

研究报告

# Lysine 21 突变对树干毕赤氏酵母木糖还原酶辅酶依赖性的影响

曾琦锴, 杜红丽, 翟志臣, 林小琼, 林影

华南理工大学生物科学与工程学院 广州 510640

**摘要:** 木糖还原酶是重组酿酒酵母工程菌利用木糖生成乙醇代谢途径中的关键酶, 该关键酶在利用木糖时依赖 NADPH 而不是 NADH 是导致酿酒酵母代谢木糖生成乙醇的最终产率低的主要原因之一。为了改变树干毕赤氏酵母木糖还原酶的辅酶依赖性, 对它的第 21 位赖氨酸 Lys 进行了突变。利用质粒载体 pET28b 分别将突变后的基因 K21A-XYL1、K21R-XYL1 及野生基因 WT-XYL1 在大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3) 中进行表达, 表达后的蛋白经 His-Tag 纯化柱纯化后测定酶学性质。结果表明: K21R 突变子的辅酶依赖性没有改变, 但 K21A 突变子的辅酶依赖性由 NADPH 完全逆转为 NADH。

**关键词:** 木糖还原酶, 定点突变, 辅酶依赖性

## Mutational Research on the Role of Lysine 21 in the *Pichia stipitis* Xylose reductase

Qikai Zeng, Hongli Du, Zhichen Zhai, Xiaoqiong Lin, and Ying Lin

School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China

**Abstract:** The xylose reductase of *Pichia stipitis* is one of the most important enzymes. It can be used to build up recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain for utilizing xylose and producing ethanol. Intercellular redox imbalance caused by NADPH preference over NADH for *Pichia stipitis* xylose reductase (PsXR) has been considered to be one of the main factors for poor ethanol productivity. Some key amino acids of PsXR, which affect the activity or coenzyme preference, were investigated in our previous study. In this study, Lys21 were rational designed for site-directed mutagenesis to alter coenzyme specificity of PsXR from NADPH and NADH into single NADH. The wild gene and mutagenesis genes were ligated into pET28b, and were transferred into *E.coli* BL21(DE3). After induced by IPTG, the xylose reductases were purified. Purified mutants K21A (Lys21→Ala), K21R(Lys21→Arg) were characterized by steady-state kinetic analysis. The results showed that the coenzyme dependence of K21A was completely reversed to NADH.

**Keywords:** xylose reductase, site-directed mutagenesis, coenzyme specificity

随着工业迅速发展对燃料需求的不断增多及所知储存的矿物燃料的继续减少, 对可再生能源的开

发和利用已成为当务之急。燃料乙醇作为一种清洁、可再生的能源在解决环境污染及能源危机方面具有

**Received:** March 14, 2008; **Accepted:** April 10, 2008

**Supported by:** the National Natural Science Foundation of Guangdong (No. 06300199).

**Corresponding author:** Ying Lin. E-mail: feylin@scut.edu.cn

广东省自然科学基金项目(No. 06300199)资助。

巨大的应用前景。木质纤维素类物质是地球上最主要的可再生资源。将木质纤维素生物转化生成乙醇,可以缓解石油日益枯竭的压力,同时具有绿色环保的社会效益<sup>[1]</sup>。木质纤维素由纤维素、半纤维素和木质素三种成分构成。其中纤维素水解得到的葡萄糖,可为大部份微生物直接利用,但含量仅次于葡萄糖,最高可占纤维素水解糖类的 34%的 D-木糖却不能被多数微生物充分利用,因此如何将木糖充分转化生成乙醇是提高纤维素及木质纤维素生物转化生产乙醇的关键环节<sup>[2]</sup>。

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是传统的酒精生产菌株,具有耗糖快、乙醇耐受力高等特点,虽然它不能直接利用木糖,但是可以利用木糖经木糖还原酶(XR)木糖醇脱氢酶(XDH)作用后的木酮糖。利用基因工程的方法将来源于树干毕赤氏酵母(*Pichia stipitis*)的 XR、XDH 的基因 *XYL1*、*XYL2* 引入到 *S.cerevisiae* 中构建出来的重组工程菌可以代谢木糖生成乙醇,但乙醇的产率很低<sup>[3-5]</sup>。木糖经 XR 作用后得到木糖醇, XR 在这一反应中主要依赖辅酶 NADPH,木糖醇在 XDH 的作用下生成木酮糖, XDH 在这一反应中只依赖辅酶 NAD<sup>+</sup>,这两个酶作用时所依赖的辅酶的不同使得木糖被利用后的主要产物为木糖醇而不是乙醇。已有实验证明利用定点突变的方法可以改变 XR 的辅酶依赖性<sup>[6]</sup>,而且将突变效果好的基因在酿酒酵母中表达可以使木糖醇的生成率降低 31%,乙醇的生成率提高 5.1%<sup>[7]</sup>。同时用定点突变的方法也可以改变 XDH 的辅酶依赖性<sup>[8]</sup>,用此辅酶依赖性得到改变后的基因构建出来工程菌木糖醇的生成率降低了 86%,乙醇生成率提高了 41%<sup>[9]</sup>。这两种突变酶所引起的乙醇生成率提高的水平相差较大,其主要原因是突变后的 XDH 完全依赖 NADP<sup>+</sup>,但突变后的 XR 的辅酶依赖性只是得到了部分改善,并没有得到完全逆转,所以,进一步探讨 XR 的可突变位点,以通过突变得到辅酶依赖性完全逆转的 XR 是提高乙醇生成率的重要方法。

本文利用前期生物信息学的计算结果<sup>[10]</sup>确定对 *P. stipitis XYL1* 中的第 21 位赖氨酸 Lys(K)实施突变,同时根据突变前后氨基酸的性质变化来确定将这一位点突变成何种氨基酸。从氨基酸的性质来看,赖氨酸 Lys(K)属于碱性亲水氨基酸,精氨酸 Arg(R)也属于碱性亲水氨基酸,而丙氨酸 Ala(A)属于中性疏水

氨基酸, K21R 突变前后氨基酸性质并未发生改变,而 K21A 突变则是将碱性亲水氨基酸突变为中性疏水性氨基酸,氨基酸性质有了很大的变化,本文研究了这两种不同性质的突变子 K21A、K21R 的辅酶依赖性及其酶学性质。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种和质料

pICAS-XYL1 为本实验室构建;表达质粒 pET28b 和大肠杆菌 BL21(DE3)购自 Invitrogen。

#### 1.1.2 酶与试剂

PCR 所用试剂、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、低分子量蛋白 Marker 为 TaKaRa 公司产品;质粒提取试剂盒为美津产品;胶回收试剂盒、PCR 产物回收试剂盒为 Qiagen 产品;点突变试剂盒(QuickChange<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit)为 Stratagene 产品;镍离子纯化预装柱(Histrap<sup>®</sup> FF crude 1 mL)为 Pharmacia 产品;咪唑为 Sigma 产品;NADPH、NADH 购自 Roche;其它试剂均为国产或进口分析纯。

#### 1.1.3 寡聚核苷酸引物

为了获得 K21A、K21R 突变,设计突变引物如下:其中引物 A、B 为 K21A 突变引物,C、D 为 K21R 突变引物(下划线标注为突变位点)。

A: 5'-CGGCTGTTGGGCIGTCGACGTCGACACCT GTTCTGAACAG-3'

B: 5'-CTGTTTCAGAACAGGTGTCGACGTCGACA GCCCAACAGCCG-3'

C: 5'-CGGCTGTTGGAGAGTCGACGTCGACACC TGTTCTGAACAG-3'

D: 5'-CTGTTTCAGAACAGGTGTCGACGTCGACTC TCCAACAGCCG-3'

上述引物合成由上海生工生物工程技术有限公司完成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 载体 pET-XYL1 的构建

为了便于目的蛋白的纯化,将目的基因的 N 端与 pET28b 载体上自带的 His 标签进行了融合,选取 *Nhe* I、*Hind* III 酶切位点设计引物: 5'-ACTGCTAG CCCTTCTATTAAGTTGAACTCTG-3'和 5'-GATAA GCTTTTAGACGAAGATAGGAATCTTG-3',以 pICAS-

XYL1 质粒为模板进行 PCR, 得到的 PCR 产物切胶回收后用 *Nhe* I、*Hind* III 酶切, 酶切产物用 PCR 纯化试剂盒纯化后与经同样的酶切过的 pET28b 表达载体一起, 用 T4 DNA 连接酶进行连接。连接液用热击法转化到大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中。将阳性克隆筛选出的并且酶切鉴定正确的质粒进行测序。

### 1.2.2 XYL1 基因的定点突变

参照 QuickChange<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit 说明书对目的基因进行突变。突变后的产物转化大肠杆菌 BL21(DE3), 挑一至两个单克隆进行测序以验证突变是否成功。

### 1.2.3 木糖还原酶基因的诱导表达

将含有野生基因 WT-XYL1 及突变基因 K21A-XYL1、K21R-XYL1 的 pET 质粒分别用热击法转化大肠杆菌 BL21(DE3), 得到转化菌株 WT-XR、K21A-XR、K21R-XR, 并挑取单个菌落接种到 LB 培养基中( $K^+$  50 mg/mL), 37°C、250 r/min 过夜培养, 再取 0.5 mL 菌液接种到 50 mL 新鲜液体培养中, 37°C 下培养 2 h, 加 IPTG 至终浓度为 1.0 mmol/L 以诱导目的基因的表达, 诱导表达的温度为 25°C, 时间为 4 h。诱导表达后将菌液置于 4°C 冰箱过夜放置。

### 1.2.4 蛋白的纯化

取过夜放置的菌液于 10 000 r/min, 10 min, 4°C 离心, 用 Buffer A(20 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 7.4, 含 500 mmol/L NaCl 和 20 mmol/L 咪唑)悬浮, 超声波破碎 5 s, 间隔 9 s, 共 99 次。破碎后液体经过用 Buffer A 平衡过的 1 mL HisTrap<sup>®</sup> FF Crude column, 用 Buffer B 洗脱(Buffer A 加咪唑至终浓度为 500 mmol/L), 收集目的峰样品跑 10%的 SDS-PAGE 分析纯度, 纯化蛋白加 15%的甘油存于 -20°C 备用。

### 1.2.5 蛋白质含量测定及酶学性质的研究

蛋白质的含量采用 Bradford 法进行测定。木糖还原酶 XR 的酶活测定是以 3 mL 反应液(0.6 mol/L 木糖溶液, 0.2 mmol/L NADPH 或 NADH, 50 mmol/L, pH 6.5 磷酸钠缓冲液、纯化后酶液)在 340 nm 下检测 NADPH 或 NADH 被氧化的量。1 个酶活单位定义为每分钟消耗 1  $\mu$ mol NADPH 或 NADH。

## 2 结果

### 2.1 突变基因的获得与蛋白的纯化

XYL1 采用 Stratagene 公司的点空变试剂盒推荐

的方法进行突变后, 挑取突变子进行测序(上海生工), 测序结果显示成功地得到了 XYL1 的突变基因 XYL1-K21A、XYL1-K21R。将带有上述基因的表达载体转化大肠杆菌 BL21(DE3), 得到对应的转化菌株: WT、K21A、K21R。菌株含 1.0 mmol/L IPTG 的 LB 诱导表达, 破碎后的上清液经 HisTrap<sup>®</sup> FF Crude column 亲和层析柱纯化(如图 1), 收集酶活峰进行 SDS-PAGE 检测, 结果如图 2 显示重组蛋白分子量约为 36 kD, 与预计的蛋白分子量相同。

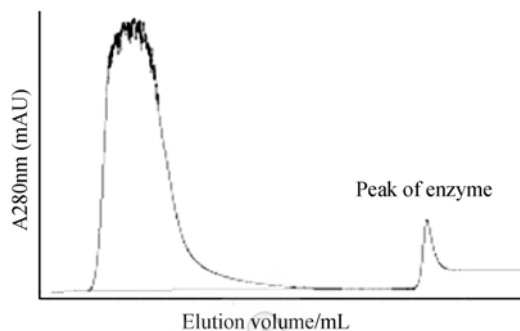


图 1 HisTrap FF Crude 亲和层析柱层析分离谱图  
Fig. 1 Purification of XR on Ni<sup>2+</sup> HisTrap column

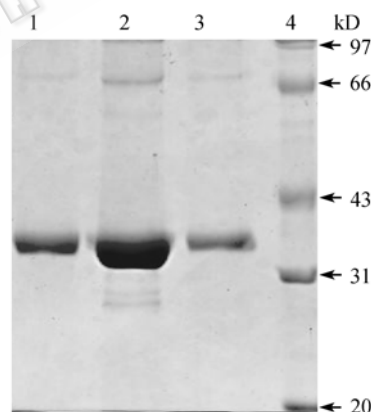


图 2 亲和层析目的峰的电泳检测  
Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the purification of 6x His-tagged XR in *E. coli* BL21(DE3)  
1~3: purified WT, K21A, K21R; 4: marker

### 2.2 酶学性质的分析与比较

将纯化得到的 K21A-XR、K21R-XR 与野生型酶 WT-XR 进行酶学性质的比较与分析, 实验结果如表 1。当以 NADH 为辅酶时, K21R-XR 突变酶的活力约为野生型 68%, 下降较为明显。当以 NADPH 为辅酶时, 活力与野生型相当, 对木糖的亲合力及催化效率并没有明显的改变。当以 NADH 为辅酶时, K21A-XR 突变酶的活力为野生型的 35%, 同时对木糖和 NADH 的亲合力也明显降低,  $K_m \cdot xylose$  由

WT 的 67 mmol/L 上升为 K21A 的 167 mmol/L,  $K_m \cdot \text{NADH}$  由 WT 的 0.021 mmol/L 上升到 0.032 mmol/L; 催化效率  $K_{cat}/K_m$  明显下降, 约为野生型的

24%。但当以 NADPH 为辅酶时, 测不到突变酶的活力。实验结果表明 K21R-XR 的酶学性质基本上不发生变化, 但 K21A-XR 的辅酶依赖性得到了逆转。

表 1 突变酶 K21A-XR 和 K21R-XR 与野生型酶 WT-XR 的酶学性质比较  
Table 1 Kinetic parameters of WT and mutant PsXR for NADH, NADPH, and xylose

Enzyme		Coenzyme	WT-XR	K21A-XR	K21R-XR
NADH	Specific activity/(u/mg)		6.61 ± 0.21	2.37 ± 0.13	4.52 ± 0.21
	$K_m \cdot \text{xylose}/(\text{mmol/L})$		67 ± 9	167 ± 12	67 ± 8
	$K_m \cdot \text{NADH}/(\text{mmol/L})$		0.021 ± 0.008	0.032 ± 0.003	0.021 ± 0.005
	$K_{cat}/(\text{mmol/L})$		785 ± 52	282 ± 10	478 ± 15
	$K_{cat}/K_m/[\text{mmol}/(\text{L} \cdot \text{min})]$		36854 ± 758	8812 ± 112	22441 ± 998
NADPH	Specific activity/(u/mg)		20.3 ± 1.5	ND <sup>[a]</sup>	21.3 ± 1.6
	$K_m \cdot \text{xylose}/(\text{mmol/L})$		33 ± 12	ND	67 ± 10
	$K_m \cdot \text{NADPH}/(\text{mmol/L})$		0.025 ± 0.006	ND	0.025 ± 0.008
	$K_{cat}/(\text{mmol/L})$		2416 ± 56	ND	2537 ± 102
	$K_{cat}/K_m/[\text{mmol}/(\text{L} \cdot \text{min})]$		95494 ± 1020	ND	100276 ± 487

[a] Data were not detected

### 3 讨论

本研究中获得的两个突变酶 K21A-XR、K21R-XR, 由于突变后的氨基酸的不同使得酶学性质有明显差异: K21R-XR 的性质与原始基因相近, 而 K21A-XR 的辅酶依赖性却得到了逆转。实验结果说明 Lys21 位点是影响 XR 辅酶结合特异性的重要位点, 这与基于 *P. stipitis* XYLI 的分子结构模拟的计算结果一致<sup>[10]</sup>, 但要达到辅酶依赖性改变的目的, 将这一位点的 Lys 突变成何种氨基酸是关键。从实验结果来看, 改变突变后的氨基酸的性质, 如从亲水性变为疏水性, 与改变氨基酸的种类但不改变属性相比能更好地改变辅酶的依赖性。同时实验结果也显示 K21A-XR 突变对 NADH 的活性和催化效率都有明显的降低, 这有可能是因为氨基酸性质的改变影响了底物的结合效率, 从而使得活性和催化效率下降。考虑到活力及催化效率对木糖利用率的影响, 本研究的进一步工作将通过改变突变位点或者增加突变位点的个数来提高在以 NADH 为辅酶时的活力及催化效率, 使得辅酶依赖性得到逆转的酶同时具有高活性与催化效率, 可以更好地利用木糖生成乙醇。

### REFERENCES

- [1] Lin Y, Tanaka S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, **69**(6): 627–642.
- [2] Niqam JN. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. *J Biotechnol*, 2001, **87**(1): 17–27.
- [3] Wang Y, Shi WL, Liu XY, Shen Y, Bao XM, Bai FW, Qu YB. Establishment of a xylose metabolic pathway in an industrial of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett*, 2004, **26**(1): 885–890.
- [4] Toivari MH, Aristidou A, Rouhonen L, Penttilä M. Conversion of xylose to ethanol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*: importance of xylulokinase (XKS1) and oxygen availability. *Metab Eng*, 2001, **3**(3): 236–249.
- [5] Jeppsson M, Träff K, Johansson B, Hahn-Hägerdal B, Gorwa-Grauslund MF. Effect of enhanced xylose reductase activity on xylose consumption and product distribution in xylose-fermenting recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*, 2003, **3**(2): 167–175.
- [6] Petschacher B, Leitgeb S, Kavanagh KL, Wilson DK, Nidetzky B. The coenzyme specificity of *Candida tenuis* xylose reductase (AKR2B5) explored by site-directed mutagenesis and X-ray crystallography. *Biochem J*, 2005, **385**(Pt1): 75–83.
- [7] Jeppsson M, Benqtsson O, Franke K, Lee H, Hahn-Hägerdal B, Gorwa-Grauslund MF. The expression of a *Pichia stipitis* xylose reductase mutant with higher  $K_m$  for NADPH increases ethanol production from xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng*, 2006, **93**(4): 665–673.
- [8] Watanabe S, Kodaki T, Makino K. Complete reversal of coenzyme specificity of xylitol dehydrogenase and increase of thermostability by the introduction of structural zinc. *J. Biological Chemistry*, 2005, **280**(11): 10340–10349.
- [9] Watanabe S, Saleh AA, Pack SP, Annaluru N, Kodaki T, Makino K. Ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing protein engineered NADP<sup>+</sup>-dependent xylitol dehydrogenase. *J Biotechnol*, 2007, **130**(3): 316–319.
- [10] Wang JF, Wei DQ, Lin Y, Wang YH, Du HL, Li YX, Chou KC. Insights from modeling the 3D structure of NAD(P)H-dependent D-xylose reductase of *Pichia stipitis* and its binding interactions with NAD and NADP. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, **359**: 323–329.