

## 研究报告

## 系列过表达非氧化磷酸戊糖途径基因对重组酿酒酵母菌株木糖代谢的影响

孙锦云 高文萱 丁文涛 刘文 陈洵\*

(天津大学 化学工程学院 天津 300072)

**摘要:**【目的】通过系统研究一个、两个及多个非氧化磷酸戊糖(PP)途径基因组合过表达对酿酒酵母木糖代谢的影响,以优化重组菌株的构建过程,构建高效的木糖代谢酿酒酵母菌株。【方法】在酿酒酵母中双拷贝过表达上游代谢途径的关键酶(木糖还原酶 XR, 木糖醇脱氢酶 XDH, 木酮糖激酶 XKS),在此基础上构建了一系列 PP 途径基因过表达菌株,并对其木糖发酵性能进行比较研究。【结果】木糖发酵结果显示,不同组合过表达 PP 途径基因能不同程度改善重组菌株的木糖发酵性能。其中,过表达 PP 途径全部基因(*RKI1*, *RPE1*, *TAL1* 和 *TKL1*)使菌株的发酵性能最优,其乙醇产率和产量较对照菌株分别提高了 39.25%和 12.57%,同时较其他基因组合过表达菌株也有不同程度的改善。【结论】通过构建 PP 途径基因不同组合过表达酿酒酵母菌株,首次对 PP 途径基因对酿酒酵母木糖代谢的影响进行了系统研究,结果表明,不同组合强化 PP 途径基因对重组菌株木糖代谢的影响存在差异,相对于其他基因过表达组合,同步过表达 PP 途径全部基因最有利于碳通量流向乙醇。

**关键词:** 酿酒酵母, 非氧化磷酸戊糖途径, 木糖, 乙醇

## Effects of systematic overexpression of genes involved in the non-oxidative pentose phosphate pathway on xylose metabolism of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains

SUN Jin-Yun GAO Wen-Xuan DING Wen-Tao LIU Wen CHEN Xun\*

(School of Biochemical Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

**Abstract:** [Objective] Construction of highly efficient xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains by single, double or multiple overexpression of genes involved in the non-oxidative pentose phosphate (PP) pathway. [Methods] *TAL1*, *TKL1*, *RPE1* and *RKI1* under the control of different strong promoters were integrated either alone or in combination into the xyloses-fermenting recombinant yeast strain AYHNEW2. The fermentation performances of the resulting strains were studied on 5% xylose. [Results] The recombinant strains generated with our approach showed improved xylose fermentation performance with varying degrees. The best results were obtained by simultaneous overexpression of all the non-oxidative PP pathway genes, and compared to the reference strain

\*通讯作者: Tel: 86-22-27892075; 信箱: chenxun@tju.edu.cn

收稿日期: 2013-04-22; 接受日期: 2013-06-06; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-12

AYHNEW2, the strain resulted from this genetic modification showed a 39.25% and 12.57% increase in ethanol productivity and yield, respectively. **[Conclusion]** Previous studies for enhancing xylose fermentation rate by genetic modification of the non-oxidative PP pathway had been more focused on overexpression of the individual genes in the pathway. In this work, we demonstrated that, compared to single or partial over-expression of the non-oxidative PP pathway, simultaneous overexpression of all the genes in the pathway was more effective in increasing the rate of carbon flow from xylose to ethanol.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*, Non-oxidative pentose phosphate pathway, Xylose, Ethanol

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,传统的酿酒酵母却不能利用木质纤维素主要成分之一的木糖,仅能利用其异构物木酮糖。自然界中普遍存在着两条木糖异构化途径,其中包括来源于木糖代谢酵母的氧化还原途径(木糖还原酶 XR, 木糖醇脱氢酶 XDH)和来自细菌和丝状真菌的木糖异构酶(XI)途径。通过引入外源的木糖异构化途径,以及对酿酒酵母内源的木糖代谢途径进行遗传修饰<sup>[1]</sup>,人们已成功构建了能够代谢木糖生产乙醇的重组酿酒酵母菌株,但其木糖代谢速度慢、副产物多,从而导致乙醇产量低、工业应用困难。

大量研究表明,重组酿酒酵母菌株木糖代谢受途径中多步反应的控制<sup>[2]</sup>。其中,作为酵母体内已知的、唯一能将木酮糖引入中心碳代谢的途径——非氧化磷酸戊糖(PP)途径被认为是影响木糖代谢的下游瓶颈<sup>[3-4]</sup>。早期研究显示,酿酒酵母 PP 途径的通量明显低于其他酵母<sup>[5]</sup>,通过对具有较高木糖代谢能力的酵母菌株进行研究发现,其 PP 途径基因的表达水平都有明显提高<sup>[6]</sup>。此外,过表达 PP 途径基因有利于菌体的生长和木糖代谢。其中,由转酮酶 TKL1 和转醛酶 TAL1 催化的反应被认为是影响该途径通量的主要因素,过表达 TAL1 或 TKL1 能够促进菌体的木糖代谢<sup>[7]</sup>。但也有研究显示,单独过表达 TKL1 并不影响途径的通量<sup>[8-9]</sup>。与此同时,过表达磷酸核酮糖差向异构酶基因 RPE1 或磷酸核酮糖异构酶基因 RKI1 并未改变途径的通量<sup>[10]</sup>。相较而言,许多研究工作通过同步过表达 PP 途径的 4 个基因提高了菌体的木糖代谢能

力<sup>[11]</sup>,而 Bera 等<sup>[12]</sup>构建的同步过表达菌株却并未表现出明显的发酵优势。

传统的代谢调控观点认为代谢通量受途径中关键酶的调控。而随着基础理论的完善,现代代谢控制分析理论指出:代谢途径的通量受系统中多步反应的控制<sup>[13]</sup>,当其中某一反应的通量发生变化时,途径中其他反应也会受到影响<sup>[14]</sup>。然而,在木糖代谢重组菌株的构建过程中,早期研究大多采用单独或共过表达 PP 途径的基因,并未对不同基因过表达水平下菌体的木糖代谢进行系统地比较研究。

基于以上工作,本文在双拷贝过表达木糖代谢途径关键酶 PsXR、PsXDH 和 ScXKS 的木糖代谢酿酒酵母菌株中,采用木糖代谢条件下的组成型强启动子 pCCW12、pGPM1、pHXT7 以及 pFBA1 对 PP 途径基因 TAL1、TKL1、RPE1 和 RKI1 进行了不同组合过表达,获得一系列具有不同途径基因过表达水平的重组酿酒酵母菌株,并对其木糖发酵性能进行了比较研究,以寻求最优的 PP 途径基因过表达组合,从而简化重组酿酒酵母菌株的构建过程,优化其木糖发酵性能。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和质粒

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (F-recA1 endA1 hsdR17 [rk-mk<sup>-</sup>]supE44  $\lambda$ -thi-1 gyrA96 reIA1)用于基因克隆工作。*Scheffersomyces stipitis* NRRL7124 用于基因 XYL1 和 XYI2 的克隆,其他基因均克隆自 *S. cerevisiae* W303-1a,本文用到的酿酒酵母菌株和质粒分别列于表 1 和表 2。

表 1 本实验中用到的酿酒酵母菌株  
Table 1 Yeast strains used in this work

菌株名称 Strain name	基因型 Genotype	来源 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) <sup>[15]</sup>
KAM-2	<i>MATa ura3-1</i>	Kong et al. (2006) <sup>[16]</sup>
AYHNEW2	<i>MATa ura3-1, pCCW12-XYL1-tHSP26, pFBA1-XKS1-tFBA1, pHXT7-XYL1-tHXT7, pFBA1-XYL2-tFBA1, pCCW12-XYL2-tHSP26, pTPI1-XKS1-tTPI1</i>	This work
AYHNEW2-RKI1	AYHNEW2 derivative; <i>pFBA1-RKI1</i>	This work
AYHNEW2-RPE1	AYHNEW2 derivative; <i>pHXT7-RPE1</i>	This work
AYHNEW2-TAL1	AYHNEW2 derivative; <i>pCCW12-TAL1</i>	This work
AYHNEW2-TKL1	AYHNEW2 derivative; <i>pGPM1-TKL1</i>	This work
AYHNEW2-TKL1-RKI1	AYHNEW2 derivative; <i>pFBA1-RKI1, pGPM1-TKL1</i>	This work
AYHNEW2-TKL1-RPE1	AYHNEW2 derivative; <i>pHXT7-RPE1, pGPM1-TKL1</i>	This work
AYHNEW2-TKL1-TAL1	AYHNEW2 derivative; <i>pCCW12-TAL1, pGPM1-TKL1</i>	This work
AYHNEW2-TAL1-RKI1	AYHNEW2 derivative; <i>pFBA1-RKI1, pCCW12-TAL1</i>	This work
AYHNEW2-TAL1-RPE1	AYHNEW2 derivative; <i>pHXT7-RPE1, pCCW12-TAL1</i>	This work
AYHNEW2-RKI1-RPE1	AYHNEW2 derivative; <i>pFBA1-RKI1, pHXT7-RPE1</i>	This work
AYHNEW2-TKL1-TAL1-RKI1	AYHNEW2 derivative; <i>pFBA1-RKI1, pCCW12-TAL1, pGPM1-TKL1</i>	This work
AYHNEW2-TKL1-TAL1-RPE1	AYHNEW2 derivative; <i>pHXT7-RPE1, pCCW12-TAL1, pGPM1-TKL1</i>	This work
AYHNEW2-TKL1-RPE1-RKI1	AYHNEW2 derivative; <i>pFBA1-RKI1, pHXT7-RPE1, pGPM1-TKL1</i>	This work
AYHNEW2-TAL1-RPE1-RKI1	AYHNEW2 derivative; <i>pFBA1-RKI1, pHXT7-RPE1, pCCW12-TAL1</i>	This work
AYHNEW2-四 <sup>+</sup>	AYHNEW2 derivative; <i>pFBA1-RKI1, pHXT7-RPE1, pCCW12-TAL1, pGPM1-TKL1</i>	This work

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

质粒名称 Plasmid name	描述 Description	来源 Reference or source
YIplac211	<i>Amp<sup>r</sup>, URA3</i>	Gietz and Sugino (1988) <sup>[17]</sup>
YIp-H8	<i>Amp<sup>r</sup>, URA3, pHXT7-XYL1-tHXT7, pFBA1-XYL2-tFBA1</i>	Zhang et al. (2012) <sup>[18]</sup>
YIp-Y8	<i>Amp<sup>r</sup>, URA3, pCCW12-XYL1-tHSP26, pFBA1-XKS1-tFBA1</i>	This work
YIp-A8	<i>Amp<sup>r</sup>, URA3, pCCW12-XYL2-tHSP26, pTPI1-XKS1-tTPI1</i>	This work
YIp-FK	<i>Amp<sup>r</sup>, URA3, pRKI1-pFBA1-RKI1</i>	This work
YIp-HR	<i>Amp<sup>r</sup>, URA3, pRPE1-pHXT7-RPE1</i>	This work
YIp-CA	<i>Amp<sup>r</sup>, URA3, pTAL1-pCCW12-TAL1</i>	This work
YIp-GT	<i>Amp<sup>r</sup>, URA3, pTKL1-pGPM1-TKL1</i>	This work

1.2 培养基及培养条件

大肠杆菌 DH5α 在 LBA 平板(10 g/L 胰化蛋白胨, 5 g/L 酵母提取物, 10 g/L NaCl, 15 g/L 琼脂粉, 0.1 g/L 氨卞青霉素, pH 7.5)上培养用于基因克隆和质粒构建;酿酒酵母在 YPD (20 g/L 蛋白胨, 10 g/L 酵母抽提物以及 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)、缺尿嘧啶的氨基酸混合物以及 20 g/L 葡萄糖)用于筛选重组子。

1.3 试剂和仪器

柱式真菌 RNA<sub>OUT</sub> 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, Penzberg, Germany), LightCycler® 480 SYBR Green I Master

mix (Roche Applied Science, Indianapolis, IN), LightCycler® 480 real-time PCR system (Roche Applied Science, USA), Waters Alliance 2695 HPLC (Waters, Milford, 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  $\text{CaCl}_2$  法, 以酵母整合型质粒 YIplac211 作为克隆载体, 采用组成型强启动子构建含有 *XYL1*、*XYL2* 以及 *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<sup>[18]</sup>, 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, *XYL2* 及其启动子 *pCCW12* 和终止子 *tHSP26*, *XKS1* 及其启动子 *pTPI1* 和终止子 *tTPI1* 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, *XYL1* 及其启动子 *pCCW12* 和终止子 *tHSP26*, *XKS1* 及其启动子 *pFBA1* 和终止子 *tFBA1* 序列, 得到质粒 YIP-A8。

采用组成型强启动子 *pFBA1*、*pHXT7*、*pCCW12* 及 *pGPM1* 分别过表达 PP 途径基因 *RKI1*、*RPE1*、*TAL1* 和 *TKL1*, 构建重组质粒 YIp-FK、YIp-HR、YIp-CA 和 YIp-GT。具体过程如下: 首先通过 PCR 扩增 *RKI1*、*RPE1*、*TAL1* 及 *TKL1* 的启动子序列和

ORF, 经酶切后分别连接 YIplac211。然后, 将 PCR 产物 *pFBA1*、*pHXT7*、*pCCW12* 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-FK、YIp-HR、YIp-CA 和 YIp-GT (见表 1)。

#### 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, 通过两步置换法来实现质粒的整合和遗传标记 *URA3* 的重复利用, 分别用 *Spe* I、*Hpa* I 和 *Hpa* I 单切质粒 YIP-H8、YIP-Y8 和 YIP-A8, 首先将线性化的 YIP-H8 整合到 KAM-2 第 IV 条染色体上 *HEM13* 和 *NRG1* 之间的空位上, 取阳性转化子涂布于 5-FOA 平板上弹出 *URA3*, 经 PCR 验证(引物对 H-CKU 和 H-CKD)正确后即为阳性整合子。然后, 采用相同的方法, 依次将 YIP-Y8 和 YIP-A8 整合到上述重组菌株第 VIII 条染色体上 *YHK8* 和 *AAP1* 之间的空位上以及第 XV 条染色体 *AUS1* 和 *TIR2* 之间的空位上, 取阳性转化子命名为 AYHNEW2。最后, 以 AYHNEW2 为出发菌株, 将用 *Sph* I、*Cla* I、*Bgl* II 及 *Cla* I 单切的质粒 YIp-FK、YIp-HR、YIp-CA 和 YIp-GT 分别进行原位整合, 并以上述单基因过表达菌株为出发菌来过表达 PP 途径的其他基因, 从而获得了系列过表达 PP 途径基因的重组酿酒酵母菌株。图 1 以 *TAL1* 整合为例阐述了两步置换法构建重组菌株的过程。

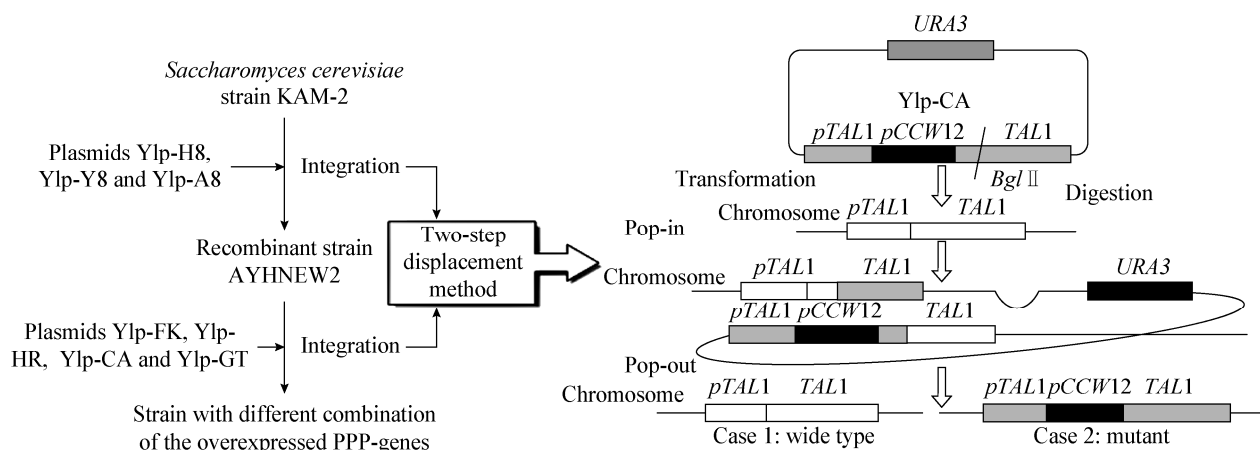


图 1 两步置换法构建重组酿酒酵母菌株

Figure 1 Construction of recombinant *S. cerevisiae* strains using the two-step displacement method

1.6 RNA 的提取和 RT-QPCR

在 2%的 YPX 培养条件下,收集处于对数生长期的酵母细胞,采用柱式真菌 RNA<sub>OUT</sub> 试剂盒提取酵母总 RNA,经反转录后,以 *ACT1* 为内参基因,对 PP 途径基因的转录水平进行测定,并通过 2<sup>-ΔΔCT</sup> 法<sup>[19]</sup>进行数据分析。

1.7 摇瓶发酵实验

摇瓶发酵实验采用含 50 g/L 木糖的 YP 培养基 (YPX)。首先,将菌株在 YPD 培养基上摇培 12 h,离心收集活化的细胞,用无菌水洗 2 次后接种至 YPX 培养基进行发酵,初始 *OD*<sub>600</sub>=1。发酵实验均采用微好氧条件:接种后前 24 h 在 30 ℃、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,发酵过程中每 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 微孔滤膜过滤后进行代谢产物分析,样品中木糖、木糖醇、甘油及乙醇的浓度通过 Waters Alliance 2695 HPLC 进行检测。使用 Aminex HPX-87H 离子交换柱,以 5 mmol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 为流动相,在 45 ℃、0.6 mL/min 的流速下进行分析,并用 Waters 2410 示差检测器进行测定。

2 结果与分析

2.1 重组菌株 PP 途径基因的转录水平

在重组菌株 AYHNEW2-四<sup>+</sup>中,使用 RT-QPCR 技术检测 PP 途径基因的转录水平,并以菌株 AYHNEW2 中各基因转录水平为参照,结果显示,过表达菌株中 PP 途径基因的转录水平得到了明显的提高,具体数据如表 3 所示。

表 3 重组酵母菌株 PP 途径基因的相对转录水平 Table 3 Relative transcript level of the PPP genes in recombinant yeasts		
基因 Genes	启动子 Promoters	相对转录水平 Relative transcript level
<i>RKI1</i>	<i>pFBA1</i>	14.39
<i>RPE1</i>	<i>pHXT7</i>	28.84
<i>TAL1</i>	<i>pCCW12</i>	9.31
<i>TKL1</i>	<i>pGPM1</i>	5.95

2.2 系列过表达 PP 途径基因对重组菌株木糖发酵性能的影响

本实验共构建了 15 株 PP 途径基因不同组合过表达的酵母菌株,为了便于研究和分析,本实验将重组菌株分为 3 组:单基因(图 2)、双基因(图 3)以及多基因(图 4)过表达菌株,在以 50 g/L 木糖为唯一碳源的培养基上对其发酵性能进行了对比研究,所有发酵实验均重复 3 次,结果如图 2 所示。

如图 2-4 所示,过表达 PP 途径的不同基因对重组菌株木糖代谢的影响存在明显差异。其中,单独或同步过表达 *RKI1* 和 *RPE1* 重组菌株的木糖代谢较出发菌株并没有明显改变。相比而言,过表达 *TAL1* 或 *TKL1* 重组菌株的生长和木糖代谢则有了明显改善,均能在 36-48 h 内耗完 5%的木糖。并且,其乙醇的生产速率和产量也不同程度的提高了,而副产物木糖醇和甘油的产量(数据未显示)则有所降低。

通过对系列过表达菌株的各发酵参数进行对比分析发现:当采用木糖代谢条件下具有适当转录强度的启动子来分别过表达 PP 途径基因时,重组菌株的木糖发酵性能与其基因型密切相关,并呈现一定的规律,即所有含有经遗传修饰 *TAL1* 过表达菌株的发酵性能均较出发菌株有较大的提高,并且与单独过表达 *TAL1* 菌株的效果相同。相比而言,过表达 *RKI1* 和 *RPE1* 菌株的发酵性能却没有明显变化,而 *TKL1* 共过表达菌株(除同步过表达 *TAL1* 和 *TKL1* 的重组菌株外)则介于两者之间。此外,相比于其他 *TAL1* 共过表达菌株,重组菌株 AYHNEW2-*TAL1*-*RKI1*-*RPE1*, AYHNEW2-四<sup>+</sup>的生长速率和木糖消耗速率虽相对较低,但其乙醇的体积生产速率和产量却不同程度高于其他过表达菌株,分别较对照菌株增加了 39.17%、39.25%和 11.58%、12.57%。

2.3 讨论

在木糖代谢重组酿酒酵母中,进入机体的木糖首先通过异源的 XR 和 XDH 途径转变为木酮

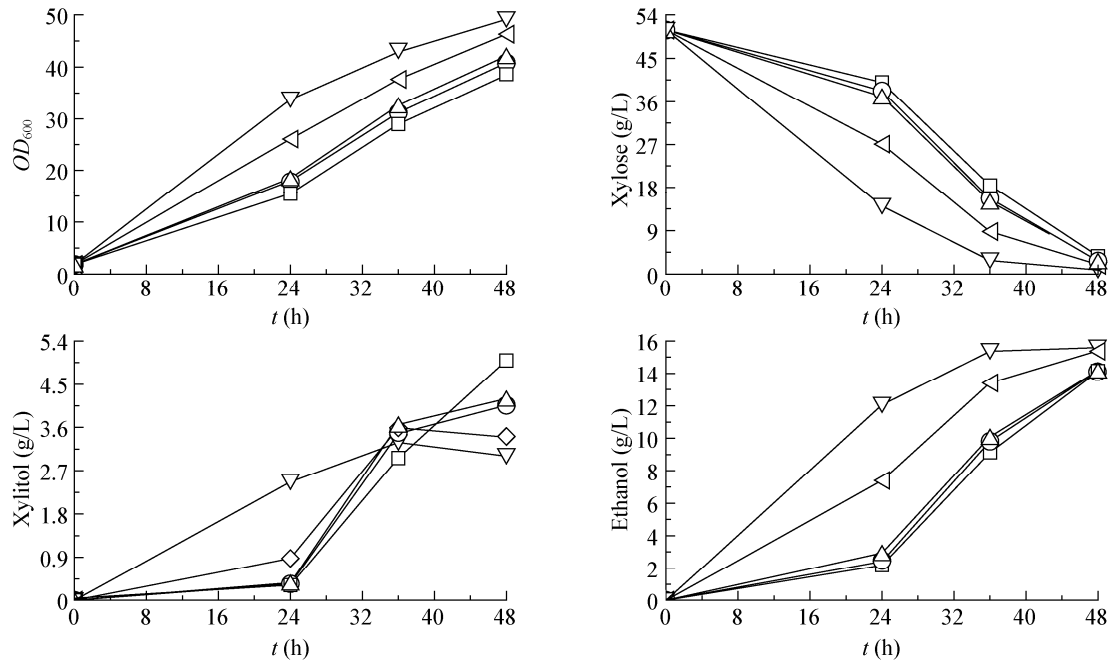


图2 单基因过表达重组酿酒酵母菌株的木糖发酵性能

Figure 2 Xylose fermentation performance of the single-gene overexpressed recombinant *S. cerevisiae* strains

Note:  $\square$ : AYHNEW2;  $\circ$ : AYHNEW2-RK11;  $\triangle$ : AYHNEW2-RPE1;  $\nabla$ : AYHNEW2-TAL1;  $\triangleleft$ : AYHNEW2-TKL1.

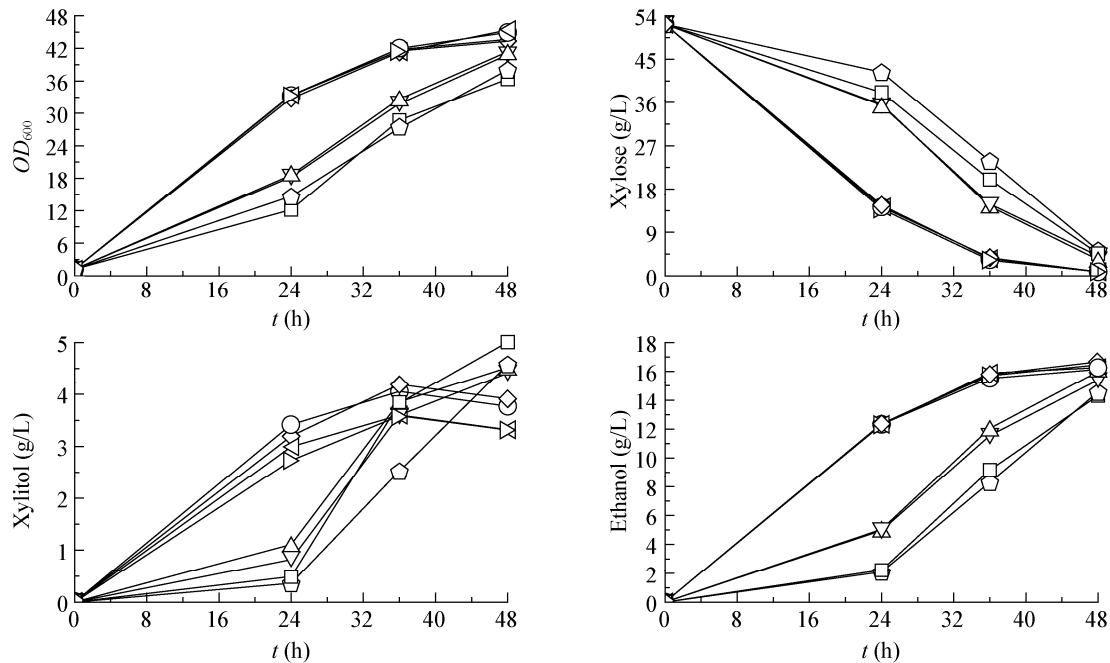


图3 双基因过表达重组酿酒酵母菌株的木糖发酵性能

Figure 3 Xylose fermentation performance of the dual-gene overexpressed recombinant *S. cerevisiae* strains

Note:  $\square$ : AYHNEW2;  $\triangleleft$ : AYHNEW2-TKL1-RK11;  $\nabla$ : AYHNEW2-TKL1-RPE1;  $\triangleleft$ : AYHNEW2-TKL1-TAL1;  $\circ$ : AYHNEW2-TAL1;  $\triangleleft$ : AYHNEW2-TAL1-RK11;  $\diamond$ : AYHNEW2-TAL1-RPE1;  $\circ$ : AYHNEW2-RPE1-RK11.

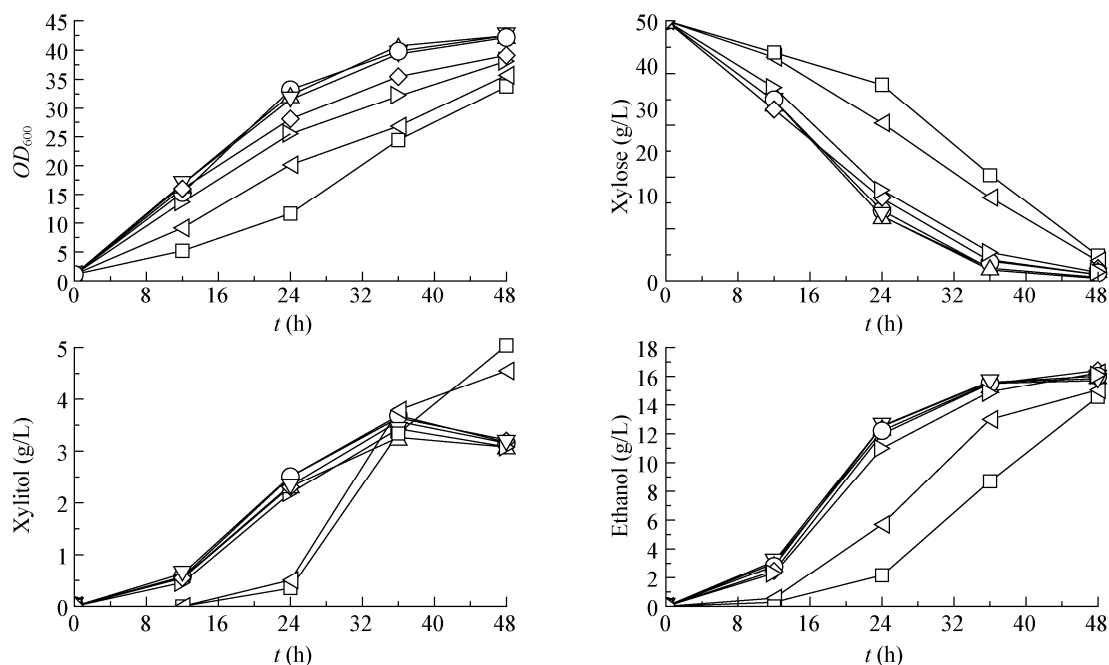


图4 多基因过表达重组酿酒酵母菌株的木糖发酵性能

Figure 4 Xylose fermentation performance of the multiple-gene overexpressed recombinant *S. cerevisiae* strains

Note:  $\square$ : AYHNEW2;  $\circ$ : AYHNEW2-TAL1;  $\triangle$ : AYHNEW2-TKL1-TAL1-RKI1;  $\diamond$ : AYHNEW2-四<sup>+</sup>;  $\nabla$ : AYHNEW2-TKL1-TAL1-RPE1;  $\leftarrow$ : AYHNEW2-TKL1-RPE1-RKI1;  $\rightarrow$ : AYHNEW2-TAL1-RPE1-RKI1.

糖, 木酮糖再经 XKS 磷酸化为 PP 途径中间代谢产物——木酮糖-5-磷酸, 从而进入 PP 途径以及糖酵解途径被进一步分解代谢以生产乙醇。早期研究显示, 上游木糖代谢途径(XR, XDH 和 XKS)控制着重组酿酒酵母木糖代谢途径的通量, 从而掩饰了下游 PP 途径对整个途径通量的控制作用<sup>[4]</sup>。通过对过表达木糖代谢上游途径基因的重组菌株的木糖发酵性能进行比较分析<sup>[20]</sup>, 我们获得了以双拷贝表达 *PsXR*、*PsXDH* 和 *ScXKS* 为背景的高效木糖代谢重组酿酒酵母菌株 AYHNEW2。

本文以酿酒酵母菌株 AYHNEW2 为出发菌株, 根据早期对 PP 途径各基因的研究结果<sup>[3,14,21]</sup>, 并结合本实验室研究工作<sup>[20]</sup>, 选择了木糖代谢条件下具有不同转录强度的组成型启动子 *pFBA1*、*pHXT7*、*pCCW12*、*pGPM1* 来分别过表达基因 *RKI1*、*RPE1*、*TAL1* 和 *TKL1*, 构建了一系列具有优化木糖代谢能力的重组酿酒酵母菌株。通过对过表达菌株各基因转录强度和木糖的代谢水平进行测定, 结

果显示, 重组菌株 PP 途径基因的转录水平均有明显提高, 而其木糖发酵性能也得到了不同程度的改善。与此同时, 相比于采用同一强启动子(*pHXT7*)来过表达 PP 途径的基因, 采用不同强度启动子过表达 PP 途径基因使得重组菌株的木糖发酵性能得到更好的优化(结果未在文中显示), 同时也进一步证实了中等强度过表达 *TAL1* 和 *TKL1* 更有利于优化酿酒酵母木糖发酵性能<sup>[14]</sup>。

通过对 PP 途径基因不同组合过表达菌株的木糖发酵性能进行对比研究, 结果显示, 重组酿酒酵母菌株中各基因的转录水平虽都有明显提高, 但其木糖代谢能力并未随之发生相应的改变。其中, *RKI1* 和 *RPE1* 转录水平的提高并没有改善过表达菌株的木糖代谢能力。相比而言, 提高 *TAL1* 或 *TKL1* 的转录水平能显著提高菌株的木糖发酵性能。这可能是因为 PP 途径中 *RKI1* 和 *RPE1* 催化反应的活性比 *TAL1* 和 *TKL1* 的高<sup>[21]</sup>, 由 *TAL1* 和 *TKL1* 催化的反应是 PP 途径的关键代谢控制点,

他们在很大程度上控制了下游途径的通量, 并且 *TAL1* 的控制作用明显强于 *TKL1*。因此, 在不改变 *TAL1* 和 *TKL1* 催化反应通量的条件下, 提高 *RKI1* 和 *RPE1* 的活性对整个途径的通量影响不大, 因而也不会明显改变菌株的木糖代谢。

此外, 关于 *TKL1* 对木糖代谢的早期研究表明, 过表达 *TKL1* 不会促进菌体的木糖代谢, 甚至有一定的负面效应。然而, 本实验中构建的 *TKL1* 过表达菌株的木糖发酵性能较对照菌株得到了明显提高。这可能是由于不同实验中选用出发菌株的遗传背景以及菌株构建方式不同造成的: 本实验采用双拷贝表达上游途径基因的重组菌株 *AYHNEW2*, 从而一定程度上消除了上游反应对整个途径的限制。同时, 选用了木糖条件下较强的启动子 *pGPM1* 来调节 *TKL1* 的表达, 并将其原位整合到了酵母染色体上, 消除了质粒不稳定以及质粒拷贝数等因素的影响, 从而显现出其对整个途径通量的控制作用。

通过对重组菌株的发酵参数进行对比研究, 结果显示, 所有与 *TAL1* 或 *TKL1* 过表达相关的重组菌株, 无论其最大比生长速率、木糖消耗速率还是乙醇的生产速率均较出发菌株有不同程度的提高, 并且其副产物木糖醇和甘油的产量不同程度的降低。虽然早期研究曾报道了过表达 *PP* 途径基因能够促进菌体的生长和木糖的代谢, 但对于木糖醇和甘油产量均降低的报道却相对较少。如 *Karhumaa* 等发现同步过表达 *PP* 途径的基因仅促进木糖的消耗, 并未改变碳源的流向<sup>[11]</sup>; 而 *Johansson* 等指出过表达途径的基因使得碳流更多地流向了木糖醇的生成<sup>[4,9]</sup>, 甚至也有研究显示过表达 *PP* 途径的基因并未改变菌株的木糖代谢<sup>[12]</sup>。

过表达 *PP* 途径基因能够促进菌体的木糖代谢, 但重组菌株的木糖发酵性能并非与过表达基因的数目呈线性相关关系, 而更多的取决于过表达基因的种类, 如单独过表达 *TAL1* 和 *TAL1* 共过表达对菌株木糖代谢的影响并没有明显差别 (除 *AYHNEW2-TAL1-RKI1-RPE1*, *AYHNEW2-四<sup>+</sup>* 外)。其中, 单独过表达 *TKL1* 或 *TAL1* 菌株的发酵

性能均有所提高, 但 *TKL1* 和 *TAL1* 共过表达菌株却与单独过表达 *TAL1* 的效果基本相同, 这可能是由于 *TAL1* 对途径的控制作用远超出了 *TKL1*。此外, 值得一提的是虽然大多数 *TAL1* 共过表达菌株的木糖代谢速率相差不大, 且明显快于其他过表达菌株, 但其乙醇产量并非最高。相比而言, 重组菌株 *AYHNEW2-TAL1-RKI1-RPE1*, *AYHNEW2-四<sup>+</sup>* 的生长及木糖消耗虽较其他过表达菌株慢, 但其乙醇产量却高于前者, 而两者副产物产量相差不大。这说明在过表达 *TAL1* 的基础上过表达单个或多个 *PP* 途径其他基因对木糖代谢有着不同的影响, 只有同步过表达 *PP* 途径中 4 个基因才能使木糖碳代谢最大化流向乙醇, 而这种代谢流的改变伴随着代谢速度的降低。

### 3 结论

本文以双拷贝过表达 *PsXR*、*PsXDH* 和 *ScXKS* 的重组酿酒酵母菌株 *AYHNEW2* 为基础, 采用木糖代谢条件下具有不同转录强度的组成型启动子不同组合过表达了 *PP* 途径中的 4 个基因, 获得了一系列具有不同 *PP* 途径基因过表达水平的重组酿酒酵母菌株。在以木糖为唯一碳源的情况下, 对其 *PP* 途径基因的转录水平、菌体生长、木糖代谢、副产物积累以及乙醇的生产等进行研究发现, 强化 *PP* 途径基因不仅能够促进菌体的生长和木糖代谢, 而且可以改变木糖代谢途径通量, 使碳流由木糖醇和甘油的合成转向乙醇生产, 从而提高了菌体的发酵性能。其中, 过表达 *PP* 途径的全部基因最大化地促进了碳通量流向乙醇的生成。因此, 同步过表达 *PP* 途径基因更有利于改善菌株木糖代谢, 这一探究对进一步提高重组菌株木糖发酵速率和效率有一定的指导作用。

### 参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] Parachin NS, Bergdahl B, van Niel EW, et al. Kinetic modelling reveals current limitations in the production of



- ethanol from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Metabolic Engineering, 2011, 13(5): 508-517.
- [3] 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.
- [4] Johansson B, Hahn-Hägerdal 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.
- [5] Blank LM, Lehmbeck F, Sauer U. Metabolic-flux and network analysis in fourteen hemiascomycetous yeasts[J]. FEMS Yeast Research, 2005, 5(6/7): 545-558.
- [6] Wahlbom CF, Cordero Otero RR, van Zyl WH, et al. Molecular analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant with improved ability to utilize xylose shows enhanced expression of proteins involved in transport, initial xylose metabolism, and the pentose phosphate pathway[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(2): 740-746.
- [7] 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): 2-13.
- [8] Metzger M, Hollenberg C. Isolation and characterization of the *Pichia stipitis* transketolase gene and expression in a xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae* transformant[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1994, 42(2): 319-325.
- [9] Walfridsson M, Hallborn J, Penttilä 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.
- [10] Miosga T, Zimmermann FK. 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-Hägerdal 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 AK, Ho NW, 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] Fell DA, Thomas S. Physiological control of metabolic flux: the requirement for multisite modulation[J]. Biochemical Journal, 1995, 311: 35-39.
- [14] Lu C, Jeffries T. Shuffling of promoters for multiple genes to optimize xylose fermentation in an engineered *Saccharomyces cerevisiae* strain[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(19): 6072-6077.
- [15] Thomas BJ, Rothstein R. Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA[J]. Cell, 1989, 56(4): 619-630.
- [16] Kong QX, Gu JG, Cao LM, et al. Improved production of ethanol by deleting *FPS1* and over-expressing *GLT1* in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnology Letters, 2006, 28(24): 2033-2038.
- [17] Gietz RD, 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: 527-534.
- [18] Zhang GC, Liu JJ, Ding WT. Overexpression of water-forming NADH oxidase decreases xylitol formation during xylose fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 78(4): 1081-1086.
- [19] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method[J]. Methods, 2001, 25: 402-408.
- [20] 张国畅. 利用代谢工程、辅酶工程及酶工程构建重组酿酒酵母木糖利用菌株以生产乙醇的研究[D]. 天津: 天津大学博士学位论文, 2012.
- [21] Schaaff-Gerstenschläger I, Miosga T, Zimmermann FK. Genetics of pentose-phosphate pathway enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Bioresource Technology, 1994, 50(1): 59-64.