

马克斯克鲁维酵母的木糖和阿拉伯糖发酵

侯胜博¹, 冯华良¹, 高教琪¹, 李益民¹, 袁文杰¹, 白凤武²

1 大连理工大学 生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116023

2 上海交通大学 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240

侯胜博, 冯华良, 高教琪, 等. 马克斯克鲁维酵母的木糖和阿拉伯糖发酵. 生物工程学报, 2017, 33(6): 923-935.

Hou SB, Feng HL, Gao JQ, et al. Fermentations of xylose and arabinose by *Kluyveromyces marxianus*. Chin J Biotech, 2017, 33(6): 923-935.

摘要: 马克斯克鲁维酵母作为非常规酵母在燃料乙醇发酵中受到人们越来越多的关注。马克斯克鲁维具有天然的发酵戊糖的能力, 但不同菌株的发酵能力存在较大差异。本研究比较了 3 株马克斯克鲁维菌株 *Kluyveromyces marxianus* 9009/1911/1727 (*K. m* 9009/1911/1727) 在不同温度下的木糖和阿拉伯糖的发酵性能差异, 结果发现不同发酵温度下, 3 株菌在耗糖速率、糖醇产率均表现出了显著的差异。菌株 *K. m* 9009 和 *K. m* 1727 在 40 °C 下的发酵性能均优于 30 °C, 这充分体现了马克斯克鲁维酵母的高温发酵优势。针对发酵差异, 采用 PCR 方法获得 3 个不同菌株的戊糖代谢途径中的 5 种关键代谢酶 (XR、XDH、XK、AR 和 LAD) 的基因序列, 并利用 Clustalx 2.1 进行了序列比对。结果显示 3 株菌的相关基因与文献中报道的 1 株克鲁维酵母的相应关键酶氨基酸编码序列相似性达 98% 以上, 并且差异的氨基酸不在酶的关键位点处。在此基础上, 通过 Real-time 实验, 对木糖发酵差异最为明显的 *K. m* 1727 和 *K. m* 1911 的木糖代谢过程 4 个关键酶 (XR、XDH、XK 和 ADH) 的基因表达量进行测定, 其结果显示对于耐热菌株 *K. m* 1727, XDH 和 XK 基因表达量低是导致木糖代谢过程中木糖醇积累、乙醇产量低的主要原因。最后, 将所测得的马克斯克鲁维酵母的戊糖代谢关键酶序列与其他不同种属相比对, 确定了其木糖和阿拉伯糖代谢途径, 为进一步利用代谢工程方法提高戊糖发酵性能奠定了基础。

关键词: 马克斯克鲁维酵母, 木糖发酵, 阿拉伯糖发酵, 代谢途径, 序列比对

Received: November 24, 2016; **Accepted:** January 6, 2017

Supported by: China Postdoctoral Science Foundation (No. 2015M571316), National Key Laboratory Project of Microbial Metabolism (No. MMLKF16-04).

Corresponding author: Wenjie Yuan. Tel: +86-411-84706308; E-mail: ywj@dlut.edu.cn

中国博士后基金项目 (No. 2015M571316), 微生物代谢国家重点实验室开放基金 (No. MMLKF16-04) 资助。

网络出版时间: 2017-01-16

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20170116.1007.003.html>

Fermentations of xylose and arabinose by *Kluyveromyces marxianus*

Shengbo Hou¹, Hualiang Feng¹, Jiaoqi Gao¹, Yimin Li¹, Wenjie Yuan¹, and Fengwu Bai²

¹ School of Life Sciences and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian 116023, Liaoning, China

² State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China

Abstract: *Kluyveromyces marxianus*, as unconventional yeast, attracts more and more attention in the biofuel fermentation. Although this sort of yeasts can ferment pentose sugars, the fermentation capacity differs largely. Xylose and arabinose fermentation by three *K. marxianus* strains (*K. m* 9009, *K. m* 1911 and *K. m* 1727) were compared at different temperatures. The results showed that the fermentation performance of the three strains had significant difference under different fermentation temperatures. Especially, the sugar consumption rate and alcohol yield of *K. m* 9009 and *K. m* 1727 at 40 °C were better than 30 °C. This results fully reflect the fermentation advantages of *K. marxianus* yeast under high-temperature. On this basis, five genes (XR, XDH, XK, AR and LAD) coding key metabolic enzymes in three different yeasts were amplified by PCR, and the sequence were compared by Clustalx 2.1. The results showed that the amino acid sequences coding key enzymes have similarity of over 98% with the reference sequences reported in the literature. Furthermore, the difference of amino acid was not at the key site of its enzyme, so the differences between three stains were not caused by the gene level, but by transcribed or translation regulation level. By real-time PCR experiment, we determined the gene expression levels of four key enzymes (XR, XDH, XK and ADH) in the xylose metabolism pathway of *K. m* 1727 and *K. m* 1911 at different fermentation time points. The results showed that, for thermotolerant yeast *K. m* 1727, the low expression level of XDH and XK genes was the main factors leading to accumulation of xylitol. In addition, according to the pathway of *Zygosaccharomyces bailii*, which have been reported in NCBI and KEGG, the xylose and arabinose metabolic pathways of *K. marxianus* were identified, which laid foundation for further improving the pentose fermentation ability by metabolic engineering.

Keywords: *Kluyveromyces marxianus*, xylose fermentation, arabinose fermentation, metabolic pathway, sequence alignment

随着人类对石油等化石资源的大量开采，能源问题日益困扰着我们。燃料乙醇因其具有较高的辛烷值^[1]，无毒，是公认的最有可能替代化石能源的环境友好型生物质能源之一。此外，纤维素燃料乙醇由于其原料来源广泛、价格低廉、可再生性等特点受到国内外学者的广泛关注^[2]。

目前，酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 由于其高的乙醇生产率、耐受性和有效的己糖发酵能力在乙醇生产中起主要作用^[3-4]，但不能利用木糖和其他的 C5 糖。虽然通过外源搭建戊糖的代谢途径，酿酒酵母获得了利用戊糖的

能力，但戊糖转化率低，乙醇得率低仍是阻碍其在纤维素乙醇生产中的应用的主要原因。此外，热带假丝酵母 *Candida tropicalis* 也常用到纤维素乙醇的发酵中^[5]，但由于其代谢途径中存在还原力不平衡的问题更多地用于木糖醇的生产^[6-7]。

近年来，非传统酵母包括拜耳接合酵母^[8]、东方伊萨酵母^[8]、马克斯克鲁维酵母^[9-10]和鲁氏酵母等越来越多地应用到纤维素乙醇发酵中。其中的马克斯克鲁维酵母 *Kluyveromyces marxianus* 具有在真核微生物中生长速率最大^[11]，可在高达 45–52 °C 温度下生长^[12]，代谢底物范围广（包括

葡萄糖、甘露糖、半乳糖、乳糖等六碳糖和木糖、阿拉伯糖等五碳糖^[13]) 等特点,使其替代酿酒酵母成为发酵木质纤维素生产乙醇的良好选择^[14-17]。

在本实验中,以 3 株不同的马克斯克鲁维酵母为出发菌株,研究了其在不同温度下发酵戊糖(木糖和阿拉伯糖)的情况,对菌体的生长、木糖和阿拉伯糖利用率和乙醇、木糖醇、阿拉伯糖醇产量以及副产物产量分别进行了测定。在此基础上,对其代谢途径中的关键酶基因(木糖代谢途径:木糖还原酶 XR、木糖醇脱氢酶 XDH 和木酮糖激酶 XK;阿拉伯糖代谢途径:阿拉伯糖还原酶 AR 和阿拉伯糖醇脱氢酶 LAD)进行了序列测定及深入分析,试图在基因水平上解释其发酵差异,找出其影响发酵结果的关键因素,为构建高发酵性能的菌株奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 菌株

马克斯克鲁维酵母 (*Kluyveromyces marxianus*) 9009、1911、1727 均购自中国工业微生物保藏中心,编号分别为 9009、1911 和 1727。以上菌株由大连理工大学生命科学院保藏。

1.1.2 培养基

活化培养基 (g/L): 无水葡萄糖 20, 酵母浸粉 10, 蛋白胨 20, 121 °C 灭菌 20 min。

种子培养基同活化培养基。

发酵培养基 (g/L): 糖类 40 (葡萄糖、木糖、阿拉伯糖), 其余成分同种子培养基。

1.1.3 引物

实验中所用的引物序列见表 1。

表 1 文中所用的引物序列

Table 1 Primer sequence involved in this paper

Prime name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
XR-F	ATGACATACCTCGCACCAAC	20
XR-R	GGGGAAGGGGAAAGAAAGTA	20
XDH-F	ATCAACCATGACCAACTC	20
XDH-R	CATGTTTCATTCTGGACCATC	20
XK-F	CAGCAATGTCTACCCCATAC	20
XK-R	CAGGTCAACAGCTTCTCGTT	20
AR-F	GAGTCCAAGTGTGTCAAGTT	20
AR-R	TCATGGAGCATTGGTGCAGT	20
ADH-F	ATGTCCGGATTGAGTCAAGA	20
ADH-R	TTGAGAATGGGTGATTCACC	20

1.1.4 工具酶及试剂盒

引物合成和序列测序委托生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA marker 等购自 TaKaRa (大连) 公司; PCR 产物纯化试剂盒与琼脂糖凝胶回收试剂盒均购自北京索莱宝科技有限公司。其他试剂为国产分析纯以上。

1.2 方法

1.2.1 菌株培养及发酵条件

将菌株接种到活化培养基中进行活化,取 1 mL 活化发酵液转接到 100 mL 种子培养基中过夜培养 12-16 h。测定 OD_{620} 值,确定其接入木糖发酵培养基的接种量,保证其起始接种量一致。

经过两级种子活化,将种子液以 10% 的体积分数接入有效体积为 200 mL 的 500 mL 摇瓶培养基中,摇瓶用 8 层纱布(微量通气)封口。30 °C、150 r/min 培养。定时取样,并测定生物量,5 000 r/min 离心 5 min,液氮冻存菌体以待后续转录水平分析,上清液用于糖以及各种代谢产物浓度的测定。

1.2.2 分析方法

生物量测定方法: 采用 *OD* 值法, 将菌液适当稀释, 在波长为 620 nm 处测定其吸光值。

发酵液代谢产物的分析: 发酵液在 5 000 r/min 下离心 5 min, 取上清液, 用孔径为 0.22 μ m 的水膜过滤, 利用高效液相色谱 (HPLC) 测定木糖、阿拉伯糖、木糖醇、阿拉伯糖醇、甘油、乙酸和乙醇的含量。色谱柱的型号为 SUGAR 系列 SP0810。流动相为纯水, 流量为 0.7 mL/min, 分别使用紫外检测器 (检测波长 205 nm) 和示差检测器。

1.2.3 酵母基因组 DNA 的提取

菌体的培养与收获: 从 30 $^{\circ}$ C 培养 2 d 的酵母菌平板上挑取一个单菌落, 接入 100 mL YPD 液体培养基, 于 30 $^{\circ}$ C 培养 16 h。10 000 r/min 离心 3 min 收集菌体。

菌体的裂解: 用无菌水洗涤菌体 2 次, 向菌体中加入 500 μ L 裂解液, 将菌体悬浮, 再加入 2/3 体积的干净玻璃珠 ($d=0.5$ mm) 和 25 μ L 的 5 mmol/L NaCl 溶液, 高速振荡破碎细胞。12 000 r/min 离心 5 min, 将上清转移至干净的离心管中。

基因组 DNA 的抽提: 加入等体积的酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1), 同上振荡, 10 000 r/min 离心 1 min。取上清, 加入 2 倍体积 95% 乙醇后置于 -20 $^{\circ}$ C 放置 1 h。

高速离心 10 min 后, 用 70% 乙醇洗涤沉淀, 于室温晾干, 并将沉淀溶于适量 TE 缓冲液 (pH 8.0) 中, 加入适量 RNase 消化 RNA, 即得酵母基因组 DNA 样品, 取 5 μ L 进行琼脂糖凝胶电泳检测, 剩余的 DNA 样品于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.4 引物设计及序列比对

引物的设计: 采用 PrimerPremier 5.0 引物设

计软件, 按照 GenBank 的 *K. marxianus* NBRC 1777 的戊糖代谢途径中关键酶 (XR、XDH、XK、AR、ADH、XLR) 基因全序列为依据设计上述引物。

序列比对: 1) 登陆 NCBI 网站, 利用网站中的 Blast 工具对所测得的关键酶基因进行序列比对。2) 利用 Clustalx 2.1 软件进行多序列比对。

1.2.5 酵母 RNA 提取及 Real-time 实验

RNA 的提取: 使用总 RNA 提取试剂盒 (天根生化科技股份有限公司)。

Real-time 实验委托生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成。

2 结果与分析

2.1 马克斯克鲁维酵母发酵木糖

经木糖为碳源的种子培养基培养后, 马克斯克鲁维酵母 9009、1911、1727 在不同温度下 (30 $^{\circ}$ C 和 40 $^{\circ}$ C) 利用木糖的情况如图 1 和表 2 所示。从图 1 可以看出, 相同发酵条件下, 不同菌株有着不同的生长状态, 在耗糖速率、木糖醇产率和乙醇产率上有着明显的不同。30 $^{\circ}$ C 条件下, 消耗木糖最快的菌株为 *K. m* 1727, 发酵 32.94 g/L 木糖, 产生 9.22 g/L 的木糖醇, 产生少量乙醇。生物量 OD_{620} 达到 6 左右; 其次为 *K. m* 1911, 生物量 OD_{620} 达到 4 左右, 6 d 消耗 29.19 g/L 木糖, 剩余 4.51 g/L 残糖, 无木糖醇积累, 但能产生 2.68 g/L 的乙醇; 消耗木糖最慢的为 *K. m* 9009, 虽然生物量最高, OD_{620} 达到 6.7 左右, 但 6 d 内只消耗 28.74 g/L 木糖, 产生 1.89 g/L 的木糖醇且基本无乙醇产生。

而 40 $^{\circ}$ C 条件下, 消耗木糖最快的也是 *K. m* 1727, 虽然最终生物量 OD_{620} 仅达到 4 左

右,但 35.60 g/L 木糖可在 5 d 基本耗完,并能产生 19.25 g/L 的木糖醇,同样基本无乙醇产生;其次是 *K. m* 9009,生物量 OD_{620} 最终能达到 4.5 左右,但 35.60 g/L 木糖需要 6 d 才能耗完,产生 13.22 g/L 的木糖醇,产生少量乙醇;耗糖最慢的为 *K. m* 1911,生物量 OD_{620} 为 3.5 左右,35.60 g/L 木糖发酵 6 d 后,还剩余 19.79 g/L,产生少量

木糖醇和乙醇。

通过比较不同温度下菌株的发酵性能可以看出,菌株 *K. m* 1727 和 *K. m* 9009 在 40 °C 条件下的发酵性能均优于 30 °C,木糖消耗快,并且木糖醇的产量分别由 9.22 g/L 和 1.89 g/L 提高至 19.25 g/L 和 13.22 g/L,体现了马克斯克鲁维酵母在高温条件下发酵的优势。

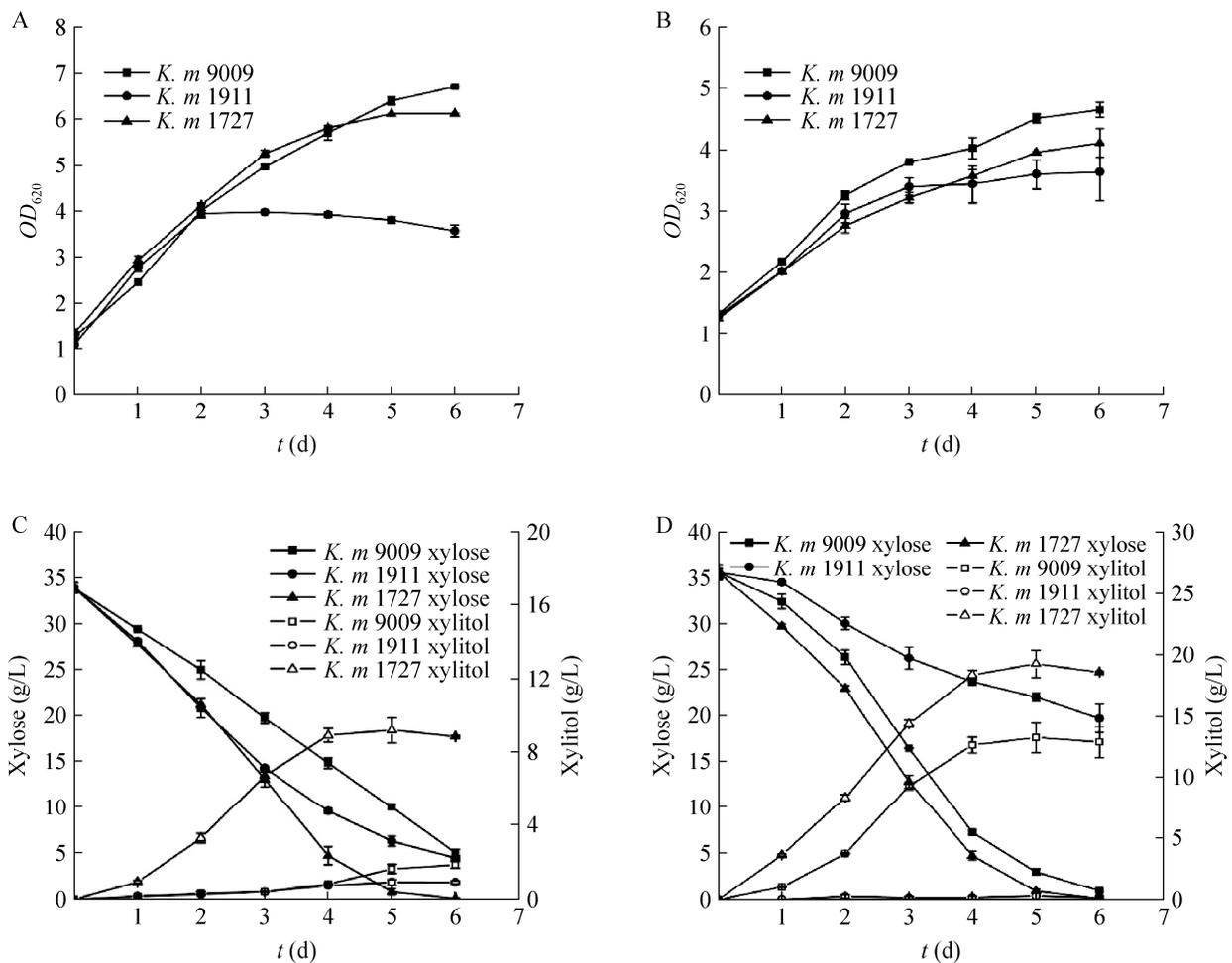


图 1 三株马克斯克鲁维酵母的木糖发酵结果 (A、C 为其 30 °C 温度下菌体的生长状况和发酵结果; B、D 为其 40 °C 温度下菌体的生长状况和发酵结果)

Fig. 1 The xylose fermentation profiles of three *Kluyveromyces marxianus* strains at different temperatures: 30 °C (A, C) and 40 °C (B, D).

表 2 木糖为底物时菌株的生长参数

Table 2 Growth parameters of strains using xylose as substrate

Temperature (°C)	Strains	Time (d)	P (Initial sugar) (g/L)	P (Sugar consumption) (g/L)	P (xylitol) (g/L)	P (Glycerol) (g/L)	P (Acetic acid) (g/L)	P (ethanol) (g/L)
30	<i>K. m</i> 9009	6	33.80±0.35	28.74	1.89±0.19	0.24±0.07	0.54±0.05	0.32
	<i>K. m</i> 1911	6	33.80±0.35	29.29	0.95±0.86	0.52±0.10	3.12±0.21	2.68±0.27
	<i>K. m</i> 1727	5	33.80±0.35	32.94	9.22±0.75	0.17	1.51±0.13	0.65±0.02
40	<i>K. m</i> 9009	6	35.60±0.31	34.61	13.22±1.24	0.54±0.03	0.93±0.12	0.52±0.12
	<i>K. m</i> 1911	6	35.60±0.31	15.81	0.29±0.02	0.18±0.01	1.24±0.07	0.92±0.04
	<i>K. m</i> 1727	5	35.60±0.31	34.67	19.25±0.23	1.35±0.22	0.84±0.10	0.24±0.11

2.2 马克斯克鲁维酵母发酵阿拉伯糖

经在酵母膏脲葡萄糖培养基 (YPD) 种子培养基培养后, 接入以阿拉伯糖为唯一碳源的发酵培养基上进行发酵, 其在不同发酵温度 (30 °C 和 40 °C) 下的发酵结果如图 2 和表 3 所示。从发酵结果来看, 3 株克鲁维酵母发酵阿拉伯糖时表现出比发酵木糖时更大的差异性。

30 °C 发酵温度下, 7 d 的发酵时间, 发酵阿拉伯糖最快的为 *K. m* 9009, 生物量 OD_{620} 达到 5, 消耗 30.70 g/L 的阿拉伯糖, 产生 13.85 g/L 的阿拉伯糖醇。其次为 *K. m* 1727, 生物量达到 3, 消耗 21.49 g/L 阿拉伯糖, 剩余 17.27 g/L 的阿拉伯糖, 但有 12.22 g/L 的阿拉伯糖醇产生。最慢的为 *K. m* 1911, 生物量只达到 2 左右, 剩余 30.98 g/L 的阿拉伯糖, 产生 6.06 g/L 的阿拉伯糖醇。3 株菌均无乙醇产生。

40 °C 发酵温度下, 发酵阿拉伯糖速率最快的为 *K. m* 1727, 37 g/L 的阿拉伯糖发酵 6 d 剩余 4 g/L 的阿拉伯糖, 产生大约 26 g/L 的阿拉伯糖醇; 其次为 *K. m* 9009, 37 g/L 的阿拉伯糖发酵 7 d 剩余 5 g/L 的阿拉伯糖, 产生大约 20 g/L 的阿拉伯糖醇; 最慢的为 *K. m* 1911, 36 g/L 的阿拉伯糖发酵 7 d 剩余 12.5 g/L 的阿拉伯糖, 产生 18 g/L 的阿拉伯糖醇。

比较 40 °C 和 30 °C 的阿拉伯糖的发酵结果,

同样体现了马克斯克鲁维酵母在高温发酵方面的优势。随温度的升高, 虽然菌株的生长受到一定影响, 但阿拉伯糖醇的产量大幅提高, *K. m* 1727 的阿拉伯糖醇产率由 30 °C 的 0.56 g/g, 提高到 40 °C 的 0.79 g/g; *K. m* 9009 的阿拉伯糖醇产率由 30 °C 的 0.45 g/g, 提高到 40 °C 的 0.63 g/g。

2.3 木糖代谢途径中关键酶编码基因的克隆及序列比对

采用 PCR 的方法, 获得了马克斯克鲁维酵母中编码木糖代谢途径中关键酶 (XR、XDH、XK) 基因, 送生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。相应关键酶的基因编码序列已提交到 NCBI 中, 其 XR 序列登录号 (*K. m* 9009, 1911, 1727): KX388390–KX388392; XDH 序列登录号 (*K. m* 9009, 1911, 1727): KX455881–KX455883; XK 序列登录号 (*K. m* 9009, 1911, 1727): KX462707–KX462709。以 NCBI 中已提交的马克斯克鲁维酵母 NBRC1777 相对应的酶编码序列为基准, 以其所编码的氨基酸序列与本文中 3 个菌株的相应基因编码蛋白序列进行 Blast 比对, 结果发现 3 株菌的 3 种关键酶氨基酸序列与 *K. m* NBRC1777 的相应序列相似性都达 98% 以上。进行 Clustalx 多序列比对后, 其差异如图 3 所示。木糖还原酶的活性位点位于 22–24、47、52、81、14、115、173、174、195、

221–224、261、276–279、284、287 和 288 处的氨基酸序列^[17]，而其序列差异存在于其氨基酸序列为 15、320–321、325、327 位点，不在其活性位点处；木糖醇脱氢酶的活性位点位于 42、44、48、54、57 等氨基酸处^[18]，而其序列差异存在于 9、12、14、211、277 处的氨基酸位点，不在其活性位点处。木酮糖激酶的活性位点位于 10、

12–15、17–91、93 等氨基酸处^[19]，而其序列差异存在于其氨基酸序列为 38、250、414、417、579 位点，不在其活性位点处；与其他 2 株不同的是，在菌株 *K. m 1727* 中，检测到与活性位点相关的差异位点包括 10、12–15、17 处的氨基酸序列。这些序列差异的突变，与 *K. m 1727* 的木糖发酵及耐热性之间的相关性尚需进一步深入研究。

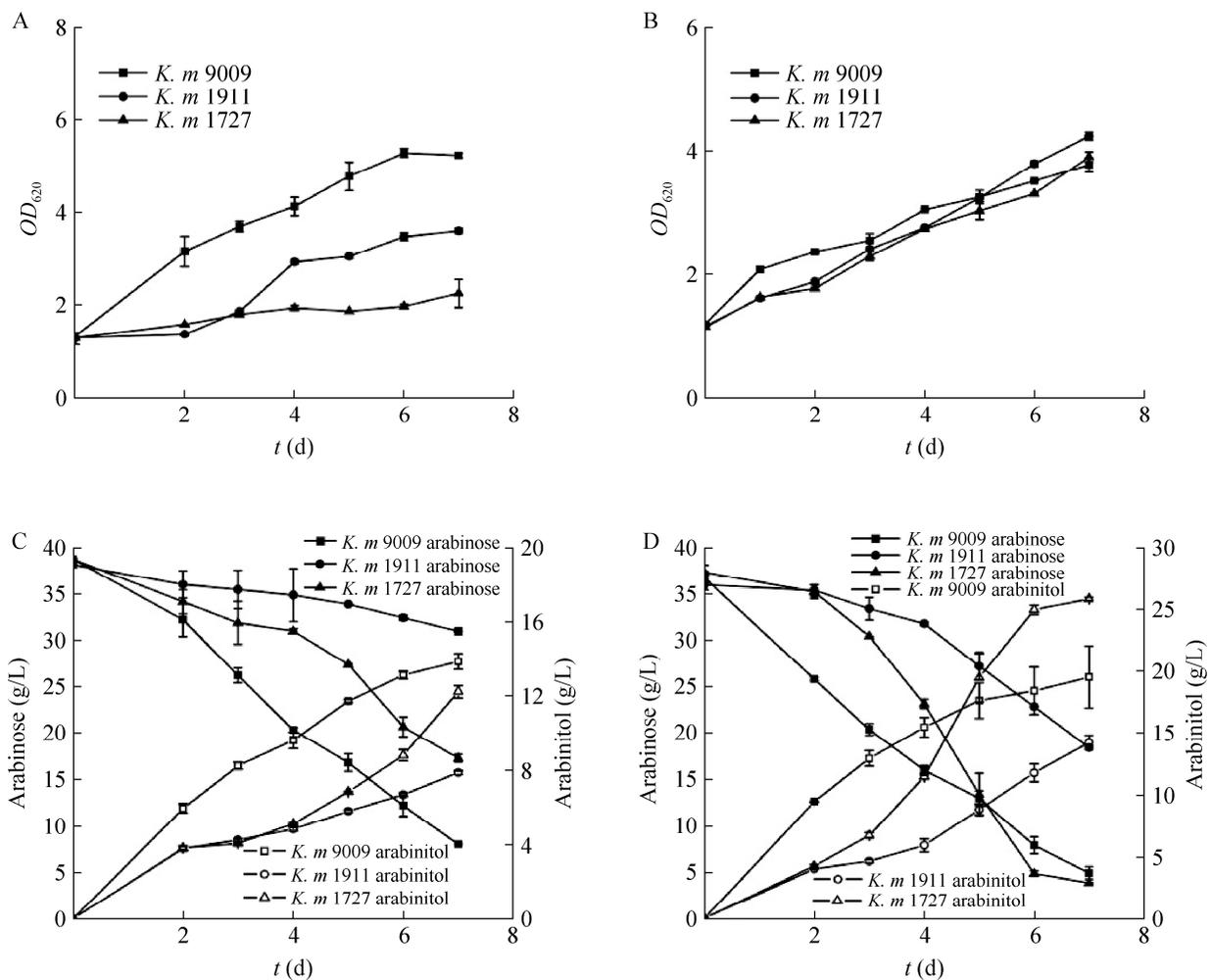


图 2 三株马克斯克鲁维酵母的阿拉伯糖发酵结果 (A、C 为其 30 °C 温度下菌体的生长状况和发酵结果；B、D 为其 40 °C 温度下菌体的生长状况和发酵结果)

Fig. 2 The arabinose fermentation profiles of three *Kluyveromyces marxianus* strains at different temperatures: 30 °C (A, C) and 40 °C (B, D).

表 3 阿拉伯糖为底物时菌株的生长参数

Table 3 Growth parameters of strains using arabinose as substrate

Temperature (°C)	Strains	Time (d)	ρ (Initial sugar) (g/L)	ρ (Residual sugar) (g/L)	ρ (Sugar consumption) (g/L)	ρ (Arabinitol) (g/L)
30	<i>K. m</i> 9009	7	38.75±0.16	8.05±0.11	30.70	13.85±0.42
	<i>K. m</i> 1911	7	38.15±0.30	30.98±0.36	7.17	6.06±0.10
	<i>K. m</i> 1727	7	38.76±0.03	17.27±0.42	21.49	12.22±0.33
40	<i>K. m</i> 9009	7	36.79±0.14	4.91±0.13	31.88	19.91±2.52
	<i>K. m</i> 1911	7	36.02±0.56	12.47±0.21	23.55	17.96±0.58
	<i>K. m</i> 1727	6	37.38±0.79	3.84±0.29	33.54	25.86±0.38

		15		320-321	325-327		
XR- <i>K. m</i> 9009		NG\$K\$MPLV		PWDLVGNEYPPI-			
XR- <i>K. m</i> 1911		NG\$K\$MPLV		PWDLVGNEYPAFI-			
XR- <i>K. m</i> 1727		NG\$K\$MPLV		PWDWLGNEYPPFI-			
XR- <i>K. m</i> NBRC 1777		NG\$E\$MPLV		PWDWLGNEFPFI-			
		:*		***:***:*		**	
		9--12--14		211	277		
XDH- <i>K. m</i> 9009		AVLLKEQGEIAFE		RAKEFG	GRD\$N\$VN		
XDH- <i>K. m</i> 1911		AVVLKKQREIAFE		RAEEFG	GRDNYN		
XDH- <i>K. m</i> 1727		AVVLKKQGEIAFE		RAKEFG	GRD\$N\$VN		
XDH- <i>K. m</i> NBRC 1777		AVVLKKQGEIAFE		RAKEFG	GRD\$D\$VN		
		:*:* ***		**:*:**	***:*:**		
		10 --- 17		38	250	414 417	579
XK- <i>K. m</i> 9009		GFDLSTQQLKCL		FDRDF	APTGE	NHPN\$K\$SI	WEQCNG
XK- <i>K. m</i> 1911		GFDLSTQQLKCL		FDRDF	APTGE	NHPN\$K\$TI	WEQCNG
XK- <i>K. m</i> 1727		GFGSFLAALQCL		FDRDF	APTGE	NHPN\$K\$SI	WEQCNG
XK- <i>K. m</i> NBRC 1777		GFDLSTQQLKCL		FDRNF	APTRE	NHSN\$K\$SI	WEQSNG
		:*:		***:*	*** *	**:*:**	***:*:**

图 3 四株马克斯克鲁维酵母的木糖代谢途径中 3 个关键酶的氨基酸序列差异位点

Fig. 3 The differences sites of amino acid sequences encoding three key enzymes in xylose metabolism pathway between four *Kluyveromyces marxianus* strains.

2.4 阿拉伯糖代谢途径中关键酶编码基因的克隆及序列比对

对马克斯克鲁维酵母中编码阿拉伯糖代谢途径中的关键酶的基因序列 (AR 和 LAD) 进行了测序, 其相应关键酶的编码序列结果已提交到 NCBI 中, 其 AR 序列登录号 (*K. m* 9009, 1911,

1727): KX455884–KX455886、LAD 序列登录号 (*K. m* 9009, 1911, 1727): KX591955–KX591957。以 NCBI 中已提交的马克斯克鲁维酵母 DMKU3-1042 相对应的酶编码序列为基准, 与其所编码的氨基酸序列进行 Blast 序列进行一一比对, 结果发现 3 株菌与 *K. m* DMKU3-1042 的相应序列

相似性都达 99%以上。并进行 Clustalx 多序列比对,其差异如图 4 所示,其中阿拉伯糖还原酶的活性位点位于 28–30、53、58、89、123–124、154–155、178、204–209、230、245–248、253、256–257^[20]处的氨基酸序列,而其序列差异存在于其氨基酸序列为 163、205、239、271–272 位点。阿拉伯糖醇脱氢酶的活性位点位于 39、41–42、44、63–65、125–127、149、196–198、213、217、243–246 氨基酸处^[20],而序列差异为 66、115、211 处的氨基酸位点。这些序列差异均不在已知蛋白活性位点处。但从序列差异的结果来看,在这两个酶的编码氨基酸中,均是 *K. m* 1911 与其他 3 株不同,并且 *K. m* 1911 发酵阿拉伯糖的效果最差,因此,这些突变的位点可能与阿拉伯糖的代谢相关。综上,与木糖代谢类似,在基因水平上仍无法解释 3 株酵母在阿拉伯糖发酵性能方面的差异,可能存在转录水平或翻译水平的调控。

2.5 关键酶基因的转录水平测定

为了在基因转录水平上解释其发酵差异,

选取了木糖发酵差异最为明显的 *K. m* 1727 和 *K. m* 1911,对木糖代谢过程 4 个关键酶 (XR、XDH、XK 和 ADH) 的基因表达量进行测定。选取在 40 °C 发酵温度下,木糖发酵时间为 0 d、2 d、4 d 的菌体,经液氮冷冻后,提取 RNA 并对其木糖代谢途径中的 4 个关键酶编码基因 (XR、XDH、XK 和 ADH) 进行实时定量 PCR 实验,以发酵第 0 天的各基因表达量为 1 作为标准,得到其不同发酵时间点处的相对表达量,其结果如图 4 所示,从图 5A 可以看出在 *K. m* 1727 中,XR 的相对表达量随发酵时间的延长而增加,第 4 天,XR 的相对表达量是其第 1 天的 4.5 倍,而 XDH 和 XK 的表达量却随发酵时间的延长没有太大变化。这正好与木糖醇的积累相符合,说明菌株木糖代谢途径只走了第一步。而从图 5B 可以看出在 *K. m* 1911 中,XR、XDH、XK 三个基因的表达量随发酵时间的延长变化趋势基本一致。此外,从图 5C 我们可以看出 *K. m* 1911 的乙醇脱氢酶的基因表达量明显高于 *K. m* 1727,这与其乙醇产率明显高于 *K. m* 1727 相一致。

	163	205	239	271-272
AR- <i>K. m</i> DMKU3-1042	VDELLK W	EAY A PL	SL Q K	Q I SQ I D
AR- <i>K. m</i> 9009	VDELLK W	EAY A PL	SL Q K	Q I SQ I D
AR- <i>K. m</i> 1911	VDG L LK W	EAY T PL	SL Q K	Q I NE I D
AR- <i>K. m</i> 1727	VDELLK W	EAY A PL	SL R K	Q I SQ I D
	** ****	***:**	**:*	*.:**
	66	115	211	
LAD- <i>K. m</i> DMKU3-1042	LS H ESL	H N G I I	P Q CAY	
LAD- <i>K. m</i> 9009	LS H ESL	H N G I I	P Q CAY	
LAD- <i>K. m</i> 1911	LS R ESL	H K G I I	P Q YAY	
LAD- <i>K. m</i> 1727	LS H ESL	H N G I I	P Q CAY	
	:	*:**	** **	

图 4 四株马克斯克鲁维酵母的阿拉伯糖代谢途径中 2 个关键酶的氨基酸序列差异位点

Fig. 4 The differences sites of amino acid sequences encoding two key enzymes in arabinose metabolism pathway between four *Kluyveromyces marxianus* strains.

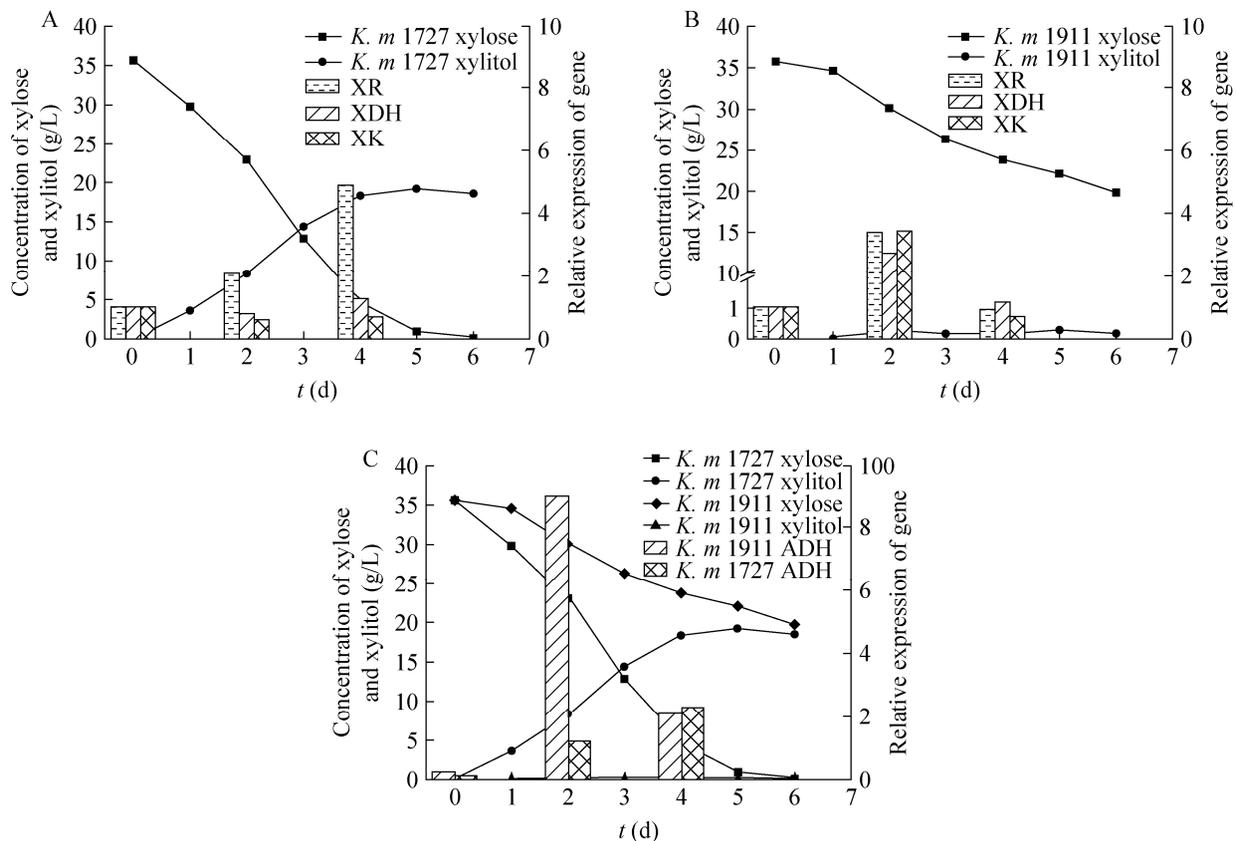


图 5 三个木糖代谢关键酶的编码基因在不同发酵时间点下的相对表达水平

Fig. 5 Relative expression of genes which encoding three key enzymes in xylose metabolism pathway at different fermentation time.

从结果可以看出，木糖醇脱氢酶和木酮糖激酶的基因表达量低是导致克鲁维酵母发酵木糖过程中木糖醇积累和乙醇产率低的主要原因。文献报道，通过在木糖代谢途径中过表达木酮糖激酶和木糖醇脱氢酶可以提高乙醇产率^[21-24]，因此采用基因工程的方法提高相关基因的表达量，同样是解决克鲁维酵母快速发酵戊糖生产乙醇的选择。

2.6 马克斯克鲁维酵母的戊糖代谢途径

通过与已发表的马克斯克鲁维酵母^[17-20]、拜耳结合酵母^[25]和热带假丝酵母^[26]对应的关键

酶编码序列相比对，根据其不同物种之间的差异和同一物种的同源性，我们进一步确定了马克斯克鲁维酵母中的戊糖代谢途径如图 6 所示。其中在木糖代谢过程中 (图 6,②)，木糖进入细胞内后，首先在木糖还原酶 (Xylose reductase, XR) 的作用下转化为木糖醇，然后在木糖醇脱氢酶 (Xylitol dehydrogenase, XDH) 的作用下形成木酮糖，最后再经过木酮糖激酶 (Xylulokinase, XK) 催化形成木酮糖-5-磷酸，由此进入戊糖磷酸途径 (PPP) 和糖酵解途径。

相对于木糖代谢途径，L-阿拉伯糖代谢途

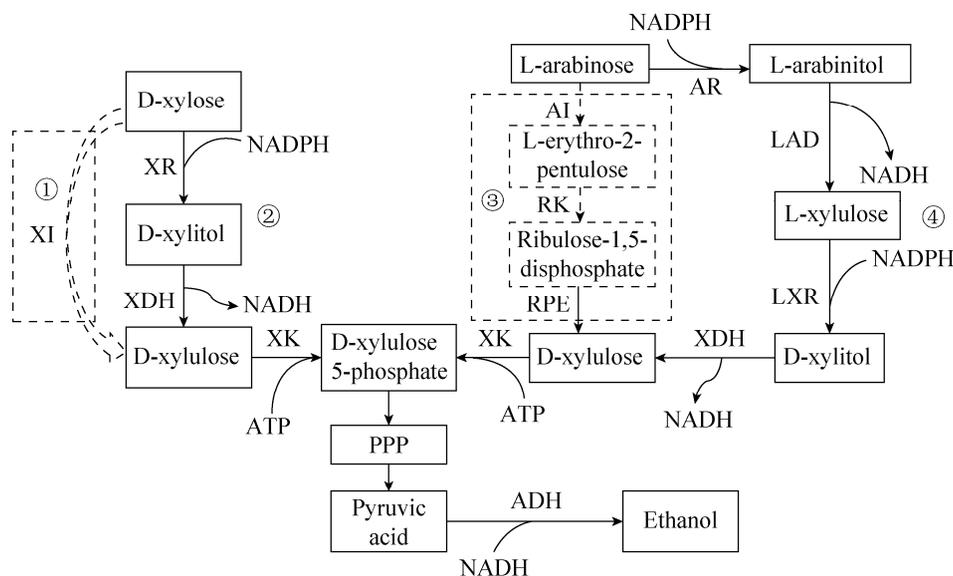


图 6 木糖和阿拉伯糖代谢途径 (①③分别为细菌中的木糖和阿拉伯糖代谢途径; ②④分别为真菌酵母中的木糖和阿拉伯糖代谢途径)

Fig. 6 Initial metabolic pathway of xylose and L-arabinose in micro-organisms (①③: the metabolic pathway of xylose and L-arabinose in bacteria; ②④: the metabolic pathway of xylose and L-arabinose in yeast).

径 (图 6,④) 相对复杂, 由 4 个交替的氧化还原反应组成。L-阿拉伯糖首先被 L-阿拉伯糖还原酶 (Arabinose reductase, AR) 还原成 L-阿拉伯糖醇, 再被 L-阿拉伯糖醇-4-脱氢酶 (L-arabinitol-4-dehydrogenase, LAD) 转化成 L-木酮糖, L-木酮糖经 L-木酮糖还原酶 (L-xylulose reductase, LXR) 还原成木糖醇, 木糖醇在木糖醇脱氢酶 (D-xylitol dehydrogenase, XDH) 和木酮糖激酶 (Xylulokinase, XK) 作用下生成 5-磷酸木酮糖, 进入细胞内的磷酸戊糖途径 (Pentose phosphate pathway, PPP) 进一步被代谢。

3 结论

通过比较 3 株马克斯克鲁维酵母 (*K. m* 9009、*K. m* 1911、*K. m* 1727) 在不同温度下 (30 °C 和 40 °C) 的戊糖发酵性能, 发现克鲁维酵母是适

于同步糖化发酵纤维素生物质生产生物能源的出发菌株。马克斯克鲁维酵母具有天然发酵戊糖的能力, 并且 *K. m* 1727 在 40 °C 的耗糖速率和木糖醇、阿拉伯糖醇产率明显高于 30 °C, 充分体现了马克斯克鲁维酵母在高温下的发酵优势。菌株 *K. m* 1911 耗糖速率虽然不如菌株 *K. m* 1727 快, 但其发酵木糖产乙醇的能力比 *K. m* 1727 高, 而 *K. m* 9009 在戊糖培养基中的生长状况最好。虽然 3 株菌代谢戊糖时表现出显著差异, 但关键酶的编码基因相差不大, 其在转录水平的差别是导致不同发酵结果的原因。采用基因工程的方法提高相关基因的表达量, 是解决克鲁维酵母快速发酵戊糖生产乙醇的选择。

REFERENCES

- [1] Bai FW, Anderson WA, Moo-Young M. Ethanol

- fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnol Adv*, 2008, 26(1): 89–105.
- [2] Yue GJ, Wu GQ, Lin X. Insights into engineering of cellulosic ethanol. *Chin J Biotech*, 2014, 30(6): 816–827 (in Chinese).
岳国君, 武国庆, 林鑫. 纤维素乙醇工程化探讨. *生物工程学报*, 2014, 30(6): 816–827.
- [3] Matsushika A, Inoue H, Kodaki T, et al. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 84(1): 37–53.
- [4] Ruyters S, Mukherjee V, Verstrepen KJ, et al. Assessing the potential of wild yeasts for bioethanol production. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2015, 42(1): 39–48.
- [5] Mattam AJ, Kuila A, Suralikerimath N, et al. Cellulolytic enzyme expression and simultaneous conversion of lignocellulosic sugars into ethanol and xylitol by a new *Candida tropicalis* strain. *Biotechnol Biofuels*, 2016, 9(1): 157.
- [6] Guo XX, Zhang RH, Li Z, et al. A novel pathway construction in *Candida tropicalis* for direct xylitol conversion from corncob xylan. *Bioresour Technol*, 2013, 128: 547–552.
- [7] Misra S, Raghuwanshi S, Saxena RK. Evaluation of corncob hemicellulosic hydrolysate for xylitol production by adapted strain of *Candida tropicalis*. *Carbohydr Polym*, 2013, 92(2): 1596–1601.
- [8] Radecka D, Mukherjee V, Mateo RQ, et al. Looking beyond *Saccharomyces*: the potential of non-conventional yeast species for desirable traits in bioethanol fermentation. *FEMS Yeast Res*, 2015, 15(6): fov053.
- [9] Lane MM, Morrissey JP. *Kluyveromyces marxianus*: a yeast emerging from its sister's shadow. *Fungal Biol Rev*, 2010, 24(1/2): 17–26.
- [10] Fonseca GG, Heinzle E, Wittmann C, et al. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 79(3): 339–354.
- [11] Groeneveld P, Stouthamer AH, Westerhoff HV. Super life—how and why ‘cell selection’ leads to the fastest-growing eukaryote. *FEBS J*, 2009, 276(1): 254–270.
- [12] Limtong S, Sringiew C, Yongmanitchai W. Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresour Technol*, 2007, 98(17): 3367–3374.
- [13] Rodrussamee N, Lertwattanasakul N, Hirata K, et al. Growth and ethanol fermentation ability on hexose and pentose sugars and glucose effect under various conditions in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 90(4): 1573–1586.
- [14] Ballesteros M, Oliva JM, Negro MJ, et al. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Process Biochem*, 2004, 39(12): 1843–1848.
- [15] Castro RCA, Roberto IC. Selection of a thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* strain with potential application for cellulosic ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. *Appl Biochem Biotechnol*, 2014, 172(3): 1553–1564.
- [16] Goshima T, Tsuji M, Inoue H, et al. Bioethanol production from lignocellulosic biomass by a novel *Kluyveromyces marxianus* strain. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2013, 77(7): 1505–1510.
- [17] Zhang B, Zhang L, Wang DM, et al. Identification of a xylose reductase gene in the xylose metabolic pathway of *Kluyveromyces marxianus* NBRC1777. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2011, 38(12): 2001–2010.
- [18] Li LL, Zhang L, Wang DM, et al. Identification of a xylitol dehydrogenase gene from *Kluyveromyces marxianus* NBRC1777. *Mol Biotechnol*, 2013, 53(2): 159–169.
- [19] Wang RL, Zhang L, Wang DM, et al. Identification of a xylulokinase catalyzing xylulose phosphorylation in the xylose metabolic pathway of *Kluyveromyces marxianus* NBRC1777. *J Ind Microbiol Biotechnol*,

- 2011, 38(10): 1739–1746.
- [20] Lertwattanasakul N, Kosaka T, Hosoyama A, et al. Genetic basis of the highly efficient yeast *Kluyveromyces marxianus*: complete genome sequence and transcriptome analyses. *Biotechnol Biofuels*, 2015, 8(1): 47.
- [21] Peng BY, Chen X, Shen Y, et al. Effect of controlled overexpression of xylulokinase by different promoters on xylose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Microbiol Sin*, 2011, 51(7): 914–922 (in Chinese).
彭炳银, 陈晓, 沈煜, 等. 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. *微生物学报*, 2011, 51 (7): 914–922.
- [22] Goshima T, Negi K, Tsuji M, et al. Ethanol fermentation from xylose by metabolically engineered strains of *Kluyveromyces marxianus*. *J Biosci Bioeng*, 2013, 116(5): 551–554.
- [23] Kim SR, Kwee NR, Kim H, et al. Feasibility of xylose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae* overexpressing endogenous aldose reductase (GRE3), xylitol dehydrogenase (XYL2), and xylulokinase (XYL3) from *Scheffersomyces stipitis*. *FEMS Yeast Res*, 2013, 13(3): 312–321.
- [24] Lee SH, Kodaki T, Park YC, et al. Effects of NADH-preferring xylose reductase expression on ethanol production from xylose in xylose-metabolizing recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol*, 2012, 158(4): 184–191.
- [25] Mira NP, Münsterkötter M, Dias-Valada F, et al. The genome sequence of the highly acetic acid-tolerant *Zygosaccharomyces bailii*-derived interspecies hybrid strain ISA1307, isolated from a sparkling wine plant. *DNA Res*, 2014, 21(3): 299–313.
- [26] Butler G, Rasmussen MD, Lin MF, et al. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature*, 2009, 459(7247): 657–662.

(本文责编 郝丽芳)