



可同化阿拉伯糖的木糖还原酿酒酵母菌株构建

黄河浪^{1,2}, 刁于真^{1,2}, 杨白雪^{1,2}, 夏子渊^{1,2}, 汤岳琴^{1,2*}

¹ 四川大学建筑与环境学院, 四川 成都 610065

² 四川省环境保护有机废弃物资源化利用重点实验室, 四川 成都 610065

摘要: 【目的】以秸秆等木质纤维素类生物质为原料生产液体生物燃料乙醇, 目前生产成本低, 大规模工业化生产尚有较大难度。构建能同化阿拉伯糖进行木糖还原生产木糖醇的重组酿酒酵母菌株, 以实现原料中全糖利用、生产高附加值产品, 实现产品多元化。【方法】首先, 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术依次向出发菌株中导入阿拉伯糖代谢途径和木糖还原酶基因, 使菌株获得代谢阿拉伯糖和将木糖转化为木糖醇的能力; 其次, 通过适应性驯化的进化工程手段, 提高重组菌株对阿拉伯糖的利用效率; 最后, 通过混合糖发酵验证重组菌株利用阿拉伯糖和还原木糖产木糖醇的能力。【结果】通过导入植物乳杆菌的阿拉伯糖代谢途径, 酿酒酵母菌株获得了较好的利用阿拉伯糖生长繁殖的能力; 进一步导入假丝酵母的木糖还原酶基因后, 重组菌株在葡萄糖作为辅助碳源条件下可高效还原木糖产木糖醇, 但阿拉伯糖的利用能力下降。利用以阿拉伯糖为唯一碳源的培养基进行反复批次驯化, 阿拉伯糖的利用能力得以恢复和提升, 得到表型较好的重组菌株 KAX3-2。该菌株在木糖(50 g/L)和阿拉伯糖(20 g/L)混合糖发酵条件下发酵 72 h 时, 对阿拉伯糖和木糖利用率分别达到 42.1%和 65.9%, 木糖醇的收率为 64%。【结论】本研究成功构建了一株能有效利用阿拉伯糖并能将木糖转化为木糖醇的重组酿酒酵母菌株 KAX3-2, 为后续构建、获得阿拉伯糖代谢能力更强、木糖醇积累效率更高菌株的工作奠定了基础。

关键词: 酿酒酵母, 木糖醇, 木糖, 阿拉伯糖, CRISPR/Cas9, 进化工程

以农业秸秆为代表的木质纤维素类生物质 (lignocellulosic biomass) 作为一类可再生的生物资源, 其主要成分为由葡萄糖聚合成的纤维素

(cellulose)、由木糖和阿拉伯糖等聚合成的半纤维素 (hemicellulose) 以及由 3 种醇单体 (对香豆醇、松柏醇、芥子醇) 组成的木质素^[1-2]。酿酒酵母

基金项目: 国家自然科学基金(31170093)

*通信作者。Tel: +86-28-85990937; E-mail: tangyq@scu.edu.cn

收稿日期: 2020-07-24; 修回日期: 2020-09-10; 网络出版日期: 2020-09-22

(*Saccharomyces cerevisiae*)是木质纤维素类生物转化最常用的微生物之一,虽能高效利用葡萄糖等六碳糖产乙醇,却无法利用木糖和阿拉伯糖等五碳糖^[3]。近年来,通过基因改造,赋予酿酒酵母五碳糖代谢能力的研究较多,但绝大部分都致力于六碳糖和五碳糖同步转化生产乙醇。由于木糖代谢过程辅酶不平衡、六碳糖抑制作用等因素,五碳糖的乙醇转化效率和速率都不理想^[4-7]。

木糖作为木质纤维素中主要的五碳糖,其还原产物木糖醇在医药和食品方面具有巨大的应用前景,是价值较高的生物基产品。将木质纤维素原料中的木糖还原为木糖醇,理论上比木糖转化为乙醇更高效,经济价值也更高^[8]。微生物可通过木糖还原酶实现木糖的还原,但该还原过程需要消耗还原力 NADPH,需要碳源提供还原力。利用酿酒酵母将木质纤维素原料水解液中所有六碳糖(主要是葡萄糖和少量的甘露糖、半乳糖等)和五碳糖(主要是木糖、少量的阿拉伯糖)分别转化,同步生产乙醇和木糖醇,可以提高纤维素原料的利用效率,降低燃料乙醇生产成本,提高经济效益。但酿酒酵母只能将六碳糖转化为乙醇,虽具有转运五碳糖的能力,却不能天然利用木糖和阿拉伯糖。因此,构建可还原木糖产木糖醇且可代谢阿拉伯糖为木糖还原提供还原力的重组酿酒酵母菌株,可实现纤维素原料的全糖利用,同步生产乙醇和木糖醇。构建利用阿拉伯糖代谢过程中提供的还原力将木糖转化为木糖醇的酿酒酵母,目前尚未有研究涉及。

酿酒酵母中 *GRE3* 基因编码的醛糖还原酶具有木糖还原能力,但活性和效率低,因此需要导入高活性的外源木糖还原酶(XR)基因。Lee 等^[9]将毕赤酵母(*Scheffersomyces stipitis*)的木糖还原

酶基因导入酿酒酵母中,利用葡萄糖代谢提供 NADPH,该重组酿酒酵母的木糖醇产率有显著提高;Pratter 等^[10]通过在酿酒酵母中表达热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)木糖还原酶 CtXR 基因,获得了高效产木糖醇的重组酿酒酵母菌株,可转化 40 g/L 的木糖为木糖醇,且收率达到 100%。

酿酒酵母中亦无阿拉伯糖代谢途径,需外源导入。自然界真菌中阿拉伯糖的代谢途径涉及 6 种酶和 4 个交替氧化还原反应,且存在辅酶不平衡问题;而细菌中的代谢途径一般只涉及基因 *araA* (编码 *L*-阿拉伯糖异构酶,催化 *L*-阿拉伯糖生成 *L*-核酮糖)、*araB* (编码 *L*-核酮糖激酶,催化 *L*-核酮糖生成 *L*-核酮糖-5-磷酸)和 *araD* (编码 *L*-核酮糖-5-磷酸-4-差向异构酶,催化 *L*-核酮糖-5-磷酸生成木酮糖-5-磷酸)编码的 3 种酶,无辅酶参与反应,是较为理想的外源阿拉伯糖代谢通路^[11]。Sedlak 等^[12]将大肠杆菌的阿拉伯糖代谢途径基因在酿酒酵母中表达,使之获得了阿拉伯糖的利用能力。Wang 等^[13]通过在具有木糖代谢能力的重组酿酒酵母中引入细菌的阿拉伯糖基因表达框(与基因表达有关的序列元件组合),获得了能转化两种五碳糖产乙醇的重组菌株。

本研究使用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术,对耐热絮凝酿酒酵母二倍体菌株 KF-7 进行改造,将植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)的阿拉伯糖代谢途径基因 *araA*、*araB*、*araD* 插入到 KF-7 基因组中 *XYL2* 基因(*ScXYL2*,编码木糖醇脱氢酶)位点,获得能利用阿拉伯糖生长繁殖的重组酿酒酵母菌株;以此为基础进一步将热带假丝酵母的木糖还原酶基因(*CtXYL1*)整合到基因组中 *PHO13* 基因(对硝基苯磷酸盐磷酸化酶)位点,赋予了阿拉伯糖代谢菌株木糖还原能力,进一步通

过反复批次驯化培养, 提升了阿拉伯糖利用能力。研究结果可以为构建纤维素原料全糖利用菌株提供一定指导。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验所用菌株、质粒及引物: 本研究所用主要菌株、质粒及引物分别如表 1、表 2 和表 3 所示, 引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

1.1.2 主要培养基: YP 培养基: 酵母提取物 10 g, 蛋白胨 20 g, 超纯水 1000 mL; 阿拉伯糖唯一碳源培养基(YNBA20 培养基): 酵母氮源(yeast nitrogen base, 不含氨基酸) 6.7 g, 阿拉伯糖 20 g, 超纯水 1000 mL。固体培养基额外添加 15 g 琼脂粉。培养基于 121 °C 下高温高压灭菌 15 min。

1.2 阿拉伯糖代谢基因质粒及表达框构建

根据 National Center for Biotechnology Information 上登记的来源于植物乳杆菌分别编码 L-阿拉伯糖异构酶(GenBank accession No. CCC80517.1)、L-核酮糖激酶(GenBank accession No. CCC80519.1)、L-核酮糖-5-磷酸-4-差向异构酶(GenBank accession No. CCC80518.1)的基因序列, 参考酿酒酵母密码子碱基偏好性对 3 个基因进行了密码子优化, 由苏州金唯智生物科技有限公司进行了基因合成。利用含有密码子优化的 *araA*、*araB*、*araD* 基因的 3 种质粒 *araA*、*araB*、*araD* in pUG35-KanMX 构建重组质粒。以 HXT7p-F 和 HXT7p-R 为正、反引物扩增菌株 KF-7 基因组中的 HXT7 启动子, 经 *Spe* I -*Sma* I 双酶切体系酶切纯化后与 *araB* in pUG35-KanMX 质粒使用 T4 DNA 连接酶连接, 转化于 *E. coli* DH5 α

表 1. 本研究所用主要菌株
Table 1. Main strains used in this study

Strains	Genotype	Source
KF-7	From protoplast fusion of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EP-1 and IR-2	[14]
KF-7-Cas9	KF-7, containing plasmid encoding Cas9	This study
KA23, KA27	KF-7, Δ XYL2, P _{TDH3} - <i>araA</i> -T _{CYC1} , P _{HXT7} - <i>araB</i> -T _{CYC1} , P _{TEF1} - <i>araD</i> -T _{CYC1}	This study
KA27-Cas9	KA-27, containing plasmid encoding Cas9	This study
KAX3, KAX5	KA-27, Δ PHO13, P _{TDH3} -CtXYL1-T _{CYC1}	This study

表 2. 本研究所用主要质粒
Table 2. Main plasmids used in this study

Plasmids	Characteristic	Source
pUG35-KanMX	P _{TDH3} -T _{CYC1} , P _{TEF1} - <i>kanMX</i> -T _{TEF1}	GenScript Co.,Ltd.
<i>araB</i> in pUG35-Kan-P _{HXT7}	P _{HXT7} - <i>araB</i> -T _{CYC1} , P _{TEF1} - <i>kanMX</i> -T _{TEF1}	This study
<i>araD</i> in pUG35-Kan-P _{TEF1}	P _{TEF1} - <i>araD</i> -T _{CYC1} , P _{TEF1} - <i>kanMX</i> -T _{TEF1}	This study
<i>araAaraD</i> in pUG35-KanMX	P _{TEF1} - <i>araD</i> -T _{CYC1} -P _{TDH3} - <i>araA</i> -T _{CYC1} , P _{TEF1} - <i>kanMX</i> -T _{TEF1}	This study
pK-CtXR	P _{TDH3} -CtXYL1-T _{CYC1} , P _{TEF1} - <i>kanMX</i> -T _{TEF1}	This study
pMEL13	<i>Amp</i> ^r ; 2 μ m origin, <i>kanMX</i> , gRNA-CAN1.Y	[15]
pMEL13-XYL2-gRNA	<i>Amp</i> ^r ; 2 μ m origin, <i>kanMX</i> , XYL2-gRNA	This study
pMEL13-PHO13-gRNA	<i>Amp</i> ^r ; 2 μ m origin, <i>kanMX</i> , PHO13-gRNA	This study
Cas9-NAT	<i>Amp</i> ^r ; <i>Cas9</i> ; <i>NAT1</i>	[16]

表 3. 本研究所用主要引物
Table 3. Main primers used in this study

Primer	Sequence
HXT7p-F	<u>GGACTAGTCTCGTAGGAACAATTTTCGG</u>
HXT7p-R	<u>TCCCCCGGGTTTTTGATTAATAAAAAAACTT</u>
TEF1p-F	<u>GGACTAGTACAATGCATACTTTGTACGTT</u>
TEF1p-R	<u>TCCCCCGGGTTGTAATTAATACTTAGATTAG</u>
araD cassette-F	TTGGCGCGACAATGCATACTTTGTACGTTCAA
araD cassette-R	GGACTAGTTACCGGCCGCAAATTAAG
araAaraD Primer-F3	<u>ATCCATACACACTAAAAAGACATATTCATACTGCCTTGAGGATAGAGAACACCATTGAGCC</u>
	<u>ATGATTACGCCAAGCG</u>
araAaraD Primer-R3	<u>CTCAGAAGAACACGCAGGGGCCGAAATTGTTCTACGAGACTAGTTCTAGCCAGCTTTTT</u>
	<u>CGAGAACCCTTAATGGTACC</u>
araB Primer-F3	<u>AGAAGGTTTTGGGACGCTCGAAGGCTTAAATTTGCGGCCGGTACCATTAAGGGTTCTCGAA</u>
	<u>AAAGCTGGCTAGAAGTACTCTC</u>
araB Primer-R3	<u>ATATAAAAAAATCAAATGTATTGTGCATCTTGGATGCCAAAAGTTACATTTTCTTTCCTTC</u>
	<u>GAGAACCCTTAATGGTACC</u>
PHO13-CtXYL1-F	<u>AAACCTGAATATTTTCTTTTCAAAAAGTAATTCTACCCTAGATTTTGCATTGCTCCTTC</u>
	<u>AATCAATGAATCGAAAAT</u>
PHO13-CtXYL1-R	<u>AGCCAAATCACAAAAAAGCCTTATAGCTTGCCCTGACAAAGAATATACTCGGGAAA</u>
	<u>TCAGTTCGAGTTTATCATTAT</u>

The restriction site and the homology arm are underlined.

感受态细胞中, 转化子培养后抽提得到重组质粒 araB in pUG35-Kan-P_{HXT7}。将引物替换为 TEF1p-F 和 TEF1p-R, 使用上述同样方法扩增菌株 KF-7 基因组中的 TEF1 启动子, 转化后抽提得到重组质粒 araD in pUG35-Kan-P_{TEF1}。以质粒 araB in pUG35-Kan-P_{HXT7} 为模板, 使用引物 araB primer-F3 和 araB primer-R3 扩增 araB 基因表达框 P_{HXT7-araB-T_{CYC1}}。以 araD in pUG35-Kan-P_{TEF1} 质粒为模板, 使用引物 araD cassette-F 和 araD cassette-R 扩增 araD 表达框 P_{TEF1-araD-T_{CYC1}}, 扩增后同 araA in pUG35-KanMX 质粒经 Spe I 和 BssH II 酶切纯化后进行连接, 转化后抽提得到重组质粒 araAaraD in pUG35-KanMX。以质粒 araAaraD in pUG35-KanMX 为模板, 替换引物为 araAaraD Primer-F3 和 araAaraD Primer-R3, 扩增获得 araAaraD 基因表达框 P_{TEF1-araD-T_{CYC1}-P_{TDH3-araA-T_{CYC1}}。}

1.3 使用 CRISPR/Cas9 系统构建阿拉伯糖代谢菌株

利用 CRISPR/Cas9 基因编辑设计工具 Yeaststriction <http://yeaststriction.tnw.tudelft.nl>^[15] 设计识别 ScXYL2 基因的 gRNA 序列并合成对应引物 XYL2-targetRNA Fw 和 XYL2-targetRNA Rv, 混合孵育后获得片段 XYL2-gRNA。以质粒 pMEL13 为模板, 6006-F、6005-R 为引物扩增线性骨架, 用 Dpn I 限制性内切酶消化后切胶回收获得线性骨架 pMEL13-backbone。将 XYL2 的 gRNA 与线性骨架 pMEL13-backbone 使用 Gibson 连接试剂盒连接, 转化后抽提得到重组质粒 pMEL13-XYL2-gRNA。用醋酸锂转化法向宿主菌株 KF-7 中导入含编码 Cas9 蛋白基因的质粒 Cas9-NAT, 使用含 80 mg/mL 诺尔斯菌素的 YPD20 (葡萄糖含量 20 g/L) 固体培养基筛选转化子, 获得 KF-7-Cas9 菌株。利用醋酸锂法向 KF-7-Cas9

菌株中同时导入 *araB* 和 *araAaraD* 基因表达框以及质粒 pMEL13-XYL2-gRNA, 使用含 80 mg/mL 诺尔斯菌素和 100 mg/mL G418 的 YPD20 固体培养基筛选转化子并验证, 获得具有阿拉伯糖代谢能力的重组菌株。

1.4 使用 CRISPR/Cas9 系统构建木糖还原菌株

利用具有热带假丝酵母木糖还原酶基因 CtXYL1 的质粒 pK-CtXR 构建重组质粒。以 PHO13-CtXYL1-F 和 PHO13-CtXYL1-R 作为正、反引物, 扩增 CtXYL1 基因表达框 P_{TDH3}-CtXYL1-T_{CYC1}。使用 Yeastriction 设计识别 PHO13 基因的 gRNA 序列 PHO13-gRNA 并合成对应引物 PHO13-targetRNA Fw 和 PHO13-targetRNA Rv, 混合孵育后获得片段 PHO13-gRNA。将 PHO13-gRNA 与线性骨架 pMEL13-backbone 使用 Gibson 连接试剂盒连接, 转化后抽提得到重组质粒 pMEL13-PHO13-gRNA。以 1.3 中获得的具有阿拉伯糖代谢能力的重组菌株为宿主, 按相同操作导入 Cas9-NAT 质粒, 再导入 CtXYL1 基因表达框以及质粒 pMEL13-PHO13-gRNA, 获得具有木糖还原能力的重组菌株。

1.5 培养方法

1.5.1 活化与预培养: 将于 -80 °C 保藏的酿酒酵母菌株接种到 YPD20 平板培养基上, 置于 30 °C 下活化培养 20 h。用接种环取一环活化后的菌株, 接种到含 100 mL YPD20 液体培养基的 500 mL 锥形瓶中, 30 °C、140 r/min 加塞培养 16–20 h。

1.5.2 反复批次驯化培养: 将预培养后的菌株接种至含 100 mL YNBA20 液体培养基的 300 mL 锥形瓶中, 35 °C、200 r/min 加塞培养, 每 24 h 测定细胞生长情况, 待细胞生长进入明显指数期后 (除前两轮外) 取 2 mL 菌液接种到新的 YNBA20

(第三轮为 YNBA15D5) 液体培养基中继续培养, 如此反复 16 次。

1.5.3 发酵评价: 以 0.1 g 细胞干重将预培养后的菌株转接到含 100 mL YP 液体培养基 (细胞初始浓度约 2×10^6 个/mL) 和设定浓度糖的 300 mL 锥形瓶中, 35 °C、200 r/min 加塞培养, 定时测定细胞生长情况、糖消耗量和产物积累量。

1.5.4 单细胞分离培养: 用接种环取一环活化后的细胞群, 混悬于 5 mL 灭菌水中。充分振荡混匀后, 利用 MSM300 显微操作系统挑取大小、形态相似的酵母单细胞若干, 接种于平板培养基上 30 °C 培养, 定期观察生长状况。

1.6 分析方法

1.6.1 细胞浓度分析: 取 2 mL 发酵菌液, 于 8000 r/min 离心 2 min, 弃上清收集菌体, 用 2 mL 0.5 mol/L EDTA 重悬, 稀释适当倍数, 使用 JASCO V-530 紫外/可见光分光光度计测定 600 nm 处的吸光值 (OD_{600})。

1.6.2 底物和产物浓度分析: 取 2 mL 发酵菌液, 于 8000 r/min 离心 2 min, 收集上清, 通过 0.45 μ m 的微孔滤膜过滤, 稀释适当倍数待测。使用 SHIMADZU SI10A 高效液相色谱 (HPLC) 测定木糖、甘油及木糖醇浓度, SHIMADZU LC-20AD 高效液相色谱测定葡萄糖、阿拉伯糖、半乳糖和甘露糖浓度; 使用 GL Sciences GC353B 气相色谱 (GC) 测定乙醇浓度。

2 结果和讨论

2.1 阿拉伯糖代谢菌株的构建及评价

利用 CRISPR/Cas9 技术, 将阿拉伯糖代谢途径整合到酿酒酵母的 XYL2 位点, 获得了重组

菌株 KA23 和 KA27。接种于 YPA20 培养基生长 (图 1), 相比于出发菌株 KF-7, 重组菌株可以利用阿拉伯糖进行生长。菌株 KA27 在以阿拉伯糖为唯一碳源的培养基中生长 120 h 时的 OD_{600} 达到 15.64, 阿拉伯糖利用率达到 42.8%; 而 KF-7 最终 OD_{600} 仅为 3.77, 几乎无法利用阿拉伯糖。这表明外源阿拉伯糖代谢途径的导入使酿酒酵母获得了阿拉伯糖代谢能力。在 Wang 等^[17]的研究中, 将阿拉伯糖代谢途径导入酿酒酵母后, 得到的重组菌株一开始并不能利用阿拉伯糖生长, 还需后续基因改造。而在本研究中, 阿拉伯糖的代谢途径导入菌株后即得到了有效表达。发酵产物中未检测到乙醇, 表明消耗的阿拉伯糖并未转化为乙醇, 可能更多用于菌体细胞的生长繁殖。

2.2 木糖代谢菌株的构建及评价

再次利用 CRISPR/Cas9 技术将编码 CtXR 的基因 CtXYLI 替换到 *PHO13* 位点, 构建了具备阿拉伯糖利用能力和木糖还原能力的菌株 KAX3 和

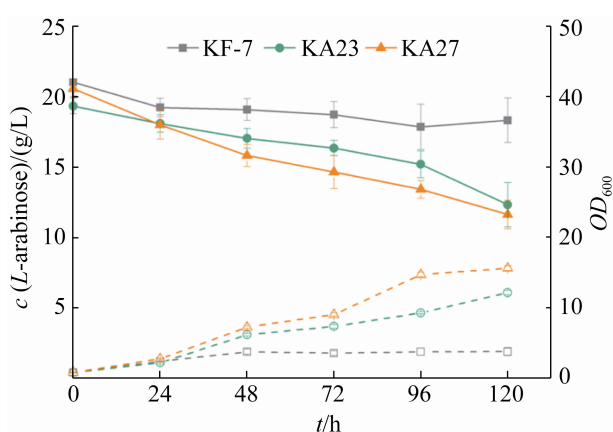


图 1. 菌株 KF-7、KA23 和 KA27 阿拉伯糖利用及生长情况

Figure 1. *L*-arabinose consumption and growth of strains KF-7, KA23 and KA27. Solid line: *L*-arabinose concentration; dashed line: OD_{600} .

KAX5。酿酒酵母自身几乎不具备木糖还原能力, 需外源导入编码活性较强的木糖还原酶的基因。有研究表明敲除 *PHO13* 基因能有效提高酿酒酵母利用木糖的能力^[18], 因此将木糖还原酶基因整合到 *PHO13* 基因位点。

以出发菌株 KA27 为对照, 选择两株重组菌株 KAX3 和 KAX5 进行木糖(50 g/L)发酵评价(添加葡萄糖作为辅助碳源)(图 2)。结果表明, 出发菌株 KA27 不能利用木糖, 菌株 KAX3 和 KAX5 在 72 h 内的木糖利用率分别达到了 73.7%和 86.7%, 木糖醇的收率分别为 95%和 94%(基于消耗木糖)。这说明导入了 CtXYLI 基因的菌株具有良好的木糖还原能力, 且木糖醇收率高。

将上述 3 株菌株进行利用阿拉伯糖生长评价实验, 以检验导入 CtXYLI 后菌株的阿拉伯糖利用能力是否受到影响, 结果见图 3。可以看出, 相比菌株 KA27, 导入 CtXYLI 的 2 个菌株的阿拉

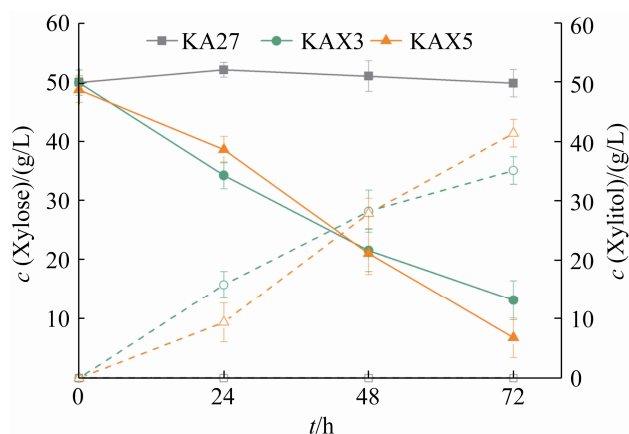


图 2. 菌株 KA27、KAX3 和 KAX5 木糖转化情况(葡萄糖为辅助碳源)

Figure 2. Xylose conversion of strains KA27, KAX3 and KAX5 (glucose as auxiliary carbon source). Solid line: xylose concentration, dashed line: xylose concentration.

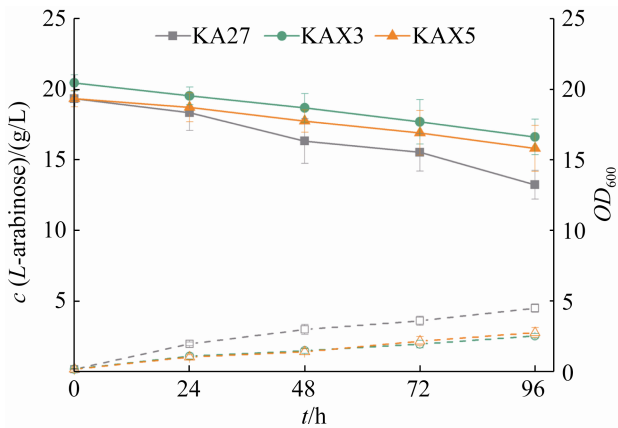


图 3. 菌株 KA27、KAX3 和 KAX5 阿拉伯糖利用及生长状况

Figure 3. *L*-arabinose consumption and growth of strains KA27, KAX3, and KAX5. Solid line: *L*-arabinose concentration; dashed line: OD_{600} .

伯糖利用能力和生长能力显著下降, 推测是由于 *CtXYL1* 的导入使得阿拉伯糖代谢相关基因的表达受到影响。

2.3 重组酿酒酵母的驯化及评价

与 KA27 相比, KAX3 与 KAX5 的阿拉伯糖代谢速率下降明显。有研究表明, 适应性进化工程对于阿拉伯糖的代谢能力提升显著^[19]。将 KAX3 和 KAX5 接入 YNBA20 液体培养基中进行反复批次驯化培养。如图 4 所示, 前两轮的速率极缓慢, 分别培养 72 h 和 216 h 亦无法观察到 OD_{600} 明显增加。第 3 轮时接入 YNBA15D5 培养基(阿拉伯糖含量 15 g/L, 葡萄糖含量 5 g/L), 生长速率大幅提高。第 4 轮再转接入 YNBA20, 生长速率较前两轮有较大提升, 后续十多轮培养中, 细胞群均在约 48 h 进入指数期, 且 OD_{600} 较稳定。这说明从第 5 轮开始, 细胞群利用阿拉伯糖生长能力得到大幅提高。16 轮驯化后, 观察到细胞群在阿拉伯糖中生长能力不再表现出明显

增加, 表明适应性驯化已无法继续提高阿拉伯糖利用能力。将驯化前的两株菌与驯化后的细胞群进行对比实验, 结果如图 5 所示。KAX3 和 KAX5 生长和利用阿拉伯糖的能力都有提升, 在培养 96 h 时, 驯化前菌株的阿拉伯糖利用率(20 g/L)分别只有 18.7%和 18.2%, 驯化后则分别达到了 52.7%和 46.6%, 表明驯化过程显著提升了阿拉伯糖利用能力。

2.4 单细胞菌株的分离和筛选

将驯化所得 KAX3 和 KAX5 细胞群进行单细胞分离后, 于 30 °C 培养 96 h。选择菌落较大、生长较好的单菌落各 4 个(共 8 个)进行阿拉伯糖生长评价, 以确定挑单细胞筛选是否有效以及进一步筛选出较为高效的阿拉伯糖代谢菌株。从表 4 可以看出, 72 h 时阿拉伯糖利用率最高的是菌株 KAX3-2 (37.1%), 比起单细胞分离前的 KAX3 驯化细胞群(34.5%)有所提高, 说明单细胞分离实验成功分离出了利用阿拉伯糖能力更强的菌株。

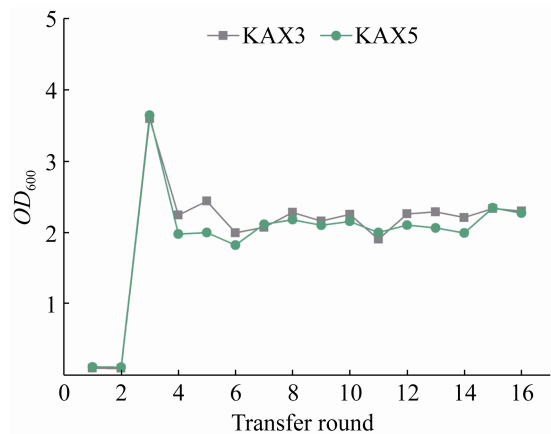


图 4. 反复批次驯化过程中各轮次 48 h 的生长状况
Figure 4. Cell growth at 48 h in each round during repeated batch acclimation.

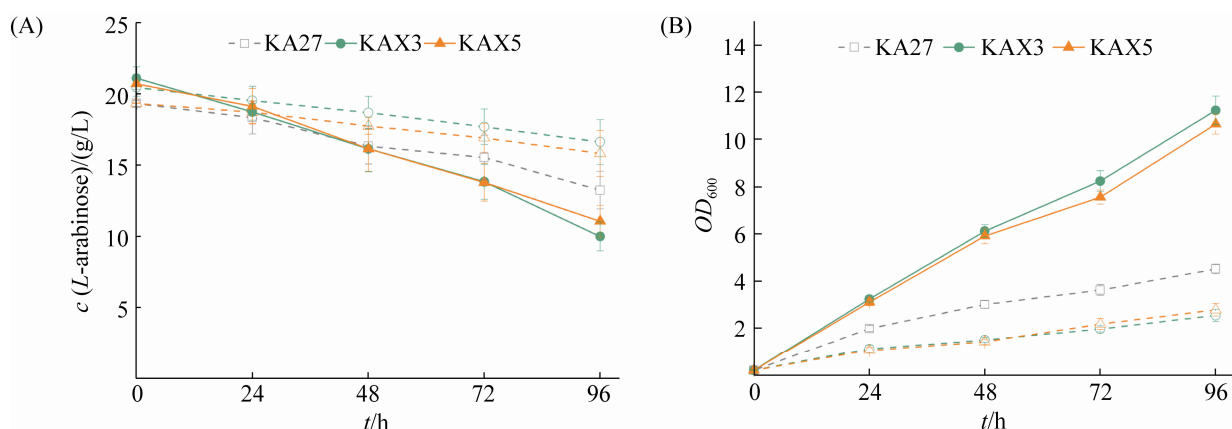


图 5. 驯化前菌株和驯化后细胞群的阿拉伯糖利用(A)及生长状况(B)

Figure 5. *L*-arabinose consumption (A) and growth (B) of strains and cell populations before and after the acclimation, respectively. Solid line: after domestication; dashed line: before domestication.

表 4. 单细胞菌株利用阿拉伯糖生长及消耗情况

Table 4. Single-cell strain growth and consumption of *L*-arabinose

Evaluation parameters	<i>t</i> /h	KAX3-1	KAX3-2	KAX3-3	KAX3-4	KAX5-1	KAX5-2	KAX5-3	KAX5-4
<i>OD</i> ₆₀₀	0	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
	24	3.53	3.72	2.47	3.67	3.71	3.63	3.61	3.67
	48	5.65	6.07	5.45	5.87	6.08	5.83	5.98	6.02
	72	8.12	8.73	7.79	8.61	7.85	8.38	7.84	8.17
<i>L</i> -arabinose concentration/(g/L)	0	20.02	21.87	20.87	21.05	21.18	21.34	20.83	20.10
	24	18.11	18.04	18.93	18.88	18.17	18.19	17.69	17.17
	48	16.62	15.80	17.24	16.48	16.90	16.79	15.33	15.84
	72	15.09	13.77	15.52	14.77	15.80	15.75	14.03	14.50

2.5 阿拉伯糖及木糖发酵评价

为评价驯化、筛选后菌株利用阿拉伯糖和转化木糖的能力，对 KAX3-2 进行木糖和阿拉伯糖混合糖(50 g/L 木糖、20 g/L 阿拉伯糖)发酵实验，以驯化前菌株 KAX3-0 作为对照。

由图 6 可以看出，驯化获得的菌株 KAX3-2 两种五碳糖的利用率都高于驯化前菌株 KAX3-0。KAX3-2 72 h 内阿拉伯糖(20 g/L)利用率为 42.1%，而 KAX3-0 则几乎不利用阿拉伯糖；前者 72 h 内消耗了约 33 g/L 木糖，木糖利用率达到 65.9%，而后者仅有 16%。不仅是阿拉伯糖的

利用能力，KAX3-2 的木糖利用能力较 KAX3-0 也有很大提升，但木糖醇的收率仅有 64%。

混合糖发酵时，驯化菌株的木糖醇收率明显低于菌株驯化前使用葡萄糖作为辅助碳源时的收率，推测在驯化过程中，菌株的木糖醇代谢能力得到提升，导致部分木糖醇被菌株进一步消耗。为了验证这一推测，使用 YPX20 (20 g/L 木糖)液体培养基进行了单独木糖的发酵评价，结果如图 7 所示。野生酿酒酵母利用木糖的能力非常弱或者完全无法利用木糖生长繁殖。在导入外源高活性的 *CtXYL1* 基因后，如果没有其他辅助碳

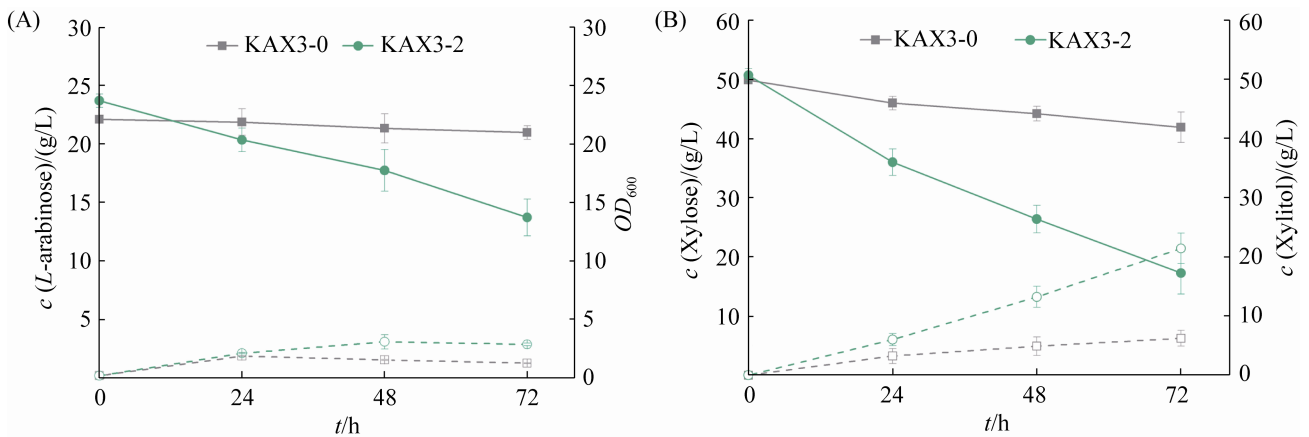


图 6. 菌株 KAX3-2 和 KAX3-0 (驯化前)混合糖发酵时阿拉伯糖消耗及菌株生长状况(A)、木糖消耗及木糖醇积累情况(B)

Figure 6. L-arabinose consumption and Growth (A) xylose consumption and xylitol accumulation (B) of strains KAX3-2 and KAX3-0 (before acclimation during mixed sugar fermentation of xylose and *L*-arabinose. A: solid line: *L*-arabinose concentration, dashed line: OD_{600} ; B: solid line: xylose concentration, dashed line: xylitol concentration.

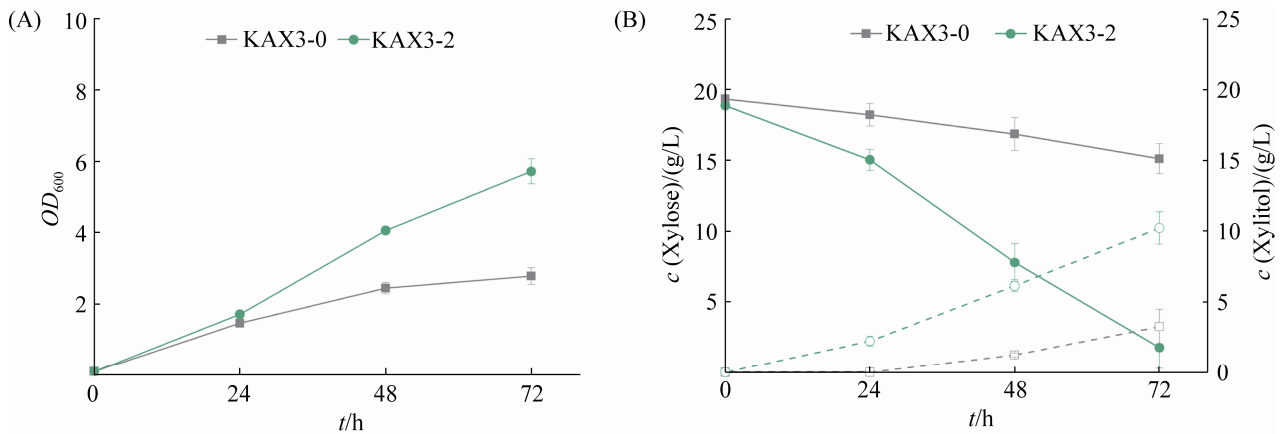


图 7. 菌株 KAX3-2 和 KAX3-0 (驯化前)单独木糖发酵时生长状况(A)、木糖消耗及木糖醇积累情况(B)

Figure 7. Growth (A), xylose consumption and xylitol accumulation (B) of strains KAX3-2 and KAX3-0 (before acclimation) during xylose fermentation. B: solid line: xylose concentration; dashed line: xylitol concentration.

源提供还原力的条件下，木糖也不能被还原从而被进一步利用。但由图 7 可以看出，比起驯化前，菌株 KAX3-2 利用木糖能力显著提升，72 h 时消耗了 18 g/L 的木糖，木糖醇收率只有 58%，表明

部分木糖醇被菌株进一步消耗用于生长繁殖。因此，可以认为在利用阿拉伯糖进行驯化的过程中，不仅是菌株的阿拉伯糖代谢能力得到提升，木糖的代谢能力也得到显著提升。研究表明，酿

酒酵母中部分转运蛋白和酶的表达对阿拉伯糖和木糖代谢都有促进作用, (推测可能是阿拉伯糖驯化过程强化了 *HXT7*、*GAL2* 等共用转运蛋白对于五碳糖的亲合性或 *GRE3*、*SORI*、*YJR096W* 等对两种五碳糖代谢都有促进作用基因的表达^[20-22]。)KAX3-2 在混合糖条件下的木糖醇收率高于单独木糖发酵时的收率, 即混合糖发酵时被进一步代谢消耗的木糖醇更少, 而阿拉伯糖为细胞生长提供了部分碳源, 因此混合糖条件下木糖醇积累更多。

基于上述结果, 驯化后菌株的阿拉伯糖和木糖的代谢能力都得到明显提升, 但为了在混合糖发酵时获得更高的木糖醇收率, 后续工作需要酿酒酵母本源的和木糖醇代谢相关的基因如 *SORI/2* 或 *XKSI* 的表达进行控制, 避免木糖醇的进一步消耗。

3 结论

本研究利用 CRISPR/Cas9 基因工程编辑技术构建了能利用阿拉伯糖并将木糖转化为木糖醇的重组酿酒酵母。以阿拉伯糖为唯一碳源通过反复批次培养驯化, 显著提升了重组酿酒酵母的阿拉伯糖利用能力, 获得了阿拉伯糖和木糖利用能力都较强的菌株 KAX3-2。KAX3-2 在发酵木糖与阿拉伯糖混合糖条件下, 能较高效利用阿拉伯糖并将木糖转化为木糖醇。后续将利用基因工程手段进一步提升该菌株的阿拉伯糖利用能力和木糖醇收率, 为纤维素原料的全糖利用生产乙醇和木糖醇提供优良菌株。

参考文献

- [1] Batalha LAR, Han Q, Jameel H, Chang HM, Colodette JL, Gomes FJB. Production of fermentable sugars from sugarcane bagasse by enzymatic hydrolysis after autohydrolysis and mechanical refining. *Bioresource Technology*, 2015, 180: 97–105.
- [2] Kumar V, Binod P, Sindhu R, Gnansounou E, Ahluwalia V. Bioconversion of pentose sugars to value added chemicals and fuels: recent trends, challenges and possibilities. *Bioresource Technology*, 2018, 269: 443–451.
- [3] Richard P, Verho R, Putkonen M, Londesborough J, Penttilä M. Production of ethanol from *L*-arabinose by *Saccharomyces cerevisiae* containing a fungal *L*-arabinose pathway. *FEMS Yeast Research*, 2003, 3(2): 185–189.
- [4] Becker J, Boles E. A modified *Saccharomyces cerevisiae* strain that consumes *L*-arabinose and produces ethanol. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(7): 4144–4150.
- [5] Watanabe S, Abu Saleh A, Pack SP, Annaluru N, Kodaki T, Makino K. Ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing protein engineered NADP⁺-dependent xylitol dehydrogenase. *Journal of Biotechnology*, 2007, 130(3): 316–319.
- [6] Jansen MLA, Bracher JM, Papapetridis I, Verhoeven MD, de Bruijn H, de Waal PP, van Maris AJA, Klaassen P, Pronk JT. *Saccharomyces cerevisiae* strains for second-generation ethanol production: from academic exploration to industrial implementation. *FEMS Yeast Research*, 2017, 17(5): fox044.
- [7] Wisselink HW, Toirkens MJ, Wu QX, Pronk JT, van Maris AJA. Novel evolutionary engineering approach for accelerated utilization of glucose, xylose, and arabinose mixtures by engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(7): 907–914.
- [8] Yang B, Xu W, Jia DX, Jin LQ. Research progress of preparation of xylitol by biosynthetic method. *Bulletin of Fermentation Science and Technology*, 2017, 46(2): 113–117, 120. (in Chinese)
杨波, 许韦, 贾东旭, 金利群. 生物法制备木糖醇的研究进展. *发酵科技通讯*, 2017, 46(2): 113–117, 120.

- [9] Lee WJ, Kim MD, Yoo MS, Ryu YW, Seo JH. Effects of xylose reductase activity on xylitol production in two-substrate fermentation of recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2003, 13(5): 725–730.
- [10] Pratter SM, Eixelsberger T, Nidetzky B. Systematic strain construction and process development: xylitol production by *Saccharomyces cerevisiae* expressing *Candida tenuis* xylose reductase in wild-type or mutant form. *Bioresource Technology*, 2015, 198: 732–738.
- [11] Wang CQ, Shen Y, Zhang YY, Suo F, Hou J, Bao XM. Research progress in ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* using *L*-arabinose. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2014, 12(1): 86–93. (in Chinese)
汪城墙, 沈煜, 张艳艳, 索凡, 侯进, 鲍晓明. 酿酒酵母 *L*-阿拉伯糖转化乙醇代谢工程的研究进展. *生物加工过程*, 2014, 12(1): 86–93.
- [12] Sedlak M, Ho NWY. Expression of *E. coli* araBAD operon encoding enzymes for metabolizing *L*-arabinose in *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2001, 28(1): 16–24.
- [13] Wang X, Yang JJ, Yang S, Jiang Y. Unraveling the genetic basis of fast *L*-arabinose consumption on top of recombinant xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2019, 116(2): 283–293.
- [14] Kida K, Kume K, Morimura S, Sonoda Y. Repeated-batch fermentation process using a thermotolerant flocculating yeast constructed by protoplast fusion. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1992, 74(3): 169–173.
- [15] Mans R, van Rossum HM, Wijsman M, Backx A, Kuijpers NGA, van den Broek M, Daran-Lapujade P, Pronk JT, van Maris AJA, Daran JMG. CRISPR/Cas9: a molecular Swiss army knife for simultaneous introduction of multiple genetic modifications in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 2015, 15(2): fov004.
- [16] Zhang GC, Kong II, Kim H, Liu JJ, Cate JHD, Jin YS. Construction of a quadruple auxotrophic mutant of an industrial polyploid *Saccharomyces cerevisiae* strain by using RNA-guided Cas9 nuclease. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(24): 7694–7701.
- [17] Wang CQ, Shen Y, Zhang YY, Suo F, Hou J, Bao XM. Improvement of *L*-arabinose fermentation by modifying the metabolic pathway and transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomed Research International*, 2013, 2013: 461204.
- [18] van Vleet JH, Jeffries TW, Olsson L. Deleting the *para*-nitrophenyl phosphatase (pNPPase), *PHO13*, in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* improves growth and ethanol production on *D*-xylose. *Metabolic Engineering*, 2008, 10(6): 360–369.
- [19] Wisselink HW, Toirkens MJ, del Rosario Franco Berriel M, Winkler AA, van Dijken JP, Pronk JT, van Maris AJA. Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic alcoholic fermentation of *L*-arabinose. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(15): 4881–4891.
- [20] Träff KL, Jönsson LJ, Hahn-Hägerdal B. Putative xylose and arabinose reductases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 2002, 19(14): 1233–1241.
- [21] Konishi J, Fukuda A, Mutaguchi K, Uemura T. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* using endogenous xylose-assimilating genes. *Biotechnology Letters*, 2015, 37(8): 1623–1630.
- [22] Li YC, Meng FB, Gou M, Sun ZY, Tang YQ. Research progresses on strain construction of xylose isomerase-based recombinant xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Bulletin*, 2017, 33(10): 88–96. (in Chinese)
李云成, 孟凡冰, 苟敏, 孙照勇, 汤岳琴. 基于木糖异构酶途径的木糖发酵酿酒酵母菌株构建研究进展. *生物技术通报*, 2017, 33(10): 88–96.

Construction of a xylose-reducing and *L*-arabinose-assimilating *Saccharomyces cerevisiae* strain by genetic and evolutionary engineering

Helang Huang^{1,2}, Yuzhen Diao^{1,2}, Baixue Yang^{1,2}, Ziyuan Xia^{1,2}, Yueqin Tang^{1,2*}

¹ College of Architecture and Environment, Sichuan University, Chengdu 610065, Sichuan Province, China

² Sichuan Environmental Protection Key Laboratory of Organic Waste Resource Utilization, Chengdu 610065, Sichuan Province, China

Abstract: [Objective] In order to utilize all sugars in the raw materials and produce high value-added products, this research aims to construct a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain that could assimilate *L*-arabinose and reduce xylose to xylitol. **[Methods]** Firstly, we used CRISPR/Cas9 gene editing technique to sequentially introduce genes in *L*-arabinose metabolism pathway and gene of xylose reductase into the *Saccharomyces cerevisiae* host strain to endow it the ability to metabolize *L*-arabinose and convert xylose into xylitol. Secondly, we used adaptive evolutionary engineering method to improve *L*-arabinose utilization efficiency of the recombinant strain. Finally, we verified the ability of the recombinant strain to metabolize *L*-arabinose and transfer xylose to xylitol by mixed sugar fermentation. **[Results]** By introducing the *L*-arabinose metabolic pathway of *Lactobacillus plantarum*, the engineered *S. cerevisiae* strain obtained good ability to grow on *L*-arabinose. After introducing the xylose reductase gene of *Candida tropicalis*, the strains were able to efficiently reduce xylose to xylitol using glucose as auxiliary carbon source, yet the utilization of *L*-arabinose decreased. After repeated batch acclimation with *L*-arabinose as the sole carbon source, the *L*-arabinose utilization ability of strains restored and improved. We isolated evolved strain KAX3-2 with good phenotype and evaluated its fermentation capacity using medium containing xylose (50 g/L) and *L*-arabinose (20 g/L). After 72 h fermentation, the utilization ratio of *L*-arabinose and xylose reached 42.1% and 65.9%, respectively, and the yield of xylitol was 64%. **[Conclusion]** This study successfully constructed a *S. cerevisiae* strain KAX3-2 which could utilize *L*-arabinose and convert xylose to xylitol efficiently as well as provided the base for the construction of strains with higher *L*-arabinose utilization efficiency and xylitol yield.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, *L*-arabinose, xylose, xylitol, CRISPR/Cas9, evolutionary engineering

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31170093)

*Corresponding author. Tel: +86-28-85990937; E-mail: tangyq@scu.edu.cn

Received: 24 July 2020; Revised: 10 September 2020; Published online: 22 September 2020



汤岳琴, 四川大学建筑与环境学院教授(博导), 四川省环境保护有机废弃物资源化利用重点实验室主任, 主要从事废弃生物质生物转化生产生物能源和化学品、微生物育种、微生物生态、环境生物技术方向的研究。