第7卷 无锡轻工业学院学报 Vol.7
第4期 JOURNAL OF THE WUXI INSTITUTE OF LIGHT INDUSTRY 1988 No.4

直接发酵木糖为酒精的新酵母基因工程菌的选育

翁溥* 章克昌 陈利夫**
(教务处)

摘 要

裂殖酵母，Schizosaccharomyces pombe 不能发酵木糖，也不能用它来增殖细胞。但是，这种酵母能发酵木酮糖为酒精，产率和转化率都很高。这表明，它缺少异构酶基因，如果将其它微生物的这种基因克隆到酵母中去，它就能直接发酵木糖。本文介绍了Schizosacch.pombe 的五碳糖磷酸代谢途径，这种代谢途径使得它成为用于这一目的的理想菌株。含有异构酶基因的 DNA 片段来自 Clark和Carbon 的大肠杆菌基因库，它的大小为 2.4kb，PstI-抗性。将这个基因克隆到上述酵母中去，得到的酵母基因工程菌株不仅能利用木糖作为唯一碳源和能源，还能发酵木糖为酒精，它具有在工业上应用的潜力

主题词：木糖异构酶；木糖；发酵；基因克隆；粟酒；裂殖酵母

纤维酒精作为一种可部分取代汽油的潜在能源而得到世界各国的普遍重视。半纤维素在大部分天然纤维中的含量仅比纤维素略少或大致相等，为此，如果能找到一条成功的半纤维素酒精发酵的途径，则将提高纤维酒精的商业竞争能力。

半纤维素水解液中的主要糖分是木糖，它是历来被认为不可发酵性的五碳糖。80年代初，美国和加拿大学者几乎同时报道，木糖经木糖异构酶异构成木酮糖后，能被酵母发酵生成酒精[1,2]。以后又陆续报道了不少木糖直接发酵的研究成果[3,4]。前一种木糖酒精发酵工艺的主要缺点是要使用木糖异构酶，而且在采用半纤维素水解液作为基质时，固相化木糖异构酶的半衰期只有80多个小时。后一种直接发酵工艺路线的主要问题是发酵速度慢(5～6天)，发酵醪酒精浓度低(小于2克/100毫升)。

本文介绍了普度大学食品科学系用基因重组的方法选育木糖直接发酵基因工程菌的研究情况，它的成功是木糖直接发酵，仍至半纤维素酒精发酵的一个突破。

1 木糖异构酶-Xylose Isomerase(XI)基因的确认

利用木糖异构酶发酵木糖是普遍存在于原核微生物中的一种现象。

本文1988年4月16日收到。

* 翁溥—P.P.Ueng美国普度大学食品科学系研究员
** 陈利夫—L.F.Chen美国普度大学食品科学系副教授

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

本研究所用的木糖异构酶基因来自大肠杆菌，而大肠杆菌基因库是Clark和Carbon建立的。已知含有五碳糖发酵基因的质粒有以下3种：plc I—3,plc10—15和plc32—9。

第一步是将木糖异构酶基因从以上几种质粒上分离出来并加以确认，其具体操作步骤如下：

用各种不同的限制性内切酶去切割上述3种含有木糖发酵基因的质粒，并将切割得到的许多DNA片段单离出来；

将单离得到的各个DNA片段分别联接到一个名为PDB248的质粒上，后者是由英国D。Nurse提供的，它含有Sacch.cerevisiae的Leu基因，并具有ampicillin和tetrocyclin的抗生素抗性；

用这样克隆获得的质粒去转化一些木糖异构酶阴性的大肠杆菌变异菌株。这些菌株未转化前，在MacConkey base+1%木糖的培养基上长成白色菌落，也没有任何抗生素抗性(表1)。

表 1 大肠杆菌K—12各菌株中木糖利用酶活性的比较

菌株	MacConkey 琼脂		酶活性		
	木糖(1%)	木酮糖(1%)	透性酶*(nmol)	异构酶(nmol/min/mg)	木酮糖激酶(nmol/min/mg)
GM8	红色	红色	48	148	130
W595	白色	红色	9	0	89
W945	白色	红色	20	0	208
JA200	白色	红色	23	0	156
JA221	白色	红色	7	0	12

*37℃时5～60分钟木糖-C^{14}的最大吸收

转化后的工程菌株细胞由于获得了木糖异构酶基因而能够发酵木糖，所以，它们在MacConkey base+1%木糖的培养基上能形成红色菌落，并且具有抗生素抗性。抗生素抗性的特性是由DNA片段克隆的位置决定的。如果克隆的位置在pst I切点处，则该菌具有Ampicillin(氨苄青霉素)敏感，但对tetrocycline四环素抗性；如果克隆在BomHI或HindⅢ处，则具有Ampicillin抗性，但对tetrocycline敏感(图1)。

经过多次重复，发现木糖异构酶基因是包含在一个用pst I限制性内切酶切割得到DNA片段上，其大小为2.4KB。

上述几个木糖异构酶阴性的变异菌株经转化后都形成了红色菌落，并获得了产生木糖异构酶的能力(表2)

表 2 各木糖—阴性大肠杆菌转化菌pDB248-XI木糖异构酶活性比较

菌株	活性(nmol/min/mg)
W595-pDB248-XI	50
W945-pDB248-XI	82
JA200-pDB248-XI	73
JA221-pDB248-XI	128
GM8(野生型)	148

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2　木糖异构酶基因转化受体菌株的选择

本研究选用Schizosaccharomyces pombe（粟酒裂殖酵母）作为木糖异构酶基因转化的受体菌株，其主要理由如下：

从美国普度大学“再生资源工程实验室”研究人员所做的早期研究可知，与Sacch. cerevisiae (S.C)相比，Schizosacch pombe(S.P)发酵木酮糖的能力较强，发酵时产生的副产物—木糖醇数量较少，是木糖酒精发酵的理想菌株；

S.P发酵葡萄糖的速率虽然比S.C低，但发酵速率仍然相当高，即它可使90%以上的葡萄糖转化为酒精；

在进行S.C和S.P对葡萄糖和木酮糖发酵比较时发现，当酵母在木酮糖中培养一段时间后，再去发酵葡萄糖，则其发酵速率会增高。如果酵母先在葡萄糖中生长，然后再去发酵木酮糖，则其发酵速率很低(图2)。如果酵母先在木酮糖中生长，再[3]

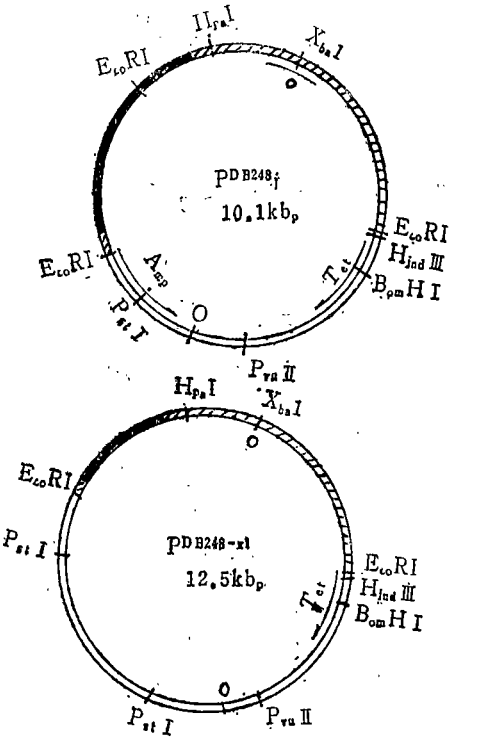


图1　质粒pDB248和pDB248-XI的限制图

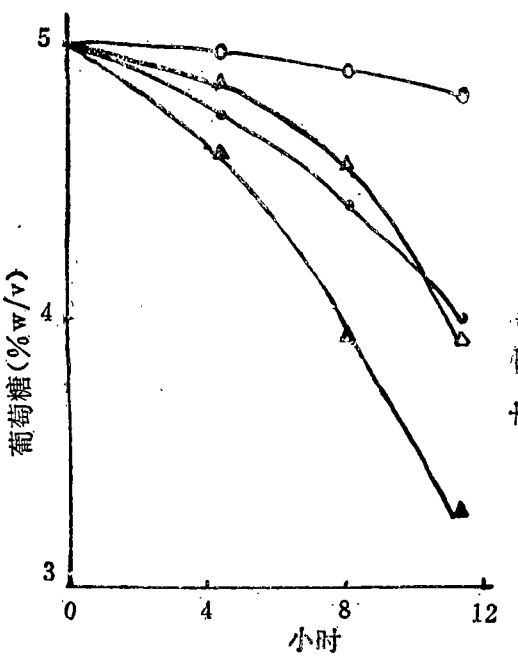


图2　不同培养工艺的S.P,S.C葡萄糖发酵曲线
○—S.P先长在葡萄糖上；
[3]—S.P先长在木酮糖上；

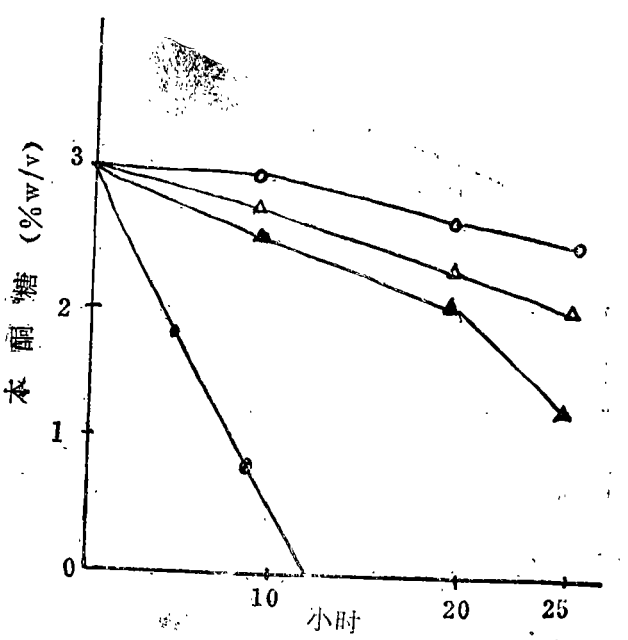


图3　不同培养工艺的S.P,S.C木酮糖发酵曲线
△—S.C先长在葡萄糖上；
▲—S.C先长在木酮糖上。

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

去发酵木酮糖，则发酵速率会增加，特别是S.P，在这种情况下，它的发酵速率远远超过S.C(图3)。从图2和图3可以设想，木酮糖的发酵要用木酮糖来诱导；

进一步用含有示踪元素 C^{14} 的葡萄糖、木糖和木糖醇来进行酵母的糖类吸收试验，结果和上述试验完全一致(图4)。

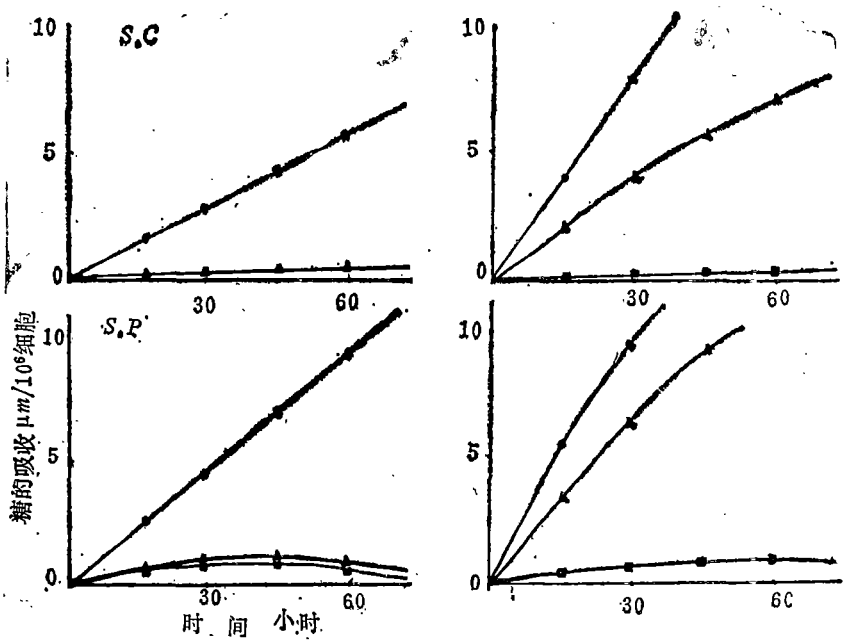


图4 糖 的 吸 收

●—●葡萄糖 ▲—▲木酮糖 ■—■木糖

从图4可知：

木酮糖的吸收需要诱导；

木酮糖不能诱导木糖的吸收；

长在木酮糖中S.P的木酮糖和葡萄糖吸收速率增加很快，大大超过S.C。

为了进一步搞清S.P木酮糖发酵速率增加快的问题，我们进行了木酮糖激酶(Xyluloki nase)活性的测定，结果见表3。

表3 生长在不同糖中的酵母的木酮糖激酶比较

菌 种	基 质(1%)	活性nmol/min/mg蛋白质	
		澄 清 液	沉 淀
Sacch. cerevisiae (ATCC 26108)	葡萄糖	11.5	1.7
	木酮糖	9.8	4.3
Schizosacch.pombe (ATCC 38399)	葡萄糖	15.8	5.6
	木酮糖	50.3	5.8
Schizosacch. pombe (pDB248-XI transformed ATCC 38399)	木 糖	38.2	8.5
Candida S.P	木 糖	117.3	33.5

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

木酮糖激酶是五碳糖代谢路线的第一个酶。从表 3 可知，这个酶的活性在S.C中，不管是生长在葡萄糖还是在木酮糖中，其数值相差无几。但是，对于S.P来说，生长木酮糖中的该酶活性是长在葡萄糖中的 3 倍。这是S.P在五碳糖发酵中优于 S.C 的一个例证。

最后，选择 S.P 作为基因克隆受体的另一原因是，转化后得到的酵母工程菌菌落，由于形态比较特殊(是裂殖菌)，容易鉴别。

3 木糖异构酶基因表达的特殊性

3.1 碳源利用基因表达的特殊性

木糖异构酶基因属于利用碳源的基因，它在酵母体内表达比产蛋白质的基因的表达困难得多。因为要证明一个利用某种碳源的基因在生物体内的表达，只能用该碳源既作细胞组成来源，又作能量来源。基因克隆所得的细胞要利用细胞内残存的碳源或能量来使该基因得到表达，此后，细胞才有可能在某种碳源的基本培养上生长。蛋白质基因表达可用葡萄糖作为能源和细胞组成来培养生物细胞，然后用免疫法、抗体法或测定蛋白质组成来分析基因是否表达。由此可知，前者的条件是相当苛刻的。

因此，木糖异构酶基因转化以后，所得细胞能否在基础培养基(YNB＋1%木糖)上生长繁殖，对本试验和微生物细胞本身都具有决定性的意义。

3.2 XI基因工程菌细胞早期培养的能量来源

为了改善上述 XI 基因在生物细胞内表达的苛刻条件，人们希望能找到一种碳源，它只能作为 XI 基因转化细胞生长的能源，但不能作为其细胞组成的碳源，这样就既能有利于细胞的生长，又不影响 XI 基因表达的鉴定。

葡萄糖和木酮糖都不符合上述的条件。于是我们重点研究了甘油能否成为这种碳源。一般说来，S.C 和 S.P 都能利用甘油作为能源和细胞组成的碳源，这对五碳糖利用基因的表达也是有害的。幸运的是我们所用的 S.P 变种(ATCC38399)只能将甘油作为能源，而不能作为细胞组成的碳源(图) 5 。

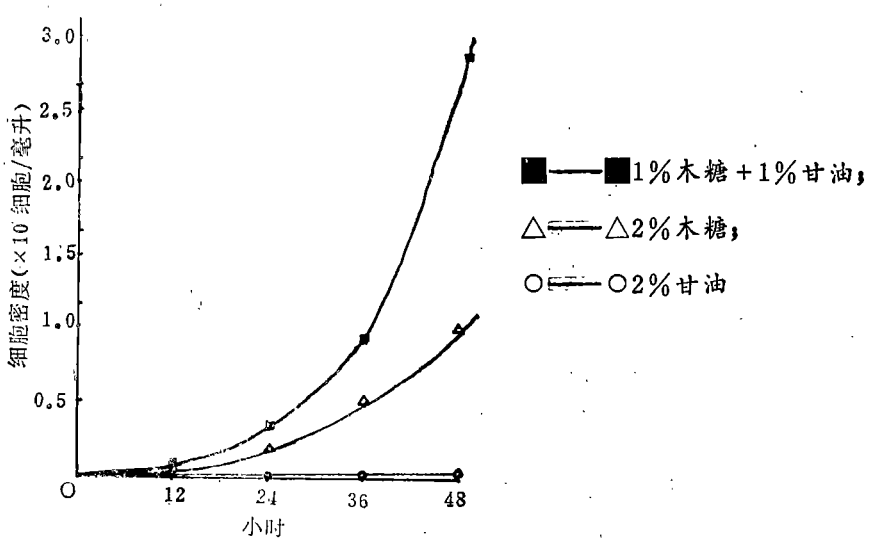


图 5　不同碳源下酵母生长曲线

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

从图5可见，在甘油中该菌株不能生长，在加0.1～1%甘油的木酮糖中比在单纯木酮糖中生长要快得多，这说明，甘油只能成为该菌株的能源。根据这个研究结果，我们在试验中就用木糖和甘油作为基因转化细胞的早期培养基碳源。

4 XI基因转化的具体步骤

我们采用S.P的亮氨酸缺陷型变异菌株(S.PLeu^{-1})作为出发菌株。将该菌培养在YNB+1%木糖和木酮糖(1：1)的混合培养基中，然后收集该细胞，并制成原生质体，再用质粒pDB248XI进行转化，并用不含Leu的平板培养。一周后，用无菌水将长出的菌落洗出，接入含有1%木糖和甘油(1：1)的YNB培养液中，培养10天后发现酵母细胞的浓度增加。然后，逐步将培养液中的甘油含量减少，直至转化酵母细胞能正常生长在只有木糖的YNB培养基中为止。

另外，将上述XI基因工程细胞中的全DNA抽提出来，再用它来转化E.coli xyl^{-}变异菌株，转化结果是：木糖发酵阳性菌落占78%(红色菌落)，阴性菌落占22%(白色菌落)。这说明，质粒pDB248在酵母中的稳定性只有80%。

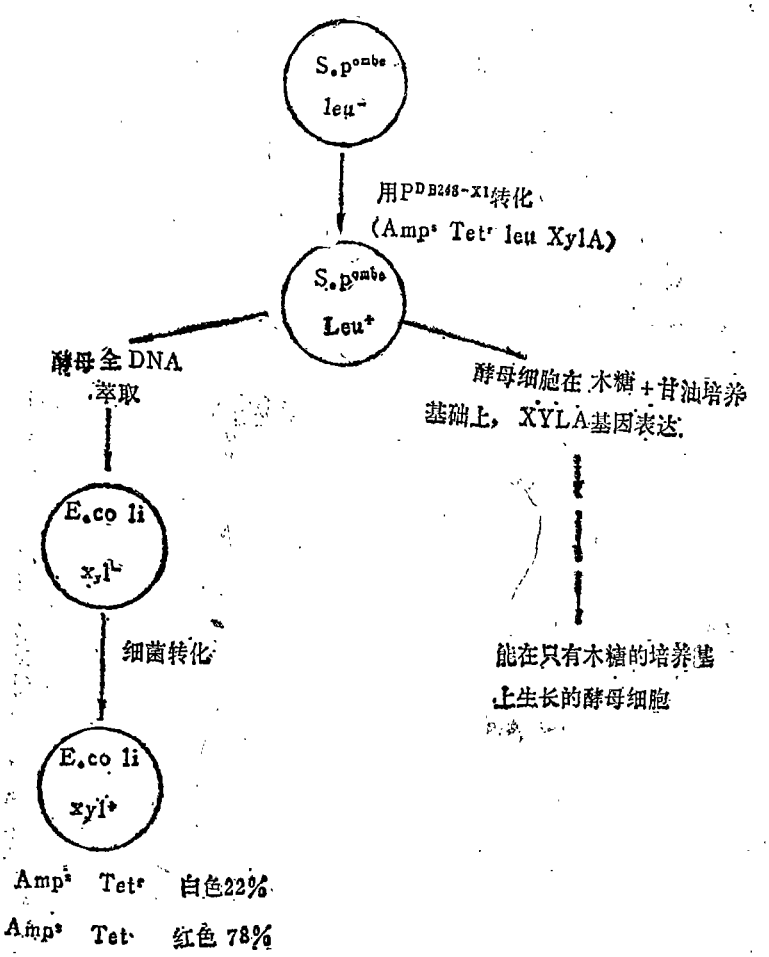


图6 基因转化的步骤

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

5 XI基因转化所得工程菌的分析

S.P 菌株的细胞是醋肠形的，裂殖时有横隔膜存在。本研究所得的S.P pDB248XI菌株是梨形，但分裂时也有横隔膜，这表明它是S.P的变种。如果将梨形细胞放到葡萄糖或木酮糖中去培养，那么，细胞很快恢复为醋肠形。

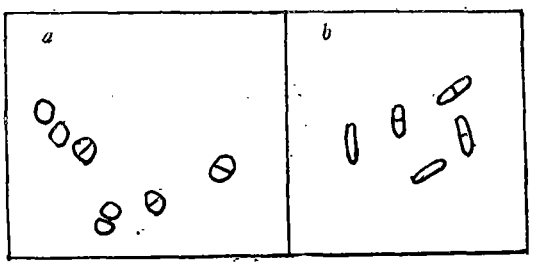


图 7　S.P pDB248XI菌株的形态
a—S.P pDB248XI菌株；　　b—S.P

转化前的S.P菌株不会吸收放谢性标记木糖，XI基因转化所得的工程菌菌株能吸收C^{14}标记木糖(数据另文发表)。

通过测定发现，现有工程菌的木糖异构酶活性并不太高，原因可能有以下两个方面：

一是由于工程菌中蛋白酶活性很强，特别是打破细胞以后，强的蛋百酶活性会使木糖异构酶失活。我们的研究发现，将工程菌的细胞汁加到E.Coli的培养液中，经过15分钟，原有的木糖异构酶活性会有消失(数据尚未发表)。为此，要进一步提高工程菌的XI活性，就需要添加蛋白酶抑制剂，或者进行诱变，以得到不产或少产蛋白酶的变异菌株。

二是可能由于该酶在细胞中存在的位置不好，也可能该酶酵母体内需要有一个启动子，这些可能性都需要进一步研究。

表 4 生长在木糖中的裂殖酵母的木糖异构酶活性比较

菌株	表现型	木糖异构酶		细胞生长		
		生长基质(%)	活性*	甘油加量 (nmol/50ml)	km (mM)	U_{max}**
ATCC38399	Leu^-xyl^-	木糖，木酮糖 (1：1)	1.2	6.0	不生长	
ATCC38399-pDB248	Leu^+xyl^-	同上	1.5	6.0	不生长	
ATCC38399-pDB248-XI	Leu^+xyl^-	木糖，甘油 (1：1)	4.1	3.0	31.2	0.9
2周菌龄						
6周菌龄		木糖，甘油 (2.0：0.3)	6.0	1.5	23.4	1.2
12周菌龄		木糖(2.0)	2.0	0.0	28.5	5.7

*—nmoles/h/mg蛋白质　　**细胞最大生长速度($x10^6$/ml/d)

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

XI 基因转化工程菌 ATCC38399pDB248-XI 对木糖的利用速度随培养时间的延长而加快。当培养时间达12周时其 U_{max}5.7，相应的 km 为 28.5mM(见 表 4)。

若将各种 S.P 的 DNA 抽提出来，并用 BglⅡ、PstⅠ和EcoRⅠ 3 种限制 性内切酶分别进行切割，用 Southern blot 法处理，发现：

没有转化的 ATCC38399 没有反应，无带条；

转化了的 S.P 中有反应，而且只有一个带条，但带条较宽大。这说明 基 因已融合到酵母本身的 DNA 中去了，而不是以质粒 pDB248XI 的形态存在，所以它 失 去一 个限制性切点。根据标准质粒 pDB248XI 的 DNA 浓度比较，大约只有一个考贝。

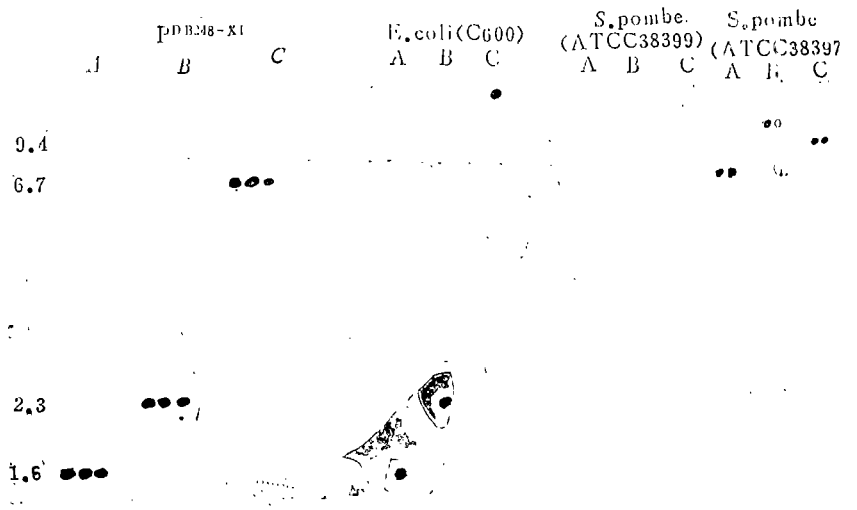


图8 S.P 菌株DNA片段电泳图

A—用BglⅡ限制性内切酶切割； B—用PstⅠ限制性内切酶切割；
C—用EcoRⅠ限制性内切酶切割。

至于基因融合到那一条染色体上(S.P有 5 条)，是在 Leu 基因附近，还 是 在 木糖激酶基因附近，目前还不清楚。

我们还研究所得的基因工程菌株 S.PpDB248-XI 的木糖酒精发酵，初 步 的发酵结果见图 9 。

从图 9 可见，该工程菌可将10%(w/v)的木糖转化为3%(w/v) 以 上 的酒精，发酵时间10天左右。进一步的诱变使工程菌的生产有了明显改进，发酵时间加快了 5 倍，木糖醇生成量明显降低。这些都充分证明，S.PpDB248XI 菌株是一株非常有潜力的菌 株，它可能成为木糖发酵第一个工业用菌株。

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

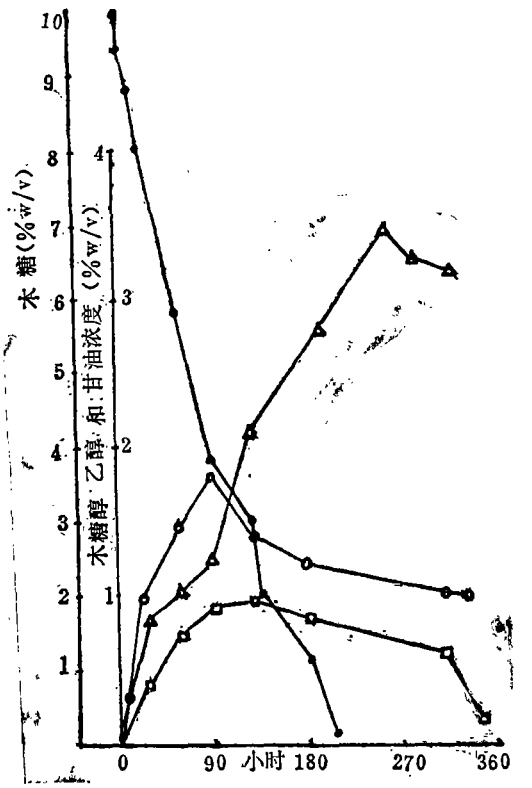


图 9 用转化后的 S.pombe 生产酒精、木糖醇和甘油

●——●木糖；△——△酒精；□——□甘油；○——○木糖醇

参　考　文　献

[1] Gong C S, Chen L F, Flickinger M C, et al, *Appl Environ Microbiol*, 1980; **41**: 430～436

[2] Wang P Y, Johnson B F, Schneider H. *Biotechnol Lett*, 1980; **2**: 273～278

[3] Gong C S, Mecracken L D, Tsao G T. *Biotechnol Lett*, 1981; **5**: 245～250

[4] Schneider L, Wang P Y, Chen Y K, et al. *Biotechnol Lett*, 1981; **2**: 89～92

[5] Gong C S, Claypool T A, Mecracken L D, et al. *Biotechnol Bioeng*, 1983; **25**: 85～102

[6] Ho N W Y, Rosenfeld S, Stevis P, et al. *Enzyme Microb Technol*, 1983a; **5**: 417～420

[7] Ho N W Y, Stevis P, Rosenfeld S, et al. *Biotechnol Bioeng Smp*, 1983b; **13**: 245～250

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

The Selection of new Yeast Species Fermenting Directly Xylose to Ethanol by Cloning of Isomerase Gene

P.P.Ueng *Zhang Kechang* *L.F.Chen*

Abstract

Fission yeast, schizosaccharomyces pombe, can not be used for fermenting xylose sugar and for cell growth. However, the yeast can be used to ferment xylulose, an isomerized product of xylose, to ethanol with high yield and efficiency. This shows that a xylose isomerase gene was missing in the yeast, and cloning of this gene from other organisms might make the yeast ferment xylose directly. It is also shown in this study that activation of sugar uptake and pentose phosphate metabolic pathway by xylulose made this yeast an ideal organism for this purpose. A 2.4 kb size Ps I-restricted DNA fragment containing xylose isomerase gene was isolated from Clark and Carbon's E.coli genomic library and cloned into the yeast. By use of xylose, the genetically engineered yeast not only can be taken as the sole carbon and energy source but also can be used to ferment the sugar to ethanol.

Subjectwords: Xylose; Fission yeast; Schizosaccharomyces pombe; Xylose isomerase; Gene cloning

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net