

doi: 10.13353/j.issn.1004.9533.2015.01.013

不同非氧化磷酸戊糖途径基因的过表达对 酿酒酵母木糖发酵性能的影响

孙锦云, 高文萱, 丁文涛, 刘文, 陈洵*

(天津大学化工学院, 天津 300072)

摘要:以双拷贝过表达木糖代谢上游途径关键酶(木糖还原酶 XR、木糖醇脱氢酶 XDH 和木酮糖激酶 XKS)的酿酒酵母菌株为背景,在过表达非氧化磷酸戊糖(PP)途径中转醛酶基因 *TAL1* 的基础上,对途径中其他基因 *TKL1*(转酮酶)、*RPE1*(核酮糖-5-磷酸差向异构酶)和 *RKI1*(核酮糖-5-磷酸异构酶)进行了不同程度的过表达,以研究 PP 途径基因过表达对酿酒酵母木糖代谢的影响。在不同培养基条件下对重组菌株木糖代谢进行研究,结果显示,在过表达 *TAL1* 的基础上不同组合过表达 PP 途径其他基因不同程度改善了酿酒酵母木糖发酵性能,重组菌株能在 36~48 h 耗完质量分数(下同)为 5% 的木糖。其中,过表达 PP 途径全部基因比其他过表达基因组合表现出明显的优势,在 8% 木糖发酵条件下其乙醇产量达到了每 1 g 木糖 0.337 g,较对照菌株提高了 7.86%。这说明同步过表达 PP 途径基因更有利于酿酒酵母木糖发酵。

关键词:酿酒酵母;非氧化磷酸戊糖途径;木糖;乙醇

中图分类号: Q78 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-9533(2015)01-0064-07

Xylose Fermentation Performance of *Saccharomyces cerevisiae* with Different Combination of the Overexpressed Non-Oxidative Pentose Phosphate Pathway Genes

Sun Jinyun, Gao Wenxuan, Ding Wentao, Liu Wen, Chen Xun*

(School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: To study the influence of non-oxidative pentose phosphate pathway (PPP) on xylose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*, different combinations of PPP genes *TKL1*, *RPE1* and *RKI1* were overexpressed in the *TAL1*-enhanced yeast strain, which also had the double-copy integration of upstream pathway genes *XYL1*, *XYL2* and *XKS1*. Performance of recombinant yeasts was investigated at both 5% and 8% xylose as well as glucose and xylose mixture, results showed that overproduction of PPP genes stimulated cell growth and xylose conversion at both xylose concentrations, concomitant with higher ethanol yield at the expense of xylitol and glycerol formation, and all recombinant strains can use up 5% xylose within 36 to 48 h. Yeast strains of *S. cerevisiae* with four PPP genes co-overexpressed showed more advantages, and under the 8% xylose concentration, ethanol yield was about 0.337 g/g xylose, 7.86% higher than parent strain. It indicated that co-overproduction of all PPP genes may be the top priority for enhancing xylose metabolism in *S. cerevisiae* strains.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*; non-oxidative pentose phosphate pathway; xylose; ethanol

收稿日期: 2013-04-02

作者简介: 孙锦云(1987-),女,硕士研究生,主要研究方向为生物化工。

通信作者: 陈洵, E-mail: chenxun@tju.edu.cn。

随着石油资源的日益枯竭,木质纤维素乙醇作为一种清洁的可再生能源受到了社会各界的广泛关注。然而,不同于传统的葡萄糖代谢,进入机体的木糖首先必须经过异构化转变为木酮糖,后者在木酮糖激酶(XKS)的作用下磷酸化为非氧化磷酸戊糖(PP)途径中间代谢产物——木酮糖-5-磷酸,由此进入PP途径和糖酵解途径被进一步分解代谢以生产乙醇。然而,作为传统的乙醇生产菌株,酿酒酵母却不能利用木质纤维素主要成分之一的木糖,而仅能利用其异构物木酮糖。为此,人们试图通过引入外源的木糖异构化途径^[1],并对酿酒酵母内源性的木糖代谢途径进行遗传修饰^[2],以构建高效的木质纤维素乙醇生产酿酒酵母菌株。

大量研究显示,作为酿酒酵母菌株中已知的、唯一有效的木酮糖代谢途径,PP途径的通量明显低于其他木糖代谢酵母^[3],被认为是影响木糖代谢的下游瓶颈^[4]。其中,由转醛酶TAL1催化的反应是影响酿酒酵母木糖代谢的关键步骤^[5]。研究发现,在木糖或木酮糖代谢过程中,酿酒酵母体内积累了大量的景天庚酮糖7-磷酸^[6],外源加入TAL1可显著降低其在酵母细胞抽提物中的积累^[7];而对于转酮酶基因TKL1过表达对菌体木糖代谢的影响观点则不一^[8-9]。与此同时,过表达核酮糖-5-磷酸差向

异构酶RPE1和核酮糖-5-磷酸异构酶RKI1并未改变重组菌株的木糖代谢^[10]。相较而言,同步过表达PP途径基因能够改善菌体的木糖代谢能力^[11],但Bera等^[12]构建的同步过表达菌株却没有表现出明显的优势。此外,早期研究工作大多采用单独或同步过表达PP途径基因,并未对不同基因组合过表达情况下重组菌株的木糖代谢进行研究。

基于以上工作,本研究以双拷贝过表达*PsXR*、*PsXDH*和*ScXKS*的酿酒酵母为出发菌,在过表达TAL1的基础上对PP途径基因TKL1、RPE1和RKI1进行不同组合过表达,获得一系列具有不同PP途径基因过表达水平的重组菌株,并对其发酵性能进行比较研究,以进一步优化酿酒酵母木糖代谢。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌DH5 α (F⁻ *recA1 endA1 hsdR17* [r_K^- m_K^-] *supE44* λ^- *thi-1 gyrA96 relA1*) 用于基因克隆工作,菌株*Scheffersomyces stipitis* NRRL7124 用于基因XYL1、XYL2的克隆,本研究用到的酿酒酵母菌株以及相关的质粒分别列于表1和表2中。

表1 本实验中用到的酿酒酵母菌株

Table 1 *S. cerevisiae* strains used in this work

Strain	Complete genotype	Reference or source
W303-1a	<i>MATa leu2-3, 112 ura3-1 trp1-92 his3-11, 15 ade2-1 can1-100</i>	Thomas and Rothstein (1989) ^[13]
KAM-2	<i>MATa ura3-1</i>	Kong et al. 2006 ^[14]
AYHNEW2	<i>MATa ura3-1 pCCW12-XYL1-HSP26, pFBA1-XKS1-FBA1, this work</i> <i>pHXT7-XYL1-HXT7, pFBA1-XYL2-FBA1, pCCW12-XYL2-H-SP26, pTPI1-XKS1-TPI1</i>	
AYHNEW2-TAL1	AYHNEW2 derivative; <i>pCCW12-TAL1</i>	this work
AYHNEW2-TAL1-RKI1	AYHNEW2 derivative; <i>pCCW12-TAL1, pFBA1-RKI1</i>	this work
AYHNEW2-TAL1-RPE1	AYHNEW2 derivative; <i>pCCW12-TAL1, pHXT7-RPE1</i>	this work
AYHNEW2-TAL1-TKL1	AYHNEW2 derivative; <i>pCCW12-TAL1, pGPM1-TKL1</i>	this work
AYHNEW2-TAL1-TKL1-RKI1	AYHNEW2 derivative; <i>pCCW12-TAL1, pGPM1-TKL1, pFBA1-RKI1</i>	this work
AYHNEW2-TAL1-TKL1-RPE1	AYHNEW2 derivative; <i>pCCW12-TAL1, pGPM1-TKL1, pHXT7-RPE1</i>	this work
AYHNEW2-TAL1-RPE1-RKI1	AYHNEW2 derivative; <i>pCCW12-TAL1, pHXT7-RPE1, pFBA1-RKI1</i>	this work
AYHNEW2-四 ⁺	AYHNEW2 derivative; <i>pCCW12-TAL1, pGPM1-TKL1, pHXT7-RPE1, pFBA1-RKI1</i>	this work

1.2 培养基及培养条件

大肠杆菌DH5 α 和LBA平板(10 g/L胰化蛋白胨, 5 g/L酵母抽提物, 10 g/L NaCl, 15 g/L琼脂粉, 0.1 g/L氨卞青霉素, pH 7.5)用于基因克隆。酿酒酵母在YPD(20 g/L蛋白胨, 10 g/L酵母抽提物,

20 g/L葡萄糖)培养基中培养,缺尿嘧啶的完全合成培养基(6.7 g/L无氨基酸的酵母基础氮源(YNB)、0.83 g/L dropout powder、缺尿嘧啶的氨基酸混合物及20 g/L葡萄糖)用于筛选重组子。发酵实验分别在以5%、8%的木糖以及8%的葡萄糖、木糖混合物

表2 本实验中用到的质粒
Table 2 Plasmids used in this work

Plasmid name	Description	Reference or source
YIplac211	Amp ^r , URA3	Gietz and Sugino (1988) [15]
YIp-H8	Amp ^r , URA3, pHXT7-XYL1-tHXT7, pFBA1-XYL2-tFBA1	Zhang et al. (2012) [16]
YIp-Y8	Amp ^r , URA3, pCCW12-XYL1-tHSP26, pFBA1-XKS1-tFBA1	this work
YIp-A8	Amp ^r , URA3, pCCW12-XYL2-tHSP26, pTP11-XKS1-tTP11	this work
YIp-CA	Amp ^r , URA3, pTAL1-pCCW12-TAL1	this work
YIp-FK	Amp ^r , URA3, pRK11-pFBA1-RK11	this work
YIp-HR	Amp ^r , URA3, pRPE1-pHXT7-RPE1	this work
YIp-GT	Amp ^r , URA3, pTKL1-pGPM1-TKL1	this work

为碳源的 YP 培养基上进行。

1.3 主要试剂与仪器

柱式真菌 RNA_{OUT} 试剂盒(北京天恩泽基因科技有限公司,中国),Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit(Roche Applied Science, Germany),LightCycler® 480 SYBR Green I Master mix(Roche Applied Science, IN),LightCycler® 480 Real-Time PCR system(Roche Applied Science, USA),Waters Alliance 2695 HPLC(Waters, USA),Aminex HPX-87H 离子交换柱(Bio-Rad),Bioquest CE2502 紫外分光光度计(Progen Scientific Ltd, UK)。

1.4 重组质粒的构建

大肠杆菌转化采用 CaCl₂ 法,XYL1,XYL2 克隆自 *S. stipitis* NRRL 7124,其他片段均源于 *S. cerevisiae* W303-1a,以酵母整合型质粒 YIplac211 为载体构建重组质粒:含有 XYL1,XYL2 及 XKS1 的质粒 YIP-H8, YIP-Y8 和 YIP-A8。其中, YIP-H8 是本实验室早期构建的^[16], YIP-Y8 和 YIP-A8 的构建过程如下:将整合所需的染色体同源片段 Y1 和 Y2,基因 XYL2 及其启动子 pCCW12 和终止子 tHSP26,基因 XKS1 及其启动子 pTP11 和终止子 tTP11 依次连接到 YIplac211 上,获得质粒 YIP-Y8。同理,在 YIplac211 上分别插入整合所需的同源片段 A1 和 A2,基因 XYL1 及其启动子 pCCW12 和终止子 tHSP26,基因 XKS1 及其启动子 pFBA1 和终止子 tFBA1 序列,得到 YIP-A8;含过表达基因 TAL1, RK11, RPE1 和 TKL1 重组质粒的构建,具体过程如下:首先,PCR 扩增基因 TAL1, RK11, RPE1 及 TKL1 的启动子序列及 ORF,经酶切后分别连接 YIplac211。然后,将 PCR 产物 pCCW12, pFBA1, pHXT7 和 pGPM1 酶切后分别与上述质粒对应相连,转化子经验证后依次命名为 YIp-CA, YIp-FK, YIp-HR 和 YIp-GT(见表 2)。

1.5 重组酿酒酵母菌株的构建

酿酒酵母转化采用醋酸锂法,分别用 SpeI, HpaI

和 HpaI 单切质粒 YIP-H8, YIP-Y8 和 YIP-A8,将线性化的质粒 YIP-H8, YIP-Y8 和 YIP-A8 分别整合到 KAM-2 第 IV 条染色体上基因 HEM13 和基因 NRG1 之间的空位上、第 VIII 条染色体上基因 YHK8 和基因 AAP1 之间的空位上以及第 XV 条染色体基因 AUS1 和基因 TIR2 之间的空位上,阳性转化子命名为 AYHNEW2。

以 AYHNEW2 为出发菌株,将经 BgIII 单切的 YIp-CA 进行原位整合。采用相同的方法,以 TAL1 过表达菌株为背景,将 SphI, ClaI 及 ClaI 线性化的 YIp-FK, YIp-HR 和 YIp-GT 不同组合进行原位整合,从而获得 TAL1 共过表达酵母菌株(见表 1)。

1.6 RNA 的提取和 RT-QPCR

在 2% 的 YPX 培养条件下,收集对数生长期的酵母细胞,采用柱式真菌 RNA_{OUT} 试剂盒提取酵母总 RNA,经反转录后,以 ACT1 为内参基因,对过表达基因的转录水平进行分析,并通过 2^{-ΔΔCT} 方法进行数据处理。

1.7 摇瓶发酵实验

发酵实验均采用微好氧条件,在含 30 mL YP 液体培养基的 100 mL 摇瓶中进行。首先,将菌株在 YPD 上摇培 12 h,离心收集活化的细胞,用无菌水洗两次后接种至发酵培养基,初始 OD₆₀₀ = 1。微好氧条件:接种后前 24 h,在 30 °C 220 r/min 条件下培养菌体 24 h 后用封口膜(Parafilm PM-996, Bemis Company, USA)封口(带有 0.5 mm 通气孔)并调转速至 110 r/min,每 12 或 24 h 取样。

1.8 代谢产物分析

发酵样品在 13 000 r/min 下离心 1 min,取上清液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤后用于代谢产物分析。样品中木糖、木糖醇、甘油和乙醇的浓度采用 Waters Alliance 2695 HPLC,以 5 mmol/L H₂SO₄ 为流动相,在 45 °C 0.6 mL/min 的流速下进行检测。

2 结果与分析

2.1 重组质粒的构建

本研究采用两步置换法,以 *URA3* 为唯一筛选

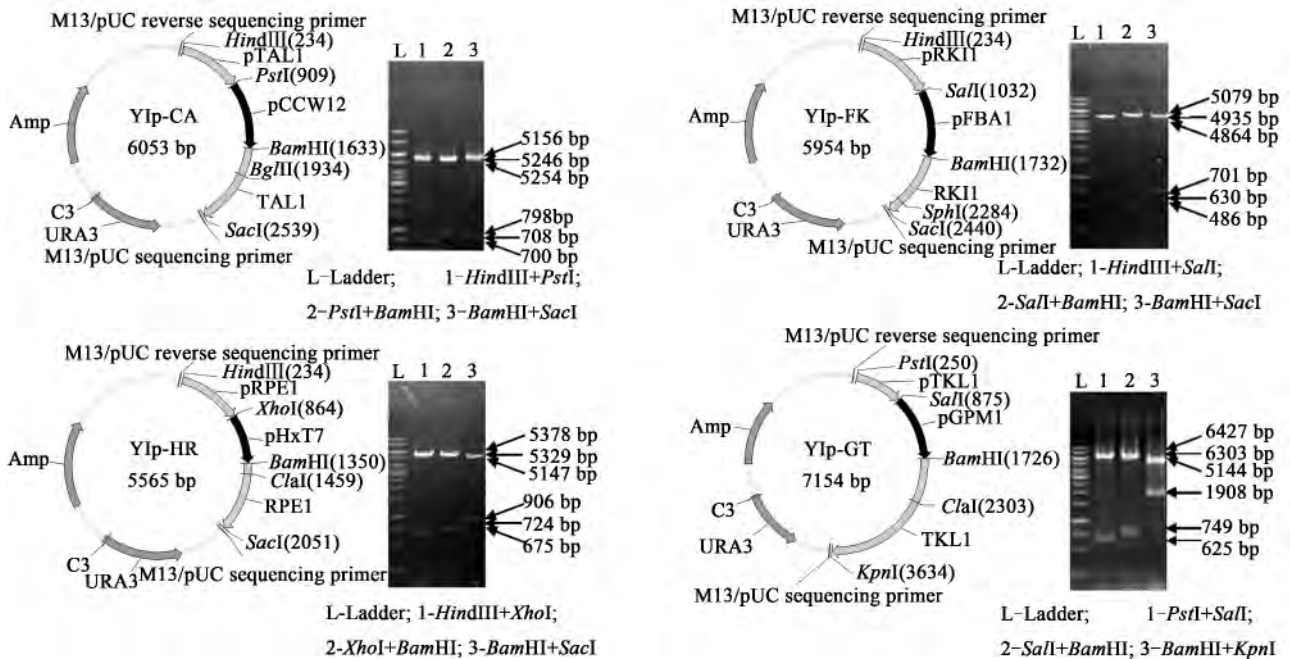


图 1 重组质粒的物理图谱及限制性酶切分析

Fig. 1 Physical maps of recombinant plasmids and restriction endonuclease analysis

2.2 PP 途径基因过表达酿酒酵母菌株的构建

以木糖代谢酿酒酵母菌株 AYHNEW2 为受体菌,采用两步置换法将携带有过表达基因的重组质粒原位整合到酵母染色体上,并通过 PCR 进行验证,以筛选正确的转化子。其中,阳性整合子的验证均采用位于整合位点之外的染色体序列(-CKU 和-CKD),并通过琼脂糖凝胶电泳进行分析,结果如图 2 所示。

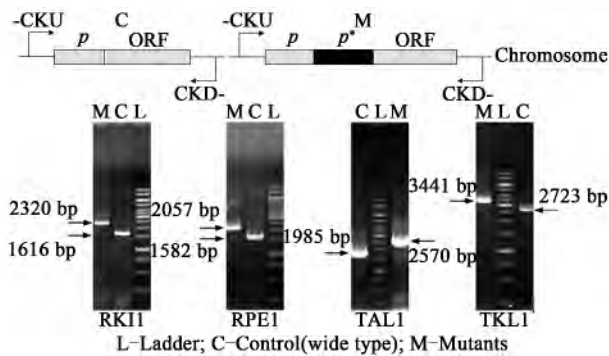


图 2 PCR 验证重组酵母菌株及其琼脂糖凝胶电泳分析

Fig. 2 Identification of recombinant yeasts by PCR and agarose gel electrophoresis analysis

标记在酿酒酵母菌株中不同组合过表达 PP 途径基因。根据这一操作技术的要求,将相关基因分别构建于含 *URA3* 的整合型载体 YIplac211 上,重组质粒经测序和酶切验证,结果如图 1 所示。

2.3 重组酿酒酵母菌株 PP 途径基因的转录水平

通过对重组菌株 PP 途径基因的转录水平进行测定,结果显示,基因 *TAL1*, *RKI1*, *RPE1* 和 *TKL1* 的相对转录水平均有所提高,具体数据如表 3。

表 3 PP 途径过表达基因的转录水平^a

Gene	Promoter	Relative transcript level
<i>TAL1</i>	<i>pCCW12</i>	9.31
<i>RKI1</i>	<i>pFBA1</i>	14.39
<i>RPE1</i>	<i>pHXT7</i>	28.84
<i>TKL1</i>	<i>pGPM1</i>	5.95

a: Present values were given as the average of two independent experiments.

2.4 过表达 PP 途径基因对酵母发酵性能的影响

在不同发酵条件下,对 PP 途径基因过表达菌株的发酵性能进行比较研究,发酵参数见表 4。

2.4.1 5% 木糖浓度下重组菌株的发酵性能

在含 5% 木糖的 YP 培养基上,对重组酵母菌株的木糖发酵性能进行了比较研究,结果如图 3 所示。

表 4 重组酿酒酵母菌株在 5% 和 8% 木糖浓度条件下的发酵参数^aTable 4 Fermentation parameters of recombinant yeasts under the condition of 5% and 8% xylose^a

strains	5% xylose					8% xylose				
	$\mu_{\max} / \text{h}^{-1}$	Xylose/ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	Ethanol/ ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	Xylitol/ ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	Glycerol/ ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	$\mu_{\max} / \text{h}^{-1}$	Xylose/ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	Ethanol/ ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	Xylitol/ ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	Glycerol/ ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
AYHNEW2	0.089	0.971	0.282	0.076	0.018	0.103	0.842	0.312	0.138	0.034
AYHNEW2-TAL1	0.129	1.469	0.306	0.036	0.008	0.136	1.216	0.324	0.108	0.023
AYHNEW2-TAL1-RKII	0.130	1.458	0.304	0.037	0.009	0.136	1.223	0.327	0.107	0.017
AYHNEW2-TAL1-RPE1	0.129	1.488	0.305	0.044	0.010	0.135	1.229	0.329	0.108	0.016
AYHNEW2-TAL1-TKL1	0.125	1.440	0.309	0.045	0.010	0.136	1.218	0.326	0.110	0.017
AYHNEW2-TAL1-TKL1-RKII	0.129	1.470	0.301	0.040	0.009	0.130	1.214	0.324	0.107	0.024
AYHNEW2-TAL1-TKL1-RPE1	0.127	1.435	0.304	0.046	0.010	0.136	1.205	0.323	0.116	0.020
AYHNEW2-TAL1-RPE1-RKII	0.126	1.344	0.313	0.048	0.008	0.129	1.132	0.335	0.096	0.022
AYHNEW2-四 ⁺	0.128	1.384	0.315	0.042	0.009	0.131	1.198	0.337	0.093	0.021

a: The yields of the products were calculated based on the xylose consumed, and all the experiments were repeated at least twice with less than 5% difference.

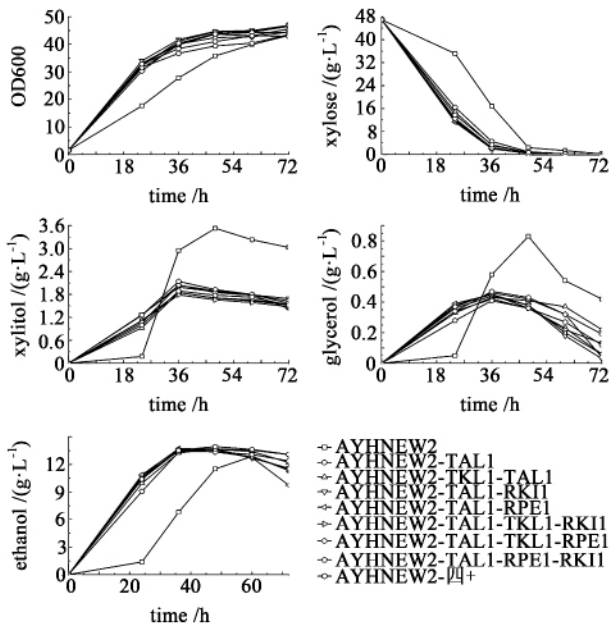


图 3 5% 木糖条件下重组菌株的发酵性能

Fig. 3 Performance of recombinant yeasts on 5% xylose

由图 3 可知,在 5% 木糖发酵条件下,所有过表达菌株的生长和木糖消耗速率均得到了明显改善,基本都能在 36~48 h 之间耗完所有木糖。与对照菌株相比,其乙醇的生产速率和产量也显著地提高,而副产物木糖醇和甘油的产量则大幅降低。说明在双拷贝过表达木糖代谢上游途径关键基因的条件下,PP 途径已成为影响重组酿酒酵母菌株木糖代谢的重要限制因素,提高 PP 途径基因的表达水平能够显著改善酵母菌株的木糖发酵性能。

此外,在过表达 *TAL1* 的基础上过表达 PP 途径

的其他基因,大多数重组菌株在木糖发酵性能方面相差不大,而菌株 AYHNEW2-TAL1-RPE1-RKII 和 AYHNEW2-四⁺的木糖消耗速率较其他重组菌株稍慢,但其乙醇产量反而略微高于其他过表达菌株,达到了 0.313 和 0.315 g/g 木糖,分别较出发菌株 AYHNEW2 提高了 10.82% 和 11.46%,而较 AYHNEW2-TAL1 增加了 2.52% 和 3.07%。

早期研究也曾报道了单独过表达 *TAL1* 或同步过表达 PP 途径 4 个基因能够促进菌体的生长和木糖代谢^[17]。Johansson 等^[18] 构建的 PP 途径基因过表达菌株能够在 56 h 消耗 5% 的木酮糖,同时促进了木糖醇的积累,但其木糖代谢并未发生明显变化。相比而言,本实验中过表达 PP 途径基因在提高菌体的木糖代谢的同时,也促进了碳通量由副产物木糖醇和甘油流向乙醇(见表 4),这可能是由于出发菌株的遗传背景不同造成的。

Hasunuma 等^[9] 近期研究指出,单独过表达 *TAL1* 或 *TKL1* 能够改善酵母菌株木糖代谢。其中,在 4% 木糖浓度下, *TAL1* 过表达菌株的乙醇产量达到了 0.324 g/g,较对照菌株提高了 6.58%,其抑制剂耐受能力也有所提高。相比而言,同步过表达 *TAL1* 和 *TKL1* 菌株却没有表现出明显的变化。

于是,本实验试图通过提高木糖的浓度来创造一渗透压压力环境,一方面探究在较高渗透压条件下,过表达 PP 途径基因能否促进重组菌株的木糖代谢,另一方面探究在较高渗透压条件下,不同组合过表达 PP 途径基因对菌株木糖发酵性能的影响是否依旧相同。

2.4.2 8% 木糖浓度下重组菌株的发酵性能

在 8% 木糖浓度的 YP 培养基中, 重组酿酒酵母菌株的木糖发酵结果如图 4 所示。

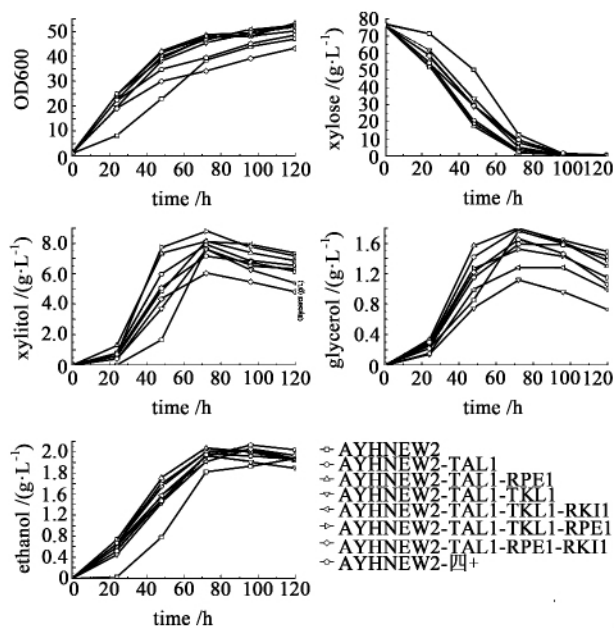


图 4 重组菌株在 8% 木糖条件下发酵性能
Fig. 4 Performance of yeasts on 8% xylose

由图 4 可以看出, 在以 8% 的木糖为唯一碳源的培养条件下, 所有过表达菌株仍表现出明显的优势, 其菌体生长、木糖代谢及乙醇的生产均较对照菌株 AYHNEW2 有所改善。

然而, 在 8% 木糖浓度下各重组菌株的木糖发酵性能表现出了较明显的差异。其中, 大多过表达菌株的木糖消耗速率虽明显加快, 能够在 72 h 耗完木糖, 但其乙醇产量并非最大。相比而言, 重组菌株 AYHNEW2-TAL1-RPE1-RKII 和 AYHNEW2-四+ 在发酵后期生物质的积累明显变慢, 但其乙醇产量却高于其他菌株 (0.335 和 0.337 g/g 木糖), 分别较 AYHNEW2 提高了 7.45% 和 7.86%。较 AYHNEW2-TAL1 分别增加了 3.52% 和 3.93%。Bera 等^[12] 成功构建了 PP 途径基因同步过表达菌株, 但研究发现重组菌株的生长、木糖代谢以及产物的生成并没有明显改善, 笔者分析认为这可能是由于不同实验所采用的菌株背景差异造成的。

由不同木糖浓度条件下重组菌株的发酵结果可知, 提高 PP 途径基因的表达水平能加快重组菌株的木糖代谢和乙醇生产, 并且这种促进作用在木糖浓度较低的情况下表现的更明显。当木糖浓度增加到 8% 时, 重组菌株的生长、木糖代谢以及乙醇

的生产虽较对照仍有所改善, 但其变化幅度相对较小。说明在较高木糖浓度下, 过表达 PP 途径基因能够促进重组菌株的木糖发酵, 但其促进作用受到了一定程度的抑制。由此可见, 通过提高木糖浓度本实验成功创造了渗透压压力环境, 同时也证明了强化 PP 途径能够改善重组菌株在此压力条件下的木糖发酵性能。

此外, 不同组合过表达 PP 途径基因对重组菌株在不同渗透压条件下的木糖代谢表现出明显的差异。在 5% 木糖浓度条件下, 重组菌株的耗糖速率大致相同。与其他过表达菌株相比, 重组菌株 AYHNEW2-四+ 的生物质的积累稍低, 但其乙醇产量却略微提高。当木糖浓度增加到 8% 时, 重组菌株 AYHNEW2-四+ 在乙醇生产方面表现出较明显的优势。说明同步过表达 PP 途径基因能有效引导碳源流向乙醇, 同时减少生物质及副产物的积累。

木质纤维素水解液中除木糖外, 还含有大量的葡萄糖。因此, 为了使实验结果与生产实际接轨, 本研究在葡萄糖和木糖混合条件下对重组菌株的生长和木糖代谢进行测定, 以进一步探究过表达 PP 途径基因对其发酵性能的影响。

2.4.3 重组菌株在 8% 混合糖中的发酵性能

在以 8% 混合糖 (4.4% 木糖和 3.6% 葡萄糖) 为碳源的 YP 培养基中, 本实验对上述重组酿酒酵母菌株的生长和木糖代谢进行了测定, 结果如图 5 所示。

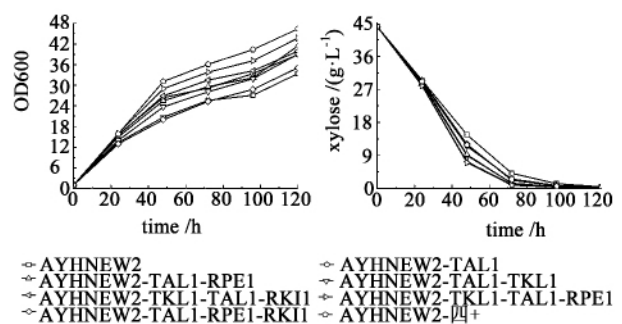


图 5 重组菌株在 8% 混合糖培养基中的发酵性能
Fig. 5 Performance of yeasts on 8% glucose and xylose

在葡萄糖存在条件下, 所有菌株均优先利用葡萄糖, 表现出二次生长现象。同时, 重组菌株的木糖消耗速率也明显降低, 大多需要 72 h 才能耗完 4.4% 的木糖。而在 4% 的混合糖 (1:1) 条件下, Peng 等^[19] 构建的 PP 途径同步过表达菌株在 72 h 仅能消耗约 1.25% 的木糖。

与此同时,在葡萄糖存在时,所有菌株的木糖代谢速率都基本相同,伴随着葡萄糖耗尽,重组菌株的木糖代谢则较对照有所提高,说明葡萄糖代谢主要是通过糖酵解途径实现,提高 PP 支路的通量理论上对葡萄糖代谢几乎没有影响,实际发酵数据也证明了这一点。但是,在木糖发酵过程中,作为目前已知的、唯一有效的木酮糖代谢途径,PP 途径通量的提高能够促进菌体的木糖代谢。其中,相比于其他过表达菌株,同步过表达菌株的生长及其木糖代谢相对较快,进一步说明了同步过表达 PP 途径基因更有利于酿酒酵母木糖发酵性能的优化。

因此,为了克服混合发酵中二次生长现象,以提高重组酿酒酵母菌株的混合糖发酵性能,下一步工作可以通过解除菌株 AYHNEW2-四⁺在混合糖发酵过程中葡萄糖对木糖代谢的抑制效应,从而优化其混合糖发酵性能,以适应工业化生产的需求。

3 结 论

1) 在过表达 *TAL1* 的基础上提高 PP 途径其他基因水平能够显著提高重组菌株的木糖代谢能力,使菌体的生长、木糖代谢以及乙醇的生产明显改善,而副产物木糖醇和甘油积累则有所降低。

2) 相比于其他 *TAL1* 共过表达酿酒酵母菌株,PP 途径基因同步过表达菌株在促进乙醇生产方面表现出了优势,并且这种优势在提高木糖浓度时表现的更明显。

参考文献:

- [1] 鲍晓明,高东,曲音波,等. 木糖代谢基因表达水平对酿酒酵母重组菌株产物形成的影响[J]. 生物工程学报,1997,13(4): 355-361
Bao Xiaoming, Gao Dong, Qu Yinbo, et al. Effect on product formation in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing different levels of xylose metabolic genes[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 1997, 13(4): 355-361 (in Chinese)
- [2] 沈煜,郑华军,王颖,等. 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[J]. 生物化学与生物物理进展,2004,31(8): 746-751
Shen Yu, Zheng Huajun, Wang Ying, et al. Effect of xylulokinase expression-level in the xylose-utilizing recombinant *Saccharomyces cerevisiae* on the metabolic pathway of xylose[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2004, 31(8): 746-751 (in Chinese)
- [3] Blank L M, Lehmebeck F, Sauer U. Metabolic-Flux and network analysis in fourteen hemiascomycetous yeasts [J]. Fems Yeast Res, 2005, 5(6/7): 545-558
- [4] Klimacek M, Krahulec S, Sauer U, et al. Limitations in xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*, made evident through comprehensive metabolite profiling and thermodynamic analysis [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(22): 7566-7574
- [5] Walfridsson M, Hallborn J, Penttil M, et al. Xylose-Metabolizing *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressing the *TKL1* and *TAL1* genes encoding the pentose phosphate pathway enzymes transketolase and transaldolase [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(12): 4184-4190
- [6] Ktter P, Ciriacy M. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1993, 38(6): 776-783
- [7] Senac T, Hahn H, Gerdal B. Effects of increased transaldolase activity on D-xylulose and D-glucose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* cell extracts [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57(6): 1701-1706
- [8] Schaaff-Gerstenschl Ger I, Miosga T, Zimmermann F K. Genetics of pentose-phosphate pathway enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Bioresource Technology, 1994, 50(1): 59-64
- [9] Hasunuma T, Sanda T, Yamada R, et al. Metabolic pathway engineering based on metabolomics confers acetic and formic acid tolerance to a recombinant xylose-fermenting strain of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Microbial Cell Factories, 2011, 10(1): 2-14
- [10] Miosga T, Zimmermann F K. Cloning and characterization of the first two genes of the non-oxidative part of the *Saccharomyces cerevisiae* pentose-phosphate pathway [J]. Current Genetics, 1996, 30(5): 404-409
- [11] Karhumaa K, Fromanger R, Hahn-H Gerdal B, et al. High activity of xylose reductase and xylitol dehydrogenase improves xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 73(5): 1039-1046
- [12] Bera A K, Ho N W, Khan A, et al. A genetic overhaul of *Saccharomyces cerevisiae* 424A (LNH-ST) to improve xylose fermentation [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2011, 38(5): 617-626
- [13] Thomas B J, Rothstein R. Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA [J]. Cell, 1989, 56(4): 619-630

(下转第 78 页)

- Human Molecular Genetics 2013 ,22(R1) : R22 – R26
- [46] Marshall I P , Blainey P C , Spormann A M , *et al.* A single-cell genome for *Thiovulum* sp [J]. Applied and Environmental Microbiology ,2012 , 78(24) : 8 555 – 8 563
- [47] Pamp S J , Harrington E D , Quake S R , *et al.* Single-Cell sequencing provides clues about the host interactions of segmented filamentous bacteria (SFB) [J]. Genome Research 2012 ,22(6) : 1 107 – 1 119
- [48] Embree M , Nagarajan H , Movahedi N , *et al.* Single-Cell genome and metatranscriptome sequencing reveal metabolic interactions of an alkane-degrading methanogenic community [J]. The ISME Journal ,2014 , 8: 757 – 767
- [49] Harrington E D , Arumugam M , Raes J , *et al.* Smash-Cell: A software framework for the analysis of single-cell amplified genome sequences [J]. Bioinformatics ,2010 , 26(23) : 2 979 – 2 980
- [50] Chitsaz H , Yee-Greenbaum J L , Tesler G , *et al.* Efficient de novo assembly of single-cell bacterial genomes from short-read data sets [J]. Nature Biotechnology , 2011 ,29(10) : 915 – 921

(上接第 63 页)

- [15] Patil R A , Kolewe M E , Normanly J , *et al.* Contribution of taxane biosynthetic pathway gene expression to observed variability in paclitaxel accumulation in *Taxus* suspension culture [J]. Biotechnol J , 2012 , 7(3) : 418 – 427
- [16] Li S , Zhang P , Zhang M , *et al.* Transcriptional profile of *Taxus chinensis* cells in response to methyl jasmonate [J]. BMC Genomics ,2012 ,13(1) : 295 – 306
- [17] Wang Z , Martin J A. Next-Generation transcriptome assembly [J]. Nat Rev Genet ,2011 ,12(10) : 671 – 682
- [18] Wu Q , Sun C , Luo H , *et al.* Transcriptome analysis of *Taxus cuspidata* needles based on 454 pyrosequencing [J]. Planta Med ,2011 ,77(4) : 394 – 400
- [19] Hao D , Ge G , Xiao P , *et al.* The first insight into the tissue specific taxus transcriptome via Illumina second generation sequencing [J]. PLoS One ,2011 ,6(6) : e21 220
- [20] Frense D. Taxanes: Perspectives for biotechnological production [J]. Appl Microbiol Biotechnol , 2007 , 73(6) : 1 233 – 1 240

(上接第 70 页)

- [14] Kong Q , Gu J , Cao L , *et al.* Improved production of ethanol by deleting *FPS1* and over-expressing *GLT1* in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Biotechnology Letter , 2006 ,28: 2 033 – 2 038
- [15] Gietz R D , Sugino A. New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites [J]. Gene ,1988 , 74(2) : 527 – 534
- [16] Zhang G , Liu J , Ding W. Overexpression of water-forming NADH oxidase decreases xylitol formation during xylose fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Applied and Environmental Microbiology , 2011 , 78(4) : 1 081 – 1 086
- [17] Parachin N S , Bergdahl B , Van Niel E W , *et al.* Kinetic modeling reveals current limitations in the production of ethanol from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Metabolic Engineering , 2011 , 13(5) : 508 – 517
- [18] Johansson B , Hahn-H Gerdal B. The non-oxidative pentose phosphate pathway controls the fermentation rate of xylulose but not of xylose in *Saccharomyces cerevisiae* TMB3001 [J]. Fems Yeast Research , 2002 , 2(3) : 277 – 282
- [19] Peng B , Shen Y , Li X , *et al.* Improvement of xylose fermentation in respiratory-deficient xylose fermenting *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Metabolic Engineering , 2012 ,14: 9 – 18