

spt15 突变基因对酿酒酵母木糖利用的影响

刘红梅, 唐雯, 来灿钢, 严明, 许琳, 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: 利用基因工程手段得到重组菌 *YPH499-3* 中的 *spt15* 有效突变基因, 通过表达载体 pYX212 转化入酿酒酵母原始菌株 *YPH499* 中, 重新获得酿酒酵母重组菌株。对其性状进行研究, 结果表明该菌株能有效利用木糖并共发酵木糖和葡萄糖。在 30°C、200 r/min, 发酵 72 h 时, 50 g/L 木糖的利用率为 82.0%, 乙醇产率为 28.4%; 当木糖和葡萄糖以质量比 1:1 混合发酵时, 木糖和葡萄糖的利用率分别为 80.4% 和 100%, 乙醇产率为 31.4%; 同时发现木糖醇的含量极低。从而验证了有效突变基因 *spt15-10* 对酿酒酵母共发酵木糖和葡萄糖产酒精的影响。

关键词: *spt15*, 酿酒酵母, 木糖利用, 共发酵

Effects of mutational *spt15* gene to xylose utilization of *Saccharomyces cerevisiae*

Hongmei Liu, Wen Tang, Cangang Lai, Ming Yan, Lin Xu, 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: We used genetic methods to get a mutational *spt15* gene from the recombinant strain *Saccharomyces cerevisiae* *YPH499-3*, screened by global transcription machinery engineering (gTME) approach. We transformed the gene into the original strain *Saccharomyces cerevisiae* *YPH499* using the vector pYX212, then got a new recombinant strain. We studied the characteristic of this strain and found that it could metabolize xylose and co-ferment xylose and glucose. Under the fermentation condition of 30°C, 200 r/min, 72 h, the utilization ratio of xylose was 82.0%, with 32.4% of ethanol yield when the carbon source in the media was 50 g/L xylose, while the utilization ratio of xylose and glucose was 80.4% and 100% respectively, with the 31.4% of ethanol yield when the carbon source was 50 g/L glucose/xylose (1:1). Meanwhile, the concentration of the by-product xylitol was very low. This study demonstrates the effect which the forward mutation of *spt15* gene makes to the co-fermentation of xylose and glucose to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*.

Keywords: *spt15*, *Saccharomyces cerevisiae*, xylose utilization, co-fermentation

木质纤维素是世界上最为丰富的生物质资源, 每年的总产量约占所有生物质资源的 50%^[1], 但目前大多数此类的物质没有得到高效利用。以生物质

为原料制取生物乙醇, 是替代石油等化石燃料的必然趋势。研究表明, 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

Received: March 3, 2009; **Accepted:** April 22, 2009

Supported by: National Natural Science Foundation of China-Guangdong Program (No. U0733001), Doctorial Thesis Foundation of Nanjing University of Technology (No. BSCX 200810).

Corresponding author: Lin Xu. E-mail: wzdd_may@126.com

国家自然科学基金-广东联合项目(No. U0733001), 南京工业大学博士论文创新基金(No. BSCX 200810)资助。

增加 25%^[2], 因此, 木糖的有效利用是提高乙醇经济指标的重要内容。

近年来, 利用代谢工程原理, 通过分子遗传改造相关代谢途径来获得能在厌氧条件下高效代谢发酵葡萄糖、木糖及其他各种戊糖的工程菌并没有得到十分理想的目标表型。这些单基因或几个基因的改造, 只是改变了细胞的局部元件, 或是重新设计调节了细胞部分网络代谢产物的平衡系统, 并没有完全解决木糖代谢途径中的复杂问题^[3-5]。

全局转录机制工程(gTME)是一种通过基因转录重排来优化细胞表型的技术^[6], 它通过分子生物学方法, 如易错 PCR、DNA 改组等, 建立起始转录因子突变库, 针对目的产品或目标表型进行定向筛选, 获得目的代谢流增强或特定表型增强的菌种。转录水平调控是基因表达调控中效率最高的一个环节。转录是由 RNA 聚合酶执行的, 在真核生物中 RNA 聚合酶 II 负责转录产生大部分功能基因的 mRNA, 而 RNA 聚合酶 II 转录效率是由起始转录因子和启动子结合能力决定的。酿酒酵母中起始转录因子之一的 *spt15*, 是一种 TATA 结合蛋白^[7], 参与转录起始复合物的形成, 控制基因表达效率。它与相关基因启动子区域 TATA 结合能力的改变, 影响相关基因表达效率, 从而引起菌种的表型变化。

本研究从 gTME 方法筛选得到的重组菌株 *YPH499-3* 中扩增得到有效的突变起始转录调控因子基因 *spt15-10*, 将该基因在不能利用木糖的原始酿酒酵母 *YPH499* 中表达, 并对获得的重组酵母菌木糖利用、木糖和葡萄糖共发酵及乙醇产量进行测定。从而验证了有效突变基因 *spt15-10* 对酿酒酵母共发酵葡萄糖和木糖产酒精的影响, 对构建有效利用木质纤维素发酵生产乙醇的工程菌有重要意义, 并为生物质资源成功工业化奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和载体

大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α , 酿酒酵母宿主菌株为 *Saccharomyces cerevisiae* *YPH499*, 酿酒酵母突变菌株 *Saccharomyces cerevisiae* *YPH499-3* 为本实验室获得, 酵母表达载体 pYX212 由本实验室保存。

YPH499 不能利用木糖, 以它为出发菌株, 利用

gTME 技术, 表达转录因子 *spt15* 突变库, 以木糖为唯一碳源筛选获得重组菌株 *YPH499-3*。经测定 *YPH499-3* 能够高效利用木糖并共发酵木糖和葡萄糖。

1.1.2 试剂

实验所用基因组 DNA 提取试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司, 限制性内切酶购自 NEB 公司, pMD18-T vector、胶回收试剂盒为大连宝生物工程有限公司(TaKaRa)生产, 质粒提取试剂盒为上海申能博彩公司生产, *Taq* 聚合酶、dNTP Mixture 购自金思特科技有限公司, dTTP 为上海生工生物工程公司生产。基因序列的测定由金思特科技有限公司完成。其他试剂为分析纯。

1.1.3 培养基

大肠杆菌用 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 0.075。

筛选培养基(SX)(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。

种子培养基(g/L): 酵母粉 10, 蛋白胨 20, 葡萄糖 20。

发酵培养基(g/L): 酵母粉 10, 蛋白胨 20, 木糖 25, 葡萄糖 25。

1.2 实验方法

1.2.1 酿酒酵母 *S. cerevisiae* *YPH499-3* 突变基因 *spt15-10* 重组质粒的构建

运用基因组提取试剂盒(上海华舜生物工程有限公司), 提取 *S. cerevisiae* *YPH499-3* 基因组。以 *S. cerevisiae* *YPH499-3* 总 DNA 为模板, 使用如下 PCR 引物(上海博亚公司合成):

表 1 PCR 反应引物

Table 1 Primers of PCR

Primers	Primer sequences (5' - 3')
Forward	TCGAGTGCTAGCAAATGGCCGATGAGGAACG TTTAAAGG
Reverse	CTAGCGGTCGACTCACATTTTCTAAATCACT TAGC ACA

PCR 扩增酿酒酵母起始转录因子 *spt15* 突变基因。PCR 循环参数为: 94 $^{\circ}$ C, 5min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 56 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 35 个循环。

用胶回收试剂盒(TaKaRa 公司)对扩增出的基因进行纯化回收。回收后的 *spt15* 突变基因与 pMD18-T(TaKaRa 公司)载体连接, 氯化钙法将连接液转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 提取单克隆质粒。利用 *Sal* 和 *Bam*H 双酶切鉴定突变基因 *spt15* 确定连接到表达载体 pMD18-T 上。重组质粒 pMD18-*spt15* 经金思特公司测序得到突变基因序列 *spt15-10*。

1.2.2 突变的 *spt15* 基因转化入酿酒酵母 *S. cerevisiae* YPH499

平末端加 T 法^[8]制备 pYX212-T 载体, 与 *spt15_10* 基因连接, 利用醋酸锂法^[9]转化入酿酒酵母 YPH499。使用 SX 筛选培养基筛选转化子, 得到含有突变基因的重组酿酒酵母 YPH499-*spt15-10*。

1.2.3 重组酿酒酵母 YPH499-*spt15-10* 发酵实验及结果分析

将上述得到的重组酿酒酵母接种于 50 mL 种子培养基中, 30°C、200 r/min 培养 24 h, 以 10%(V/V) 接种于含 100 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中, 30°C、200 r/min 培养。

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 50 g/L 木糖、50 g/L 葡萄糖、50 g/L 混合糖发酵培养基中, 30°C、200 r/min 厌氧发酵, 测定残糖量、木糖醇和乙醇含量。

发酵液样品经 0.45 μ m 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 OD_{600} 测定, 1 OD_{600} =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 结果与分析

2.1 *spt15-10* 重组质粒的构建

以 *S. cerevisiae* YPH499-3 的基因组 DNA 为模板进行 PCR 反应, PCR 产物电泳检测在 0.7 kb 左右有一明显条带(图 1), 且非特异性扩增不明显。

突变基因 *spt15-10* 的序列与原酿酒酵母 *spt15*

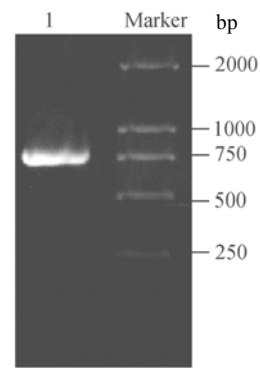


图 1 突变基因 *spt15-10* PCR 产物

Fig. 1 PCR products of *spt15-10* gene. 1: PCR products; M: DNA marker DL2000.

基因序列^[10]的比对结果显示, *spt15-10* 的 224 位碱基由胞嘧啶(C)突变为胸腺嘧啶(T), 第 465 位碱基由胞嘧啶(C)突变为胸腺嘧啶(T), 末尾缺失 15 个碱基, 使相对应的原氨基酸序列中 74 位的苏氨酸残基被异亮氨酸残基取代, 末尾缺失 5 个氨基酸(图 2)。

2.2 重组酿酒酵母 YPH499-*spt15-10* 的鉴定

重组质粒 pMD18-*spt15-10* 经 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳回收纯化。利用 T4 DNA 连接酶将 *spt15-10* 基因和 pYX212-T 连接, 构建出带有 *spt15-10* 的重组载体 pYX212-*spt15-10*。pYX212-*spt15-10* 转化入不能利用木糖的酿酒酵母 YPH499, YNB(不含尿嘧啶)木糖培养基鉴定。得到能够在以木糖为唯一碳源的培养基上生长的重组酿酒酵母 YPH499-*spt15-10*。

2.3 重组菌 YPH499-*spt15-10* 发酵产物的检测

2.3.1 不同碳源对 YPH499-*spt15-10* 生长的影响

原始菌株 YPH499 不能在以木糖为唯一碳源的培养基上生长。与 YPH499-3^[2]在不同培养基上生长情况相似, 即相同培养条件下 YPH499-*spt15-10* 在 50 g/L 的木糖、葡萄糖和两者的混合糖(m/m=1)培养基上的生长速率均较原始菌 YPH499 高(图 3), 使用混合糖培养基时, 木糖和葡萄糖同时利用, 生长情况最好。这说明突变的转录起始因子 *spt15-10* 改变了原始酵母的生长性状。

2.3.2 不同碳源对 YPH499-*spt15-10* 糖利用的影响

以葡萄糖(50 g/L)为唯一碳源, 发酵 68 h, YPH499 和 YPH499-*spt15-10* 都将葡萄糖全部消耗。以木糖和混合糖为碳源, 发酵 72 h, YPH499-*spt15-10* 的糖利用率为: 82.0%(50 g/L 木糖), 80.4%(50 g/L 混合糖中的木糖), 100%(50 g/L 混合糖中的葡萄糖, 56 h 时耗

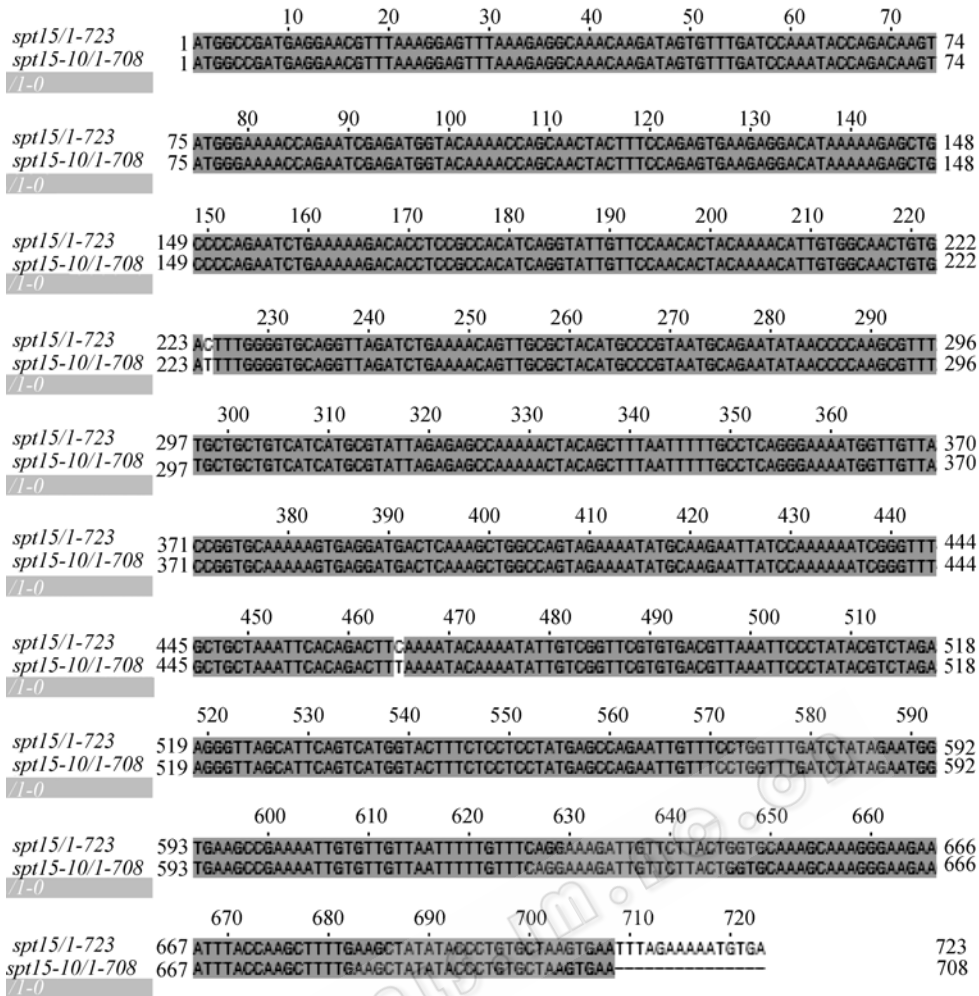


图 2 *spt15-10* 与 *spt15* 序列比对
Fig. 2 Sequences alignment of *spt15-10* and *spt15*.

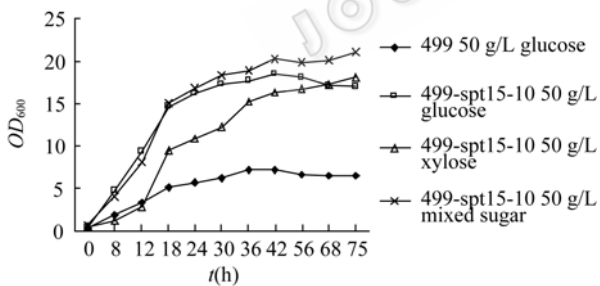


图 3 *YPH499* 与 *YPH499-spt15-10* 不同糖培养基生长曲线
Fig.3 Growth curve of *YPH499* and *YPH499-spt15-10* in the fermentation medium including different sugars.

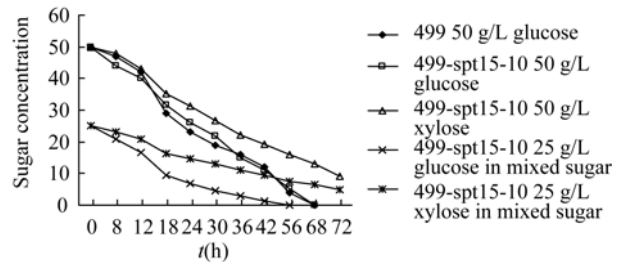


图 4 *YPH499* 与 *YPH499-spt15-10* 糖利用情况
Fig. 4 Sugar utilization of *YPH499* and *YPH499-spt15-10*.

光), 其木糖利用率均达到 80%以上, 葡萄糖全部耗完。混合糖发酵时, 木糖和葡萄糖同时开始利用, 但对葡萄糖的利用明显优于木糖(图 4)。与 *YPH499-3*^[2] 在不同糖浓度上生长情况相比, *YPH499-spt15-10* 的糖利用率都有所下降, 因为 *YPH499-3* 是多条突变 *spt15* 基因共同作用的重组菌。

2.3.3 *YPH499-spt15-10* 木糖醇产量测定

与 *YPH499-3*^[2] 在各种糖厌氧情况下发酵产生的木糖醇情况类似, *YPH499-spt15-10* 在上述几种实验条件下木糖醇含量极低, 都在最低检测线(0.3 g/L)以下, 说明该菌利用木糖时的副产物含量低。

2.3.4 *YPH499-spt15-10* 厌氧发酵乙醇产量

原始菌株 *YPH499* 和重组菌株 *YPH499-spt15-10*

在 50 g/L 的葡萄糖、木糖和混合糖(m/m=1)培养基中, 30°C、200 r/min 的条件下发酵 72 h 后得到的乙醇产量如表 2 所示。

表 2 重组菌与对照菌株相同条件下的产醇比较
Table 2 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)	23.05	46.1
YPH499-spt15-10	50(Glucose)	18.6	37.2
YPH499-spt15-10	50(Xylose)	14.2	28.4
YPH499-spt15-10	50(Mixed sugar)	15.7	31.4

与出发菌 YPH499 相比, 重组菌 YPH499-spt15-10 利用葡萄糖产乙醇产率有所下降, 但能较好地利用木糖产乙醇, 在木糖单一碳源和混合糖碳源培养基中的乙醇产率分别为 28.4% 和 31.4%。而与重组菌 YPH499-3^[2] 相比, 同等发酵条件下 YPH499-spt15-10 的乙醇产量降低。该结果说明起始转录因子 *spt15* 基因的单一突变与多突变共同作用对菌株利用木糖产酒精的影响程度不同, 同时初步揭示出起始转录因子 *spt15* 基因的有效突变使酿酒酵母的代谢途径和代谢流发生了重大变化。

3 结论

细胞的表型是由众多基因综合决定的, 构建一个理想表型的菌株需要同时进行多基因的修饰, 然而引入这些修饰的能力通常是很有限制的。基因表达调控发生在遗传信息传递的各个水平上, 从 DNA→mRNA→蛋白质, 转录调控是其中最重要的一个环节。gTME 方法, 通过改造起始转录调控因子 *spt15*, 利用特定筛选条件得到优化的目标表型, 就是通过起始转录因子的改变来实现多基因的同时改变从而调节整个的代谢网络。MIT 研究小组 06 年已经成功应用于提高酿酒酵母的乙醇耐受性和产量^[6]。本实验室在 2007 年也成功应用于酿酒酵母的木糖代谢, 构建酿酒酵母起始转录因子 *spt15* 突变库, 获得了高效共发酵戊糖和己糖的酿酒酵母菌 YPH499-3^[3]。

全局转录机制工程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。本研究首次得到了高效利用木糖并共发酵木糖和葡萄糖的 gTME 酿酒酵母重组菌株 YPH499-3 中有效突变基因 *spt15-10*。并把 *spt15-10* 重新转化入不利用木

糖的原始酿酒酵母 YPH499 进行鉴定, 得到的重组菌株依然获得了高效利用木糖并共发酵木糖和葡萄糖的新性状。通过检测, 50 g/L 木糖利用率达到 82.0%, 50 g/L 葡萄糖利用率 100%, 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 80.4% 和 100%, 并且几乎检测不到木糖醇。

在未来的研究中, 可配合目标菌株的具体分析, 深入研究起始转录因子的改变对木糖代谢调控网络的影响, 通过全局调控的手段优化酿酒酵母混合糖代谢网络, 以实现最大效率的糖利用, 从根本上降低生物乙醇的原料成本。这将对基因工程和代谢工程技术理论的发展带来重大的革新, 对实现重组菌株的工业应用也将有着不可估量的巨大推动作用。

REFERENCES

- [1] Nigam JN. Development of xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis* for ethanol production through adaptation on hardwood hemicellulose acid prehydrolysate. *J Appl Microbiol*, 2001, **90**: 208–215.
- [2] Aristos A, Merja P. Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. *Curr Biotechnol*, 2000, **11**(2): 187–198.
- [3] Liu HM, Xu L, Yan M, et al. gTME for construction of recombinant yeast co-fermenting xylose and glucose. *Chin J Biotech*, 2008, **24**(6): 1–6.
刘红梅, 许琳, 严明, 等. gTME 构建共发酵木糖和葡萄糖的重组酿酒酵母. 生物工程学报, 2008, **24**(6): 1–6.
- [4] Alper H, Jin YS, Moxley JF. Identifying gene targets for the metabolic engineering of lycopene biosynthesis in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2005, **7**: 155–164.
- [5] Alper H, Miyaoku K, Stephanopoulos G. Construction of lycopene-overproducing *E. coli* strains by combining systematic and combinatorial gene knockout targets. *Nat Biotechnol*, 2005, **23**, 612–616.
- [6] Hal A, Joel M, Elke N, et al. 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] Hemsley A, Arnheim N, Toney MD, et al. A simple method for site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Nucl Acids Res*, 1989, **17**: 6545–6551.
- [9] 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.
- [10] Dietrich FS, Mulligan J, Hennessy K, et al. The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome V. *Nature*, 1997, **387**(6632): 78–81.