



酿酒酵母异源表达纤维二糖转运蛋白 LacY 与纤维二糖利用菌株的构建

鲁尚昆, 苏意德, 邵文举, 张爱利*

河北工业大学化工学院, 天津 300130

鲁尚昆, 苏意德, 邵文举, 张爱利. 酿酒酵母异源表达纤维二糖转运蛋白 LacY 与纤维二糖利用菌株的构建[J]. 微生物学报, 2023, 63(1): 170-180.

LU Shangkun, SU Yide, SHAO Wenju, ZHANG Aili. Heterologous expression of cellobiose transporter LacY in *Saccharomyces cerevisiae* and development of engineered *S. cerevisiae* for cellobiose utilization[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(1): 170-180.

摘要: 【目的】在酿酒酵母体内设计代谢通路, 使酿酒酵母能利用纤维素水解产物纤维二糖生产乙醇。【方法】首先, 用大肠杆菌 DH5 α 总 DNA 为模板克隆编码大肠杆菌乳糖透过酶的 *LacY* 基因。为过表达 *LacY* 基因, 以质粒 YEplac181 作为载体, 将酿酒酵母 *PGK1p* 强启动子加到 *LacY* 基因之前, *CYCl1* 终止子加到 *LacY* 基因之后, 构建质粒 YEplac181-*PGK1p-LacY-CYCl1*。之后, 将纤维二糖转运蛋白 LacY 表达质粒和 β -葡萄糖苷酶 (β -glucosidase, BGL) 表达质粒 pRS316-*PGK1p-ghl-1-CYCl1* 依次转入野生型酿酒酵母 W303-1A 中, 使野生型酿酒酵母 W303-1A 异源表达可转运纤维二糖的 LacY 蛋白和 β -葡萄糖苷酶 GH1-1, 构建可利用纤维二糖的酿酒酵母工程菌 W303-1A GL。最后, 通过发酵测定酿酒酵母工程菌 W303-1A GL 的纤维二糖利用情况和乙醇产量, 并对纤维二糖代谢通路中纤维二糖酶活力进行测定。【结果】本研究构建了纤维二糖转运蛋白 LacY 和 β -葡萄糖苷酶 GH1-1 协同表达的酿酒酵母工程菌 W303-1A GL。W303-1A GL 可以有效利用纤维二糖发酵生产乙醇, W303-1A GL 发酵 24 h 时乙醇产量达到 3.25 g/L, 得率为 0.325 g 乙醇/g 纤维二糖, 利用葡萄糖产乙醇理论得率为 0.511 g 乙醇/g 纤维二糖, 达到葡萄糖产乙醇理论得率的 64%, 细胞密度最高在第 54 h 达到 $OD_{600}=10.84$, 胞内 β -葡萄糖苷酶的酶活在 72 h 最高, 可达到 0.51 U/mg。【结论】本研究成功构建了能有效利用纤维二糖的重组酿酒酵母

资助项目: 国家自然科学基金(21978065, 21206028); 教育部“春晖计划”合作科研项目(Z2017012)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (21978065, 21206028) and the “Chunhui Program” of Ministry of Education (Z2017012).

*Corresponding author. E-mail: zhangaili@tju.edu.cn

Received: 2022-04-10; Accepted: 2022-05-20; Published online: 2022-07-25

工程菌 W303-1A GL, 为提高纤维素乙醇生产效率、降低纤维素乙醇生产成本提供了新思路。

关键词: 酿酒酵母; 纤维二糖; 纤维素乙醇; β -葡萄糖苷酶

Heterologous expression of cellobiose transporter LacY in *Saccharomyces cerevisiae* and development of engineered *S. cerevisiae* for cellobiose utilization

LU Shangkun, SU Yide, SHAO Wenju, ZHANG Aili*

School of Chemical Engineering and Technology, Hebei University of Technology, Tianjin 300130, China

Abstract: [Objective] A metabolic pathway was designed in *Saccharomyces cerevisiae* so that it could produce ethanol from cellobiose, a hydrolysate of cellulose. **[Methods]** First, with the total DNA of *Escherichia coli* DH5 α as template, the *LacY* gene encoding lactose permease was cloned. With plasmid YEplac181 as the vector, the strong promoter *PGK1p* of *S. cerevisiae* was added in front of the *LacY*, and the *CYC1t* terminator was added behind *LacY* to construct the plasmid YEplac181-*PGK1p-LacY-CYC1t*. Then, the cellobiose transporter (*LacY*) expression plasmid and β -glucosidase expression plasmid pRS316-*PGK1p-ghl-1-CYC1t* were successively transferred into wild-type *S. cerevisiae* W303-1A. The engineered *S. cerevisiae* W303-1A GL was constructed by heterologous expression of cellobiose transporter *LacY* and β -glucosidase GH1-1 in W303-1A. Finally, the cellobiose utilization and ethanol yield of W303-1A GL were determined based on fermentation, and the cellobiose activity in the cellobiose metabolic pathway was detected. **[Results]** W303-1A GL which expressed *LacY* and GH1-1 was developed, which can use cellobiose to produce ethanol. The ethanol yield of W303-1A GL was up to 3.25 g/L at 24 h, and the production rate was 0.325 g ethanol/g cellobiose, 64% of the theoretical production rate from glucose (0.511 g ethanol/g cellobiose). The highest cell density was $OD_{600}=10.84$ at 54 h, and the activity of intracellular β -glucosidase peaked (0.51 U/mg) at 72 h. **[Conclusion]** W303-1A GL which can effectively utilize cellobiose is developed. This study is expected to serve as a reference for improving the production of cellulosic ethanol at lower cost.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*; cellobiose; cellulosic ethanol; β -glucosidase

进入 21 世纪以来, 人们面临的能源危机和环境问题的规模、速度和严重程度都是前所未有的, 传统的以化石能源为基础的发展模式正

面临资源匮乏的危险, 这对人类社会的可持续发展提出了巨大的挑战^[1], 可再生能源越来越受到人们的关注。作为地球上最丰富的可再生

资源之一，木质纤维素广泛存在于自然界和各种农林废料中，具有环保、可持续发展等优点^[2]，但如何让木质纤维素高效利用是困扰人类的一大难题。目前工业利用主要以发酵前预处理^[3]为主，通过高压爆破等物理手段处理后加入纤维素商品酶完成纤维素的水解，这种方式相比于普通燃料生产成本偏高，不具有优势。同步糖化发酵(simultaneous saccharification and fermentation, SSF)^[4]是目前纤维素乙醇生产中应用最为广泛的，其具有操作简便、成本低等优点，但发酵过程中出现的大量纤维二糖影响了纤维素酶的活性，进而限制了酶解速率。另一方面，将纤维素利用与发酵相耦合，一步完成纤维素转化为生物燃料的联合生物加工技术(combined bioprocessing, CBP)^[5]，其CBP菌株主要向着2个方向构建：一是在已有纤维素利用菌株中引入高价值燃料的合成途径，二是将目前的工业燃料生产菌赋予纤维素利用的能力。

纤维素酶解为葡萄糖所需的酶主要分为3类^[6]：内切 β -葡聚糖酶(C₁)、外切 β -葡聚糖酶(C_X)和 β -葡萄糖苷酶(β -glucosidase, BGL)。纤维素的降解过程大致为内切 β -葡聚糖酶任意切割纤维素中的 β -1,4-糖苷键，打开高度聚合的纤维素链，外切 β -葡聚糖酶从产生的缺口处水解产生纤维二糖，最终由 β -葡萄糖苷酶水解纤维二糖得到葡萄糖。已有多个报道指出葡萄糖和纤维二糖对纤维素酶会产生严重的反馈抑制^[7-8]。

常见的微生物对纤维二糖的利用方式主要为3种：细胞外水解、细胞内水解和细胞内磷酸降解，如图1所示。由于细胞外水解依旧会带来葡萄糖抑制，所以主要介绍另外2种方式。细胞内水解途径为纤维二糖经纤维二糖转运酶进入细胞后， β -葡萄糖苷酶水解产生2分子葡萄糖进入糖酵解途径。而细胞内磷酸分解途径则是纤维

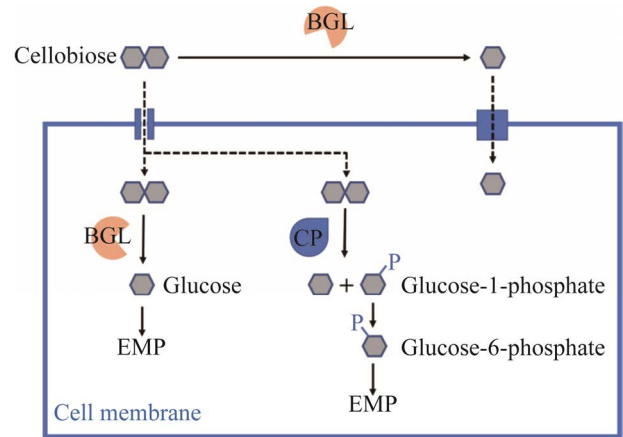


图1 纤维二糖利用途径

Figure 1 Cellobiose utilization pathway.

二糖磷酸化酶(CP)作用于纤维二糖产生葡萄糖和葡萄糖-1-磷酸，葡萄糖-1-磷酸经葡糖磷酸变位酶变为葡萄糖-6-磷酸后进入糖酵解。

乙醇是一种清洁能源，常温下为液态，方便储存和运输，并且可以作为汽油添加剂部分代替汽油，还能促进汽油充分燃烧，降低尾气污染水平，进而缓解温室效应^[9]。而酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)作为生产生物燃料最为常用的微生物之一，其能高效利用葡萄糖等六碳糖产乙醇^[10]，但无法利用纤维二糖。2010年，Galazka等^[11]首次在酿酒酵母中通过表达来自于粗糙脉孢菌的纤维糊精转运蛋白CDT-1和 β -葡萄糖苷酶GH1-1完成了体内纤维二糖利用途径的构建，乙醇产率达到了理论产量的86.3%，为酿酒酵母利用纤维素发酵打下了坚实的基础。Sekar等^[12]在大肠杆菌中过表达了来自于*Saccharophagus degradans*的纤维二糖磷酸化酶(由Cep94A编码)，发现相较于空白对照，细胞密度提升了20%，证明了大肠杆菌存在着内源性纤维二糖转运蛋白，通过敲除手段确认了这个酶由LacY基因编码。酿酒酵母是重要的模式微生物之一，其遗传背景清晰，酿酒酵母底盘细胞在改造时易于操作，是优秀的

微生物细胞工厂,在生产生物质能源方面应用广泛,是一种产液体燃料醇类的优势宿主菌,但酿酒酵母自身不能直接利用纤维素和纤维二糖。

为了构建能利用纤维二糖的酿酒酵母菌株,在酿酒酵母中引入纤维二糖代谢途径,提高纤维素利用率。本研究以野生型酿酒酵母 W303-1A 为出发菌株,在 W303-1A 中异源表达来源于大肠杆菌的乳糖透过酶(*LacY* 编码)和 β -葡萄糖苷酶(来自于粗糙脉孢菌的 *ghl-1*),以构建酿酒酵母细胞内纤维二糖利用途径,并对生长情况、纤维二糖利用情况和 β -葡萄糖苷酶

的酶活进行了测定。本研究实现了纤维二糖的高效利用,为构建以纤维素作为原料利用的菌株提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

本研究所用菌株见表 1,所用质粒见表 2,所用引物见表 3。本文所用到的引物均由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成,具体如表 3 所示。

表 1 本研究所用菌株

Table 1 Strains used in this study

Strains	Genotype	Source
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ , ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>deoR</i> , <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺), <i>supE44</i> , λ ⁻ , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>phoA</i>	[13]
W303-1A	<i>MATa leu2-3, 112 ura3-1 trp1-92 his-11,15 Ade2-1 can1-100</i>	[14]
W303-1A-control	W303-1A YEplac181 YEplac195	This study
W303-1A GL	W303-1A YEplac181-PGK1p- <i>LacY-CYC1t</i> pRS316-PGK1p- <i>ghl-1-CYC1t</i>	This study

表 2 本研究所用质粒

Table 2 Plasmids used in this study

Plasmids	Characteristic	Source
YEplac181	<i>Amp^r LEU2</i>	[15]
YEplac195	<i>Amp^r URA3</i>	[15]
pRS316-PGK1p- <i>ghl-1-CYC1t</i> (pRS316-BT)	<i>Amp^r URA3</i>	[16]
p426-SNR52p-gRNA.CAN1.Y-SUP4t	<i>Amp^r URA3</i>	Shanghai Biological Technology Co., Ltd. enzyme res
YEplac181-PGK1p- <i>LacY-CYC1t</i>	<i>Amp^r LEU2</i>	This study

表 3 本研究所用引物

Table 3 Primers used in this study

Primer	Sequence (5'→3')
LacY-U (<i>Kpn</i> I)	GGGCCCC <u>GGTACC</u> AGGCCATGTCTGCCCCGATTT
LacY-D	TGACATAACTAATTACATGATTAAGCGACTTCATTCACCT
CYC1t-U	GACTCTTTGATCAAGAAGGACTAATCATGTAATTAGTTATGTCA
PGK1p-U (<i>Sac</i> I)	GGCC <u>GAGCTC</u> AGGCATTTGCAAGAATTACTC
PGK1p-D (<i>Kpn</i> I)	GGCC <u>GGTACCTG</u> TTTTATATTTGTTGTAAAAAGTAG
V2gRNAtcr-D (<i>Bam</i> H I)	GGGCCCC <u>GATCC</u> ATAGGGCGAATTGGGTAC

The underline indicates restriction enzyme sites.

1.1.2 主要培养基

LB 液体培养基: 胰化蛋白胨 1.0%, 酵母提取物 0.5%, NaCl 1.0%, 用氢氧化钠调 pH 为 7.5, 100 kPa 灭菌 20 min。LBA 液体培养基: 在 LB 液体培养基基础上, 100 kPa 蒸汽压灭菌 20 min 后加入氨苄青霉素, 终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。LBA 固体培养基: 在 LB 液体培养基基础上加入终浓度 1.5% 的琼脂粉, 100 kPa 蒸汽压灭菌 20 min 后加入氨苄青霉素, 终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。YPD 液体培养基: 蛋白胨 2.0%, 酵母提取物 1.0%, 葡萄糖 2.0%, 自然 pH, 75 kPa 蒸汽压灭菌 30 min。YPD 固体培养基: 蛋白胨 2.0%, 酵母提取物 1.0%, 葡萄糖 2.0%, 琼脂粉 1.5%, 自然 pH, 75 kPa 蒸汽压灭菌 30 min。完全合成培养基(SC): 成分为无氨基酸酵母氮源、营养缺陷混合物、组氨酸、色氨酸、亮氨酸、腺嘌呤、尿嘧啶、葡萄糖。终浓度分别为 0.67% (质量体积分数)、830 mg/L、100 mg/L、100 mg/L、100 mg/L、50 mg/L、50 mg/L 和 2% (质量体积分数), 将葡萄糖替换为终浓度 1% 的纤维二糖可用于纤维二糖发酵, 固体培养基需额外添加 2% (质量体积分数) 琼脂粉, 用氢氧化钠固体调整 pH 值, 液体 pH 标定至 5.6, 固体 pH 标定至 6.5。缺失某些氨基酸成分可做成选择培养基。培养基于 75 kPa 蒸汽压下高温高压灭菌 30 min。营养缺陷混合物成分为缬氨酸、异亮氨酸、丝氨酸、苏氨酸、甲硫氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸, 终浓度分别为 150、30、150、150、20、100、100、30、20、50、30 mg/L。

1.1.3 试剂

葡萄糖、蛋白胨、胰蛋白胨、酵母提取物、琼脂、琼脂糖、蔗糖、无氨基酸酵母碳源、L 型氨基酸、腺嘌呤、尿嘧啶、氯化钠、Tris 碱、EDTA、CTAB、Triton-100 聚乙二醇-4000、氯化钙

二水、无水乙酸钠、溶菌酶, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 无水乙醇、冰醋酸, 天津康克德科技有限公司; 酸洗玻璃珠, 默克生命科学(上海)有限公司; *Taq* DNA 聚合酶, 北京天根生化科技有限公司; T_4 DNA 连接酶、限制性核酸内切酶, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

1.2 质粒 YEplac181-*PGK1p* 的构建

提取酿酒酵母 W303-1A 染色体作为模板, 将保藏于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的酿酒酵母 W303-1A 菌株接种在 YPD 固体培养基上, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 活化 48 h, 挑取单菌落接种于 5 mL YPD 液体培养基中, 200 r/min 过夜培养 16 h 后, 13 000 r/min 离心 30 s 后收集菌体, 使用去离子水洗涤菌体, 弃去上清。使用 200 μL 破菌缓冲液重悬菌体, 添加 200 μL 酸洗玻璃珠和 200 μL 酚氯仿溶液在涡旋混合器上剧烈振荡 4 min。添加 200 μL TE 缓冲液于混合物中混合均匀。13 000 r/min 离心 5 min。转移上清液于 1 mL 无水乙醇中混合均匀。13 000 r/min 离心 3 min, 弃上清。使用 500 μL 70% 乙醇洗涤沉淀后, 13 000 r/min 离心 3 min, 弃去上清液。室温干燥沉淀, 使用适量 TE 缓冲液溶解, 保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

以酿酒酵母 W303-1A 染色体为模板, 用引物对 *PGK1p-U* (*Sac* I)/*PGK1p-D* (*Kpn* I) 进行 PCR, 扩增条件为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min; 30 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min。得到大小为 741 bp 的 *PGK1p* 片段。引物序列见表 3, 酚氯仿纯化后通过凝胶电泳验证。

验证无误后将其与质粒 YEplac181 同时使用限制性内切酶 *Sac* I 和 *Kpn* I 进行消化, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h 后于 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 热失活 5 min, 使用 T_4 连接酶进行 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 连接过夜, 连接体系进行大肠杆菌 DH5 α 转化并涂布于含有氨苄青霉素的 LB 固体平板上, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h, 挑取生长的转化子接种于 5 mL LBA 液体培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 培

养 14 h, 13 000 r/min 离心 30 s 收集菌体, 并利用 CTAB 法提取质粒。所提质粒使用限制性内切酶 *Sac* I 和 *Kpn* I 进行双酶切验证, 琼脂糖凝胶电泳验证筛选阳性克隆, 得到质粒 YEplac181-PGK1p。

1.3 *LacY* 基因序列克隆

首先提取大肠杆菌 DH5 α 总 DNA, 先将转化子接种于 LB 液体培养基中, 37 °C、250 r/min 扩大培养 16 h 后, 10 000 r/min 离心 2 min 收集菌体, 用 TE 溶液洗涤菌体 2 次, 即加入 20 μ L 溶液并用移液器吹打菌体使其充分悬浮, 离心收集菌体, 在菌体中加入 565 μ L TE 溶液并使细胞悬浮, 再加入 35 μ L 20% SDS 溶液, 于 37 °C 恒温水浴放置 1 h, 之后加入 5 mol/L NaCl 溶液 100 μ L、CTAB/NaCl 溶液 80 μ L, 于 65 °C 水浴放置 10 min, 加入等体积的氯仿/异戊醇 (780 μ L), 混匀, 12 000 r/min 离心 5 min。取上清到新离心管中加入等体积的酚、氯仿/异戊醇 (各 390 μ L), 混匀, 12 000 r/min 离心 5 min。取上清于新离心管中, 加入 0.6 倍体积的异丙醇, 混匀, 12 000 r/min 离心 10 min。弃上清, 晾干, 溶于 50 μ L TE 溶液中, -20 °C 保存备用。以大肠杆菌 DH5 α 基因组为模板, 用引物对 LacY-U(*Kpn* I)/LacY-D 进行 PCR, 扩增条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min 20 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。得到大小为 1 322 bp 的 *LacY* 片段。

1.4 质粒 YEplac181-PGK1p-LacY-CYC1t 的构建

以质粒 p426-SNR52p-gRNA.CAN1.Y-SUP4t 为模板, 利用引物对 CYC1t-U/V2gRNAtter-D 进行 PCR, 扩增条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。得到大小为 303 bp 的 *CYC1t* 片段。

以得到的 *LacY* 片段和 *CYC1t* 片段共同为

模板, 用引物对 LacY-U (*Kpn* I)/V2gRNAtter-D 进行融合 PCR, 扩增条件为: 先不加引物 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min 40 s, 10 个循环; 72 °C 10 min; 然后添加引物 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min 40 s, 25 个循环; 72 °C 10 min, 得到大小为 1 585 bp 的 *LacY-CYC1t* 融合片段。引物序列见表 3, 酚氯仿纯化后通过凝胶电泳验证。

验证无误后将其与质粒 YEplac181-PGK1p 同时使用限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Bam*H I 进行消化, 37 °C 反应 1 h 后 80 °C 热失活 5 min, 使用 T₄ DNA 连接酶进行 4 °C 连接过夜, 连接体系进行大肠杆菌转化并涂布于含有氨苄青霉素的 LB 固体平板上, 37 °C 培养 24 h, 挑取生长的转化子接种于 5 mL LBA 液体培养基中, 置于 37 °C、250 r/min 培养 14 h, 13 000 r/min 离心 30 s 收集菌体, 并利用 CTAB 法提取质粒。使用 *Kpn* I 单酶切验证, 琼脂糖凝胶电泳验证筛选阳性克隆, 得到质粒 YEplac181-PGK1p-LacY-CYC1t。

1.5 YEplac181-PGK1p-LacY-CYC1t 与 pRS316-PGK1p-gh1-1-CYC1t 质粒转化酿酒酵母

将活化的酵母菌接种于 5 mL YPD 液体培养基中, 30 °C、200 r/min 培养 16 h 后, 离心收集适量菌体, 并用无菌水洗菌体 2 次。将保存在冰箱中提前煮沸 5 min 的 ss-DNA 取出融化。采用醋酸锂法转化酿酒酵母细胞, 向菌体中加入 360 μ L 转化体系, 其中 50% PEG4000 240 μ L、LiAc 36 μ L、ss-DNA 50 μ L、ddH₂O 32 μ L、质粒 DNA 2 μ L, 之后在漩涡分离器上高速振荡混匀。将转化体系置于 42 °C 水浴中维持 30 min。再 13 000 r/min 离心 30 s 收集菌体, 然后用 100 μ L 无菌水重悬菌体, 涂布于缺失亮氨酸和尿嘧啶的 SC 固体选择培养基中, 30 °C 培养 2-3 d。

1.6 生长发酵分析方法

1.6.1 菌株生长曲线测定

发酵期间,从 0 h 开始在各时间点取出一定量的发酵液进行稀释。使用可见光分光光度计测定稀释过的样品并通过计算得到该时间点的 OD_{600} 值。以时间为横坐标, OD_{600} 值为纵坐标得到菌株的生长曲线。

1.6.2 还原糖含量测定

标准曲线的绘制:将 1 mg/mL 的还原糖标准液(纤维二糖)按一定比例进行稀释,得到一系列浓度梯度的还原糖溶液,编号 0–9。吸取还原糖溶液 500 μ L 与 DNS 试剂 500 μ L 进行混合并煮沸 5 min。随后常温水浴静置 5 min,加入蒸馏水至总体积为 5 mL。以 0 号为参照,测定混合液在 OD_{540} 处的值,实验平行 3 次,绘制还原糖标准曲线。测定还原糖含量:发酵期间,从 0 h 开始在各时间点取出一定量的发酵液,快速离心去除菌体后,对上清液进行稀释。同样吸取稀释液 500 μ L 与 DNS 试剂 500 μ L 混合并煮沸 5 min,降温 5 min 后测定稀释液在 OD_{540} 处的值,通过计算得出该时间点发酵液残余的还原糖含量。实验平行 3 次,绘制标准误差线。

1.6.3 β -葡萄糖苷酶酶活测定

活性蛋白的制备:取定量的酵母培养液,收集菌体后水洗细胞 2 次,弃蒸馏水。使用 0.5 mL 0 $^{\circ}$ C 蛋白破碎缓冲液重悬菌体并添加 0.5 mL 的酸洗玻璃珠。在涡旋混合器上每振荡 30 s 置于冰盒降温 30 s,持续 8 min。4 $^{\circ}$ C、13 000 r/min 离心 5 min,上清液即为活性蛋白溶液。 β -葡萄糖苷酶酶活测定:4-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (PNPG)是纤维二糖的类似物,经酶分解后可产生在碱性环境下有颜色的对硝基苯酚 (PNP),通过测得 405 nm 处的吸光值可计算出 β -葡萄糖苷酶的酶活。酶活单位定

义:单位时间内(1 min)产生 1 μ mol/L PNP 所需的酶为一个单位。标准曲线的绘制:配制一系列浓度的 PNP 溶液,测试总体积 1 mL,其中 250 mmol/L NaAc 溶液 100 μ L, PNP 溶液 250 μ L, 1 mol/L Na_2CO_3 500 μ L。每个浓度 3 个平行,读取 405 nm 处的吸光值绘制标准曲线。酶活测定:吸取 3 mL 一定时间点的发酵液制备有活性的粗酶液。测定总体积 1 mL,其中 250 mmol/L NaAc 溶液 100 μ L 和 PNP 溶液 250 μ L 在 30 $^{\circ}$ C 温浴 5 min 后加入适当稀释的粗酶液 150 μ L 反应 10 min,迅速加入 1 mol/L Na_2CO_3 500 μ L 终止反应。测定体系静置 5 min 后离心 30 s 吸取上清液读取 405 nm 处吸光值,实验平行 3 次,绘制标准误差线。

1.6.4 乙醇产量测定

采用 Shimadzu 20A 高效液相色谱(HPLC)测定发酵液中乙醇的含量。色谱柱为 ODS- C_{18} 柱(4.6 \times 250 mm, 5 μ m),流动相为乙腈:水(4:6, 体积比),流速为 1.0 mL/min,柱温为 40 $^{\circ}$ C,检测波长为 227 nm。

1.6.5 数据处理及分析

每个试验数据均独立进行 3 次,取平均值。采用 Excel 2010 对数据进行整理和图形绘制,采用 SPSS 26.0 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA)。 $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 可利用纤维二糖酿酒酵母工程菌的构建

随机挑取单克隆进行培养并提取相应质粒, *Kpn* I 单酶切筛选出正确的转化子,琼脂糖凝胶电泳验证如图 2 所示,经酶切后得到 1 548 bp *LacY-CYC1t* 基因片段和 6 472 bp YEplac181-*PGK1p* 载体片段,说明 YEplac181-*PGK1p-LacY-CYC1t* 构建正确。

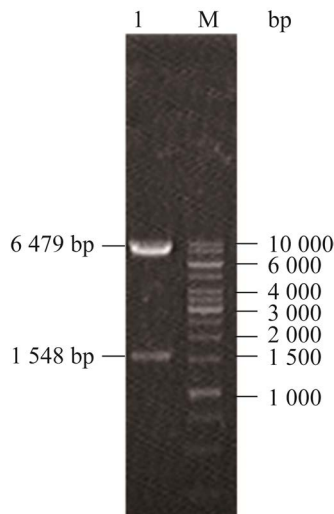


图2 质粒 YEplac181-PGK1p-LacY-CYC1t 的构建
Figure 2 Construction of plasmid YEplac181-PGK1p-LacY-CYC1t. M: Marker; 1: YEplac181-PGK1p vector and LacY-CYC1t gene.

将表达 β -葡萄糖苷酶的质粒 pRS316-BT (带有 GFP 标记的 *ghl-1*) 与表达乳糖透过酶的质粒 YEplac181-PGK1p-LacY-CYC1t 组合构建出纤维二糖代谢途径, 导入酿酒酵母 W303-1A 中, 菌株命名为 W303-1A GL。

此外将质粒 YEplac181 和 YEplac195 通过醋酸锂转化法转入菌株 W303-1A 中, 涂布于缺失亮氨酸和尿嘧啶的 SC 固体培养基中进行培养, 挑取转化子得到对照菌株 W303-1A-control。

2.2 工程菌的纤维二糖利用性能研究

将菌株 W303-1A GL 与 W303-1A-control 在 5 mL 含有 20 g/L 葡萄糖的缺失亮氨酸与尿嘧啶的 SC 液体培养基中, 30 °C、200 r/min 活化过夜后, 转接至 5 mL 含有 20 g/L 葡萄糖的缺失亮氨酸与尿嘧啶的 SC 液体培养基中 30 °C、200 r/min 培养 16 h, 取一定量的菌液收集菌体, 重悬于 50 mL 含有 10 g/L 纤维二糖的缺失亮氨酸与尿嘧啶的 SC 液体培养基中。发酵的初始 OD_{600} 为 0.5, 初始纤维二糖含量为 10 g/L, 发酵温度为 30 °C, 摇床转速为 100 r/min。发酵过程中选取一定的时间点进行取样测定工程菌的生长、培养基中的残糖量和 β -葡萄糖苷酶的酶活。

通过分光光度法测定发酵液的菌落密度来绘制生长曲线, 见图 3。我们可以看到对照菌株 W303-1A-control 无法利用纤维二糖生长, 而构建的纤维二糖利用菌株 W303-1A GL 在发酵开始的前 6 h 几乎没有生长, 之后生长逐渐加快。菌株 W303-1A GL 细胞密度最高在第 54 h 时 OD_{600} 可达到 10.84。

通过 DNS 法测得各时间节点处发酵液的残糖量, 绘制纤维二糖利用菌株的糖耗曲线, 见图 4。在 72 h 发酵时间内对照菌株 W303-1A-control 无法消耗纤维二糖, 而纤维二糖利用菌株 W303-1A GL 可明显消耗纤维二糖, W303-1A GL 的糖耗速度在 12 h 后明显加快, 于 24 h 左右耗完所有纤维二糖。

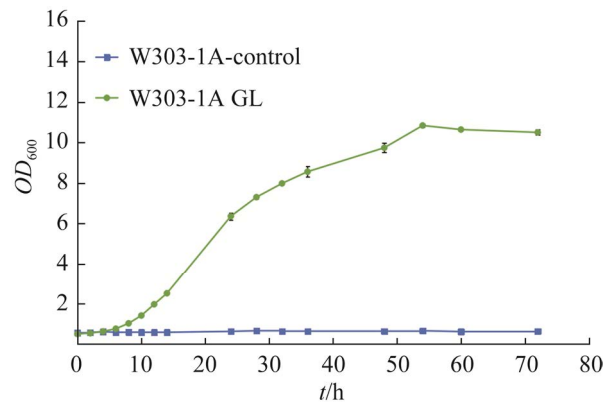


图3 纤维二糖利用菌株的生长曲线

Figure 3 Growth curve of cellobiose utilization strains. Error bars represent SD of three replicates.

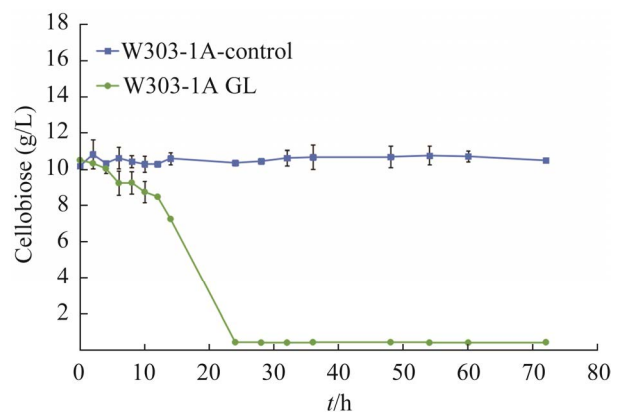


图4 纤维二糖利用菌株的糖耗曲线

Figure 4 Cellobiose consumption curve of cellobiose utilization strains. Error bars represent SD of three replicates.

选取发酵过程中的关键节点收集发酵液, 分别测定上清液和细胞内的 β -葡萄糖苷酶酶活。酶活测定结果如图 5 所示, 纤维二糖利用菌株 W303-1A GL 的上清液酶活与对照菌株 W303-1 A-control 相比无显著差异。对照菌株 W303-1A-control 与纤维二糖利用菌株 W303-1A GL 的细胞内酶活差异明显, W303-1A GL 的细胞内酶活在 72 h 时达到最高, 为 0.51 U/mg。

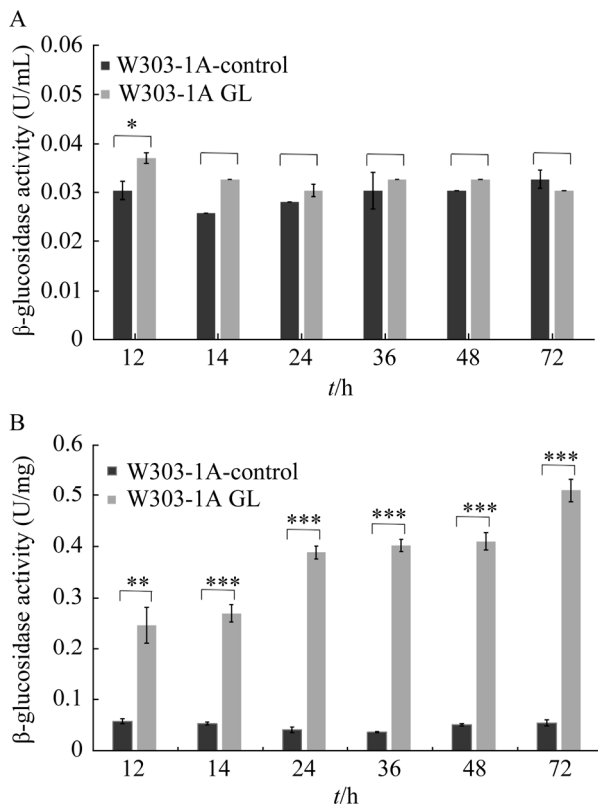


图 5 菌株的 β -葡萄糖苷酶活性

Figure 5 β -glucosidase activity of strains. A: The supernatant activity of all strains. B: The intracellular activity of all strains. Error bars represent SD of three replicates and asterisks indicate significant differences. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

2.3 纤维二糖利用菌株的乙醇生产能力研究

菌株经发酵后留乙醇样, 利用液相色谱检测纤维二糖利用菌株的乙醇生产能力, 结果如

图 6 所示, 对照菌 W303-1A-control 几乎无乙醇产生, 而纤维二糖利用菌株 W303-1A GL 乙醇产量在 24 h 时最高, 可达到约 3.25 g/L。在 24 h 纤维二糖利用菌株 W303-1A GL 得率为 0.325 g 乙醇/g 纤维二糖, 可以看出, W303-1A GL 工程菌纤维二糖利用情况良好。24 h 之后乙醇含量降低可能是由于酿酒酵母将乙醇作为碳源利用。

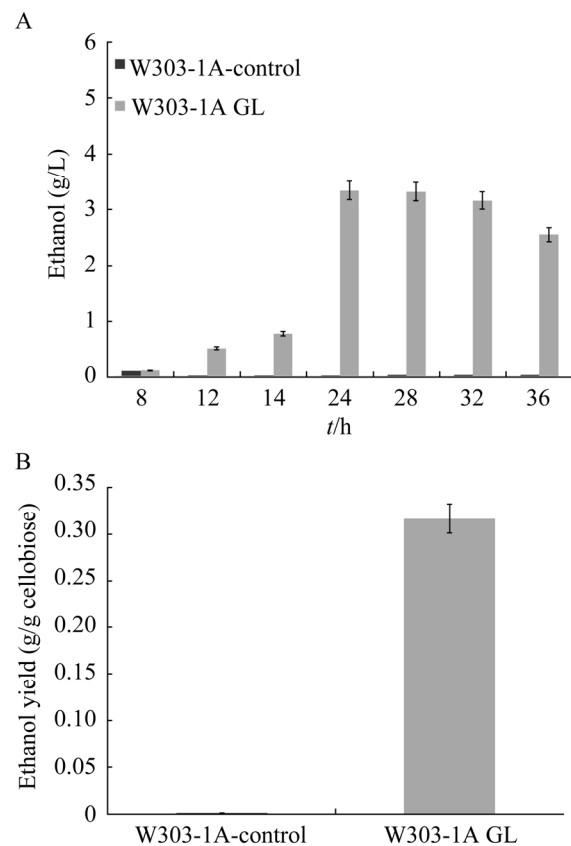


图 6 菌株乙醇得率和产量

Figure 6 Ethanol yield and production of strains. A: The change of ethanol production of strains within 36 h. B: The ethanol yield of strains at 24 h. Error bars represent SD of three replicates.

3 讨论与结论

将低成本的生物质资源转变为高附加价值的产品是人们所期许的最终目标, 探究利用木

质纤维素生产生物燃料有着深远的意义。本研究在酿酒酵母中成功表达了来自于大肠杆菌的乳糖透过酶 *LacY* 基因, 由工程菌 W303-1A GL 的生长结果可以看出, 通过搭配载体 pRS316-*PGK1p-ghl-1-CYCl*t 表达的 β -葡萄糖苷酶, 工程菌在 54 h 时达到最大细胞密度 $OD_{600}=10.84$, β -葡萄糖苷酶酶活最高为 0.51 U/mg, 发酵 24 h 时乙醇产量可达到 3.25 g/L, 得率为 0.325 g 乙醇/g 纤维二糖, 利用葡萄糖产乙醇理论得率为 0.511 g 乙醇/g 纤维二糖, 达到理论得率的 64%, 成功构建出酿酒酵母工程菌 W303-1A GL。虽然这株酿酒酵母工程菌可以利用纤维二糖, 但效率还是偏低, 例如与 Galazka 等^[11]构建的纤维二糖利用菌株的 0.441 g 乙醇/g 纤维二糖相比还有一定的差距。但在之后的研究中可以进一步对纤维二糖代谢途径进行优化, 优化后的纤维二糖利用途径通过 δ 整合的方式整合进酿酒酵母染色体中, 保证基因表达的稳定性, 并测试最终工程菌的遗传稳定性, 进一步提高菌株纤维二糖的利用效率。

在探索快速利用纤维二糖途径的过程中, 进一步阐明纤维二糖利用的潜在机制也是非常重要的。随着各种组学的发展, 利用纤维二糖所引起的酿酒酵母的代谢变化已经得到了揭示。Ha 等^[17]将 *Scheffersomyces stipitis* 中推定的己糖转运蛋白 HXT2.4 引入酿酒酵母中, 发现酿酒酵母可以利用纤维二糖, 但效率较低, 他们分析发现了 HXT2.4 上的一个 A291D 突变, 进一步研究发现该位点被负电荷氨基酸替代会增强纤维二糖发酵。Oh 等^[18]对 *CDT-2* 基因构建基因文库进行低 pH 值培养筛选, 在乙醇生产明显改善的菌株中 *CDT-2* 基因找到了 2 个点突变——I96N 和 T487A。Lin 等^[16]通过转录组测序对比了酿酒酵母中纤维二糖代谢与葡萄糖代谢之间基因表达的差异。在酿酒酵母利用纤

维二糖时, 与线粒体相关的基因表达水平大幅上调, 涉及到氧化磷酸化和 TCA 循环, 这表明纤维二糖同木糖一样, 也会激活线粒体的活性。但有关于氨基酸合成与硫胺素合成的基因大幅下调。进一步分析利用纤维二糖的调节机制, 对 19 个出现变化的转录因子进行测试, 发现 *SUT1* 的过表达或 *HAP4* 的缺失会有效提高纤维二糖利用率。Chomvong 等^[19]对利用纤维二糖的酵母进行代谢谱分析发现, 葡萄糖作为一种信号分子, 其缺失引发了细胞的“碳饥饿”, 导致体内 ATP 水平显著偏高, 进一步抑制了糖酵解途径的限速酶, 引发糖酵解的失衡。Yun 等^[20]同样在代谢谱分析中发现 TCA 途径中 GABA 分流途径的增强, 此途径参与细胞对各种应激的抵抗, 这可能与“碳饥饿”引发的应激有关。通过评价细胞各时期内的自噬水平, 发现纤维二糖利用菌株的自噬强度明显高于葡萄糖代谢。他们的研究为后续纤维二糖利用的优化提供了珍贵的理论基础。

综上所述, 本研究已经构建了能利用纤维二糖的酿酒酵母菌株, 但代谢通路的组合还可以进一步优化, 从而阐明纤维二糖利用的潜在机制, 构建稳定可靠的发酵菌株, 实现木质纤维素类可再生能源的高效转化。

致谢

感谢 UC Berkeley 的 Jamie Cate 博士惠赠质粒 pRS316-BT (带有绿色荧光蛋白 GFP 标记的 *ghl-1*)。

参考文献

- [1] ZAMAN K, MOEMEN MAE. Energy consumption, carbon dioxide emissions and economic development: evaluating alternative and plausible environmental hypothesis for sustainable growth[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2017, 74: 1119-1130.

- [2] BRETHAUER S, WYMAN CE. Review: continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(13): 4862-4874.
- [3] YANG XR, XU MM, YANG ST. Metabolic and process engineering of *Clostridium cellulovorans* for biofuel production from cellulose[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 32: 39-48.
- [4] HAHN-HAGERDAL B, GALBE M, GORWA-GRAUSLUND MF, LIDEN G, ZACCHI G. Bio-ethanol—the fuel of tomorrow from the residues of today[J]. *Trends in Biotechnology*, 2006, 24(12): 549-556.
- [5] PARISUTHAM V, KIM TH, LEE SK. Feasibilities of consolidated bioprocessing microbes: from pretreatment to biofuel production[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 161: 431-440.
- [6] SRIVASTAVA N, SRIVASTAVA M, MISHRA PK, SINGH P, RAMTEKE PW. Application of cellulases in biofuels industries: an overview[J]. *Journal of Biofuels and Bioenergy*, 2015, 1(1): 55.
- [7] ZHAO Y, WU B, YAN BX, GAO PJ. Mechanism of cellobiose inhibition in cellulose hydrolysis by cellobiohydrolase[J]. *Science in China Series C, Life Sciences*, 2004, 47(1): 18-24.
- [8] ANDRIC P, MEYER AS, JENSEN PA, DAM-JOHANSEN K. Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis: I. Significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes[J]. *Biotechnology Advances*, 2010, 28(3): 308-324.
- [9] 熊云. 我国发展生物质液体燃料的探讨[J]. *能源研究与信息*, 2003, 19(2): 101-106.
XIONG Y. Development of biomass liquid fuels in China[J]. *Energy Research and Information*, 2003, 19(2): 101-106 (in Chinese).
- [10] RICHARD P, VERHO R, PUTKONEN M, LONDESBOROUGH J, PENTTILA M. Production of ethanol from L-arabinose by *Saccharomyces cerevisiae* containing a fungal L-arabinose pathway[J]. *FEMS Yeast Research*, 2003, 3(2): 185-189.
- [11] GALAZKA JM, TIAN CG, BEESON WT, MARTINEZ B, GLASS NL, CATE JHD. Cellodextrin transport in yeast for improved biofuel production[J]. *Science*, 2010, 330(6000): 84-86.
- [12] SEKAR R, SHIN HD, CHEN R. Engineering *Escherichia coli* cells for cellobiose assimilation through a phosphorolytic mechanism[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(5): 1611-1614.
- [13] HANAHAN D. Techniques for transformation of *Escherichia coli*[A]// *DNA Cloning A Practical Approach*[M]. 1985, 1: 109-135.
- [14] THOMAS BJ, ROTHSTEIN R. Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA[J]. *Cell*, 1989, 56(4): 619-630.
- [15] GIETZ RD, AKIO S. New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with *in vitro* mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites[J]. *Gene*, 1988, 74(2): 527-534.
- [16] LIN YP, CHOMVONG K, ACOSTA-SAMPSON L, ESTRELA R, GALAZKA JM, KIM SR, JIN YS, CATE JH. Leveraging transcription factors to speed cellobiose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7(1): 126.
- [17] HA SJ, KIM H, LIN YP, JANG MU, GALAZKA JM, KIM TJ, CATE JHD, JIN YS. Single amino acid substitutions in HXT2.4 from *Scheffersomyces stipitidis* lead to improved cellobiose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(5): 1500-1507.
- [18] OH EJ, KWAK S, KIM H, JIN YS. Transporter engineering for cellobiose fermentation under lower pH conditions by engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 245: 1469-1475.
- [19] CHOMVONG K, BENJAMIN DI, NOMURA DK, CATE JHD. Cellobiose consumption uncouples extracellular glucose sensing and glucose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *mBio*, 2017, 8(4): e00855-e00817.
- [20] YUN EJ, OH EJ, LIU JJ, YU S, KIM DH, KWAK S, KIM KH, JIN YS. Promiscuous activities of heterologous enzymes lead to unintended metabolic rerouting in *Saccharomyces cerevisiae* engineered to assimilate various sugars from renewable biomass[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11: 140.