢酶以及木酮糖激酶活性^[11~13]. 木酮糖激酶的酶活性单位定义为 1 min 磷酸化 1 μ mol 木酮糖所需的酶量. 所有测定在 30℃ 进行.

1.6 菌株平板生长试验

转化子在相应选择培养基中, 对照菌株 H158 在 YPD 中培养至对数生长期, 离心收集菌体, 制备休止细胞. 调整菌体浓度使菌悬液 $A_{600} = 0.5$. 以 10 倍梯度进行系列稀释, 分别以 5 μ l 点滴到以木糖为唯一碳源的全营养 SC 平板上, 并于 30℃ 培养 5 天观察菌株生长状况.

1.7 摇瓶发酵

根据质粒的选择标记, 选用不同选择压力的 SC 培养基, 活化培养. 转接菌液至含 300 ml 发酵培养基的 500 ml 三角瓶中, 控制初始 $A_{600} = 0.6$, 30℃, 70 r/min 摇床, 限氧发酵. 以 A_{600} 表示菌体的生长量.

1.8 底物产物分析

用高效液相层析 (HPLC) 分析底物的消耗以及产物的产出. 层析柱使用 Aminex HPX-87H 离子交换柱 (Bio-Rad 公司, USA), 流动相为 5 mmol/L H₂SO₄, 流速为 0.4 ml/min, 分析在 55℃ 进行. 用折光检测仪 RID-10A (Shimadzu 公司, Japan) 进行检测.

2 结果与讨论

2.1 带有木糖代谢途径中各关键酶重组质粒的构建
本研究采用双质粒共转化的策略, 在酵母受体

菌中引入木糖代谢相关基因, 根据这一操作技术的要求, 将相关基因分别构建于不同选择标记的质粒 YEp24 (URA3⁺) 和 pMA91 (LEU2⁺) 上 (图 2).

将 *Bam*H I 酶切 pKB102-*xyl*1 得到的带有 *ADH*_p、乙醇脱氢酶终止子 (alcohol dehydrogenase terminator, *ADH*_t) 的 *XYL*1 片段, 连接在 YEp24 的 *Bam*H I 位点, 再将 *Hind* III 酶切 pMA91-*xy*2 得到带有 *PGK*_p、磷酸甘油激酶终止子 (phosphoglycerate kinase terminator, *PGK*_t) 的 *XYL*2 片段连接在 YEp24 *Hind* III 位点, 得到的重组质粒命名为 YEpP-*xy*211. 与 *PGK*_p 相比, *ADH*_p 较弱. *XYL*1, *XYL*2 分别置于 *ADH*_p 和 *PGK*_p 控制下表达, 使 *XYL*1 表达量略低于 *XYL*2, 可以从一定程度上减

少木糖醇的积累^[2].
PCR 扩增得到的 *xy*1A 置于质粒 pMA91 的 *Bgl* II 位点上, 构成重组质粒 pBXI.

分析 GenBank *XKS*1 (X82408) 基因序列, 有 2 个不同的开放阅读框架分别为 1 776 bp 和 1 803 bp. 选用上游引物 5' ATCCTCTAGA-ATGTTTGTTCAGTAATTCA 3', 下游引物 5' AGATCTGGATCCTTAGATGAGAGTCTTTTCGAG 3', PCR 扩增得到的 1 803 bp 片段插入到质粒 pMA91 的 *Bgl* II 位点上, 构成重组质粒 pMA-*xy*203. 根据共转化的需要, 将 pMA-*xy*203 上的 *Hind* III 小片段连接于质粒 YEp24 的 *Hind* III 位点, 构成重组质粒 YEpP-*xy*204 (图 2).

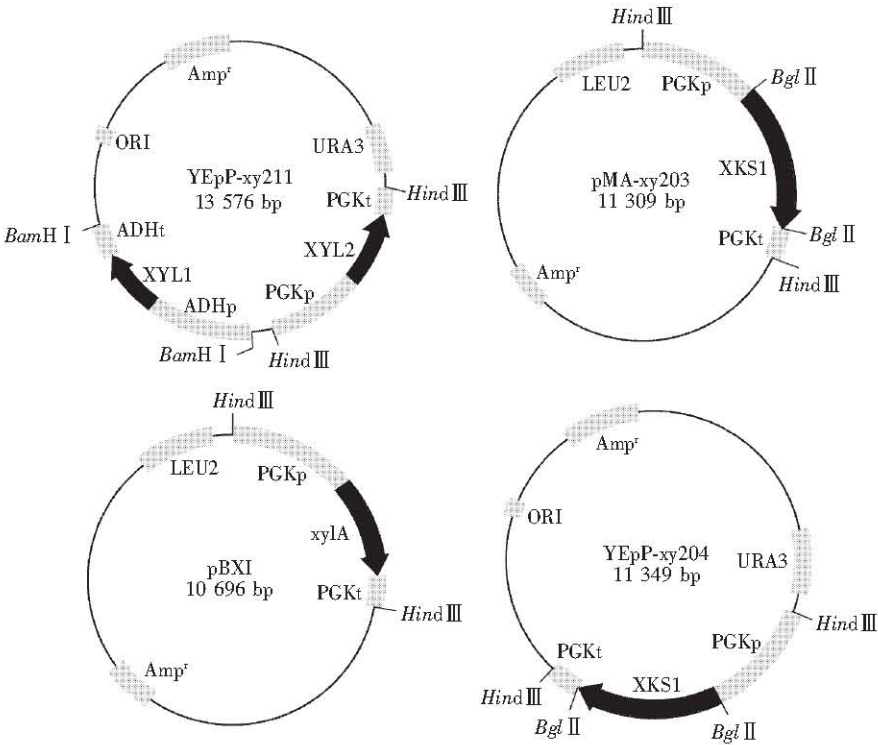


Fig. 2 Physical maps of recombinant plasmids

2.2 表达木糖代谢关键酶基因的重组菌株构建

以营养缺陷型酵母菌株 H158 为受体菌株, 将携带有 *XYL*1, *XYL*2 基因的 YEpP-*xy*211 和携带 *XKS*1 基因的 pMA-*xy*203 共转化 H158, 在同时缺少 Leu 和 Ura 的平板上筛选得到克隆, 经反转化 *E. coli* 检测正确后命名为 HSXY-251. 单独以 YEpP-*xy*211 转化 H158 得到的重组菌株定名为 H158-XR-XDH. 同样, 携带基因 *xyl*1A 的 pBXI 和携带 *XKS*1

基因的 YEpP-*xy*204 共转化 H158, 得到的重组菌株命名为 HSXY-252. 单独以 pBXI 转化 H158 得到的重组菌株定名为 H158-XI.

2.3 木酮糖激酶的活性测定

测定各菌株粗酶液中 XK 酶活, 测定结果表明, 在酿酒酵母中引入带有木酮糖激酶基因 *XKS*1 的重组质粒后, HSXY-251 和 HSXY-252 的 XK 活性分别提高了 14 倍和 6.75 倍, 内源 *XKS*1 在 *PGK*_p

的控制下, 在酿酒酵母中得到了高水平表达. 在同一启动子控制下不同的质粒载体在酿酒酵母中表现出不同的木酮糖激酶活性 (表 1).

Table 1 The XK activites in cell extracts

Strains	Vectors for XK expression	Enzyme activity / (U · mg ⁻¹)
H158 (Parent)		8 ± 1
HSXY-251	pMA91	112 ± 1
HSXY-252	YE _p 24	54 ± 1

All reactions are performed at 30 °C.

2.4 重组酿酒酵母利用木糖的平板生长实验

以木糖为唯一碳源的平板生长实验结果表明, 受体菌株 H158 在以木糖为唯一碳源的培养基中几乎没有生长. 而引入木糖代谢途径的各个重组酿酒酵母均可以木糖为唯一碳源生长, 但 XK 超表达的重组菌株在平板上没有表现出更好的生长趋势 (图 3).

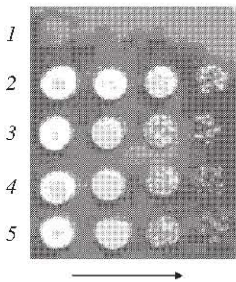


Fig. 3 Growth of the different strains on the YSC medium containing 20 g/L xylose

Cells were grown to A₆₀₀ of 0.5 and 5μl of serial 1:10 dilutions (along the arrow direction) were spotted. 1: H158 (Parental strain); 2: H158-XR-XDH; 3: HSXY-251; 4: H158-XI; 5: HSXY-252.

2.5 重组酿酒酵母木糖葡萄糖共底物发酵实验

以 A₆₀₀ 表示菌体生长量, 以 2% 葡萄糖和 5% 木糖为发酵底物, 利用高效液相色谱对摇瓶发酵代谢底物、产物分析. 结果表明, 各菌株表现出相似的生长曲线 (数据未标出), 最大生长量均在 A₆₀₀ = 6.0 左右, 达到最大生长量的时间均为 24 h. 代谢产物分析表明, 菌株 H158-XR-XDH 木糖利用量少, 仅为 5.59 g/L, 乙醇产量为 6.90 g/L, 而副产

物木糖醇产生量高达 4.82 g/L. 而 HSXY-251 中带有高拷贝的含 XKS1 质粒, 木糖利用达到 12.35 g/L, 提高了 120.9 %, 乙醇产量为 9.41 g/L, 提高了 36%, 同时, 木糖醇仅生成 0.73 g/L, 下降了 84.9% (图 4).

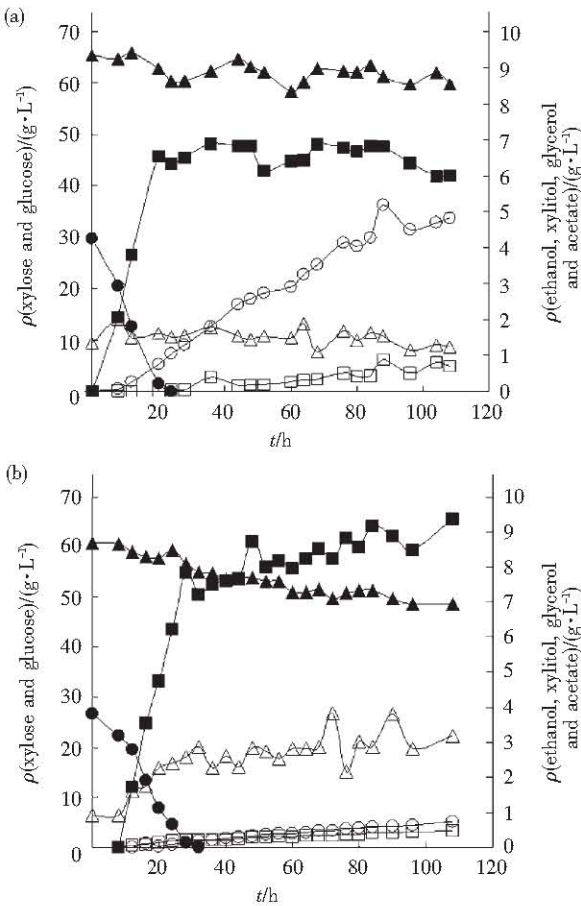


Fig. 4 Cofermentation of glucose and xylose by the recombinant *S. cerevisiae* strains expressing XR and XDH with or without XK

(a) H158-XR-XDH; (b) HSXY-251. ●—●: glucose; ▲—▲: xylose; ■—■: ethanol; ○—○: xylitol; △—△: glycerol; □—□: acetate.

菌株 HSXY-252 与 H158-XI 的发酵结果表明, 两株菌对木糖的消耗没有明显差异 (图 5). 这一结果暗示, 在表达 *T. thermophilus* 的 XI 木糖代谢途径的重组酿酒酵母中, 超表达 XK 对木糖利用的促进作用不大, 这可能是因为来自嗜热细菌的 XI 最适反应温度过高而在常规发酵温度下酶活性过低引起的.

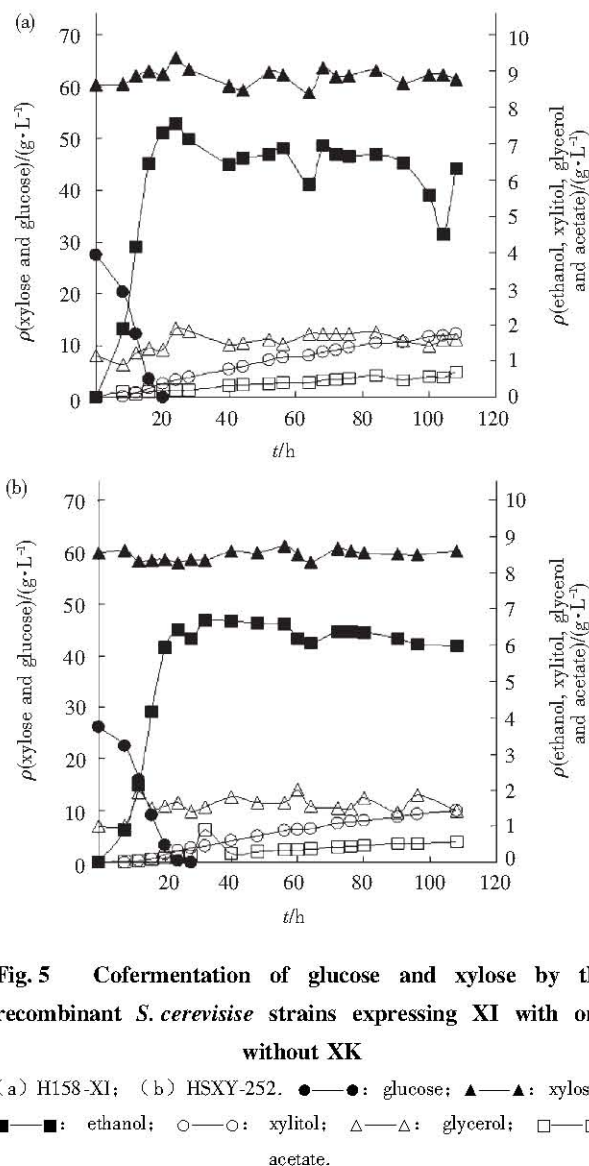


Fig. 5 Cofermentation of glucose and xylose by the recombinant *S. cerevisiae* strains expressing XI with or without XK

(a) H158-XI; (b) HSXY-252. ●—●: glucose; ▲—▲: xylose; ■—■: ethanol; ○—○: xylitol; △—△: glycerol; □—□: acetate.

3 结 论

本文在酿酒酵母 H158 中分别引入木糖还原酶、木糖醇脱氢酶和木糖异构酶, 并在此基础上超表达了木糖代谢途径中的关键酶——木酮糖激酶. 在以木糖为唯一碳源的完全培养基平板上, 超表达木酮糖激酶没有使重组菌株表现出更好的生长状况. 但是葡萄糖、木糖共底物限氧发酵结果显示, 在表达 *XYL1*, *XYL2* 的重组菌株中, 增加木酮糖激酶活性, 木糖利用有明显提高, 从 5.6 g/L 增加到 12.4 g/L, 乙醇得率增加了 36%, 从原来的 6.9 g/L 增长到 9.4 g/L, 而木糖乙醇发酵得到的

主要副产物木糖醇的量下降了 84.9%, 从 4.8 g/L 下降到 0.7 g/L. 结果表明, 木酮糖激酶的高效表达对木糖发酵生产乙醇具有促进作用.

参 考 文 献

- 1 Nancy H, Zhengdao C, Adam P B. Genetically engineered *Saccharomyces cerevisiae* yeast capable of effective cofermentation of glucose and xylose. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64** (5): 1852 ~ 1859
- 2 Walfridsson M, Anderlund M, Bao X, *et al.* Expression of different levels of enzymes from the *Pichia stipitis* *XYL1* and *XYL2* genes in *Saccharomyces cerevisiae* and its effects on product formation during xylose utilisation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, **48** (2): 218 ~ 224
- 3 Walfridsson M, Bao X, Anderlund M, *et al.* Ethanol fermentation of xylose with *Saccharomyces cerevisiae* harboring the *Thermus thermophilus xylA* gene which expresses an active xylose (glucose) isomerase. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62** (12): 4648 ~ 4651
- 4 Walfridsson M, Hallborn J, Penttil M, *et al.* Xylose metabolising *Saccharomyces cerevisiae* overexpressing the *TKL1* and *TAL1* genes encoding the pentose phosphate pathway enzymes transketolase and transaldolase. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61** (2): 4184 ~ 4190
- 5 Anna E, Camilla C, Fredrik W, *et al.* Anaerobic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* carrying *XYL1*, *XYL2*, and *XKS1* in mineral medium chemostat cultures. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66** (8): 3381 ~ 3386
- 6 Hallborn J, Gorwa M F, Meinander N, *et al.* The influence of cosubstrate, and aeration on xylitol formation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing the *XYL1* gene. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1994, **42** (2~3): 326 ~ 333
- 7 Dekker K A, Yamagata H, Sakaguchi K, *et al.* Xylose (glucose) isomerase gene from the *Thermophile thermophilus*: cloning, sequencing and comparison with other thermostable xylose isomerase. *J Bacteriol*, 1991, **173** (10): 3078 ~ 3083
- 8 毛 华, 曲音波, 高培基, 等. 酵母属间原生质体融合改进菌株木糖发酵性能. *生物工程学报*, 1996, **12** (增刊): 157 ~ 162
- 9 Mao H, Qu Y B, Gao P J, *et al.* *Chin J Biotechnol*, 1996, **12** (Supplement): 157 ~ 162
- 10 Blomqvist K, Suihko M L, Knowles J, *et al.* Chromosomal integration and expression of two bacterial α -acetolactate decarboxylase genes in brewer's yeast. *Appl Environ Microbiol*, 1991, **57** (10): 2796 ~ 2803
- 11 Mellor J, Dobson M J, Roberts N A, *et al.* Efficient synthesis of enzymatically active calf chymosin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 1983, **24** (1): 1 ~ 14
- 12 Smiley K L, Bolen P L. Demonstration of D-xylose reductase and D-xylitol dehydrogenase in *Pachysolen tannophilus*. *Biotechnol Lett*, 1982, **4** (8): 607 ~ 610
- 13 Rizzi M, Harwart K, Erleman P, *et al.* Purification and properties of the NAD⁺-dehydrogenase from yeast *Pichia stipitis*. *J Ferment Bioeng*, 1989, **67** (1): 20 ~ 24
- 14 Shamanna D K, Sanderson K E. Uptake and catabolism of D-xylose in *Salmonella typhimurium* LT2. *J Bacteriol*, 1979, **139** (7): 64 ~ 70

Effect of Xylulokinase Expression-level in The Xylose-utilizing Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* on The Metabolic Pathway of Xylose *

SHEN Yu¹⁾, ZHENG Hua-Jun¹⁾, WANG Ying¹⁾, BAO Xiao-Ming¹⁾ **, QU Yin-Bo¹⁾, BAI Feng-Wu²⁾

(¹⁾ State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China;

(²⁾ Department of Bioengineering, Dalian University of Technology, Dalian 116023, China)

Abstract The xylulokinase gene *XKS1* was cloned from *Saccharomyces cerevisiae* NAN-27 and ligated into plasmids pMA91 and YEep24, producing pMA-xy203 and YEep-xy204, respectively. In both plasmids, *XKS1* was under the control of *PGK* promoter. pMA-xy203 was transferred into the pre-constructed recombinant yeast strain H158-XR-XDH, which contains the *XYL1* and *XYL2* genes from *Pichia stipitis*, encoding xylose reductase and xylitol dehydrogenase respectively, in an episomal plasmid vector. This new recombinant strain was named HSXY-251. YEep-xy204 was transferred into the pre-constructed recombinant yeast strain H158-XI, which contains the *xylA* gene from *Thermus thermophilus* encoding xylose isomerase in an episomal plasmid vector, resulting in recombinant strain HSXY-252. The xylulokinase activities in HSXY-251 and HSXY-252 were respectively 14 and 6.7 times higher than that in the parent strain. Glucose and xylose co-fermentation carried out with HSXY-251 under oxygen-limited conditions at 30°C resulted in 9.4 g/L ethanol concentration with 12.4 g/L xylose consumed. Xylose consumption and ethanol production were respectively 120.9% and 36% higher than in the parent strain. Furthermore, the by-product xylitol was 0.7 g/L, a decrease of 84.9%.

Key words xylose, xylulokinase, *Saccharomyces cerevisiae*, ethanol

* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China and China Energy Conservation Investment Corporation (50273019), and The Opening Fund of the State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University.

** Corresponding author. Tel: 86-531-8364384-8105, E-mail: bxm@sdu.edu.cn

Received: March 11, 2004 Accepted: April 28, 2004