

马克斯克鲁维酵母 GX-UN120 糖转运蛋白基因的克隆及表征

孟金浩², 张立飞², 张名帆², 龙静¹, 李树波², 庞宗文^{*1}

1 广西大学生命科学与技术学院, 广西 南宁 530004

2 广西大学轻工与食品工程学院, 广西 南宁 530004

孟金浩, 张立飞, 张名帆, 龙静, 李树波, 庞宗文. 马克斯克鲁维酵母 GX-UN120 糖转运蛋白基因的克隆及表征[J]. 微生物学通报, 2023, 50(5): 2137-2154.

MENG Jinhao, ZHANG Lifei, ZHANG Mingfan, LONG Jing, LI Shubo, PANG Zongwen. Cloning and characterization of sugar transporter genes of *Kluyveromyces marxianus* GX-UN120[J]. Microbiology China, 2023, 50(5): 2137-2154.

摘要: 【背景】马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)具有完整的木糖代谢途径, 可以高效利用木质纤维素中的木糖, 因此对其糖转运蛋白基因的研究可有效解决酵母木糖转运的相关问题。【目的】根据马克斯克鲁维酵母 DMKU3-1042 中 *KLMA_70145* 和 *KLMA_80101* 基因位点的功能预测, 获得马克斯克鲁维酵母 GX-UN120 相应的糖转运蛋白基因序列并探究其功能。【方法】将转运蛋白基因分别克隆表达至酿酒酵母 EBY.VW4000 中考察重组菌株生长特性, 以此间接评价对应转运蛋白的转运能力。【结果】*Km_SUT2* 基因编码的糖转运蛋白可有效提高宿主细胞转运木糖、阿拉伯糖、山梨糖、核糖、乳糖和葡萄糖的能力, 但却不能转运甘露糖、果糖、蔗糖和半乳糖。类似地, *Km_SUT3* 基因编码的糖转运蛋白可提高细胞转运木糖、阿拉伯糖、山梨糖、半乳糖、核糖、乳糖和葡萄糖的能力, 但却不能转运甘露糖和果糖。然而在葡萄糖存在的条件下, 重组菌株对各种碳源的利用均受抑制, 但 *Km_SUT3* 转运木糖和核糖过程中受葡萄糖的抑制作用较小。【结论】马克斯克鲁维酵母 GX-UN120 中转运蛋白 *Km_SUT2* 和 *Km_SUT3* 可有效促进木糖等单糖转运, 其中 *Km_SUT3* 可使重组菌株在低葡萄糖浓度条件下具有同时利用葡萄糖和木糖的能力, 但 *Km_SUT2* 转运木糖过程完全受葡萄糖的抑制。

关键词: 马克斯克鲁维酵母; 糖转运蛋白; 木糖; 木质纤维素; 酿酒酵母

资助项目: 国家自然科学基金(31760253)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31760253).

*Corresponding author. E-mail: pangzw@gxu.edu.cn

Received: 2022-07-20; Accepted: 2022-09-18; Published online: 2022-11-10

Cloning and characterization of sugar transporter genes of *Kluyveromyces marxianus* GX-UN120

MENG Jinhao², ZHANG Lifei², ZHANG Mingfan², LONG Jing¹, LI Shubo², PANG Zongwen^{*1}

¹ College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, Guangxi, China

² College of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, Guangxi, China

Abstract: [Background] *Kluyveromyces marxianus* with a complete xylose metabolic pathway can utilize xylose in lignocellulose. The study of its sugar transporter genes may solve the problem of how to efficiently transport xylose. [Objective] To explore the functions of the sugar transporter genes of *K. marxianus* GX-UN120 obtained according to the function prediction of *KLMA_70145* and *KLMA_80101* in *K. marxianus* DMKU3-1042. [Methods] *Km_SUT2* and *Km_SUT3* were respectively expressed in *Saccharomyces cerevisiae* EBY.VW4000. We then observed the growth characteristics of different recombinants in the media with different carbon sources to evaluate the transport capacity of corresponding transporters. [Results] The sugar transporter *Km_SUT2* improved the ability of host cells to transport xylose, arabinose, sorbose, ribose, lactose and glucose, while the cells did not have the ability to transport mannose, fructose, sucrose or galactose. Similarly, the sugar transporter *Km_SUT3* can transport xylose, arabinose, sorbose, galactose, ribose, lactose and glucose, while it cannot transport mannose or fructose. In the medium with glucose, the utilization of carbon sources by the recombinants was inhibited, while the inhibition on the transport of xylose and ribose by *Km_SUT3* was weaker than that by *Km_SUT2*. [Conclusion] The transporters *Km_SUT2* and *Km_SUT3* in *K. marxianus* GX-UN120 can promote the transport of monosaccharides such as xylose. More significantly, *Km_SUT3* enables the recombinant to utilize both glucose and xylose under the condition of low glucose concentration, while the transport of xylose by *Km_SUT2* is entirely inhibited by glucose.

Keywords: *Kluyveromyces marxianus*; sugar transporter; xylose; lignocellulose; *Saccharomyces cerevisiae*

作为一种天然、丰富、廉价的可再生资源,木质纤维素已被广泛应用于第二代乙醇等化学品的生产^[1-3]。目前,生物法高效利用木质纤维素面临的主要瓶颈是木质纤维素水解液中的可利用糖尤其是木糖的吸收和利用率低等问题,而木质纤维素利用率低的根本原因是大部分工业微生物无法高效利用木糖或受葡萄糖的抑制^[4-5]。马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)是一种常见于发酵乳制品(如奶酪和

开菲尔)中的酵母^[6-8],具有高温耐受性强、生长速率快、代谢底物广泛等特点。更为重要的是,马克斯克鲁维酵母具有完整的木糖代谢途径,而且可有效利用木糖合成各种精细化学品,已被开发作为继酿酒酵母后另一重要的乙醇生产菌种,并被广泛应用于木质纤维素发酵乙醇中^[9-12]。因此,探究马克斯克鲁维酵母中糖转运蛋白的功能对解决木质纤维素利用等问题具有重要意义^[13]。

近年来, 有学者已对马克斯克鲁维酵母 (*Kluyveromyces marxianus*) DMKU3-1042 全基因组进行了测序并对大多数基因进行了注释和转录组分析, 预测其存在 29 个主要的糖转运蛋白^[14]。其中, *KLMA_10545* 位点基因已被 Knoshaug 等^[15]鉴定为编码葡萄糖转运蛋白, 但其余 28 个转运蛋白相应的转运功能仍未被报道。值得注意的是, 在以木糖为唯一碳源时, DMKU3-1042 菌株中位于 *KLMA_70145* 位点及 *KLMA_80101* 位点基因的转录丰度与其他单一糖源时转录丰度相比最高, 表明此 2 个基因的生理功能与马克斯克鲁维酵母的木糖跨膜运输相关^[14]。因此, 本研究以酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) EBY.VW4000 为宿主, 探究 DMKU3-1042 菌株中 *KLMA_70145* 和 *KLMA_80101* 位点基因编码的转运蛋白的转运能力, 以期丰富现有的酵母木糖转运蛋白库, 为今后木质纤维素的高效利用及木糖与葡萄糖同步发酵生产乙醇的工业化提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 菌种、培养基及培养条件

马克斯克鲁维酵母 GX-UN120 和酿酒酵母 EBY.VW4000 (已糖转运蛋白缺失型酿酒酵母, 已敲除绝大部分糖转运蛋白基因, 仅能以麦芽糖为碳源生长) 为本实验室保藏, 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) Trans T1 (用于质粒扩增) 购买自北京全式金生物技术有限公司。

马克斯克鲁维酵母接种于 YPD 培养基(酵

母粉 10 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 葡萄糖 20 g/L)中, 37 °C、150 r/min 培养 12–16 h, 固体培养则是在 37 °C 恒温培养箱倒置培养^[16]; 酿酒酵母 EBY.VW4000 则接种于 SC-Trp (20.0 g/L 麦芽糖、5.0 g/L 无氨基酸酵母氮源、1.7 g/L 除色氨酸以外的氨基酸粉末)培养基中, 30 °C、200 r/min 培养 12–16 h, 固体培养则是在 30 °C 恒温培养箱倒置培养^[17]。大肠杆菌培养于 LB (酵母粉 5.0 g/L, 胰蛋白胨 10.0 g/L, NaCl 10.0 g/L)培养基, 37 °C、200 r/min 培养 12–16 h, 固体培养(筛选阳性转化子时添加氨苄青霉素至终浓度为 100 µg/mL)则在 37 °C 恒温培养箱倒置培养过夜。

1.2 主要试剂和仪器

PrimerSTAR 聚合酶、DNA Marker、*Ex Taq* 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *EcoR* I、*Kpn* I、*Sam* I 和 *BamH* I, 北京全式金生物技术有限公司; 限制性内切酶 *Ava* I、*Sca* I 及磷酸化酶, 赛默飞世尔科技有限公司; 引物的合成和 DNA 测序, 生工生物工程(上海)股份有限公司。高效液相色谱仪, 北京优联光电技术有限公司; 荧光显微镜, OLYMPUS 仪器有限公司。

1.3 酿酒酵母表达菌株构建

依据马克斯克鲁维酵母 DMKU3-1042 菌株中 *KLMA_70145* 和 *KLMA_80101* 位点基因序列, 设计引物如表 1 所示。构建重组表达载体如图 1 所示, 将获得的重组环形质粒酶切线性化后, 经电转转入已制备好的酿酒酵母感受态中, 转化后获得的重组菌株如表 2 所示。

表 1 本实验中使用的引物

Table 1 Primers used in this study

Name	Primer	Sequence (5'→3')
<i>Km_SUT2</i>	7BK-F	GCCGGATCCATGCTTGAAGTGAAGCCAGAC
	7BK-R	GGCGGTACCTCATCTTTCATCTTTCCTTATTT
<i>Km_SUT3</i>	8BS-F	GCCGGATCCGGTGGTGTGTTGGTGTGTACATT
	8BSR	TCCCCCGGGCTAAATGGATTTTCTCTTACC

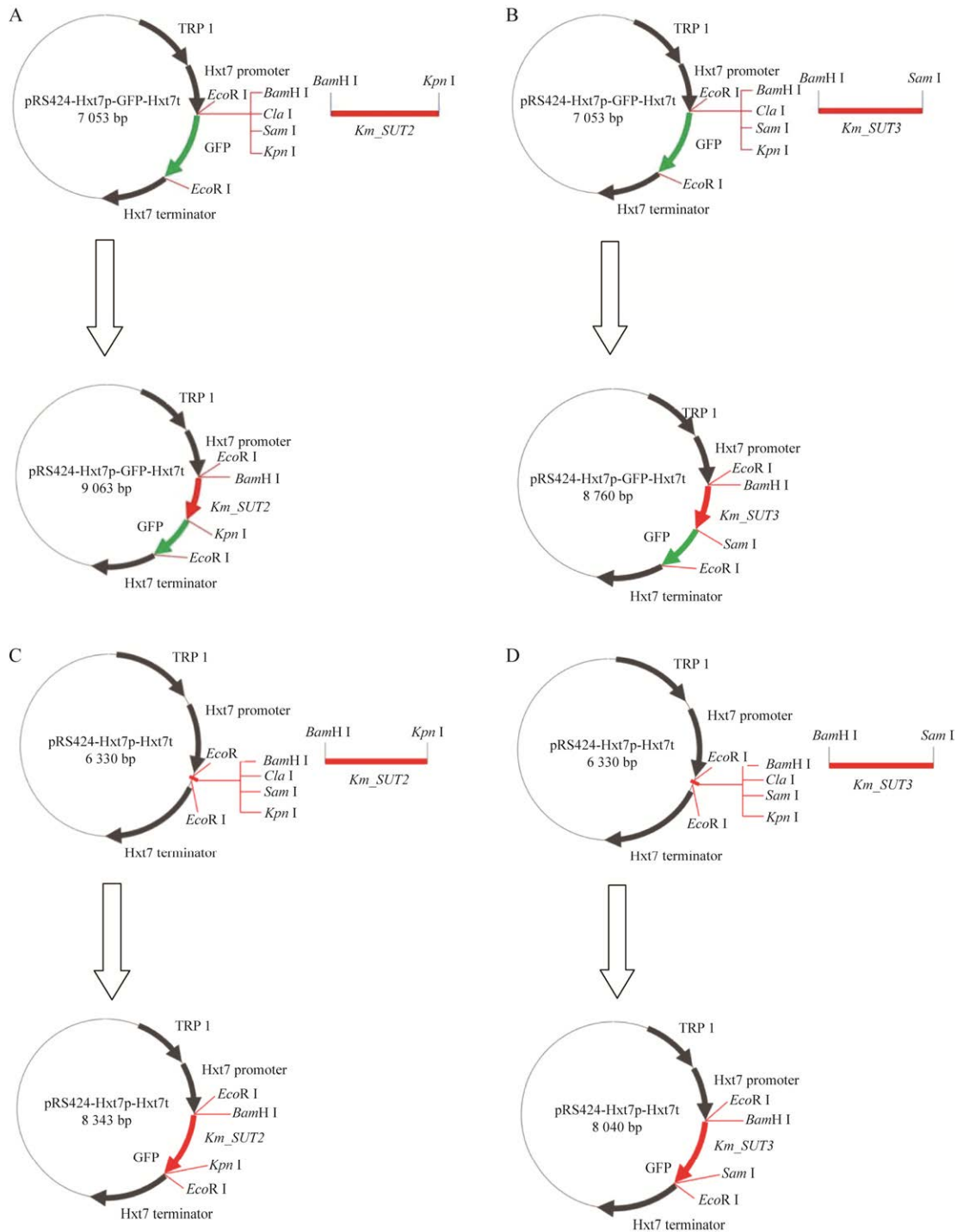


图1 *Km_SUT2*和*Km_SUT3*的重组表达载体构建 A:重组载体 pRS424-Hxt7p-Km_SUT2-GFP-Hxt7t. B: 重组载体 pRS424-Hxt7p-Km_SUT3-GFP-Hxt7t. C: 重组载体 pRS424-Hxt7p-Km_SUT2-Hxt7t. D: 重组载体 pRS424-Hxt7p-Km_SUT3-Hxt7t

Figure 1 Construction of *Km_SUT2* and *Km_SUT3* recombinant expression vectors. A: Recombinant vector pRS424-Hxt7p-Km_SUT2-GFP-Hxt7t. B: Recombinant vector pRS424-Hxt7p-Km_SUT3-GFP-Hxt7t. C: Recombinant vector pRS424-Hxt7p-Km_SUT2-Hxt7t. D: Recombinant vector pRS424-Hxt7p-Km_SUT3-Hxt7t.

表 2 本实验中所使用的菌株

Table 2 The recombinant strains obtained in this experiment

Strain	Description	Source
EBY-GFP-Km_SUT2	Transfer the vector pRS424-Km_SUT2-GFP into EBY.VW4000	This study
EBY-GFP-Km_SUT3	Transfer the vector pRS424-Km_SUT3-GFP into EBY.VW4000	This study
EBY-SUT2-1	Transfer the vector pRS424-Km_SUT2 into EBY.VW4000	This study
EBY-SUT2-2	Transfer the vector pRS424-Km_SUT2 into EBY.VW4000	This study
EBY-SUT3-1	Transfer the vector pRS424-Km_SUT3 into EBY.VW4000	This study
EBY-SUT3-3	Transfer the vector pRS424-Km_SUT3 into EBY.VW4000	This study

1.4 重组目的蛋白糖转运能力的研究

1.4.1 目的蛋白的定位

将重组菌株 EBY-GFP-Km_SUT2 与 EBY-GFP-Km_SUT3 接种至 SC-Trp 液体培养基(添加 20.0 g/L 麦芽糖)中, 30 °C、200 r/min 培养过夜, 用 1.5 mL 无菌离心管 12 000 r/min 离心 2 min 收集菌体, 用无菌水吹洗菌体 2 次, 重悬于生理盐水中。取 10 μ L 菌悬液制片后用荧光显微镜进行观察。

1.4.2 重组菌株在不同碳源下的生长情况

将重组菌株 EBY-SUT2-1、EBY-SUT2-2、EBY-SUT3-1、EBY-SUT3-3 接种于 SC-Trp 液体培养基(添加 20.0 g/L 麦芽糖)中, 30 °C、200 r/min 培养过夜。用 50 mL 的离心管 12 000 r/min 离心收集菌体, 用无菌水洗涤菌体 2 次, 去除残留在菌体表面的麦芽糖, 12 000 r/min 离心 2 min 收集菌体。无菌水重悬菌体, 调整 OD_{600} 值至 0.7, 将菌悬液依次梯度稀释成 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 共 6 个梯度, 分别取 1 μ L 上述 6 个浓度梯度的菌悬液在含有不同糖的 SC-Trp 固体培养基上进行点板, 同时以原始酿酒酵母 EBY.VW4000 作为对照, 倒置于 30 °C 的培养箱中, 静置培养 5 d。

1.4.3 重组菌株的糖转运及利用

将重组菌株 EBY-SUT2-1、EBY-SUT2-2、EBY-SUT3-1、EBY-SUT3-3 接种于 SC-Trp 液体培养基(添加 20.0 g/L 麦芽糖)中, 30 °C、200 r/min 培养至 OD_{600} 值为 0.6–1.0, 将其作为种子液接

种到 SC-Trp 液体培养基(添加 20.0 g/L 不同糖)中, 30 °C、200 r/min 培养。每 12 h 测定菌液 OD_{600} 值, 并利用高效液相色谱仪检测所取样品中重组菌与酿酒酵母 EBY.VW4000 在不同糖发酵液中上清液的残糖量, 绘制重组菌的生长曲线及糖消耗曲线。

根据所得结果计算重组菌株比生长速率 μ 、表观生长得率 $Y_{x/s}$ 以及糖的比消耗速率 γ 。其中, 重组菌株比生长速率计算公式:

$$\mu = \frac{1}{t \ln(\frac{xt}{x0})};$$

表观生长得率计算公式:

$$Y_{x/s} = \frac{(xt - x0)}{(s0 - st)};$$

各种糖的比消耗速率计算公式:

$$\gamma = \frac{\mu}{Y_{x/s}}。$$

式中, x_0 和 s_0 分别代表初始 OD_{600} 值以及初始糖浓度, xt 和 st 代表所选时间点的 OD_{600} 值及糖浓度。

1.4.4 重组菌中葡萄糖对可利用糖吸收效率的影响

将重组菌株 EBY-SUT2-1、EBY-SUT2-2、EBY-SUT3-1、EBY-SUT3-3 接种于 SC-Trp 液体培养基(添加 20.0 g/L 麦芽糖)中, 30 °C、200 r/min 培养过夜至 OD_{600} 值为 0.6–1.0, 将其作为种子液接种到 SC-Trp (添加 20.0 g/L 的葡萄糖和 20.0 g/L 的其他糖)液体培养基中, 30 °C、200 r/min

培养, 每 12 h 取一次样, 测量菌液 OD_{600} 值, 同时利用高效液相色谱仪测定所取样品中葡萄糖和其他糖的糖剩余量。

2 结果与分析

2.1 Km_SUT2 蛋白与 Km_SUT3 蛋白的定位

糖转运蛋白属于膜蛋白或跨膜蛋白, 根据转运蛋白的跨膜运输机制, 糖转运蛋白在细胞中能否正常发挥功能取决于目的基因能否正确表达以及表达蛋白是否在细胞膜上正确折叠。结果如图 2 所示, 融合蛋白 Km_SUT2-GFP 与 Km_SUT3-GFP 表达的绿色荧光蛋白集中在酵

母细胞的外围, 这表明目的基因成功表达并且正确装配到细胞膜上。

2.2 重组菌株在不同碳源中的生长情况

根据图 3 中结果, 以 EBY.VW4000 为对照, 重组酵母 EBY-SUT2-1、EBY-SUT2-2 在木糖、核糖、阿拉伯糖、乳糖、山梨糖、葡萄糖培养基上均能正常生长, 表明 Km_SUT2 糖转运蛋白能够将这 6 种糖转入菌体细胞内供自身生长。然而重组酵母在含甘露糖、果糖、蔗糖、半乳糖的固体培养基上不能生长或表现出微弱的生长能力, 说明 Km_SUT2 糖转运蛋白不能转运这几种糖或是转运能力很弱。

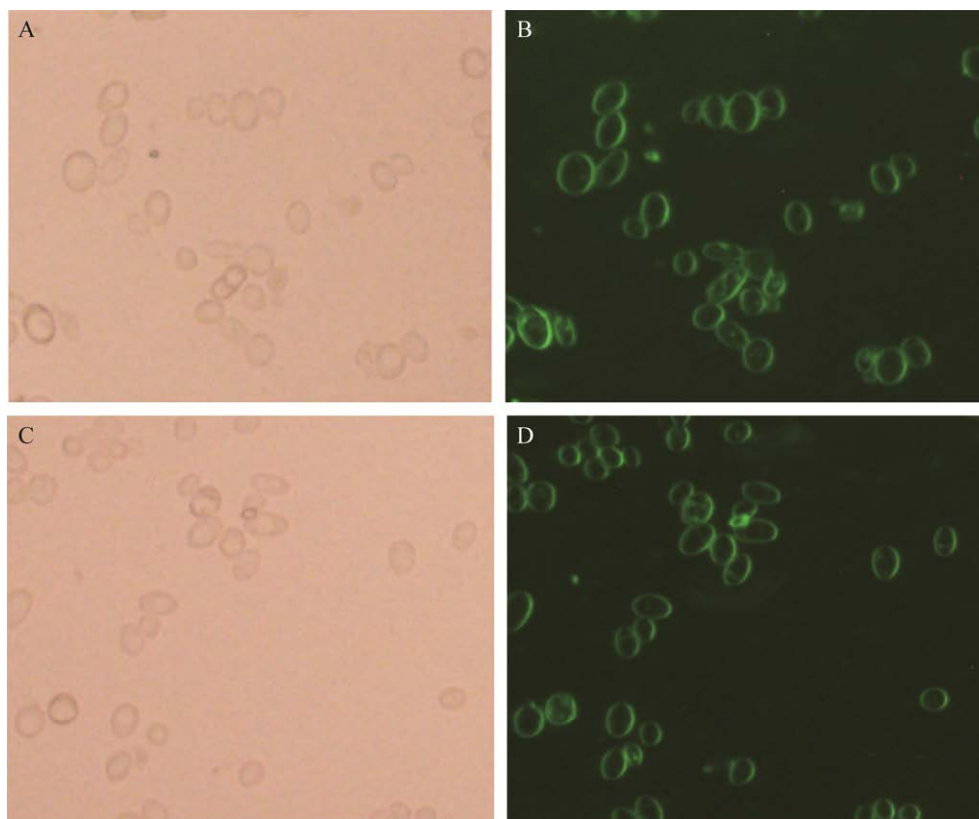


图 2 荧光显微镜下两种融合表达蛋白的定位 A: EBY-GFP-Km_SUT2 明场视野. B: EBY-GFP-Km_SUT2 荧光视野. C: EBY-GFP-Km_SUT3 明场视野. D: EBY-GFP-Km_SUT3 荧光视野

Figure 2 Localization of two fusion expressed proteins under fluorescence microscopy. A: EBY-GFP-Km_SUT2 bright field field. B: EBY-GFP-Km_SUT2 fluorescent field. C: EBY-GFP-Km_SUT3 bright field field. D: EBY-GFP-Km_SUT3 fluorescent field.

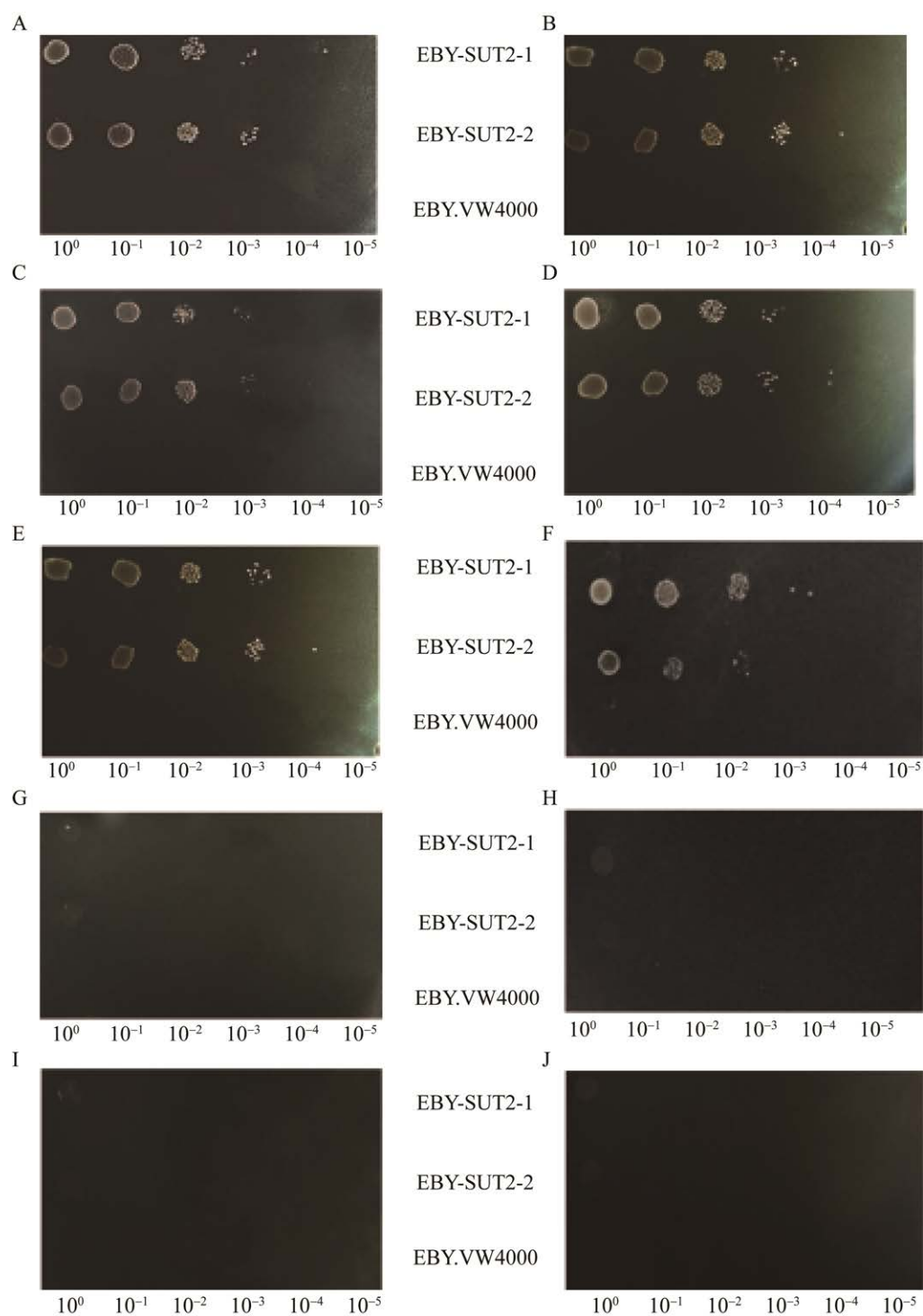


图3 EBY-SUT2-1、EBY-SUT2-2 与 EBY.VW4000 在不同碳源培养基中的生长情况 A:阿拉伯糖. B: 山梨糖. C: 木糖. D: 乳糖. E: 核糖. F: 葡萄糖. G: 甘露糖. H: 果糖. I: 蔗糖. J: 半乳糖

Figure 3 Growth of EBY-SUT2-1, EBY-SUT2-2 and EBY.VW4000 on different carbon sources medium. A: Arabinose. B: Sorbose. C: Xylose. D: Lactose. E: Ribose. F: Glucose. G: Mannose. H: Fructose. I: Sucrose. J: Galactose.

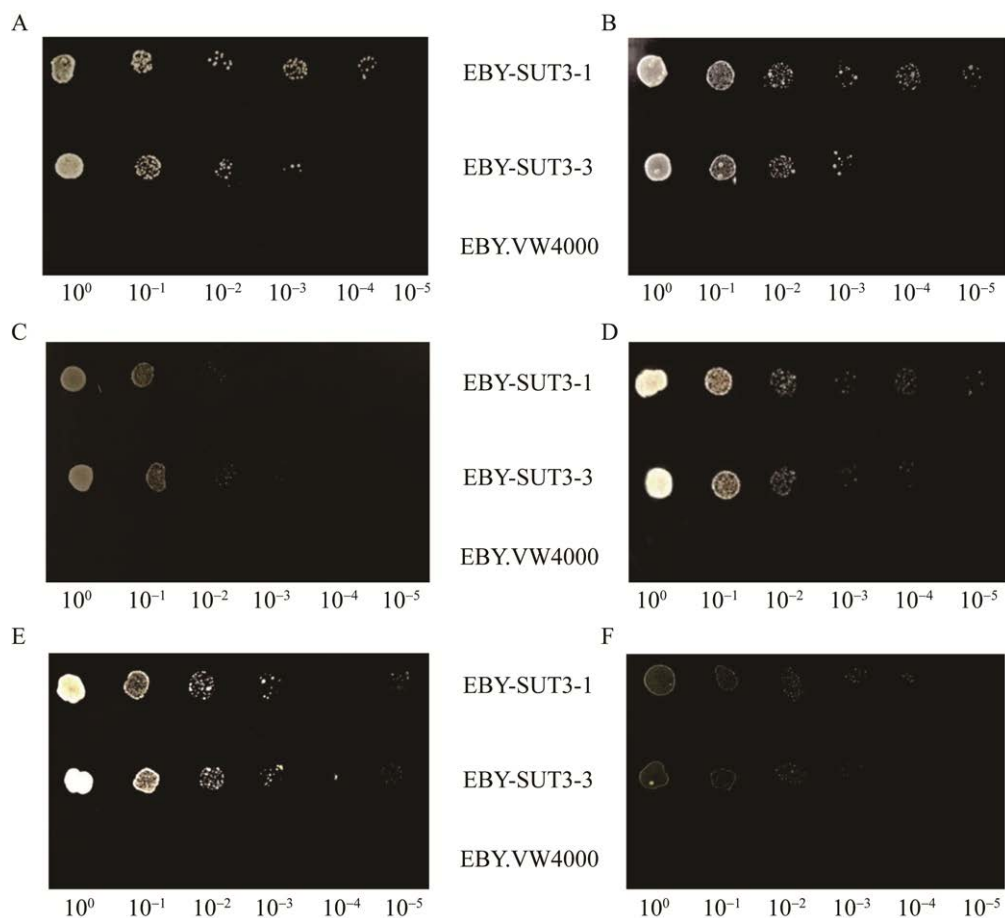
如图 4 所示, 重组酵母 EBY-SUT3-1、EBY-SUT3-3 在含山梨糖、阿拉伯糖、木糖、乳糖、核糖、半乳糖、蔗糖、葡萄糖的培养基上均能正常生长, 在含果糖、甘露糖的培养基上不能生长, 这说明 Km_SUT3 糖转运蛋白具备山梨糖、木糖、阿拉伯糖、乳糖、核糖、半乳糖、蔗糖及葡萄糖的转运能力, 不具备果糖和甘露糖的转运能力。

2.3 重组菌株的糖转运及利用

2.3.1 生长曲线与糖消耗曲线

由于 EBY.VW4000 缺失了几乎全部糖转运蛋白但代谢能力依旧完整保留, 仅表达单个糖转运蛋白的重组菌株其生长的主要限速步骤是糖的转运速率, 因此通过对重组菌株在单一碳源的生长速率以及糖消耗速率间接评价 Km_SUT2

与 Km_SUT3 对不同糖的转运能力。结果如图 5 所示, 重组菌 EBY-SUT2-1、EBY-SUT2-2 在木糖、阿拉伯糖、乳糖、核糖、山梨糖及葡萄糖中的生长明显好于在半乳糖、果糖、甘露糖、蔗糖中的生长, 与点板实验结果吻合。木糖、阿拉伯糖、山梨糖、乳糖、葡萄糖、核糖中的菌液 OD_{600} 值最高均可达到 2.8 左右, 而其中以葡萄糖消耗速率最快, 于 72 h 左右被消耗殆尽; 其次, 木糖与山梨糖消耗速率相似, 略低于葡萄糖, 均在 108 h 左右消耗殆尽; 而剩余几种糖的消耗速率均较低, 108 h 残糖量均大于 20 g/L。综上所述, 表达 Km_SUT2 的重组酵母对葡萄糖、木糖、山梨糖具有更高的利用效率, 其中葡萄糖的利用效率最高, 这间接反映了相较于其他糖 Km_SUT2 对这 3 种糖具有较好的转运效率。



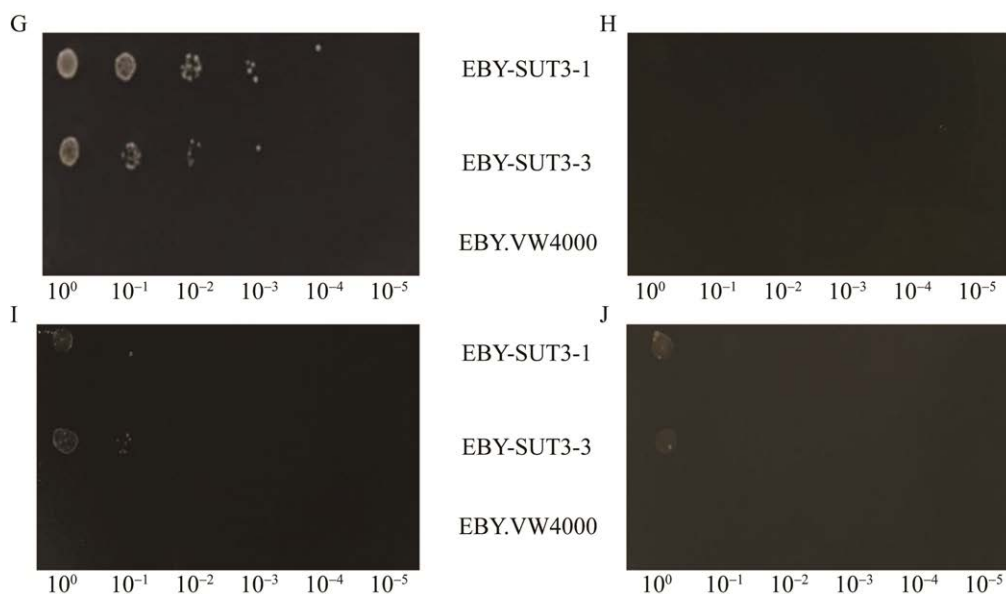
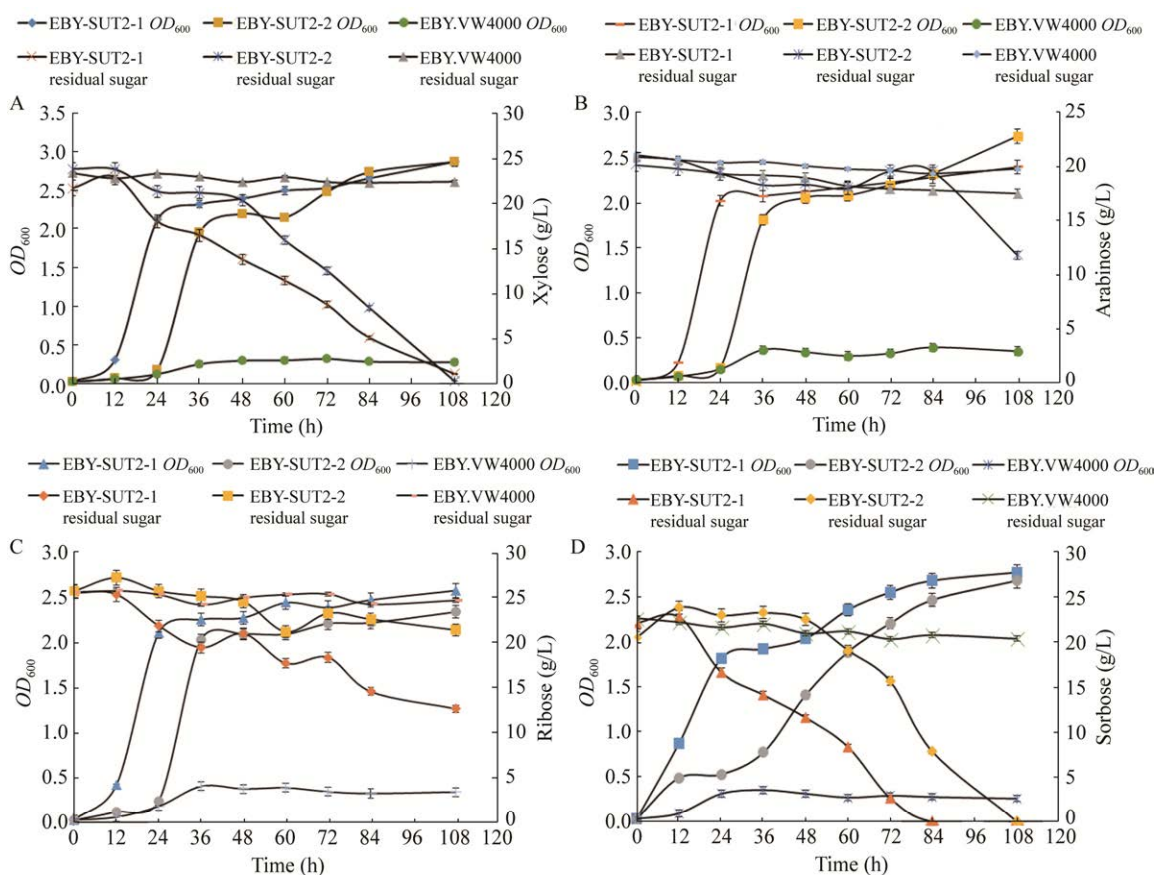


图4 EBY-SUT3-1、EBY-SUT3-3 与 EBY.VW4000 在不同碳源培养基中的生长情况 A:阿拉伯糖. B:乳糖. C: 木糖. D: 半乳糖. E: 核糖. F: 山梨糖. G: 葡萄糖. H: 果糖. I: 蔗糖. J: 甘露糖

Figure 4 Growth of EBY-SUT3-1, EBY-SUT3-3 and EBY.VW4000 on different carbon sources medium. A: Arabinose. B: Lactose. C: Xylose. D: Galactose. E: Ribose. F: Sorbose. G: Glucose. H: Fructose. I: Sucrose. J: Mannose.



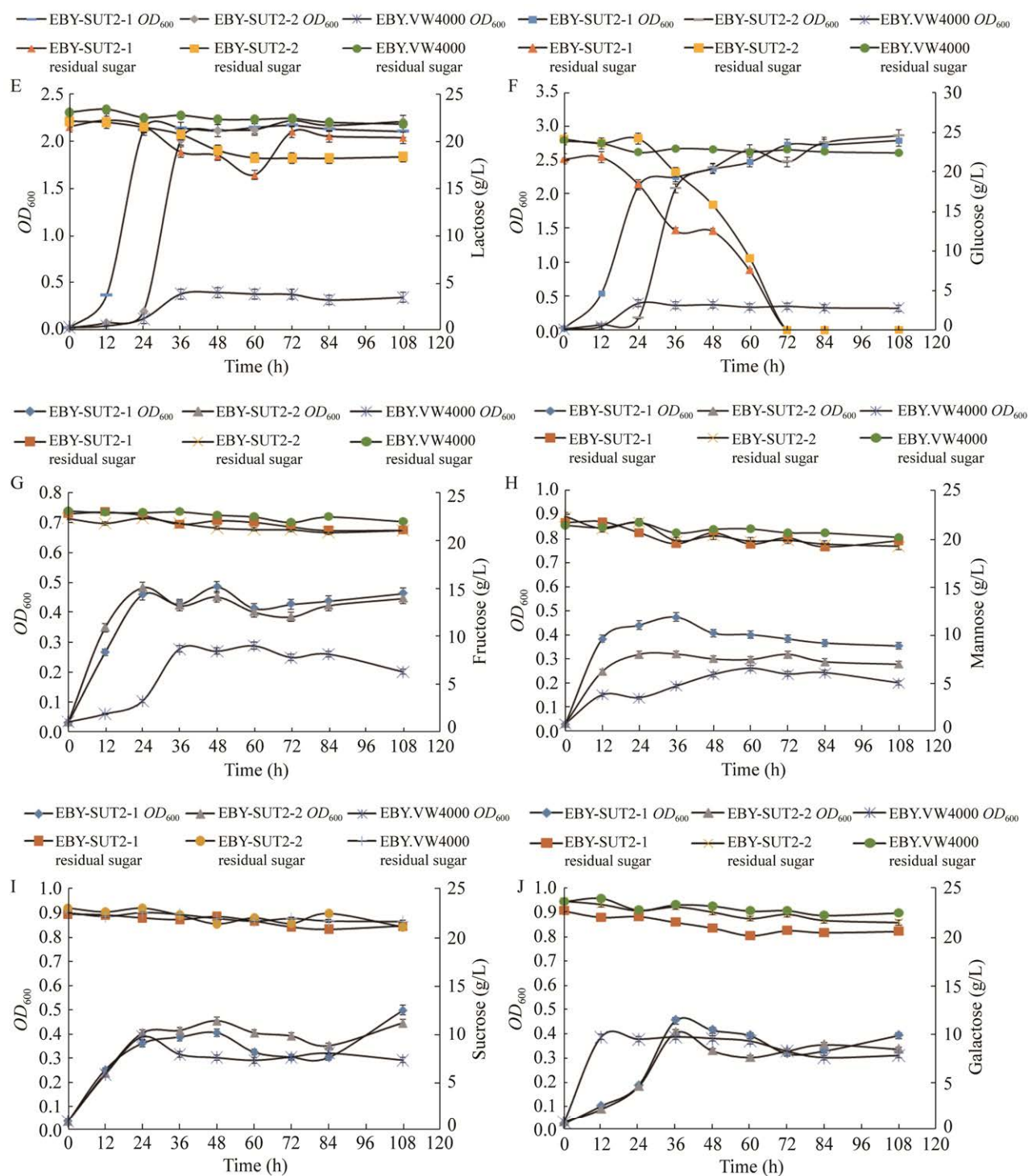


图5 EBY-SUT2-1、EBY-SUT2-2与EBY.VW4000在不同糖培养基中的生长情况 A: 木糖. B: 阿拉伯糖. C: 核糖. D: 山梨糖. E: 乳糖. F: 葡萄糖. G: 果糖. H: 甘露糖. I: 蔗糖. J: 半乳糖

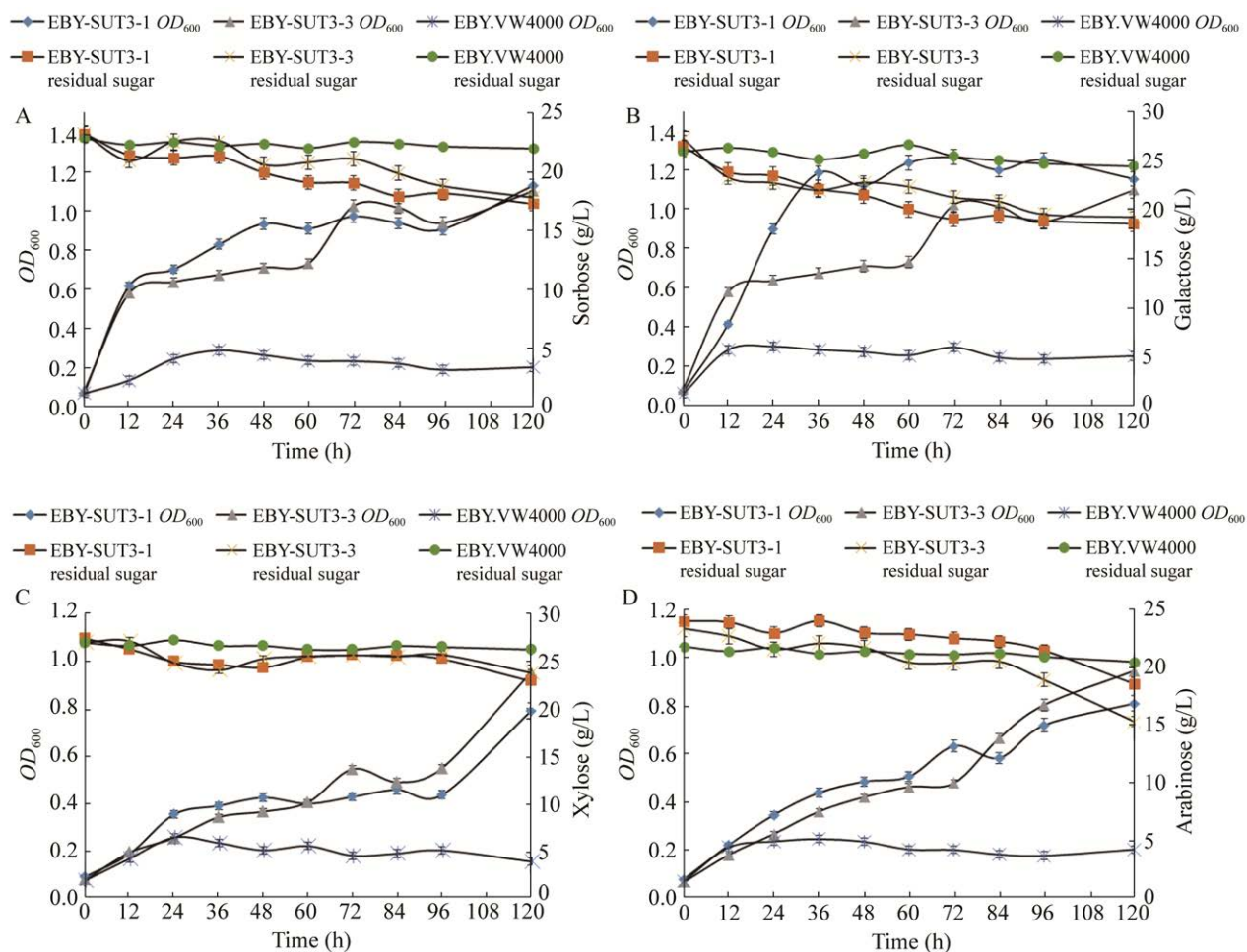
Figure 5 Growth of EBY-SUT2-1, EBY-SUT2-2 and EBY.VW4000 on different sugars medium. A: Xylose. B: Arabinose. C: Ribose. D: Sorbose. E: Lactose. F: Glucose. G: Fructose. H: Mannose. I: Sucrose. J: Galactose.

由图 6 可知, 与点板实验结果吻合, 重组菌 EBY-SUT3-1、EBY-SUT3-3 在山梨糖、半乳糖、木糖、葡萄糖、阿拉伯糖、乳糖、核糖、蔗糖中的生长明显好于在果糖、甘露糖中的生长。经过 120 h 培养, 培养基在含蔗糖的菌液 OD_{600} 值最高达到了 1.5, 在葡萄糖中的菌液 OD_{600} 值达到 2.0, 在乳糖、半乳糖、核糖、山梨糖、甘露糖中培养基中菌液 OD_{600} 达到 1.0 左右。其中山梨糖、木糖、葡萄糖及乳糖被消耗掉 1/4 左右, 而在甘露糖、果糖中菌液 OD_{600} 仅为 0.4, 且培养基内的糖几乎未被利用。结果表明表达 Km_SUT3 的重组菌株对葡萄糖、木糖、山梨糖及乳糖的利用效率较高但无法利用甘露糖与果糖。 Km_STU2 和 Km_STU3 所编码的 2 种糖

转运蛋白均能转运木糖, 具备发酵利用木质纤维素的潜力, 而 Km_SUT2 与 Km_SUT3 相比表现出更强大的转运能力且特异性更好。图 5 和图 6 中酿酒酵母 EBY.VW4000 在 10 种糖的培养基内的 OD_{600} 值均增加了 0.10–0.30 左右, 推测为酵母转接时胞内残存有部分麦芽糖所致。

2.3.2 重组菌株基质消耗动力学

微生物反应过程中消耗的基质主要用于合成新的细胞物质、合成代谢产物和提供能量 3 个方面。通过重组菌株在可利用糖培养基中的生长曲线(OD_{600})及糖消耗曲线, 得到单位时间内单位细胞量消耗的基质糖量, 即基质的比消耗速率 γ 。结果如表 3 所示, 表达 Km_SUT2 的重组酵母对木糖、山梨糖、葡萄糖的利用率较高,



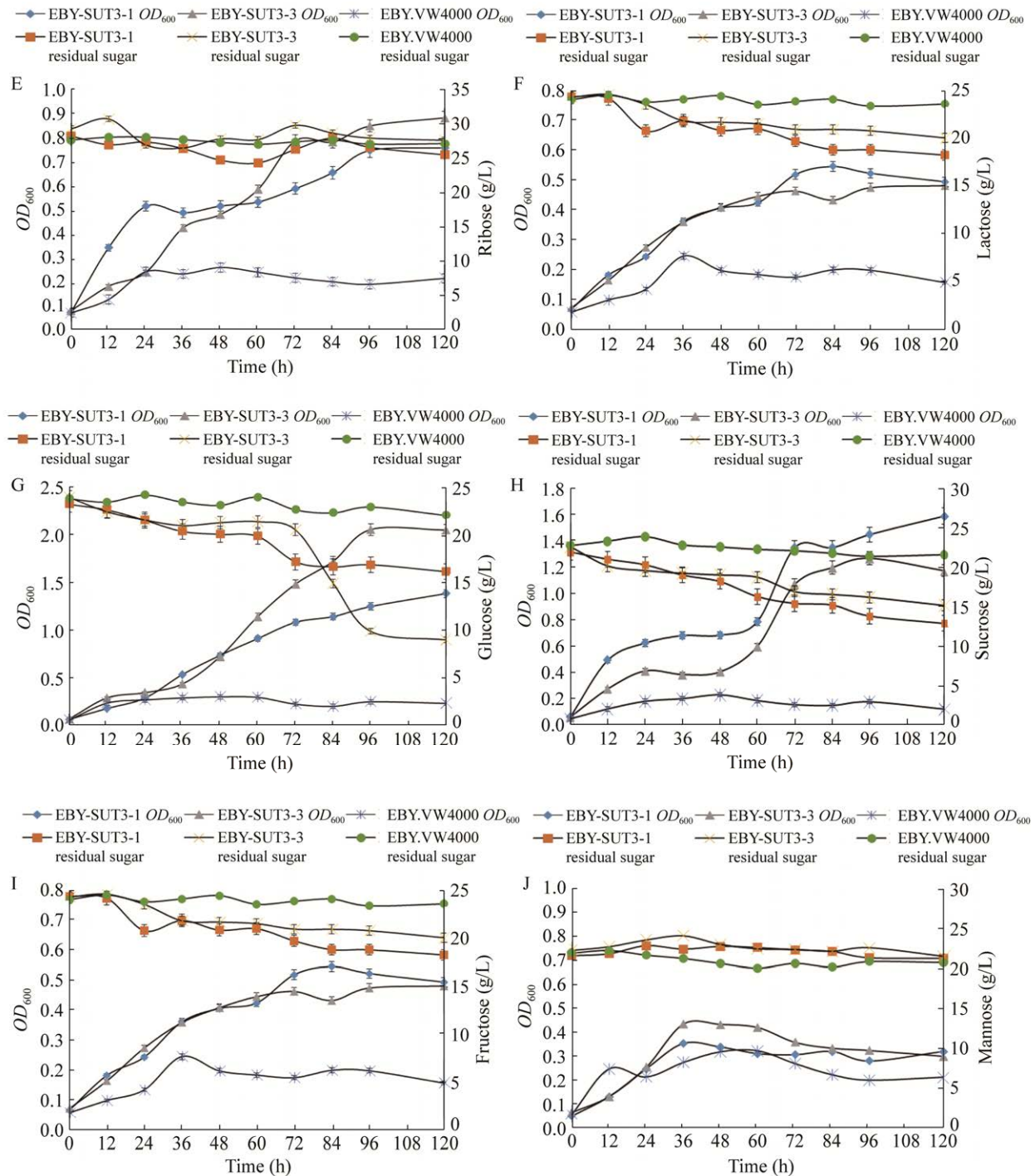


图6 EBY-SUT3-1、EBY-SUT3-3与EBY.VW4000在不同糖培养基中的生长情况 A: 山梨糖. B: 半乳糖. C: 木糖. D: 阿拉伯糖. E: 核糖. F: 乳糖. G: 葡萄糖. H: 蔗糖. I: 果糖. J: 甘露糖

Figure 6 Growth of EBY-SUT3-1, EBY-SUT3-3 and EBY.VW4000 on different sugars medium. A: Sorbose. B: Galactose. C: Xylose. D: Arabinose. E: Ribose. F: Lactose. G: Glucose. H: Sucrose. I: Fructose. J: Mannose.

表 3 重组菌株 EBY-SUT2-1、EBY-SUT2-2、EBY-SUT3-1 和 EBY-SUT3-3 在不同单糖培养基中的糖基质比消耗速率

Table 3 Sugar-substrate specific consumption rate of recombinant strains EBY-SUT2-1, EBY-SUT2-2, EBY-SUT3-1 and EBY-SUT3-3 in different monosaccharide medium ($(\text{g}\cdot\text{h})^{-1}$)

Medium	EBY-SUT2-1	EBY-SUT2-2	EBY-SUT3-1	EBY-SUT3-3
Xylose	0.528 7	0.331 9	0.397 9	0.411 7
Arabinose	0.112 4	0.139 8	0.316 6	0.255 9
Lactose	0.220 5	0.284 2	0.700 8	0.638 8
Ribose	0.235 4	0.228 9	0.317 7	0.559 9
Sorbose	0.481 8	0.214 4	0.115 7	0.179 7
Galactose	—	—	0.196 7	0.047 6
Glucose	0.446 2	0.668 1	0.858 5	0.696 7
Sucrose	—	—	0.286 8	0.202 2

—表示由于 Km_SUT2 不能利用该糖, 因此无对应比消耗速率

— indicates that since Km_SUT2 cannot utilize this sugar, there is no corresponding specific consumption rate.

比消耗速率大小为葡萄糖>木糖>山梨糖, 且木糖比消耗速率与葡萄糖较为接近; 表达 Km_SUT3 的重组酵母对乳糖、核糖、葡萄糖、木糖的利用率较高, 比消耗速率为葡萄糖>乳糖>核糖>木糖, 同时相较于 Km_SUT2 , 表达 Km_SUT3 糖转运蛋白的重组菌株具有更高的葡萄糖利用效率, 但其对木糖的利用效率相对较低。

2.3.3 重组菌株中葡萄糖对可利用糖吸收效率的影响

分别把其他可利用糖与葡萄糖共同添加到 SC-Trp 液体培养基中, 30 °C、200 r/min 培养 5 d, 每隔 12 h 测定菌液的 OD_{600} 值及培养基中葡萄糖和其他糖的残余糖量, 绘制双坐标曲线。结果如图 7、图 8 所示, 重组菌株在混合糖发酵的条件下 OD_{600} 值均可达到 3.0–3.5, 生物量的积累相较于单糖更好, 重组菌株在混合糖利用方面表现得更具优势, 间接表明 2 种糖转运蛋白在转运混合糖的能力更好。表达 Km_SUT3 糖转运蛋白的重组菌株在混合糖条件下对木糖及核糖的比消耗速率均反超表达 Km_SUT2 的重组菌株, 说明 Km_SUT3 对木糖及核糖的转运受葡萄糖抑制的效果比 Km_SUT2 弱, 且木糖的

利用在所有可利用单糖中受葡萄糖抑制最弱。

重组酵母 EBY-SUT2-1、EBY-SUT2-2、EBY-SUT3-1 和 EBY-SUT3-3 在单一糖源和添加葡萄糖的混合糖源条件下 30 °C、200 r/min 液体培养, 根据培养基中菌体的生长情况与糖的消耗情况, 算出单位时间内单位细胞量消耗的基质糖量, 即基质的比消耗速率 γ 。结果如表 4、表 5 所示, 重组菌株在单一糖源时基质的比消耗速率均大于葡萄糖存在时, 说明 Km_SUT2 及 Km_SUT3 编码的糖转运蛋白对这些单糖的利用均受葡萄糖的抑制, 但其中 EBY-SUT3-1、EBY-SUT3-3 对木糖、核糖的利用受葡萄糖抑制较小, 这与上述图 7、图 8 所得结果一致。

3 讨论与结论

本研究鉴定获得的 2 个马克斯克鲁维酵母 GX-UN120 中的糖转运蛋白 Km_SUT2 和 Km_SUT3 经过 SMART 网站的氨基酸序列分析, 发现两者均属于主要易化子超家族(major facilitator superfamily, MFS), 且均具备良好的木糖转运能力。两者在可利用碳源环境下生长均可获得较好的生物量积累, OD_{600} 普遍可达

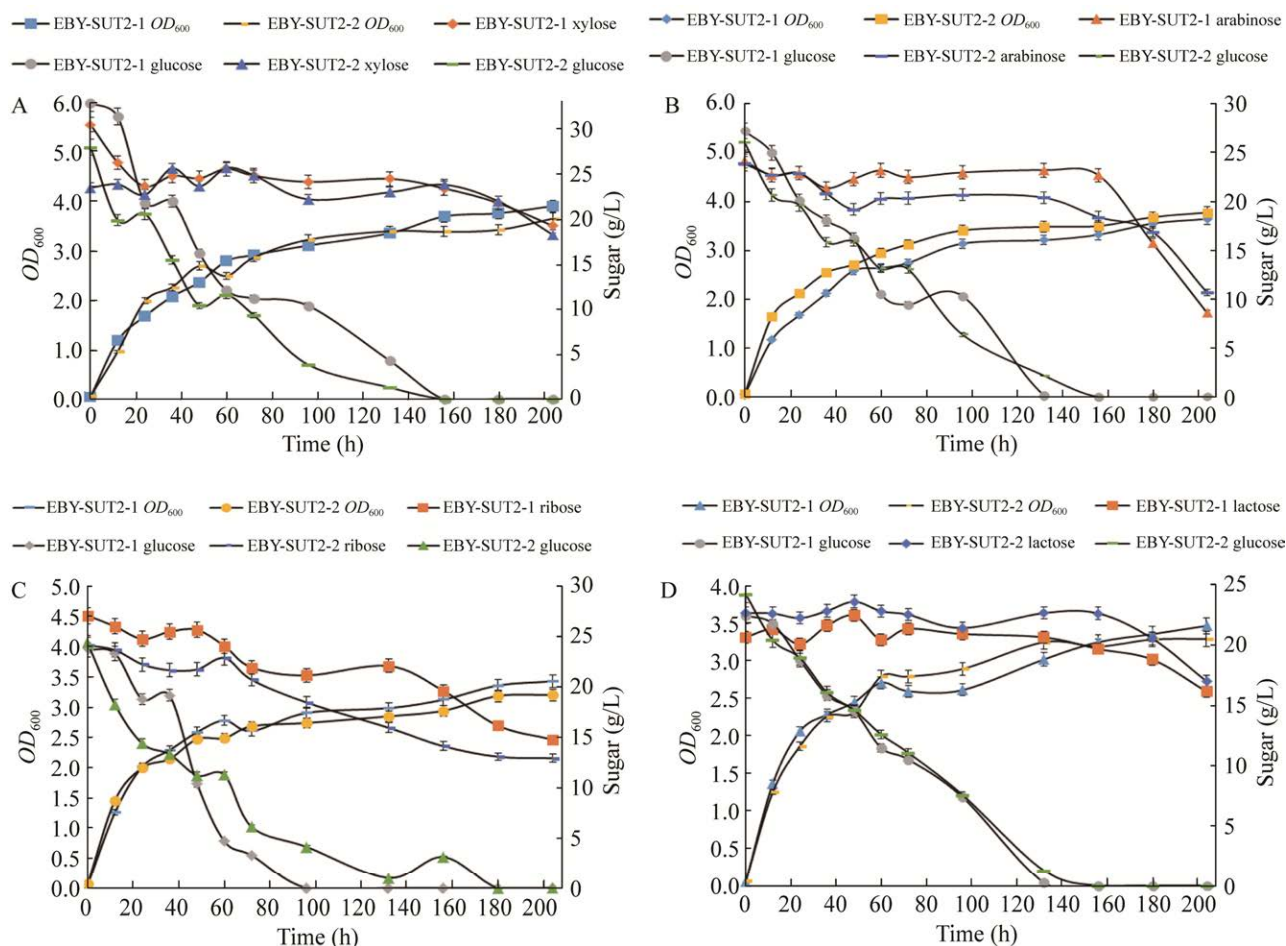


图 7 重组酵母 EBY-SUT2-1、EBY-SUT2-2 在葡萄糖和其他糖培养基中的生长情况 A: 木糖. B: 阿拉伯糖. C: 核糖. D: 乳糖

Figure 7 Recombinants EBY-SUT2-1, EBY-SUT2-2 grow on glucose and other different sugar medium. A: Xylose. B: Arabinose. C: Ribose. D: Lactose.

1.2 以上, 而高婧芳等^[18]鉴定得到的来自木质纤维素降解真菌粗糙脉孢菌的糖转运蛋白 NcHXT-1/2 同样在 EBY.VW4000 中进行异源表达后, 其重组菌株在可利用糖中的 OD_{600} 值最高为 0.8。关于这一点原文中提到粗糙脉孢菌的糖转运蛋白与酿酒酵母自身转运蛋白序列相似度很低, 而马克斯克鲁维酵母转运蛋白与之相比与酿酒酵母相似性更高, 这可能是其转运蛋白在酿酒酵母中表现出性能更好的原因^[18]。与此同时, 本研究中表达 *Km_SUT2* 和 *Km_SUT3*

的重组菌株在混合糖条件下的生物量积累普遍好于单糖情况下, 预示了这 2 种糖转运蛋白在混合糖利用上的潜力。

值得注意的是, 木糖和葡萄糖的同步发酵一直是提高木质纤维素利用效率的关键, 因此能同步利用木糖及葡萄糖的转运蛋白也是研究的重点, 但目前已报道的能同步利用木糖与葡萄糖的转运蛋白很少^[12,19]。Jiang 等^[20]尝试通过定点突变的手段改变氨基酸残基来改变转运蛋白特异性, 并成功获得了不受葡萄糖抑制的木

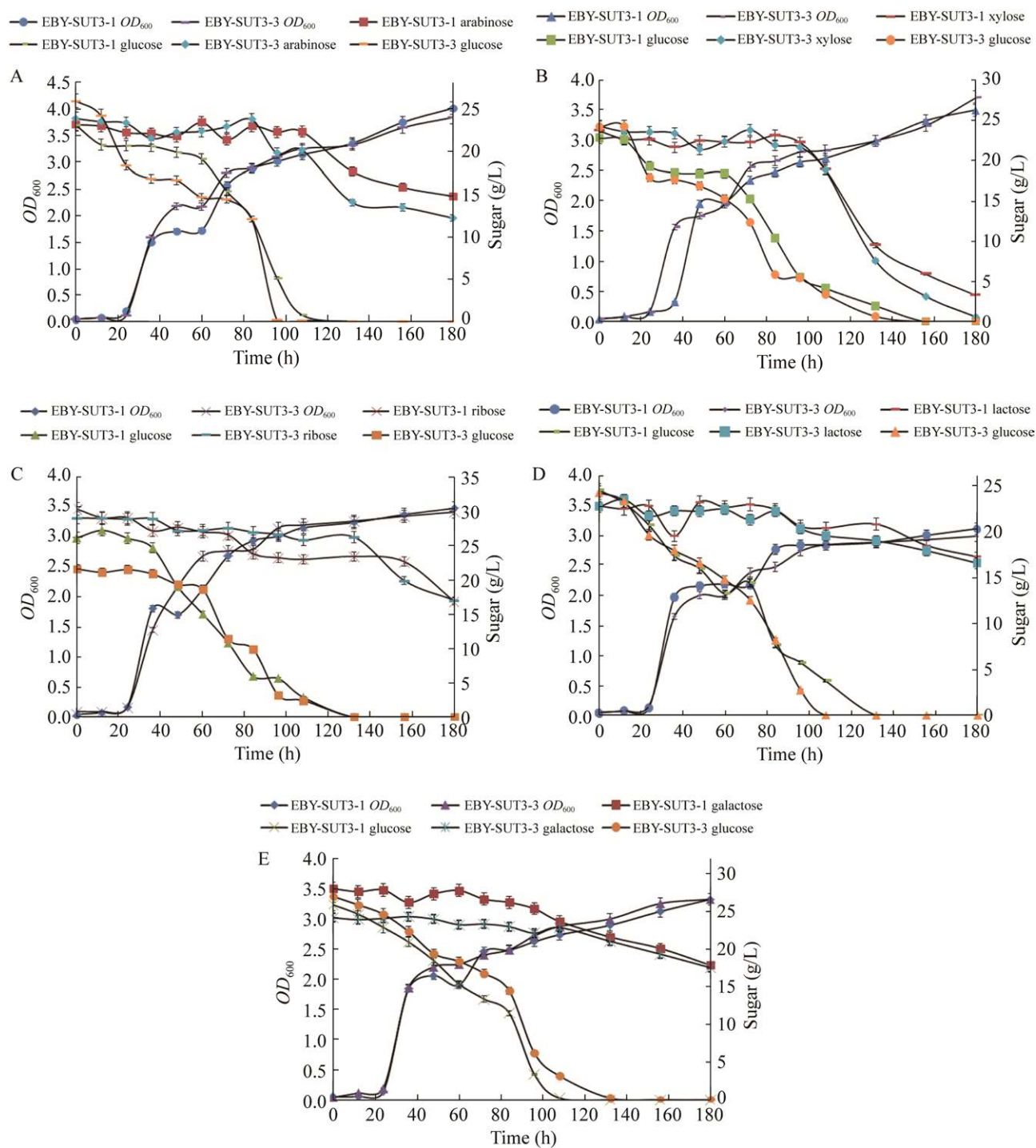


图8 重组酵母 EBY-SUT3-1、EBY-SUT3-3 在葡萄糖和其他糖培养基中的生长情况 A: 阿拉伯糖. B: 木糖. C: 核糖. D: 乳糖. E: 半乳糖

Figure 8 Recombinants EBY-SUT3-1, EBY-SUT3-3 grow on glucose and other different sugar medium. A: Arabinose. B: Xylose. C: Ribose. D: Lactose. E: Galactose.

表 4 重组菌株 EBY-SUT2-1 和 EBY-SUT2-2 在含有等量葡萄糖的培养基中不同单糖的糖基质比消耗速率

Table 4 The specific consumption rate of sugar substrates of different monosaccharides in the medium containing the same amount of glucose by recombinant strains EBY-SUT2-1 and EBY-SUT2-2 ((g·h)⁻¹)

Medium	EBY-SUT2-1	EBY-SUT2-2
Xylose	0.528 7	0.331 9
Xylose+Glucose	0.060 4	0.007 5
Arabinose	0.112 4	0.139 8
Arabinose+Glucose	0.012 3	0.097 3
Lactose	0.220 5	0.284 2
Lactose+Glucose	0.027 4	0.003 8
Ribose	0.235 4	0.228 9
Ribose+Glucose	0.011 1	0.059 3

表 5 重组菌株 EBY-SUT3-1 和 EBY-SUT2-3 在含有等量葡萄糖的培养基中不同单糖的糖基质比消耗速率

Table 5 Specific sugar-substrate consumption rates of different monosaccharides in medium containing equal amounts of glucose by recombinant strains EBY-SUT3-1 and EBY-SUT2-3 ((g·h)⁻¹)

Medium	EBY-SUT3-1	EBY-SUT3-3
Xylose	0.397 9	0.411 7
Xylose+Glucose	0.017 6	0.239 0
Galactose	0.196 7	0.047 6
Galactose+Glucose	0.030 1	0.007 0
Arabinose	0.316 6	0.255 9
Arabinose+Glucose	0.009 6	0.080 6
Lactose	0.700 8	0.638 8
Lactose+Glucose	0.006 2	0.126 0
Ribose	0.317 7	0.559 9
Ribose+Glucose	0.152 0	0.157 9

糖特异性转运蛋白,但同时该转运蛋白完全丧失了葡萄糖转运能力。Kuanyshev 等^[21]通过相似的方式改变了转运蛋白对糖的偏好性,但对混合糖的同步利用机制方面并未进行阐述。本

研究中 *Km_SUT3* 编码的糖转运蛋白在转运木糖及核糖时受葡萄糖抑制作用较弱,而且在葡萄糖浓度为 5 g/L 时木糖利用效率可恢复正常水平。Chattopadhyay 等^[22]于热带假丝酵母中发现的 CTSTP1 转运蛋白也表现出同样的现象,这一性质可能和转运蛋白与木糖及葡萄糖的结合能差距不大有关^[23]。针对 *Km_SUT3* 表现出的同步利用葡萄糖与木糖的这一特性,后续研究拟采用半柔性分子对接、丙氨酸扫描和定点突变等方式对其功能与结构之间的关系进行探究,或许可以探明转运蛋白同步利用葡萄糖和木糖的关键点,为今后木质纤维素的高效利用以及木糖与葡萄糖同步发酵生产乙醇的工业化提供理论基础^[24]。

REFERENCES

- [1] ZUBKOVA V, STROJWAS A, BIELECKI M, KIEUSH L, KOVERYA A. Comparative study of pyrolytic behavior of the biomass wastes originating in the Ukraine and potential application of such biomass. Part 1. Analysis of the course of pyrolysis process and the composition of formed products[J]. Fuel, 2019, 254: 115688.
- [2] RAJ T, KAPOOR M, GAUR R, CHRISTOPHER J, LAMBA B, TULI DK, KUMAR R. Physical and chemical characterization of various Indian agriculture residues for biofuels production[J]. Energy & Fuels, 2015, 29(5): 3111-3118.
- [3] 曹莲莹, 李凯, 李凡, 佟毅, 白凤武, 刘晨光. 木质纤维素乙醇关键技术研究进展[J]. 生物产业技术, 2018(4): 25-32.
CAO LY, LI K, LI F, TONG Y, BAI FW, LIU CG. Progress on key technology of lignocellulosic ethanol[J]. Biotechnology & Business, 2018(4): 25-32 (in Chinese).
- [4] RAJ T, CHANDRASEKHAR K, NARESH KUMAR A, RAJESH BANU J, YOON JJ, KANT BHATIA S, YANG YH, VARJANI S, KIM SH. Recent advances in commercial biorefineries for lignocellulosic ethanol production: current status, challenges and future perspectives[J]. Bioresource Technology, 2022, 344: 126292.

- [5] BAPTISTA M, CUNHA JT, DOMINGUES L. Establishment of *Kluyveromyces marxianus* as a microbial cell factory for lignocellulosic processes: production of high value furan derivatives[J]. Journal of Fungi: Basel, Switzerland, 2021, 7(12): 1047.
- [6] COLORETTI F, CHIAVARI C, LUISE D, TOFALO R, FASOLI G, SUZZI G, GRAZIA L. Detection and identification of yeasts in natural whey starter for Parmigiano Reggiano cheese-making[J]. International Dairy Journal, 2017, 66: 13-17.
- [7] GETHINS L, REA MC, STANTON C, ROSS RP, KILCAWLEY K, O'SULLIVAN M, CROTTY S, MORRISSEY JP. Acquisition of the yeast *Kluyveromyces marxianus* from unpasteurised milk by a kefir grain enhances kefir quality[J]. FEMS Microbiology Letters, 2016, 363(16): fnw165.
- [8] TITTARELLI F, VARELA JA, GETHINS L, STANTON C, ROSS RP, SUZZI G, GRAZIA L, TOFALO R, MORRISSEY JP. Development and implementation of multilocus sequence typing to study the diversity of the yeast *Kluyveromyces marxianus* in Italian cheeses[J]. Microbial Genomics, 2018, 4(2): 1-10.
- [9] 王冬梅, 洪洞. 在耐热的马克斯克鲁维酵母中构建微生物细胞工厂[J]. 生物学杂志, 2020, 37(1): 1-10.
WANG DM, HONG J. Constructing microbial cell factory with thermo-tolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*[J]. Journal of Biology, 2020, 37(1): 1-10 (in Chinese).
- [10] SIVARATHNAKUMAR S, JAYAMUTHUNAGAI J, BASKAR G, PRAVEENKUMAR R, SELVAKUMARI AE, BHARATHIRAJA B. Bioethanol production from woody stem *Prosopis juliflora* using thermo tolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* and its kinetics studies[J]. Bioresource Technology, 2019, 293: 122060.
- [11] CAMPOS BB, DINIZ RHS, da SILVEIRA FA, RIBEIRO Jr JI, FIETTO LG, MACHADO JC, da SILVEIRA WB. Elephant grass (*Pennisetum purpureum* schumach) is a promising feedstock for ethanol production by the thermotolerant yeast *kluyveromyces marxianus* cct 7735[J]. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 2019, 36(1): 43-49.
- [12] DU C, LI YM, XIANG RJ, HE Y, SUN H, WANG HN, YUAN WJ. Co-utilization of multiple lignocellulose-derived sugars and inhibitors by the robust mutant *Kluyveromyces marxianus* through adaptive laboratory evolution[J]. Fuel, 2022, 315: 122816.
- [13] NITIYON S, KEO-UDONE C, MURATA M, LERTWATTANASAKUL N, LIMTONG S, KOSAKA T, YAMADA M. Efficient conversion of xylose to ethanol by stress-tolerant *Kluyveromyces marxianus* BUNL-21[J]. SpringerPlus, 2016, 5(1): 185.
- [14] LERTWATTANASAKUL N, KOSAKA T, HOSOYAMA A, SUZUKI Y, RODRUSSAMEE N, MATSUTANI M, MURATA M, FUJIMOTO N, SUPRAYOGI, TSUCHIKANE K, LIMTONG S, FUJITA N, YAMADA M. Genetic basis of the highly efficient yeast *Kluyveromyces marxianus*: complete genome sequence and transcriptome analyses[J]. Biotechnology for Biofuels, 2015, 8: 47.
- [15] KNOSHAUG EP, VIDGREN V, MAGALHÃES F, JARVIS EE, FRANDEN MA, ZHANG M, SINGH A. Novel transporters from *Kluyveromyces marxianus* and *Pichia guilliermondii* expressed in *Saccharomyces cerevisiae* enable growth on L-arabinose and D-xylose[J]. Yeast, 2015, 32(10): 615-628.
- [16] 金玮璠, 李红. 应用高效复合培养基 M3D 与紫外诱变法筛选高效发酵啤酒酵母菌株[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(5): 50-55. DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.201605009.
JIN WY, LI H. Screening of high efficient fermentation beer yeast strain using high efficient composite medium M3D combined with ultraviolet mutagenesis towards[J]. Food Fermentation and Industry, 2016, 42(5): 50-55. DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.201605009 (in Chinese).
- [17] WIECZORKE R, KRAMPE S, WEIERSTALL T, FREIDEL K, HOLLENBERG CP, BOLES E. Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. FEBS Letters, 1999, 464(3): 123-128.
- [18] 高婧芳, 王邦, 韩晓云, 田朝光. 全基因组水平扫描鉴定粗糙脉孢菌糖转运蛋白及其在酿酒酵母已糖发酵中的评价[J]. 生物工程学报, 2017, 33(1): 79-89.
GAO JF, WANG B, HAN XY, TIAN GT. Genome-wide screening of predicted sugar transporters in *Neurospora crassa* and the application in hexose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2017, 33(1): 79-89 (in

- Chinese).
- [19] DONZELLA L, VARELA JA, SOUSA MJ, MORRISSEY JP. Identification of novel pentose transporters in *Kluyveromyces marxianus* using a new screening platform[J]. FEMS Yeast Research, 2021, 21(4): foab026.
- [20] JIANG Y, SHEN Y, GU LC, WANG ZZ, SU N, NIU KL, GUO W, HOU SL, BAO XM, TIAN CG, FANG X. Identification and Characterization of an Efficient D-Xylose Transporter in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(9).
- [21] KUANYNSHEV N, DEEWAN A, JAGTAP SS, LIU J, SELVAM B, CHEN LQ, SHUKLA D, RAO CV, JIN YS. Identification and analysis of sugar transporters capable of co-transporting glucose and xylose simultaneously[J]. Biotechnology Journal, 2021, 16(11): e2100238.
- [22] CHATTOPADHYAY A, SINGH R, DAS AK, MAITI MK. Characterization of two sugar transporters responsible for efficient xylose uptake in an oleaginous yeast *Candida tropicalis* SY005[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2020, 695: 108645.
- [23] LI HB, SCHMITZ O, ALPER HS. Enabling glucose/xylose co-transport in yeast through the directed evolution of a sugar transporter[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(23): 10215-10223.
- [24] SHARMA NK, BEHERA S, ARORA R, KUMAR S, SANI RK. Xylose transport in yeast for lignocellulosic ethanol production: current status[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2018, 125(3): 259-267.