

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
51(7):914-922; 4 July 2011  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 不同启动子控制下木酮糖激酶的差异表达及其对酿酒酵母木糖代谢的影响

彭炳银<sup>#</sup>, 陈晓<sup>#</sup>, 沈煜<sup>\*</sup>, 鲍晓明

山东大学 微生物技术国家重点实验室 济南 250100

**摘要:** 【目的】以不同强度的启动子控制表达木酮糖激酶基因,并研究其引起的不同木酮糖激酶活性水平对木糖利用酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 代谢流向的影响。【方法】以酿酒酵母 CEN.PK 113-5D 为出发菌株,选择酿酒酵母内源启动子 *TEF1p*, *PGK1p* 和 *HXK2p*,利用 *Cre-loxP* 无标记同源重组系统,置换染色体上木酮糖激酶基因 *XKS1* 的启动子 (*XKS1p*) 序列;并通过附加体质粒引入木糖代谢上游途径,构建不同水平表达木酮糖激酶的木糖利用工程菌株;从木酮糖激酶的转录水平、酶活水平、胞内的 ATP 浓度及木糖代谢等性状,对各菌株进行评价。【结果】转录及酶活测定结果显示,与天然状态相比,所选择的启动子对木酮糖激酶均表现出更强的启动效率。菌株体内表达木酮糖激酶活性水平由高至低的顺序为其基因 *XKS1* 在启动子 *PGK1p*、*TEF1p*、*HXK2p* 和 *XKS1p* 控制下。随着木酮糖激酶的活性的提高,胞内的 ATP 水平下降,而转化木糖生成乙醇的能力上升。最高乙醇产率为 0.35 g/g 消耗的总糖,此时副产物木糖醇产率最低,为 0.18 g/g 消耗的木糖。【结论】通过在染色体上置换启动子,提高了木酮糖激酶的表达水平。在一定范围内,木酮糖激酶的高活性有利于木糖向乙醇的转化。

**关键词:** 酿酒酵母,启动子,木酮糖激酶,木糖,乙醇

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2011) 07-0914-09

随着车用生物燃料乙醇的广泛应用,以谷物为原料的第一代燃料乙醇生产面临原料供需矛盾的挑战,以木质纤维素为原料的第二代燃料乙醇,是解决燃料乙醇规模化应用的根本出路<sup>[1]</sup>。目前经济上盈利的第二代燃料乙醇生产,依然面临许多技术难题,其中之一是木质纤维素的全糖利用。

酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 是传统的乙醇生产菌株,也是第二代燃料乙醇生产研发中备受青睐的微生物。酿酒酵母对葡萄糖有着较高

的乙醇转化效率,但不能有效地利用木质纤维素中含量次丰富的木糖<sup>[2]</sup>。通过代谢工程手段在酿酒酵母中建立木糖代谢途径的研究工作已开展多年,自然界中 2 条转化木糖为木酮糖的木糖最初代谢途径均已在酿酒酵母中建立<sup>[2-6]</sup>。木酮糖经过内源性的木酮糖激酶的磷酸化生成 5-磷酸木酮糖,并通过磷酸戊糖途径进入糖酵解途径,厌氧条件下生成乙醇<sup>[2]</sup>。

木酮糖激酶 (Xylulokinase, XK) 在酿酒酵母的

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30970091, 31070096)

<sup>\*</sup> 通信作者。Tel/Fax: +86-531-88365826; E-mail: shenyu@sdu.edu.cn

作者简介: <sup>#</sup> 并列第一作者。彭炳银 (1986 -), 男, 辽宁人, 硕士研究生, 从事于微生物代谢方向的研究, E-mail: pengbingyin@yahoo.com.cn; 陈晓 (1987 -), 男, 山东人, 硕士研究生, E-mail: xchen\_1987@126.com

收稿日期: 2011-01-03; 修回日期: 2011-03-09

基因组中由 *XKS1* 基因编码<sup>[7]</sup>。研究表明,过表达木酮糖激酶基因可以促进酿酒酵母发酵木酮糖<sup>[8]</sup>,提高木糖发酵的乙醇产率<sup>[9-10]</sup>。Yong-Su Jin 等<sup>[11]</sup>通过以多拷贝和低拷贝载体表达 *XKS1* 基因,控制 *XKS1* 的表达水平,结果显示,过高的 XK 活性抑制酿酒酵母工程菌株对木糖的利用,而适量的 XK 活性可以促进木糖的利用,推测过高的 XK 活性引起胞内 ATP 过度消耗从而抑制细胞对木糖的利用<sup>[11]</sup>。

由于基于附加体质粒的外源基因表达存在潜在的不稳定性,且抗性筛选标记的残留影响菌株的安全性和进一步遗传操作,本文利用 *Cre-loxP* 无标记同源重组系统,以不同的酿酒酵母内源组成型启动子置换染色体上 *XKS1* 基因的启动子(*XKS1p*)序列,从而控制木酮糖激酶基因的表达水平,进而研究不同木酮糖激酶活性水平对胞内 ATP 及木糖代谢流向的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂和仪器:** UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒(上海生工生物工程技术有限公司),无 RNA 酶的 DNA 酶(Promega Corporation),PrimeScript™ 逆转录试剂盒(宝生物工程(大连)有限公司),Realtime PCR Master Mix (SYBR Green) 荧光定量试剂盒(东洋纺(上海)生物科技有限公司),CheckLite 250 plus Kit(Kikkoman Corporation),ATP 荧光法微生物快速检测仪 Lumitester C-110 (Kikkoman Corporation),高效液相色谱仪(Prominence LC-20A)(岛津集团),Aminex HPX-87H 离子交换柱(Bio-Rad Laboratories, Inc.)。

**1.1.2 菌株及质粒:**本文中所用菌株及质粒列于表 1。

表 1 本文所用菌株及质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this work

| Name                                    | Description                                                                                                                    | Source    |
|-----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strains |                                                                                                                                |           |
| CEN. PK 113-5D                          | <i>MATa</i> ; <i>ura3-53</i>                                                                                                   | [12]      |
| BSPC002                                 | CEN. PK 113-5D derivative; (-194, -1) <i>XKS1</i> :: <i>loxP-TEF1p</i>                                                         | This work |
| BSPC004                                 | CEN. PK 113-5D derivative; (-194, -1) <i>XKS1</i> :: <i>loxP-PGK1p</i>                                                         | This work |
| BSPC006                                 | CEN. PK 113-5D derivative; (-194, -1) <i>XKS1</i> :: <i>loxP-HXK2p</i>                                                         | This work |
| BSPC010                                 | CEN. PK 113-5D derivative; {pY7}                                                                                               | This work |
| BSPC012                                 | BSPC002 derivative; {pY7}                                                                                                      | This work |
| BSPC014                                 | BSPC004 derivative; {pY7}                                                                                                      | This work |
| BSPC016                                 | BSPC006 derivative; {pY7}                                                                                                      | This work |
| Plasmids                                |                                                                                                                                |           |
| pUG6                                    | <i>E. coli</i> plasmid with segment <i>LoxP-KanMX4-LoxP</i>                                                                    | [13]      |
| pSH47                                   | shuttle plasmid for <i>E. coli</i> and <i>S. cerevisiae</i> , <i>Cre</i> gene under <i>GAL2</i> regulative regulation promoter | [13]      |
| pY7                                     | 2 $\mu$ , containing <i>XYL1</i> , <i>XYL2</i> genes, optimal XR/XDH expressing ratio for xylose fermentation                  | [14]      |

**1.1.3 培养基:**(1) YPD/YPG 培养基:2% 蛋白胨, 1% 酵母粉, 2% 葡萄糖/半乳糖;必要时添加 200  $\mu$ g/mL G418 用于相应重组菌株筛选及培养。(2) SC-URA 培养基(缺尿嘧啶的完全合成培养基):6.7 g/L 酵母基础氮源(YNB), 0.77 g/L 缺尿嘧啶的氨基酸混合物, 20 g/L 葡萄糖或木糖, pH 6.0。(3) 5-FOA 培养基(5-氟-乳清酸培养基):2 倍 SC-URA 培养基中添加 50 mg/L 尿嘧啶, 1 g/L 5-FOA, pH 6.0 0.2  $\mu$ m 孔径滤膜过滤除菌,使用时加

入等体积 3% 的无菌水琼脂,混合均匀后铺倒平板。(4) DMM/XMM/DXMM(葡萄糖/木糖/葡萄糖木糖混合基本培养基):6.7 g/L 酵母基础氮源, 20 g/L 葡萄糖/20 g/L 木糖/20 g/L 葡萄糖和 20 g/L 木糖, pH 至 6.0。

**1.1.4 引物及 DNA 序列测定:**本文所用引物序列列于表 2 中。引物合成及必要的 DNA 序列测定由上海博尚生物技术有限公司进行合成。

表 2 PCR 引物及其序列

Table 2 PCR Primers

| Primers                                                    | Description             | Sequence (5'→3') <sup>a</sup>                               |
|------------------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------------------------------|
| Amplification of fragment <i>loxP-KanMX4-loxP-Promoter</i> |                         |                                                             |
| XKTEF1ps                                                   | <i>TEF1</i> promoter    | <u>AGTGGCCTATGCACAATGCTACTTTGTACGTTCAAAT</u>                |
| XKTEF1pa                                                   |                         | aacctctctgtctctctgaactgaacacaacatTTTGTAATTAATAACTTAGATT     |
| XKPGK1ps                                                   | <i>PGK1</i> promoter    | <u>CTAGTGGCCTATGCTTTTGGCCTCACCCATAC</u>                     |
| XKPGK1pa                                                   |                         | cctctctgtctctctgaactgaacacaacatTGTTTTATATTGTTGTA            |
| XKHXXK2ps                                                  | <i>HXX2</i> promoter    | <u>CTAGTGGCCTATGCTTGAATAAAGTGCGGGGCT</u>                    |
| XKHXXK2pa                                                  |                         | ctctctgtctctctgaactgaacacaacatTTTATTAATTAGCGTAC             |
| XKKans                                                     | <i>loxP-KanMX4-loxP</i> | aaacaaaacaaccccgatttaataacattgtcacagtaCAGCTGAAGCTTCGTACGCTG |
| Kana                                                       |                         | <u>GCATAGGCCACTAGTGGATCTG</u>                               |
| Fragment validation                                        |                         |                                                             |
| Kans                                                       |                         | CAGCTGAAGCTTCGTACGCTG                                       |
| VXKS1a                                                     |                         | CAAAGTTATGGCCGCTCTCAG                                       |
| Real-time PCR                                              |                         |                                                             |
| RTXKS1s                                                    | <i>XKS1</i>             | TTTACCCCTGCGGAAGAATG                                        |
| RTXKS1a                                                    |                         | GGCAGAGTTGGATGAATGAAAAG                                     |
| RTACT1s                                                    | <i>ACT1</i>             | ATGCAAACCGCTGCTCAA                                          |
| RTACT1a                                                    |                         | AGTTGGTCAATACCGGCAGA                                        |

<sup>a</sup> The bases underlined indicate the complementary sequences between the promoters and the *loxP-KanMX4-loxP* fragment respectively; the bases written in lowercase are the recombinant sequences involved in the substitution of *XKS1* promoter.

## 1.2 启动子整合片段的获得

以酿酒酵母 CEN. PK113-5D 基因组为模板分别扩增出启动子 *TEF1p*、*PGK1p* 和 *HXX2p* 片段(引物见表 2)。以质粒 pUG6 为模板扩增出两端带有 *loxP* 位点的 G418 抗性基因 *KanMX4* 片段 *loxP-KanMX4-loxP*。将每个启动子与 DNA 片段 *loxP-*

*KanMX4-loxP* 通过重叠延伸 PCR 进行融合扩增(图 1), 分别得到 *loxP-KanMX4-loxP-TEF1p* (引物: XKTEF1ps, XKTEF1pa)、*loxP-KanMX4-loxP-PGK1p* (引物: XKPGK1ps, XKPGK1pa) 及 *loxP-KanMX4-loxP-HXX2p* (引物: XKHXXK2ps, XKHXXK2pa) 启动子整合片段。

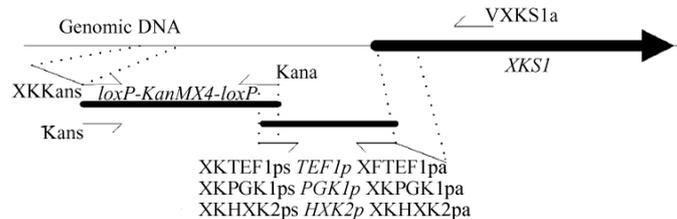


图 1 启动子整合片段的扩增

Fig. 1 Amplification of *loxP-KanMX4-loxP-Promoter* fragment.

## 1.3 不同启动子控制表达木酮糖激酶的菌株构建

将启动子整合片段 *loxP-KanMX4-loxP-TEF1p*、*loxP-KanMX4-loxP-PGK1p* 及 *loxP-KanMX4-loxP-HXX2p* 分别转化酵母 CEN. PK113-5D, 在含有 G418 的 YPD 平板筛选到的转化子, 以表 2 中引物 Kans 和 VXKS1a 进行验证(图 1)。质粒 pSH47 转化重组酵母, 于 SC-URA 培养基平板上筛选到的转化子转接至 YPG 培养基中诱导重组酶 Cre 表达<sup>[13]</sup>, 以去除染色体上的 *KanMX4* 标记基因。去除 *KanMX4* 标记的菌株经 YPD 培养过夜后在 5-FOA 培养基平板上

筛选消除质粒 pSH47 的菌株。向消除了各筛选标记的不同启动子控制的木酮糖激酶菌株中分别转入将带有木糖还原酶(XR)及木糖醇脱氢酶(XDH)基因(*XYL1*, *XYL2*)的质粒 pY7, 得到表达不同水平木酮糖激酶的木糖代谢工程菌株(表 1)。

## 1.4 木酮糖激酶转录水平分析

收集在 YPD 中培养至  $OD_{600}$  在 0.8 到 1.0 之间, 处于对数期的酿酒酵母菌体细胞, 提取菌株总 RNA。将 DNA 酶处理后的 RNA 进行逆转录反应, 终反应液用时实荧光定量 PCR 进行转录水平分析。

具体操作过程参考相关公司试剂的说明书。所用引物见表 2, 内参基因为 *ACT1*, 数据通过  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法<sup>[15]</sup> 计算。

### 1.5 木酮糖激酶活测定

木酮糖激酶的 1 个酶活性单位定义为 1 分钟内磷酸化 1 微摩尔木酮糖所需的酶量。酶活测定参照 Eliasson 等<sup>[3]</sup> 所报道的方法进行。通过检测 NADH 氧化速率反映木酮糖磷酸化速率。NADH 的浓度变化通过在 30℃ 条件在 340 nm 波长下实时单位时间吸光度变化值进行推算。

### 1.6 胞内 ATP 的测定

收集在 XMM 中培养至对数生长期末期的适量菌体, 用无菌水洗两次, 收集菌体用于 ATP 测定。使用 CheckLite 250 plus 试剂盒裂解细胞并测定 ATP 浓度, 荧光强度以 Lumitester C-110 仪器检测。

### 1.7 利用木糖生长实验

液体生长实验, 菌株在 DMM 培养基转接 2 次, 活化培养至对数生长中后期, 转接至 XMM 培养基, 在 30℃、200 r/min 的摇床进行培养, 并定时取样测定  $OD_{600}$ , 以测定菌株的生长状况。平板点滴实验, 制备菌株的休止细胞, 起始细胞密度  $OD_{600}$  调至 1, 并 10 倍梯度稀释点滴至 XMM 培养基固体平板, 30℃ 培养 4 天, 观察菌落生长情况。

### 1.8 木糖葡萄糖共发酵

菌株在 DXMM 培养基中转接 2 次, 培养至对数生长中后期, 离心收集菌体, 转接至装有 50 mL DXMM 培养基的 100 mL 三角瓶中, 使用水封橡胶塞 (带有通入水中的出气口) 以限制氧气的供量<sup>[16]</sup>。30℃ 200 r/min 的摇床进行培养 72 h, 定时取样用于代谢物分析。

### 1.9 代谢产物分析

分批发酵中的样品通过 0.45 微米的微孔滤膜过滤后保存于 -20℃ 待后继分析。样品中的葡萄

糖、木糖、木糖醇、甘油、乙酸和乙醇的浓度通过 HPLC 进行检测。HPLC 采用高效液相色谱仪 (Prominence LC-20A)。层析柱使用 Aminex HPX-87H 离子交换柱, 流动相为 5 mmol/L  $H_2SO_4$ , 流速为 0.6 mL/min, 分析在 45℃ 进行, 用 RID-10A 检测器进行检测。

## 2 结果

### 2.1 木酮糖激酶在酿酒酵母中表达水平及对胞内 ATP 的影响

为了控制木酮糖激酶基因的不同表达水平, 参照基因芯片数据 (GEO: GDS2267) 以及酵母基因组数据库 (Saccharomyces Genome Database) 提供的 pol II occupation 分析<sup>[17]</sup>, 选择了 3 个强度不同的启动子, 转录延伸因子基因启动子 (*TEF1p*), 磷酸甘油酸激酶基因启动子 (*PGK1p*) 和己糖激酶基因启动子 (*HXK2p*) 的启动子, 并用这些启动子置换 *XKS1* 基因上游启动子区域 (*XKS1p*) (图 1), 通过引入带有木糖还原酶 (XR) 及木糖醇脱氢酶 (XDH) 基因 (*XYL1*, *XYL2*) 的质粒 pY7 在菌株中建立 XR-XDH 木糖代谢途径。利用 *XKS1p*、*TEF1p*、*PGK1p* 和 *HXK2p* 表达 *XKS1* 的木糖代谢工程菌分别命名为 BSPC010、BSPC012、BSPC014 和 BSPC016 (表 1)。

木酮糖激酶基因转录水平和菌株中木酮糖激酶活性测定结果 (表 3) 显示, 与其天然启动子相比, 在所选择启动子控制下的 *XKS1* 的转录和表达水平都有明显提高。其中, *TEF1* 启动子控制下的 *XKS1* 显示出最高的转录水平, 而 *PGK1* 启动子控制下表达 *XKS1* 的菌株显示出最高的酶活水平。胞内 ATP 水平与木酮糖激酶的活性水平呈负相关, 其中天然启动子控制 *XKS1* 表达的菌株 BSPC010 木酮糖激酶活性最低, 胞内 ATP 水平最高。

表 3 木酮糖激酶的表达及胞内 ATP 水平

Table 3 Expressional level of xylulokinase and intracellular ATP level

| Strains | Promoter controlling <i>XKS1</i> | Fold-change for <i>XKS1</i> mRNA comparing to BSPC010 (Real Time PCR) <sup>a, b</sup> | Xylulokinase activity <sup>a</sup> (U/mg total protein) | Intracellular level of ATP <sup>a</sup> ( $\mu$ mol/g biomass) |
|---------|----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| BSPC010 | native promoter                  | 1                                                                                     | 0.07 ± 0.00                                             | 9.42                                                           |
| BSPC012 | <i>TEF1</i> promoter             | 48 ± 6                                                                                | 0.16 ± 0.01                                             | 5.67                                                           |
| BSPC014 | <i>PGK1</i> promoter             | 35 ± 9                                                                                | 0.20 ± 0.01                                             | 3.28                                                           |
| BSPC016 | <i>HXK2</i> promoter             | 11 ± 2                                                                                | 0.10 ± 0.03                                             | 6.37                                                           |

a. Values are given as the average and experimental deviation of two independent experiments. b. Values are calculated by  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method<sup>[15]</sup>.

## 2.2 木酮糖激酶水平对酿酒酵母利用木糖生长的影响

分别在液体培养基和固体平板上测试了工程菌株以木糖为唯一碳源的生长能力(图2)。替换启动子过表达木酮糖激酶的工程菌株利用木糖生长的能力均强于利用天然启动子控制 *XKS1* 表达的菌株 BSPC010。各工程菌株在木糖上的生长能力由高到低依次为 BSPC012、BSPC016、BSPC014、BSPC010。这显示了在一定范围之内较高的木酮糖激酶活性有利于菌株利用木糖生长,而过高的活性会对菌株在木糖上的生长起到抑制作用。

## 2.3 木酮糖激酶水平对木糖代谢的影响

以葡萄糖和木糖为碳源进行共发酵,测试发酵过程中糖的利用和代谢产物的生成情况。各菌株均在 15 h 内将葡萄糖消耗尽,具体糖利用和产物生成结果(表4)显示,木酮糖激酶过表达的菌株对木糖的发酵能力都有所提高,且木酮糖激酶的酶活水平与乙醇产率(Ethanol Yield)呈正相关与副产物木糖醇产率(Xylitol Yield)呈负相关。体内木酮糖活性最高的菌株 BSPC014 利用的木糖次高,但木糖醇产率最低,乙醇产率最高,为 0.35 g/g 总糖消耗。

表4 葡萄糖和木糖限氧分批共发酵的糖利用和产物生成

Table 4 Sugar consumption and product production in oxygen-limited batch co-fermentations of glucose and xylose

| Strains | Consumed Glucose (g/L) | Consumed Xylose (g/L) | Produced Ethanol (g/L) | Xylitol Yield on Consumed Xylose (g/g) | Glycerol Yield on Consumed total sugars (g/g) | Acetate Yield on Consumed total sugars (g/g) | Ethanol Yield on Consumed total sugars (g/g) |
|---------|------------------------|-----------------------|------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|
| BSPC010 | 19.00 ± 0.08           | 7.94 ± 0.24           | 7.71 ± 0.17            | 0.61 ± 0.03                            | 0.019 ± 0.004                                 | 0.048 ± 0.012                                | 0.28 ± 0.01                                  |
| BSPC012 | 19.04 ± 0.09           | 13.16 ± 0.20          | 10.47 ± 0.15           | 0.35 ± 0.05                            | 0.035 ± 0.003                                 | 0.013 ± 0.002                                | 0.33 ± 0.00                                  |
| BSPC014 | 19.00 ± 0.05           | 11.42 ± 0.05          | 10.74 ± 0.05           | 0.18 ± 0.04                            | 0.043 ± 0.010                                 | 0.018 ± 0.002                                | 0.35 ± 0.00                                  |
| BSPC016 | 18.97 ± 0.11           | 12.17 ± 1.16          | 9.99 ± 0.23            | 0.40 ± 0.05                            | 0.032 ± 0.001                                 | 0.018 ± 0.003                                | 0.32 ± 0.01                                  |

Values are given as the average and experimental deviation of two independent batch fermentations.

表5 葡萄糖和木糖的限氧分批共发酵的代谢物比利用/生成速率

Table 5 Specific consumption/production rate of metabolites in oxygen-limited batch co-fermentations of glucose and xylose

| Strains                                           | $r_{\text{Glucose}}$ (mmol/g biomass/h) | $r_{\text{Xylose}}$ (mmol/g biomass/h) | $r_{\text{Xylitol}}$ (mmol/g biomass/h) | $r_{\text{Glycerol}}$ (mmol/g biomass/h) | $r_{\text{Acetate}}$ (mmol/g biomass/h) | $r_{\text{Ethanol}}$ (mmol/g biomass/h) | Carbon Recovery |
|---------------------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------|
| Glucose-xylose co-fermentation phase <sup>a</sup> |                                         |                                        |                                         |                                          |                                         |                                         |                 |
| BSPC010                                           | 6.95 ± 0.15                             | 0.93 ± 0.17                            | 0.44 ± 0.04                             | 0.65 ± 0.02                              | 0.35 ± 0.07                             | 10.81 ± 0.54                            | 0.91 ± 0.03     |
| BSPC012                                           | 7.01 ± 0.05                             | 1.06 ± 0.04                            | 0.09 ± 0.00                             | 0.86 ± 0.07                              | 0.26 ± 0.01                             | 11.79 ± 0.01                            | 0.93 ± 0.01     |
| BSPC014                                           | 6.91 ± 0.02                             | 1.00 ± 0.02                            | 0.04 ± 0.00                             | 0.83 ± 0.08                              | 0.27 ± 0.02                             | 11.17 ± 0.65                            | 0.90 ± 0.05     |
| BSPC016                                           | 7.17 ± 0.12                             | 1.12 ± 0.14                            | 0.16 ± 0.00                             | 0.87 ± 0.05                              | 0.29 ± 0.00                             | 11.69 ± 0.14                            | 0.91 ± 0.03     |
| Xylose fermentation phase <sup>b</sup>            |                                         |                                        |                                         |                                          |                                         |                                         |                 |
| BSPC010                                           |                                         | 0.34 ± 0.01                            | 0.22 ± 0.01                             | -0.03 ± 0.01                             | 0.14 ± 0.04                             | 0.18 ± 0.01                             | 0.92 ± 0.05     |
| BSPC012                                           |                                         | 0.59 ± 0.00                            | 0.24 ± 0.04                             | 0.00 ± 0.02                              | 0.03 ± 0.01                             | 0.52 ± 0.02                             | 0.87 ± 0.04     |
| BSPC014                                           |                                         | 0.53 ± 0.00                            | 0.11 ± 0.00                             | 0.03 ± 0.02                              | 0.04 ± 0.01                             | 0.69 ± 0.07                             | 0.89 ± 0.05     |
| BSPC016                                           |                                         | 0.56 ± 0.04                            | 0.25 ± 0.01                             | -0.01 ± 0.00                             | 0.05 ± 0.01                             | 0.50 ± 0.06                             | 0.91 ± 0.01     |

Values are given as the average and experimental deviation of two independent batch fermentations.  $r$ : Specific consumption rate of glucose or xylose; Specific production rate of xylitol, glycerol, acetate or ethanol. a. The phase when glucose and a fraction of xylose were used. b. The phase after glucose depletion

发酵过程中的底物比利用速率和产物比生成速率(表5)表明,过表达木酮糖激酶的工程菌株在葡萄糖木糖共发酵阶段,各菌株间实际进入中心代谢的木糖比代谢速率均在 0.96 mmol/g biomass/h 左右(表5中木糖比利用速率  $r_{\text{Xylose}}$  与木糖醇比生成速率  $r_{\text{Xylitol}}$  的差值);而在木糖发酵阶段,实际进入中心代谢的木糖比代谢速率及乙醇比生成速率均与木酮糖激酶的水平呈正相关(图3)。但是过高的木酮糖激酶活性降低酵母对木糖的比利用速率且提高副产

物乙酸的比生成速率(图4)。

## 3 讨论

本文利用 *Cre-loxP* 重组系统在酿酒酵母染色体上以启动子 *TEF1p*, *PGK1p* 和 *HXK2p* 替换木酮糖激酶编码基因 *XKS1* 天然启动子 *XKS1p* 区域,在不同水平上稳定过表达木酮糖激酶,并且去除抗性筛选标记 *KanMX4* 基因,这样的遗传操作系统也同样适

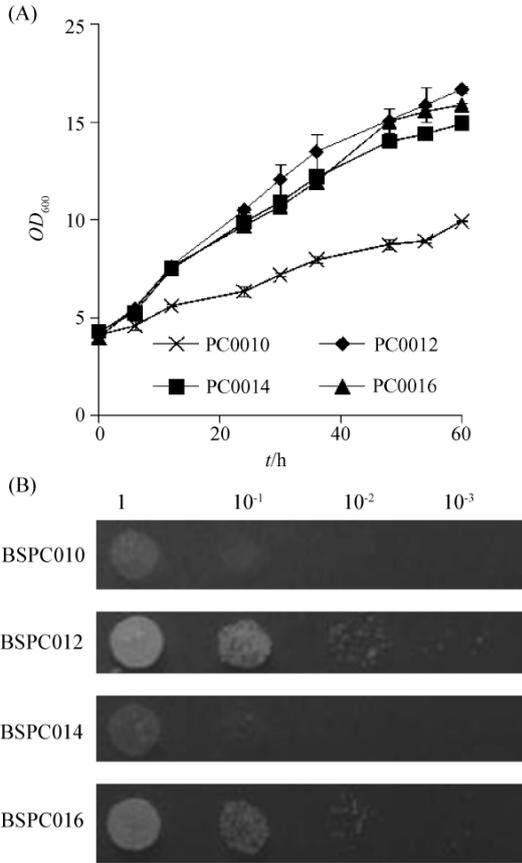


图2 菌株以木糖为唯一碳源的生长  
Fig.2 Growth on xylose. A: flask-shaking experiments; B: plate drop tests.

用于野生型的工业酿酒酵母菌株。替换了启动子的 *XKS1* 转录和表达水平都有明显提高,但转录水平 (Real Time PCR) 与酶的活性的变化趋势不尽相同, *TEF1* 启动子控制下的 *XKS1* 显示出最高的转录水平,而 *PGK1* 启动子控制下 *XKS1* 显示出最高的酶活水平。这种差异可能是 mRNA 稳定性不同或者 (并且) 5'端非编码区 (5'UTR) 影响蛋白质翻译所致。

强化木酮糖激酶的表达可以促进木酮糖转变成 5-磷酸木酮糖,从而使其进入中心代谢并向乙醇转化。理论上三分子木酮糖可发酵生成五分子乙醇同时伴有五分子 ATP 的生成<sup>[4]</sup>。然而对各工程菌株胞内的 ATP 水平的研究表明,胞内木酮糖激酶活性越高,ATP 水平越低(表 3)。这说明了进入中心代谢的木酮糖并非仅仅通过 ATP 生成的途径代谢。表达木糖还原酶和木糖醇脱氢酶的菌株代谢木糖时存在辅酶氧化不平衡问题。发酵的结果显示高的木酮糖激酶活降低木糖醇的产率(表 3 和表 4)。这说明了木酮糖激酶的加强也促进了木糖醇向木酮糖的

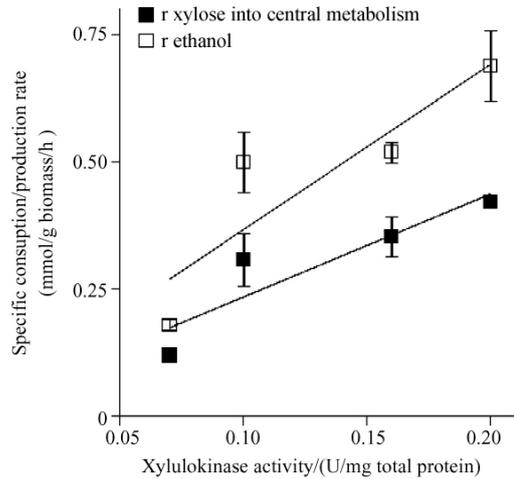


图3 木糖发酵阶段,木酮糖激酶比酶活与进入中心代谢的木糖比代谢速率和乙醇比生成速率的关系  
Fig. 3 Correlation between xylulokinase activity and specific metabolic rate of xylose that fluxes into central metabolism (*r* xylose into central metabolism) or specific production rate of ethanol (*r* ethanol) during xylose fermentation phase

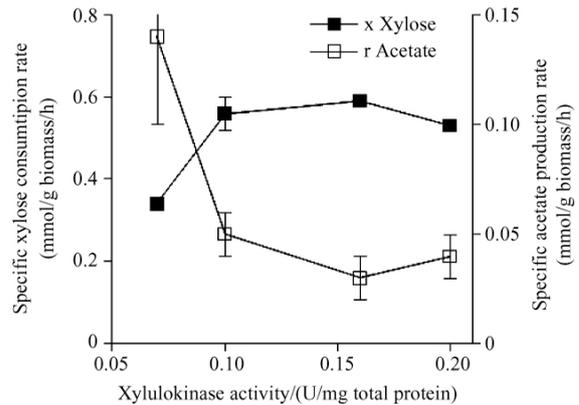


图4 木糖发酵阶段,木酮糖激酶比酶活与木糖比利用速率和乙酸比生成速率关系  
Fig. 4 Correlation between xylulokinase activity and specific consumption rate of xylose (*r* xylose) or specific production rate of acetate acid (*r* acetate) during xylose fermentation phase.

转化,而这会加剧胞内 NADH 积累。酵母可以通过生成甘油再氧化胞内多余的 NADH。葡萄糖木糖共发酵的结果显示,在木糖利用阶段,木酮糖激酶活性最高的菌株 (BSPC014) 的甘油比生成速率最高,其次为 BSPC012、BSPC016 和 BSPC010 (表 5),而木糖向甘油的转化是 ATP 消耗的过程<sup>[4]</sup>,其会导致 ATP 水平下降。另一方面,酵母本身较弱的戊糖磷酸途径会限制 5-磷酸木酮糖进入糖酵解<sup>[11]</sup>,从而影响 ATP 的生成。总之,胞内 ATP 水平是细胞中复杂的

代谢网络相互影响相互平衡的结果。

菌株以木糖为唯一碳源的生长能力的评估结果显示,虽然与出发菌株相比,木酮糖激酶的酶活水平提高可以促进菌株利用木糖的生长,但两者并不呈现完全的正相关关系,菌株 BSPC014 的木酮糖激酶的活性水平最高(表 3),利用木糖生长的能力却稍逊。Yong-Su Jin 等人<sup>[11]</sup>认为表达过高水平的木酮糖激酶可能会降低细胞内的 ATP 水平从而影响菌体的生长。本文的结果也支持这种观点,较高的木酮糖激酶水平可以促进菌株利用木糖生长,但过高的木酮糖激酶水平通过降低胞内的 ATP 水平反而影响细胞利用木糖的生长能力。

葡萄糖木糖共发酵代谢产物的分析结果表明,高木酮糖激酶活性促进木糖进入中心代谢,减少木糖醇的积累,促进乙醇生成。但利用木糖生长的能力及木糖的利用率并不完全与木酮糖激酶的活性呈正相关,一方面,高木酮糖激酶活性在促进木糖经该步反应进入中心代谢途径的同时也可使胞内的 ATP 降低,而胞内低的 ATP 水平可以促进糖酵解途径反应的进行<sup>[18]</sup>,从而增加乙醇的产量。另一方面,细胞的生长代谢不仅仅受胞内的 ATP 水平影响,胞内的 NADPH 水平也与细胞的生长,及木糖的还原和乙酸的生成相关<sup>[19]</sup>。胞内高的 NADPH/NADP 比率有利于木糖的还原反应,但不利于乙酸的生成反应。因此木糖的比利用速率和乙酸的比生成速率的变化可以反映细胞内 NADPH/NADP 比率的变化。以木糖为碳源的情况下,木糖代谢流进入糖酵解途径后不仅需要流向乙醇以维持细胞生长对能量的需求,也需经糖异生途径生成葡萄糖-6-磷酸进入戊糖磷酸途径以维持细胞对 NADPH 的需求。推测低的 ATP 水平促使糖酵解途径的加强,从而进入糖异生途径的碳流减少使得胞内 NADPH 水平降低,进而削弱了细胞的生长及木糖的利用能力,但强化了副产物乙酸的产生。因此,木酮糖激酶可能通过影响进入中心代谢途径中的碳流,及胞内 ATP 和 NADPH 水平等多方面因素而影响酵母对木糖的利用。

木糖是木质纤维素原料中含量次高的单糖,其有效利用可以大幅度提高原料利用率。本文研究了利用不同启动子表达不同水平的木酮糖激酶从而对

木糖代谢产生的影响。证实,在适度水平下较高的木酮糖激酶水平更有利用木糖向乙醇的转化,并且酵母对木糖的发酵能力不仅仅决定于木酮糖激酶的表达水平,也受其它因素影响,比如体内涉及辅酶的反应途径<sup>[20]</sup>和细胞能量水平。通过对这些机理的探寻,对木糖代谢工程菌株构建,进一步提高木糖发酵的速率和效率有很好的指导作用。

致谢 感谢 Johann Wolfgang Goethe-University Frankfurt 的 Peter Kötter 博士馈赠菌株 CEN. PK113-5D。

## 参考文献

- [1] 曲音波. 纤维素乙醇产业化. 化学进展 (*Progress in Chemistry*), 2007, 19(0708): 1098-1108.
- [2] Jeffries TW, Jin YS. Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 63(5): 495-509.
- [3] Eliasson A, Christensson C, Wahlbom C, Hahn-Hägerdal B. Anaerobic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* carrying *XYL1*, *XYL2*, and *XKS1* in mineral medium chemostat cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(8): 3381-3386.
- [4] Kuyper M, Winkler AA, van Dijken JP, Pronk JT. Minimal metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: a proof of principle. *FEMS Yeast Research*, 2004, 4(6): 655-664.
- [5] Wang Y, Shi WL, Liu XY, Shen Y, Bao XM, Bai FW, Qu YB. Establishment of a xylose metabolic pathway in an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 2004, 26(11): 885-890.
- [6] 沈煜, 王颖, 鲍晓明, 曲音波. 酿酒酵母木糖发酵酒精途径工程的研究进展. 生物工程学报 (*Chinese Journal of Biotechnology*), 2003, 19(5): 636-640.
- [7] Rodriguez-Peña JM, Cid VJ, Arroyo J, Nombela C. The YGR194c (*XKS1*) gene encodes the xylulokinase from the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, 1998, 162(1): 155-160.
- [8] Richard P, Toivari MH, Penttilä M. The role of xylulokinase in *Saccharomyces cerevisiae* xylose catabolism. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, 190(1): 39-43.

- [9] 沈煜,郑华军,王颖,鲍晓明,曲音波,白凤武. 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. *生物化学与生物物理进展 (Progress in Biochemistry and Biophysics)*, 2004, 31(8): 746-751.
- [10] Johansson B, Christensson C, Hobbey T, Hahn-Hägerdal B. Xylulokinase overexpression in two strains of *Saccharomyces cerevisiae* also expressing xylose reductase and xylitol dehydrogenase and its effect on fermentation of xylose and lignocellulosic hydrolysate. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(9): 4249-4255.
- [11] Jin YS, Ni H, Laplaza JM, Jeffries TW. Optimal growth and ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* require moderate D-xylulokinase activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(1): 495-503.
- [12] Entian KD, Kötter P. 23 Yeast mutant and plasmid collections. *Methods in Microbiology*, vol. 26. London, United Kingdom: Academic Press, 1998: 431-449.
- [13] Güldener U, Heck S, Fiedler T, Beinhauer J. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Research*, 1996, 24(13): 2519-2524.
- [14] Walfridsson M, Anderlund M, Bao X, Hahn-Hägerdal B. Expression of different levels of enzymes from the *Pichia stipitis* *XYL1* and *XYL2* genes in *Saccharomyces cerevisiae* and its effects on product formation during xylose utilisation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1997, 48(2): 218-224.
- [15] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [16] Hou J, Shen Y, Li XP, Bao XM. Effect of the reversal of coenzyme specificity by expression of mutated *Pichia stipitis* xylitol dehydrogenase in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Letters in Applied Microbiology*, 2007, 45(2): 184-189.
- [17] Steinmetz EJ, Warren CL, Kuehner JN, Panbehi B, Ansari AZ, Brow DA. Genome-wide distribution of yeast RNA polymerase II and its control by Sen1 helicase. *Molecular Cell*, 2006, 24(5): 735-746.
- [18] Larsson C, Nilsson A, Blomberg A, Gustafsson L. Glycolytic flux is conditionally correlated with ATP concentration in *Saccharomyces cerevisiae*: a chemostat study under carbon- or nitrogen-limiting conditions. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(23): 7243-7250.
- [19] Bruinenberg PM, Van Dijken JP, Scheffers WA. A theoretical analysis of NADPH production and consumption in yeasts. *Journal of General Microbiology*, 1983, 129: 953-964.
- [20] Bengtsson O, Hahn-Hägerdal B, Gorwa-Grauslund MF. Xylose reductase from *Pichia stipitis* with altered coenzyme preference improves ethanolic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*, 2009, 2: 9.

# Effect of controlled overexpression of xylulokinase by different promoters on xylose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*

Bingyin Peng<sup>#</sup>, Xiao Chen<sup>#</sup>, Yu Shen<sup>\*</sup>, Xiaoming Bao

The State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China

**Abstract:** [ **Objective** ] To investigate xylose metabolism in the *Saccharomyces cerevisiae* stains overexpressing the xylulokinase gene *XKS1* at different levels by replacing the promoter in the chromosome. [ **Methods** ] Based on *S. cerevisiae* CEN. PK 113-5D, we constructed xylose-metabolizing strains where the promoter of xylulokinase gene *XKS1* was replaced by *TEF1* promoter, *PGK1* promoter and *HXK2* promoter on the chromosome. We quantitated the transcriptional level of *XKS1* gene (accumulated mRNA) and measured the activity of xylulokinase in each stains. Furthermore, we also determined the intracellular level of ATP and evaluated the xylose-fermenting abilities of the engineered strains. [ **Results** ] The engineered strains exhibited higher expression of xylulokinase than the parental strain at both transcription and enzyme activity levels. The highest xylulokinase activity was observed in the strain whose *XKS1* was controlled by *PGK1p*, and was decreasingly followed by the strains whose *XKS1* was controlled by *TEF1p*, *HXK2p* and native promoter. The expression level of xylulokinase negatively correlated with intracellular level of ATP and positively correlated with ability of ethanol production from xylose. The highest ethanol yield was 0.35 g/g consumed sugars while the lowest xylitol yield, which was 0.18 g/g consumed xylose, was observed. [ **Conclusion** ] By promoter replacement, xylulokinase was overexpressed at different levels. In this work, higher expressional level of xylulokinase improved the conversion of xylose to ethanol.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*, promoter, xylulokinase, xylose, ethanol

( 本文责编:王晋芳 )

---

Supported by National Natural Science Foundation of China (30970091, 31070096)

<sup>\*</sup> Corresponding author. Tel: +86-531-88365826; Fax: +86-531-88365826; E-mail: shenyu@sdu.edu.cn

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

Received: 3 January 2011/Revised: 9 March 2011