

# 酿酒酵母中的嗜热细菌木糖异构酶活性表达及木糖代谢研究\*

## Active Expression of Xylose Isomerase from *Thermobifida fusca* in *Saccharomyces Cerevisiae* and Its Influence on Xylose Metabolism

王青艳<sup>1,2</sup>, 杨登峰<sup>1</sup>, 孙 靓<sup>1</sup>, 陆 雁<sup>1</sup>, 黄日波<sup>1,2,\*</sup>

WANG Qing-yan<sup>1,2</sup>, YANG Deng-feng<sup>1</sup>, SUN Liang<sup>1</sup>, LU Yan<sup>1</sup>, HUANG Ri-bo<sup>1,2,\*</sup>

(1. 广西科学院国家非粮生物质能源工程技术研究中心, 广西南宁 530007; 2. 广西大学, 广西南宁 530003)

(1. National Engineering Research Center for Non-food Biorefinery, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China; 2. Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530003, China)

**摘要:** 将来自嗜热放线细菌 *Thermobifida fusca* 的木糖异构酶 (xylose isomerase, XI) 基因 *xyIA*, 连接于酵母表达载体 pYES2 的半乳糖诱导启动子 (PGAL) 下, 得到重组质粒 pYES2-*xyIA*, 用其转化酵母菌 INV Sc1, 测定重组酵母菌株 INV Sc1-*xyIA* 的木糖异构酶活性, 并对重组酵母菌株进行木糖葡萄糖共发酵试验, 探讨在酿酒酵母中建立新的生产乙醇木糖代谢途径。结果木糖异构酶在 75°C, pH 值 6.8 的酶活力最高, 在酿酒酵母中成功地获得活性表达, 并且 SDS-PAGE 电泳有明显的特异性表达产物带, 单体分子量为 43kD。INV Sc1-*xyIA* 在木糖葡萄糖共发酵实验中消耗木糖和产生乙醇分别比对照菌提高 53.8% 和 36%, 提高了其生产乙醇的能力。

**关键词:** 木糖代谢 木糖异构酶 嗜热菌放线菌 酿酒酵母

中图分类号: TQ926 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2009)04-0446-05

**Abstract** The xylose isomerase gene *xyIA* of *Thermobifida fusca* was successfully cloned in the yeast expression vector pYES2 to construct recombinant that consume xylose to produce ethanol. The fused gene was under the control of the galactose-inducible promoter (PGAL). The recombinant plasmid was transformed into the yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* INV Sc1 by the lithium acetate method. The recombinant strain named INV Sc1/pYES2-*xyIA* was obtained. The recombinant xylose isomerase activity was determined by the modified glucose oxidase assay and showed the highest activity at 75°C and pH 6.8. Production of recombinant xylose isomerase was seen in the Coomassie stained SDS-PAGE gel and the molecular mass was estimated to be 43kD. Glucose and xylose co-fermentation by INV Sc1/pYES2-*xyIA* were carried out, the consumption of xylose and the production of ethanol were 53.8% and 36% higher than the control strain INV Sc1/pYES2.

**Key words** xylose metabolize, xylose isomerase, *Thermobifida fusca*, *Saccharomyces cerevisiae*

木质纤维素是年产量巨大而且目前尚未被充分利用的可再生资源, 广泛存在于农副产品及林业加工

的木质废弃物, 以及造纸厂废弃物中, 其水解物中木糖的含量仅次于葡萄糖。如果能有效利用这些可再生资源, 将可以缓解能源和环境污染危机<sup>[1]</sup>。燃料乙醇是有发展前景的环境友好清洁能源之一, 促进木糖向乙醇的生物转化是充分利用木质纤维素生物质, 降低乙醇生产成本的关键环节之一<sup>[2]</sup>。近年来, 很多研究者致力于构建能够利用木糖发酵产酒精的重组酵母菌, 拓展酵母菌转化出乙醇的底物。这对于木质纤维

收稿日期: 2009-10-16

作者简介: 王青艳 (1972-), 女, 副研究员, 博士研究生, 主要从事微生物生物技术研究。

\* 国家科技支撑计划课题 (No. 2007BAD75B05), 国际科技合作项目 (No. 2008DFA30710), 国家自然科学基金项目 (No. 20666002) 桂科配 (No. 0728001), 广西科学院基本业务研究经费项目 (No. 0701) 资助。

\*\* 通讯作者。

素资源全面利用具有重要的理论意义和应用价值<sup>[3]</sup>。

酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 是传统的乙醇生产菌株。酿酒酵母缺乏将木糖转化为木酮糖的代谢途径而不能很好地利用木糖, 但是其可以代谢木糖的异构体形式: 木酮糖<sup>[4]</sup>。木糖在木糖异构酶 (xylose isomerase, XI) 的作用下直接转化形成木酮糖。细菌的木糖异构酶 (XI, EC 5. 3. 1. 5) 在体内可以直接转化木糖到木酮糖, 不需要辅酶, 被认为是构建代谢木糖酿酒酵母工程菌株的便利途径<sup>[5]</sup>。但是许多不同种属来源的木糖异构酶在酿酒酵母中均没有得到活性表达<sup>[6-8]</sup>, 直到 1996 年 Walfridsson 等<sup>[5]</sup>首次在酿酒酵母中实现了嗜热细菌 *Thermus thermophilus* 木糖异构酶的活性表达。目前只有 *Thermus thermophilus*<sup>[5]</sup> 及 *Piromyces* sp.<sup>[9]</sup> 的木糖异构酶基因 *xylA* 在酿酒酵母中得到了活性表达。成功构建利用木糖酿酒酵母工程菌株的例子不多, 仍然有必要再探讨木糖异构酶在酿酒酵母中的表达及其对发酵木糖生产乙醇的影响。

由于嗜热细菌的木糖异构酶基因能在酵母菌中有活性表达, 所以我们克隆嗜热放线菌 *T. fusca* 的木糖异构酶基因, 并转化酿酒酵母, 初步研究工程菌株利用木糖葡萄糖共同发酵生产乙醇, 为进一步在酿酒酵母中建立新的木糖代谢途径打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ : [ $F^+$   $\Phi$  80d lacZ $\Delta$  M15  $\Delta$  (lacZYA-argF) U169 deoR recA 1 endA 1 hsdR17 (rk $^-$  mk $^+$ ) supE44 $\lambda^-$  thi-1 g rA96 relA 1, 用于克隆, 为本实验室保藏] 作为酵母受体菌株的酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) INV Sc1 (MATa his3 $\Delta$  1 leu2 t rp1-289 ura3-52) 和表达质粒 pYES2 购自英骏生物有限公司, 用于 *xylA* 基因表达的酵母表达质粒 pYES2 携带有半乳糖启动子, 为 *E. coli* 和 *S. cerevisiae* 之间的穿梭载体, 在 *E. coli* 中的选择标记为 Amp $^r$ , 而在 *S. cerevisiae* 中的选择标记为尿嘧啶 U $^+$ 。重组质粒 pYES2-*xylA* 和重组酵母菌 INV Sc1(pYES2-*xylA*) 为本研究中作者自己构建。

### 1.2 培养基及培养条件

*E. coli* 在 LB 培养基中于 37 $^{\circ}$ C 培养, 添加 100 $\mu$ g/ml 氨苄青霉素用以筛选转化子。*S. cerevisiae* 在 YPD 培养基中培养于 30 $^{\circ}$ C。在不含尿嘧啶的酿酒酵母完全合成培养基 SC-U [(synthetic complete medium, SC-U): 1.7g/L 无氨基酸的酵母基础氮源 (yeast nitrogen base, YNB)、5g/L (NH $_4$ ) $_2$ SO $_4$ , 添加必需的氨基酸

(组氨酸、亮氨酸和色氨酸)] 上筛选转化子, 酿酒酵母完全合成培养基或添加其他营养成分以及 25g/L 木糖和 20g/L 葡萄糖后用发酵培养基。

### 1.3 分子生物学操作程序

常规分子生物学操作程序参照文献 [10] 及有关公司提供的操作手册进行。*E. coli* 的转化采用常规 CaCl $_2$  法; 酵母转化采用醋酸锂完整细胞转化法<sup>[11]</sup>。PCR 引物合成由捷瑞生物技术有限公司完成。扩增 *xylA* 基因的引物如下:

sense Primer

5'-ACTCATA TGAAATCT AAAAGATTCCAAGTAT-3'

antisense Primer

5'-ATAGGA TCCT TACTCT TCTATTCTTAATTTATT-3'

其中斜体部分分别为 *Nde*I 和 *Bam*HI 酶切位点。PCR 反应采用德国的 Whatman Biometra PCR 仪。

### 1.4 粗酶液制备

酿酒酵母转化子摇瓶液体培养在 SC 诱导培养基 (含 2% 半乳糖的 SC-U 培养基) 中培养 8~12h, 离心收集菌体, 用 100mmol/L, pH 值 7.0 的磷酸钠缓冲液洗涤 2 次, 菌体悬浮于新配制的裂解缓冲液 (100mmol/L 磷酸缓冲液, 0.5mmol/L EDTA, 0.5mmol/L DTT, 1mmol/L PMSF, pH 值 7.0) 中。菌悬液加入适量玻璃珠 (直径 0.5mm), 在漩涡振荡器振荡处理 30~50s, 冰浴 5min 破碎重复 3~5 次。将细胞破碎液于 10000g, 4 $^{\circ}$ C 离心 10min, 收集上清液, 即为粗酶液, 储存于 -20 $^{\circ}$ C 用于酶活性测定及蛋白含量分析。

### 1.5 酶活性测定方法

木糖异构酶活性以转化果糖为葡萄糖的能力表示<sup>[12]</sup>。将酶活反应液 100 $\mu$ l (0.1mol/L pH 值 7.0 的 HEPES 缓冲液, 400mmol/L 果糖, 10mmol/L MnCl $_2$ , 100 $\mu$ l 酶粗液), 80 $^{\circ}$ C 保温处理 10min, 加入 3ml 50% 的三氯乙酸以终止反应。产生的葡萄糖应用葡萄糖氧化酶试剂盒 (上海荣盛生物技术有限公司出品) 进行定量。

酶活定义为 1 个酶活单位等于每分钟催化 1 $\mu$ mol 底物 (果糖) 转化为产物 (葡萄糖) 所需要的酶量。

蛋白含量的测定按 Coomassie Blue 法进行, 以牛血清白蛋白为标准品。

### 1.6 SDS-PAGE 电泳方法

采用不连续缓冲系统的 SDS-PAGE 电泳, 参照文献 [13] 的操作程序以及有关公司提供的操作手册进行。

### 1.7 葡萄糖与木糖共发酵实验方法

从平板上挑取重组酿酒酵母菌落, 在 YPD 液体

培养基中 30℃ 过夜培养后,于 2000rpm, 4℃ 离心 5min,弃上清,菌体用 0.9% 生理盐水洗涤 2 次,沉淀重悬于 2ml 诱导培养基(含 2% 半乳糖的 SC-U 培养基)并接入 50ml 诱导培养基中,30℃、220rpm 条件下振荡培养 8~12h 同前述离心收集洗涤菌体,沉淀重悬于 10ml 木糖发酵培养基(含 2.0% 葡萄糖和 2.5% 木糖的 SC-U 培养基)并接入 100ml SC-U 木糖培养基中,控制初始 A600 约为 0.4,于 30℃、90rpm 条件下摇床限氧发酵 72h

用高效液相层析方法(HPLC)分析共发酵底物的消耗以及用气相色谱方法分析共发酵产物的产出。高效液相色谱仪,使用 Waters carbohydrate 柱,恒定柱温 30℃,恒定流速为 1ml/min,流动相为 80% 的乙腈水溶液,用 2414 示差检测器(美国 Waters 公司出品)检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 带有 *xy1A* 基因的重组质粒的构建

以嗜热细菌 *T. fusca* 的总 DNA 为模板,PCR 扩增 *T. fusca* 的木糖异构酶基因 *xy1A*,结果(图 1),扩增出 1.1kb 大小的目的 DNA 片段。以限制性内切酶 *NdeI* 和 *BamHI* 分别对 *xy1A* 和表达质粒 pYES2 处理后,回收 *xy1A* 基因和 pYES2 大片段,经连接酶连接得到重组质粒 pYES2-*xy1A*

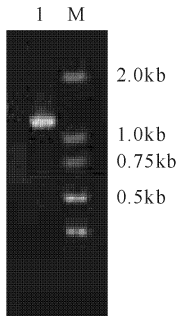


图 1 *xy1A* 的 PCR 扩增

Fig. 1 Amplification of *xy1A* gene by PCR

1. DNA Marker DL200; M. *xy1A* gene.

### 2.2 重组酵母菌的构建与重组酶的表达

用重组质粒 pYES2-*xy1A* 转化酿酒酵母 INVSc1,在不含尿嘧啶的 SC 平板上各获得了几十个转化子,转化子细胞破碎液以 P1 P2 为引物作 PCR 扩增,可以获得 1 条 1.1kb 左右的扩增片段,分离提取重组表达质粒进行酶切鉴定,酶切图谱与预期的一致,说明所获转化子确为含有 pYES2-*xy1A* 的重组酵母菌,命名为 INVSc1/pYES2-*xy1A* 对照空载体 pYES2 的转化子不能获得 1.1kb 左右的扩增片段。粗酶液的 SDS-PAGE 电泳结果(图 2 显示,酵母重组

菌株 INVSc1 有明显特异性表达产物带产生,分子量为 43kD,与文献[5]报道的木糖异构酶单体的分子量相同。说明该木糖异构酶基因已经在酿酒酵母中得到表达,530 nm 光密度扫描结果表明外源蛋白表达量约占可溶性蛋白的 16%。

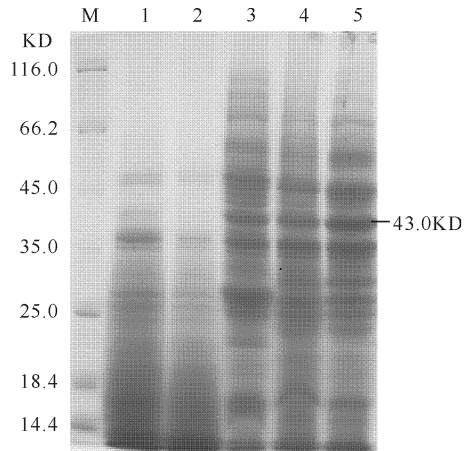


图 2 SDS-PAGE 电泳结果

Fig. 2 Pattern of SDS-PAGE

M. Low molecular weight standard; 1, 2. Control strain; 3, 5. Recombinants *S. cerevisiae* INVSc1 with *xy1A* gene.

### 2.3 重组木糖异构酶的酶活性

以 pYES2-*xy1A* 和 pYES 空载体的转化子诱导表达后的细胞破碎液在文献[5]报道的最适条件(80℃、pH7.0)下测得 *xy1A* 转化子的细胞破碎液有明显酶活,酶活力为 28U/ml, pYES2 空载体转化子的细胞破碎液没有酶活,表明该木糖异构酶基因已在酿酒酵母中得到表达。

### 2.4 重组酶的性质

以酿酒酵母工程菌 INVSc1 的粗酶液分别测定不同温度及不同 pH 值下木糖异构酶的酶活结果(图 3)显示,重组酵母转化子产生的木糖异构酶,在 25℃ 到 90℃ 的温度范围内,最适作用温度为 75℃,而温度在 30℃ 及 40℃ 时,该酶的相对酶活力分别为 33% 及 50% (图 4A),说明在酵母菌的最适生长温度下,此异构酶的活力接近于中等水平,重组酵母菌产生的木糖异构酶的最适 pH 值为 6.8(图 3B),而对照菌株(INVSc1-pYES2)在所测定条件下均未检测到木糖异构酶酶活。

将 *T. fusca* 的木糖异构酶基因 *xy1A* 置于 PGAL 启动子下,转化酿酒酵母,成功地在酿酒酵母中得到木糖异构酶的活性表达,由酿酒酵母重组子 INVSc1 产生的木糖异构酶最高酶活条件为温度 75℃,pH 值 6.5,在这一反应条件下,酿酒酵母重组子 INVSc1 木糖异构酶的发酵液酶活约为 46U/ml。

### 3 结束语

本研究利用 PCR 技术克隆嗜热放线细菌 *T. fusca* 的木糖异构酶并置于酿酒酵母的表达载体 pYES 的 PGAL 启动子下进行表达, 实现了嗜热菌木糖异构酶在酿酒酵母中的活性表达。工程菌 INVSc1-*xy1A* 消耗木糖和产生乙醇分别比对照菌提高 53.8% 和 36%, 提高了其在厌氧条件下发酵葡萄糖和木糖产生乙醇的能力。

利用基因工程技术构建和改良酵母菌, 提高它们对木糖的发酵能力是可行的。但是这些重组酵母还存在着许多问题需要解决, 比如, 来源于嗜热菌的 *xy1A* 虽然能够在酿酒酵母中活性表达, 但是其最适反应温度较高 (75°C), 而在常规酵母培养温度 (30-35°C) 下活性较低<sup>[5]</sup>, 这就给重组菌株对木糖的利用造成一定的障碍。

本研究尝试从嗜热放线细菌克隆木糖异构酶基因并在酿酒酵母中进行表达, 为在酿酒酵母中构建能利用木糖生产乙醇的酵母工程菌提出了一个新的思路, 同时还成功构建了能够利用木糖产乙醇的酵母工程菌。但是木糖乙醇的转化率还不高, 必须要进一步对酵母工程菌进行改造, 以期获得比较理想的酵母工程菌。

参考文献:

- [1] Dien B S, Nichols N N, Patricia JO B, et al. Development of new ethanol genetic *Echerichia coli* strains for fermentation of lignocellulosic biomass [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2000, 84: 181-196.
- [2] Gong C S, Cao N J, Du J, et al. Ethanol from renewable resource [J]. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, 1999, 65: 207-241.
- [3] Yan Lin, Shuzo Tanaka. Ethanol fermentation from biomass resources current state and prospects [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 69(6): 627-642.
- [4] Hahn-hagerdal, Jeppsson, Skoog H. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeast [J]. *Enzyme Microb Technol*, 1994, 16(11): 933-943.
- [5] Walfridsson M, Bao X, Anderlund M, et al. Ethanol fermentation of xylose with *Saccharomyces cerevisiae* harboring the *Thermus thermophilus xy1A* gene which expresses an active xylose (glucose) isomerase [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(12): 4648-4651.
- [6] Nancy H, Zheng D C, Adam P B. Genetically engineered *Saccharomyces cerevisiae* yeast capable of effective cofermentation of glucose and xylose [J]. *Appl Environ*

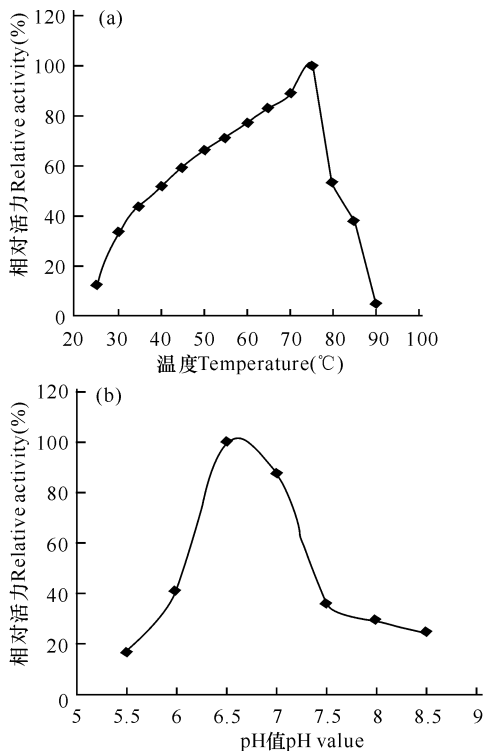


图3 不同温度 (a) 及 pH 值 (b) 下重组酿酒酵母菌株的木糖异构酶活性

Fig. 3 The relative activity at different temperature (a) and pH value (b) of the recombinant xylose isomerase

### 2.5 重组酿酒酵母木糖葡萄糖共底物发酵结果

各工程菌株表现出相似的生长, 最大生长量均在 A600 6.0 左右, 达到最大生长量的时间均为 18h。图 4 表明, 酵母菌利用葡萄糖的能力大于木糖, 并且优先利用葡萄糖。重组酵母菌株 INVSc1/pYES2-*xy1A* 经过 72h 发酵, 消耗木糖 7.6g/L, 产生乙醇 9.7g/L, 重组酵母菌株 INVSc1/pYES2-*xy1A* 木糖的消耗和乙醇产量分别比对照菌提高 53.8% 和 36%, 说明尝试建立的 XI 木糖代谢途径, 促进了酿酒酵母利用木糖发酵生产乙醇的能力。

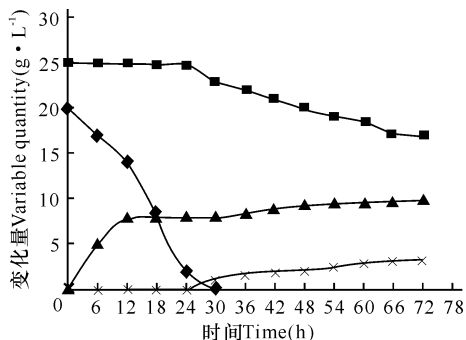


图4 重组菌株葡萄糖木糖共底物发酵实验结果

Fig. 4 Cofermentation of glucose and xylose by the recombinant strains

—■—: 木糖; —◆—: 葡萄糖; —▲—: 酒精; —×—: 木糖醇。  
—■—: Xylose; —◆—: Glucose; —▲—: Ethanol; —×—: Xylitol

Microbiol, 1998, 64( 5): 1852-1859.

[7] Aristidou A, Penttila M. Metabolic engineering applications to renewable resource utilization [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2000, 11( 2): 187-198.

[8] Jeffries T W, Jin Y S. Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2004, 63(5): 495-509.

[9] Marko K, Maurice T, Jasper D, et al. Evolutionary engineering of mixed sugar utilization by a xylose fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain [J]. Fems Yeast Res, 2005, 5 925-934.

[10] 萨姆布鲁克 EF, 弗里奇 T, 曼尼阿蒂斯 H 分子克隆实验指南: 第 2 版 [M]. 北京: 科学出版社, 1992.

[11] Gietz R D, Schiestl R H, Willems A R, et al. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SSDN A/PEG procedure [J]. Yeast, 1995, 11 355-360.

[12] Dekker K A, Yamagata H, Sakaguchi K, et al. Xylose (glucose) isomerase gene from the thermophile *Thermus thermophilus* Cloning, sequencing and comparison with other thermostable xylose isomerase [J]. J Bacteriol, 1991, 173(10): 3078-30831.

[13] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2002.

(责任编辑: 邓大玉)

(上接第 445 页 Continue from page 445)

参考文献:

[1] Rao R S, Jyothi C P, Prakasham R S, et al. Xylitol production from corn fiber and sugarcane bagasse hydrolysates by *Candida tropicalis* [J]. Bioresource Technology, 2006, 97( 15): 1974-1978.

[2] Carlos Martin, Oscar Almazan, Marcelo Marcet, et al. A study of three strategies for improving the fermentability of sugarcane bagasse hydrolysates for fuel ethanol production [J]. International Sugar Journal, 2007, 109 (1297): 33-39.

[3] Chen H Z, Li Z H. Lignocellulose fractionation [J]. Journal of Cellulose Science and Technology, 2003, 11 (4): 31-40.

[4] Huang Z X, Chen Y Q, Chen R K. A advances in the research of bagasse degradation by enzyme [J]. Bagasse, 2004, 11(4): 52-56

[5] Cristobal Cara, Encarnacion Ruiz, Ignacio Ballesteros, et al. Enhanced enzymatic hydrolysis of olive tree wood by steam explosion and alkaline peroxide delignification [J]. Process Biochemistry, 2006, 41(2): 423-429.

[6] Karr W E, Holtzapple M T. The multiple benefits of adding non-ionic surfactant during the enzymatic hydrolysis of corn stover [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1998( 59): 419-427.

[7] Martinez J, Negro M J, Saez R, et al. Effect of acid steam explosion on enzymatic hydrolysis of *O. nervosum* and *C. cardunculus* [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1990, 24/25 127-134.

[8] Morjanoff P J, Gray P P. Optimization of steam

explosion as method for increasing susceptibility of sugarcane bagasse to enzymatic saccharification [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1987, 6(29): 733-744.

[9] 王玉芳, 徐文玉. 木质纤维固体基质发酵物中半纤维素、纤维素和木素的定量分析程序 [J]. 微生物学通报, 1987, 14(2): 81-84.

[10] Ghose T K. Measurement of cellulase activities [J]. Pure and Applied chemistry, 1987, 59(2): 257-268.

[11] Qi X J, Gou J X, Han X J, et al. Study on measuring reducing sugar by DNS reagent [J]. Journal of Cellulose Science and Technology, 2004, 12(3): 17-20.

[12] Luo P, Liu Z, Wang G S. Study of acid-catalyzed steam explosion pretreatment for enzymatic hydrolysis of wheat straw [J]. Chemistry and Industry of Forest Products, 2006, 26(4): 105-109.

[13] 江苏省轻化工业厅纤维水解研究所. 植物纤维水解生产 [M]. 北京: 燃料化学工业出版社, 1972 10-11.

[14] Chen H Z, Li Z H. Studies on the steam explosion of wheat straw I. mechanisms of steam explosion of wheat straw [J]. Journal of Cellulose Science and Technology, 1999, 4(7): 14-22.

[15] Tanahashi M, Tamabuchi K, Goto T, et al. Characterization of steam exploded wood [J]. Wood Research, 1988, 75 1-12.

[16] Soderstrom J, Pilcher L, Galbe M, et al. Two-step steam pretreatment of softwood by dilute H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> impregnation for ethanol production [J]. Biomass & Bioenergy, 2003, 24(6): 475-486.

(责任编辑: 邓大玉)