

研究报告

gTME 构建共发酵木糖和葡萄糖的重组酿酒酵母

刘红梅, 许琳, 严明, 来灿钢, 欧阳平凯

南京工业大学制药与生命科学学院, 材料化学工程国家重点实验室, 南京 210009

摘要: 利用全转录工程 (gTME) 方法将全局转录因子 *spt15* 随机突变并克隆表达, 构建突变库。将突变基因连接到表达载体 pYX212 上, 醋酸锂法转化入不利用木糖的酿酒酵母 YPH499 中, 经特定的培养基初筛获得高效利用木糖并共发酵木糖和葡萄糖的酿酒酵母重组菌株。对获得的重组菌株进行了初步研究, 该菌株能够很好的利用木糖并共发酵木糖和葡萄糖。在 30°C, 200 r/min, 发酵 96 h 时, 50 g/L 木糖和葡萄糖的利用率为 94.0% 和 98.9%, 乙醇产率为 32.4% 和 31.6%, 原始菌株乙醇产率为 44.3%; 当木糖和葡萄糖以质量比 1:1 混合发酵时, 木糖和葡萄糖利用率分别为 91.7% 和 85.9%, 乙醇产率为 26%。木糖醇的含量极低。

关键词: 全转录工程 (gTME), 重组酵母菌, 木糖, 共发酵

gTME for Construction of Recombinant Yeast Co-fermenting Xylose and Glucose

Hongmei Liu, Lin Xu, Ming Yan, Cangang Lai, and Pingkai Ouyang

State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, College of Life Science and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China

Abstract: Global transcription machinery engineering (gTME) was employed to engineer xylose metabolism. Mutation of the transcription factor gene *Spt15* was introduced by error-prone PCR, followed by screening on media using xylose as the sole carbon source. One recombinant strain growing well on such media was chosen for further research. This strain showed modest growth rates in the media containing 50 g/L xylose or glucose at the condition of 30°C, 200 r/min, 96 h, 94.0% and 98.9% of xylose and glucose were consumed, with the ethanol yield were 32.4% and 31.6%, respectively. The control strain had the ethanol yield of 44.3% under the glucose concentration of 50 g/L. When the carbon source was 50 g/L glucose/xylose (1:1), the utilization ratio of xylose and glucose was 91.7% and 85.9%, with the ethanol yield was 26%. Xylose was eventually exhausted. Concentration of the by-product xylitol was very low.

Keywords: global transcription machinery engineering (gTME), recombinant yeast, xylose, co-ferment

以生物质为原料制取的工业乙醇, 作为一种清洁的可再生能源, 是替代石油等化石燃料的必然趋势, 已被纳入许多国家的发展战略规划。传统的生

物乙醇生产主要以粮食发酵为主, 世界粮食紧缺现象严重限制了原料来源。木质纤维素是世界上最为丰富的生物质资源, 量最大、价最廉, 每年的总产量

Received: January 15, 2008; **Accepted:** March 12, 2008

Supported by: the National 973 Program of China (No. 2003CB716000).

Corresponding author: Lin Xu. E-mail: xulin@njut.edu.cn

国家 973 项目 (No. 2003CB716000) 资助。

约占所有生物质资源的 50%。木质纤维素的水解产物中,单糖的组成是葡萄糖、木糖、甘露糖、半乳糖和阿拉伯糖^[1],其中约 2/3 为六碳糖,1/3 为五碳糖^[2]。充分利用木质纤维素原料中的木糖发酵生产乙醇,能使乙醇的产量在原有基础上增加 25%。

酿酒酵母(*S. cerevisiae*)是真核微生物,细胞壁厚、固醇含量高,对乙醇及木质纤维素水解物中毒性因子的耐受性较高^[3];能在低 pH、严格厌氧条件下快速发酵葡萄糖生产乙醇,副产物少;不易被细菌和病毒污染,且相关工业技术成熟。酿酒酵母全基因组测序已完成^[4],是迄今为止研究最透彻的真核微生物,可利用生物信息学的方法和手段,以及日趋完善的分子生物学技术,对其进行基因操作和代谢网络的重构。是乙醇发酵的研究重点和首要目标微生物。酿酒酵母拥有可以代谢木糖的各种酶,但是天然酿酒酵母几乎不表达关键酶,因此不能有效利用木糖发酵生产乙醇。

近年来,国内外许多研究者都致力于构建能代谢五碳糖和六碳糖的高效产乙醇的基因重组菌。思路包括两方面:一类是将酿酒酵母与其它可代谢木糖的酵母进行细胞融合^[5],筛选出可以代谢木糖的融合子;另一类是利用基因工程手段转化携带木糖外源基因的质粒到酿酒酵母当中,从而获得一种可以以混合糖为原料产乙醇的基因工程菌。但是获得的重组菌仅是在受体菌株中过量表达或删除与木糖代谢有关的少数几个关键酶基因,造成了细胞的糖代谢流失衡,因此构建得到的重组菌株也未能投入商业化生产。

因而我们认为这些单基因或几个基因的改造,某种的基因缺失或者扩增,只是改变了细胞的局部元件,或是重新设计调节了细胞网络代谢产物的平衡系统,而这些人为的改变在细胞自身的代谢调节下往往不能达到人们所期望的结果,并没有解决木糖代谢途径中的复杂问题。因此可以在酵母菌木糖代谢途径的基因组层面上定向进化或同时改变多个相关基因群,使细胞在整体水平上适应木糖的代谢或利用。

全局转录机制工程(Global transcription machinery engineering, gTME)技术正是通过基因工程方法改造全局转录调控因子使整个转录调控过程发生变化从而改变或提高目标基因的转录及表

达^[6]。gTME 方法特别能够操纵大肠杆菌的 σ 因子和在酿酒酵母中的 TFIID 组分引起转录子多基因的重排。TFII D 由 TBP(TATA 结合蛋白)和十几种 TBP 相关因子(TAF)构成^[7]。转录因子 spt15 属于转录起始复合物部分,是一种 TATA 结合蛋白,与 RNA 聚合酶 II 及十几种基本转录因子结合后可以转录在基因组中占据绝大多数的 mRNA 基因,它的突变使相关基因过量表达,在表型上提高了酵母对乙醇耐受能力。

首次利用 gTME 方法将全局转录因子 spt15 随机突变并克隆表达,构建突变库。将突变基因连接到含有强启动子 TPI 的表达载体 pYX212 上,醋酸锂法转化入不利用木糖的酿酒酵母 YPH499 中,经过特定的培养基初筛获得需要的细胞表型,得到高效利用木糖并共发酵木糖和葡萄糖的酿酒酵母重组菌株。并对获得的重组菌株进行了初步研究。该重组菌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 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和载体

大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α , 酿酒酵母宿主菌株为 *Saccharomyces cerevisiae* YPH499、BY4742(购自美国 Stratagene 公司),酵母表达载体 pYX212 由本实验室保存。

1.1.2 培养基和培养条件

大肠杆菌 *E. coli* 用 LB 培养基培养,添加 50 μ g/mL 氨苄青霉素。酿酒酵母用 YPAD 培养基培养,以木糖为唯一碳源筛选酵母转化子。

基本培养基(YPAD) g/L: 酵母粉 10, 蛋白胨 20, 葡萄糖 20, 腺嘌呤硫酸盐(L-adenine hemisulfate) 0.075。筛选培养基 g/L: 不含氨基酸酵母氮源(YNB)6.7, 必需氨基酸混合物(缺尿嘧啶)1.3, 木糖 20, 琼脂粉 20。

发酵培养基 g/L: 胰蛋白胨 20, 酵母粉 10, 不同浓度的木糖和木糖、葡萄糖的混合糖(质量比为 1:1)。

1.1.3 试剂

实验所用限制性内切酶购自 NEB 公司, pGEM-T vector System1 为 Promega 公司生产,基因组 DNA 提取试剂盒为北京天根公司生产,胶回收

试剂盒、质粒提取试剂盒、Taq 聚合酶、T4 连接酶为上海申能博彩公司生产, 氨苄抗生素、dNTP Mixture、dTTP 为上海生工生物工程公司生产, GenemorphII Random Mutagenesis Kit 为美国 Stratagene 公司生产。基因序列的测定由英骏 (Invitrogen) 生物有限公司完成。其它试剂为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 酿酒酵母 *S. cerevisiae* BY4742 基因组的提取

采用北京天根公司基因组 DNA 提取试剂盒提取。

1.2.2 目的基因 *spt15* 的扩增及其易错 PCR 基因库建立

根据公开的 *spt15* 序列信息设计 PCR 引物^[8]。引物如下: SPT15_Sense: 5'-TCGAGTGCTAGCAAAATGGCCGATGAGGAACGTTTAAAGG-3' 和 SPT15_Anti: 5'-CTAGCGGTCGACTCACATTTTTCTAAATC ACTTAGCACA-3'。

以获得的 *spt15* 基因为模板进行不同 *spt15* 浓度的易错 PCR (GenemorphII Random Mutagenesis Kit)。

1.2.3 表达载体的 T 载体 pYX212-T 构建

平末端加 T 法^[9]。EcoR V 酶切 pYX212 成平末端利用高效 Taq 酶加 dTTP 72°C 温浴连接 45 min, TaKaRa 胶回收试剂盒回收纯化质粒 DNA 带; T4 连接酶 16°C 自连, 试剂盒回收线性 DNA, 得到 pYX212-T 并估计其浓度。

1.2.4 目的基因与表达载体的连接、酿酒酵母转化及阳性转化子的筛选

将 *spt15* 基因易错 PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离回收, 分别直接与 pYX212-T 16°C 连接, 将连接产物醋酸锂法^[10]转化入酿酒酵母 YPH499, YNB(不含尿嘧啶)木糖培养基筛选得到白色菌落转化子, 接种到 YPX 液体培养基中培养, 经过镜检和菌落 PCR, 菌落 PCR 由 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.3 重组酿酒酵母 YPH499-3 发酵实验及结果分析

获得的阳性重组子酿酒酵母 YPH499-3 接种于 20 mL YNB(不含尿嘧啶)木糖培养基, 30°C, 200 r/min 活化 24 h。将活化的种子液按 10%(V/V) 的接种量分别接种于含 100 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中。将菌液适当稀释后在 600 nm 下测定吸光度值, 选择在对数生长期的菌株分别接种到 100 mL 50 g/L 木糖、100 g/L 木糖、150 g/L 木糖、50 g/L 葡萄糖、

100 g/L 葡萄糖、150 g/L 葡萄糖、50 g/L 混合糖、100 g/L 混合糖、150 g/L 混合糖发酵培养基中, 30°C 200 r/min 厌氧发酵, 测定乙醇含量和残糖量。

发酵液样品经 0.45 μm 醋酸纤维滤膜过滤, 木糖、木糖醇、葡萄糖浓度用高效液相色谱测定。DIONEX(Ultimate 3000) 高效液相色谱仪, 检测器 Shodex RI-101, Chromeleon version 6.80 工作站, 色谱柱为 Lichrospher-NH₂ 柱(江苏汉邦科技有限公司) 色谱条件: 柱温 30°C, 流动相为乙腈: 水=80: 20(V/V), 流速为 1.0 mL/min。

乙醇检测: 血乙醇试剂盒(长春汇力生物技术有限公司), 采用两点速率法。

菌体浓度用 OD₆₀₀ 测定, 1 OD₆₀₀=0.367 g 干菌体/L(木糖), 0.410 g 干菌体/L(葡萄糖), 0.355 g 干菌体/L(混合糖)。

2 结果与讨论

2.1 *spt15* 基因的克隆及其易错 PCR 基因库建立

以 *S. cerevisiae* BY4742 的基因组 DNA 为模板, 利用设计的引物进行 PCR 反应, PCR 产物电泳检测在 0.75 kb 左右有一明显条带(图 1), 且非特异性扩增不明显。

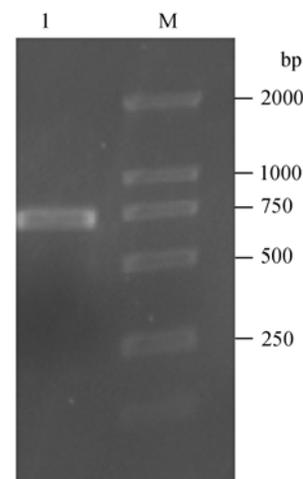


图 1 *spt15* 基因的克隆

Fig. 1 PCR products of *spt15* gene
1: PCR products; M: DNA marker DL2000

将 PCR 产物经纯化回收后和克隆载体 pGM-T 连接, 连接产物转化大肠杆菌 *E. coli* DH5α, 利用蓝白斑筛选出阳性转化子, 提取的质粒用 *Nco* I 和 *Nol* I 双酶切, 电泳验证酶切产物和 PCR 产物基本相同(图 2)。

质粒测序结果表明得到的 *spt15* 序列正确, 和基因库中基因序列同源性 100%, 蛋白质同源性 100%。

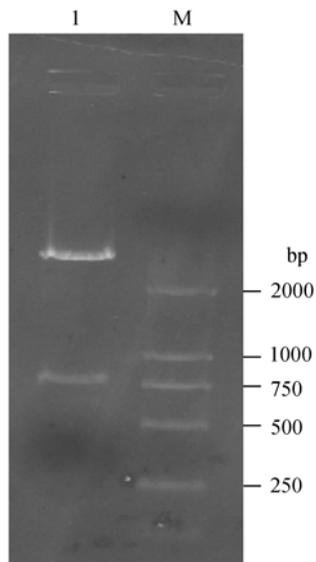


图 2 *Nco I* & *Not I* 酶切 pGM-T-spt1

Fig. 2 Identification of pGM-T-spt15 by digested with *Nco I* and *Not I*

1: pGM-T-spt15 digested with *Nco I* and *Not I*; M: DNA marker DL2000

利用 GenemorphII Random Mutagenesis Kit 以 *spt15* 为模板进行易错 PCR, 经电泳验证易错 PCR 产物与 PCR 产物基本相同(图 3)。



图 3 不同 *spt15* 浓度的易错 PCR

Fig. 3 Error-prone PCR with different *spt15* concentrations
1~16: Error-prone PCR products with different *spt15* concentration;
M: DL2000 marker

2.2 重组酵母表达载体 pYX212-spt15 的构建和重组酿酒酵母筛选

在重组质粒 pGM-spt15 上经 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳回收纯化。利用 T4DNA 连接酶将 *spt15* 基因和 pYX212-T 连接, 构建出带有 *spt15* 的重组载体 pYX212-spt15。pYX212-spt15 转化入不能利用木糖的酿酒酵母 YPH499, YNB(不含尿嘧啶)木糖培养基筛选。得到能够在木糖为唯一碳源的培养基上生长

的重组酿酒酵母 YPH499-3(图 4)。

2.3 重组酿酒酵母发酵产物的检测

2.3.1 不同糖浓度对 YPH499-3 生长的影响

YPH499-3 在 50 g/L、100 g/L、150 g/L 的木糖、葡萄糖和两者的混合糖(质量比木糖: 葡萄糖为 1:1)的培养基上均达到较高生长速率, 随着糖浓度增加相应 OD 值有所降低, 存在着一定的底物抑制现象, 木糖和葡萄糖同时利用, 共利用率较高(图 5)。



图 4 筛选出的重组菌落

Fig. 4 Colony on the screening plate

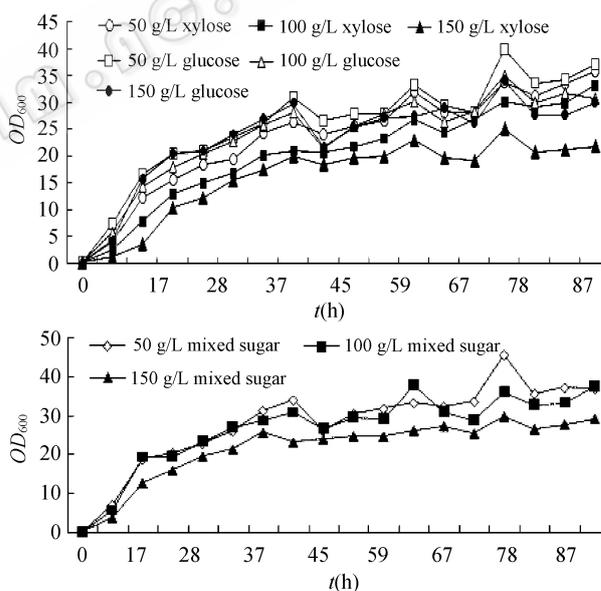


图 5 YPH499-3 在不同浓度木糖和葡萄糖培养基上(a)以及不同浓度混合糖培养上(b)的时间进程

Fig. 5 Time courses of YPH499-3 in the ferment media with different concentrations of xylose and glucose (a), and different concentrations of mixed sugar

2.3.2 不同浓度木糖、葡萄糖对 YPH499-3 的影响

在发酵 96 h 时测得糖的利用率为: 94.0%(50 g/L 木糖), 90.0%(100 g/L 木糖), 82.0%(150 g/L 木糖), 98.9%(50 g/L 葡萄糖), 97.1%(100 g/L 葡萄糖), 95.9%(150 g/L 葡萄糖), 91.7%(50 g/L 混合糖中的木

糖), 85.9%(50 g/L 混合糖中的葡萄糖), 80.8%(100 g/L 混合糖中的木糖), 90.3%(100 g/L 混合糖中的葡萄糖), 92.0%(150 g/L 混合糖中的木糖), 92.1%(150 g/L 混合糖中的葡萄糖), 其木糖和葡萄糖利用率均达到 80%以上(结果见图 6、7)。而木糖醇产量很少(发酵 96 h, 只有 10%木糖、15%木糖检测到木糖醇, 含量分别为: 2.81 g/L、2.45 g/L)。

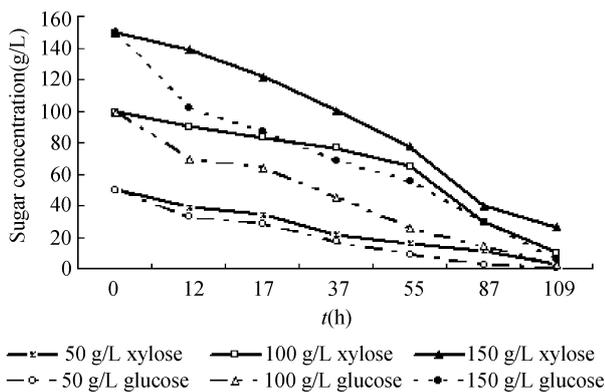


图 6 YPH499-3 在不同糖浓度培养基中的利用

Fig. 6 Utilization of xylose and glucose in ferment media of different sugar concentrations by YPH499-3

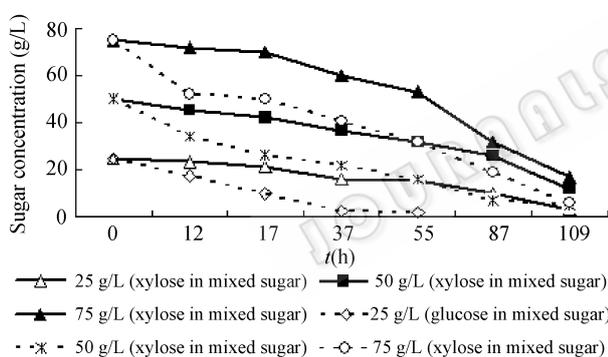


图 7 YPH499-3 在不同混合糖浓度培养基中的利用

Fig. 7 Utilization of xylose and glucose in ferment media of different mixed sugar concentrations by YPH499-3

2.3.3 YPH499-3 厌氧发酵乙醇产量

原始菌株 YPH499 和重组菌株 YPH499-3 在 50 g/L 的葡萄糖、木糖和混合糖(木糖和葡萄糖质量比为 1:1)培养基, 30°C 200 r/min 的条件下发酵 96 h 后得到的结果如表 1 所示, 相对于出发菌 YPH499, 重组菌 YPH499-3 能很好地利用木糖产乙醇, 且其产乙醇量高于同期条件下的葡萄糖和混合糖, 这与文献报道的不太一致, 也揭示了本重组菌的代谢途径发生了很大的变化, 正在进一步研究中。

表 1 重组菌与对照菌株相同条件下的产醇比较

Table 1 Comparison of the ethanol yield with the recombinant yeast and control yeast

Strain	Carbon source (g/L)	Ethanol mass concentration (g/L)	Ethanol Yield/%
YPH499	50(glucose)	22.15	44.3
YPH499-3	50(glucose)	15.8	31.6
YPH499-3	50(xylose)	16.2	32.4
YPH499-3	50(mixed sugar)	13.0	26.0

3 讨论

基因表达调控发生在遗传信息传递过程的各个水平上。而转录调控是基因表达调控中最重要的一环, 也是当前研究的重点。gTME 的方法能改变主要蛋白质在整个转录子的产生和调控, 这样就产生了在转录水平多样性的一种新类型, 即通过对于转录蛋白应答的变更, 使得整个转录子产生大的扰动。此方法允许改变许多末端基因的表达, 同时也能很容易连回到单转录蛋白。MIT 研究小组 06 年报告已经成功利用 gTME 方法突变转录因子 *spt15* 转化入酿酒酵母, 从而增加酵母对乙醇和葡萄糖的耐受能力, 提高了生物乙醇生产的速度和效率。目前全局转录机制工程技术应用于酿酒酵母中木糖代谢途径中的研究仍属空白, 国内外尚未见报道。

本研究首次利用 gTME 方法得到高效利用木糖并共发酵木糖和葡萄糖的酿酒酵母重组菌株 YPH499-3。并对获得的重组菌株进行了初步研究。通过检测该菌株能够很好的利用木糖并共发酵木糖和葡萄糖。50 g/L 木糖利用率达到 94.2%, 50 g/L 葡萄糖利用率 94.8%, 当木糖和葡萄糖以质量比 1:1 混合发酵时, 木糖和葡萄糖利用率分别为 91.7%和 85.9%, 并且木糖醇含量很少。构建出的重组酿酒酵母能发酵木糖和共发酵木糖和葡萄糖产乙醇。该重组菌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。

利用 gTME 技术构建和改良酵母菌, 提高它们对木糖的发酵能力在理论上是可行的, 并且已经构建出的重组菌株, 提高了其在厌氧条件下共发酵木糖和葡萄糖产乙醇的能力, 这些成果为生物质原料生物转化制取乙醇奠定了一定的理论基础。但是, 目前所获得的重组菌株距离实际商业化生产还有相当大的差距, 生物质水解液的己糖、戊糖同步厌

氧乙醇发酵技术仍然在进一步研究中。因此,进一步利用微生物的木糖代谢机制,构建性能更加优良的共发酵菌株,提高其乙醇的生产性能,增强菌株对发酵抑制剂的耐受力,从而降低生产成本,对植物纤维原料生物转化生产乙醇具有重要的意义。

REFERENCES

- [1] Nigam JN. Development of xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis* for ethanol production through adaptation on hardwood hemicellulose acid prehydrolysate. *Journal of Applied Microbiology*, 2001, **90**: 208–215.
- [2] Slininger PJ, Bothast RJ, Van Cauwenberge JE, et al. Conversion of D-xylose to ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1982, **14**: 371–384.
- [3] Tang YQ, An MZ, Liu K, et al. Ethanol production from acid hydrolysate of wood biomass using the flocculating yeast *Saccharomyces cerevisiae* strain KF-7. *Process Biochemistry*, 2006, **41**(4): 909–914.
- [4] Goffeau A, Barrell BG, Bussey B, et al. Life with 6000 genes. *Science*, 1996, **274**(5287): 546, 563–567.
- [5] Heluane H, Spencer JFT, Spencer D, et al. Characterization of hybrids obtained by protoplast fusion, between *Pachysolen tannophilus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbial Biotechnol*, 1993, **40**: 98–100.
- [6] Hal A, Joel M, Elke N, Gerald RF, Gregory S. Engineering yeast transcription machinery for improved ethanol tolerance and production. *Science*, 2006, **314**(8), 1565–1568.
- [7] Hal A, Gregory S. Global transcription machinery engineering: A new approach for improving cellular phenotype. *Metab Eng*, 2007, **9**: 258–267.
- [8] Hallborn J, Walfidsson M, Airaksinen U, et al. Xylitol production by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Bio Technology*, 1991, **9**: 1090–1095.
- [9] Hemsley A, Arnheim N, Toney MD, et al. A simple method for site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Nucl Acid Res*, 1989, **17**: 6545–6551.
- [10] Robert H, Schidst I, Andrew R, et al. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SSDNA/PEG procedure. *Yeast*, 1995, **11**: 355–360.

《生物工程学报》英文版简介

为了加快期刊的国际化进程,扩大国际交流,本刊与国际知名的爱思唯尔出版公司(Elsevier)达成协议,合作出版英文电子版《Chinese Journal of Biotechnology》,该刊与中文版同步,月刊。出版后置于爱思唯尔庞大的 ScienceDirect 网络出版平台上,我刊网址: <http://www.sciencedirect.com/science/journal/18722075>。

爱思唯尔是国际著名的出版公司,《Cell》等知名杂志便出自该公司。ScienceDirect 是爱思唯尔建立的世界上最全面的服务于多学科研究型图书馆的电子数据库。研究人员通过它能在线访问超过 1800 种期刊和 400 万篇电子版全文。《生物工程学报》英文版借助这个庞大而成熟的平台,将可以大大地提高文章的浏览量,扩大期刊及作者在国内外的影响,提高文章的被引频次。同时,出版英文电子版将可克服与国外文字沟通的障碍,使作者的科研成果能在第一时间内为国际同行所了解。

本刊的栏目有综述、研究报告、研究简报和技术与方法等,范围包括基因工程、细胞工程、酶工程、蛋白质工程、发酵工程、生化工程、代谢工程、组织工程、生物制药、生物芯片、生物反应器及生物信息学等,涉及生物技术各个领域,非常欢迎广大科研人员踊跃投稿。直接投英文稿件而被录用的,也将同时发表在中文印刷版上。本刊将增加英文稿件的刊出量,并邀请国外专家对录用英文稿件进行英文润色,部分优质稿件将参考专家意见予以优先发表。英文版不再另收版面费。

具体做法是:每期从中文版中精选出 5~10 篇稿件译成英文,凡具备以下条件之一者即可入选:1. 在理论方面有新发现或新见解。2. 在应用方面取得新进展,达到新水平。3. 在技术方面建立新方法或改进已有的方法。选中后通知作者译成英文,经编辑部审核送爱思唯尔出版公司进行文字加工,再返回作者进行内容确证。

投稿时请注意以下事项:1. 稿件撰写时,应力求叙述清楚,避免语法错误和用词不当。2. 突出创新点,用具体材料、数据加以说明与论证。3. 加强图表注释,使读者在不读正文的情况下能正确理解图表的涵义。

欲了解更详细的信息,请关注我们网页的更新或联络编辑部:

电话: 010-64807509; 传真: 010-64807327; E-mail: cjb@im.ac.cn