

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因的*Candida tropicalis*过量表达及其对木糖醇合成代谢的影响

高雪楠¹, 张 婵^{1,*}, 尹 胜², 张秋晨², 王成涛^{1,2,*}, 徐宝财^{1,2}

(1.北京工商大学 北京市食品添加剂工程技术研究中心, 北京 100048;

2.北京工商大学 食品质量与安全北京实验室, 北京 100048)

摘 要: 研究葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因*g6pd*过量表达对*Candida tropicalis*木糖醇生物合成代谢的影响。克隆*Candida tropicalis* CT16的*g6pd*基因, 并将其与表达载体pYES-pgk重组连接, 构建重组载体pYES-pgk-*g6pd*, LiAc/ssDNA/PEG方法转化导入*C. tropicalis* CT16, 筛选阳性转化子, 实现*g6pd*基因的过量表达。结果表明: 发酵62 h, 阳性转化子*C. tropicalis* SYG5的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活力提高了300%, 发酵液中木糖醇质量浓度达到79.90 g/L, 较野生型对照菌株的木糖醇产量提高了12.41%, 木糖醇产率提高了44.94%。因此, 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶在*C. tropicalis*木糖醇的合成代谢途径中发挥重要作用, 增强*g6pd*基因的表达, 可以明显提高菌体NADPH供应量和还原力, 有利于木糖醇的生物合成。

关键词: *Candida tropicalis*; 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶; *g6pd*基因; 过量表达; 木糖醇

Cloning and Overexpression of Glucose-6-phosphate dehydrogenase in *Candida tropicalis* and Its Influence on Xylitol Biosynthesis

GAO Xue-nan¹, ZHANG Chan^{1,*}, YIN Sheng², ZHANG Qiu-chen², WANG Cheng-tao^{1,2,*}, XU Bao-cai^{1,2}

(1. Beijing Engineering and Technology Research Center of Food Additives, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China; 2. Beijing Laboratory of Food Quality and Safety, Beijing Technology and Business University,

Beijing 100048, China)

Abstract: The influence of overexpression of glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) gene, *g6pd*, on xylitol biosynthesis in *Candida tropicalis* was investigated. The gene *g6pd* was cloned from *Candida tropicalis* CT16 and inserted into a yeast expression vector pYES-pgk, generating a recombinant expression vector pYES-pgk-*g6pd*, which was then introduced into *C. tropicalis* CT16 by the LiAc/ssDNA/PEG transformation method, resulting in over-expression of the *g6pd* gene. The fermentation results showed that the G6PDH activity was increased by 300%, and a maximum xylitol yield of 79.90 g/L was achieved in the recombinant strain SYG5 harboring pYES-pgk-*g6pd* after 62 h of fermentation. Compared to the wild type strain *C. tropicalis* CT16, the yield and productive rate of xylitol in strain SYG5 were increased by 11.30% and 44.91%, respectively. These results indicate that increasing the expression level of the gene *g6pd* significantly enhances xylitol production and that the G6PDH plays a key role in the biosynthesis pathway of xylitol in *C. tropicalis*.

Key words: *Candida tropicalis*; glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH); gene *g6pd* over-expression; xylose; xylitol

中图分类号: Q789

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2014) 07-0102-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201407021

木糖醇是甜度最高的糖醇, 其甜度相当于蔗糖, 热量只有蔗糖的40%, 并具有清凉感, 因其具有防龋齿、洁齿、润喉、改善胃肠功能等特点, 已广泛应用于口香

糖、胶姆糖、太妃糖、软糖、巧克力、果冻、冷饮、口含片、漱口剂、润喉药物、止咳糖浆中; 木糖醇代谢不需要胰岛素调节, 不会导致人体血糖的剧烈变化, 可作

收稿日期: 2013-09-17

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)项目(2012AA021502); 北京市自然科学基金项目(5122008);

教育部科学技术研究重点项目(2111101); 北京市教委科技面上项目(KM201110011001)

作者简介: 高雪楠(1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品生物技术。E-mail: 945310757@qq.com

*通信作者: 张婵(1984—), 女, 讲师, 博士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: zhangchan@th.btbu.edu.cn

王成涛(1969—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: wct5566@163.com

为糖尿病人的甜味剂；木糖醇可促进肝糖元合成，减少脂肪和肝组织中蛋白质消耗，具有改善肝功能和抗脂肪肝的作用，可作为肝炎、高血压、高血脂和年老体弱病人的专用输液剂。近年来，随着人们生活质量提高，木糖醇的健康功效越来越多被消费者所接受^[1-3]。全球木糖醇年需求量10万 t以上，我是世界木糖醇的主要生产和出口国，年产量占世界总产量约40%，我国木糖醇年需求量2.5万 t以上。目前木糖醇主要通过化学合成制造，需使用有毒性的镍催化剂和高压氢气，要求原料木糖的纯度高，工艺复杂、安全性差、生产成本低、副产物成分复杂，环境污染严重，不符合节能减排、可持续发展的社会要求，成为目前国家严格限制发展的行业^[4]。

已有研究发现，酵母菌可转化木糖生成木糖醇，该生化过程的原料木糖无需纯化制备，反应条件温和，无需耐高压设备，此“清洁”、“绿色”的生产技术成为近年研究热点^[5-7]。木糖醇的生物合成与磷酸戊糖途径(pentose phosphate pathway, PPP)紧密相连，需要木糖还原酶、还原性辅酶NADPH等参与(木糖+NADPH $\xrightarrow{\text{木糖还原酶}}$ 木糖醇+NADP⁺)，此还原反应是木糖醇能否顺利连续合成的关键步骤^[8-10]，NADPH主要是通过PPP途径产生，当PPP途径受到破坏，木糖醇产量则明显降低^[11]。关于增强PPP途径的代谢通量分配及NADPH的再生，改善PPP途径以提高木糖醇产率的研究已有一些报道^[12-19]。Kang等^[15]研究认为，以木糖为底物发酵时，PPP途径的多种酶活力远远高于以葡萄糖为底物时的情况。Choi等^[16]研究认为，葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose 6-phosphatedehydrogenase, G6PDH)是PPP途径中催化生成NADPH的关键性调控限速酶，因此，提高G6PDH的酶活力是增加NADPH供应量的有效手段之一。Kwon等^[17]将*Saccharomyces cerevisiae*的G6PDH编码基因ZWF1导入遗传改造后含外源木糖脱氢酶基因的酿酒酵母中，改造后重组菌株中G6PDH的酶活力提高了近6倍，发酵液中木糖醇浓度与只导入木糖脱氢酶基因的菌株相比，木糖醇产率提高了25%，表明导入编码G6PDH的基因能够显著提高木糖醇产率。热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)也是目前木糖醇生产研究广泛应用的菌株^[6-7, 15-16]。本实验以*Candida tropicalis* CT16为模式菌株，将葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因G6PDH进行克隆、过量表达，构建高产稳定表达的木糖醇工程菌株，研究其对木糖醇合成代谢的影响，为木糖醇生物合成制造提供优良菌株和技术指导。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

C. tropicalis CT16 本实验室保存；*Escherichia coli* TOP10感受态细胞 天根生化科技(北京)有限公司；

酵母表达载体pYES-pgk 本实验室构建保存。

酵母基因组提取试剂盒、酵母质粒提取试剂盒、抗生素G418 北京天根生化科技有限公司；DNA Marker 北京全式金公司；EX Taq DNA聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA连接酶 日本TaKaRa公司；酵母提取物、胰蛋白胨和蛋白胨 英国Oxoid公司；木糖 山东福田科技集团；木糖醇(分析纯) 美国Sigma公司；NADP⁺、NADPH 半夏科技公司；其余试剂均为国产分析纯。

1.2 培养基

Luria-Bertani (LB) 培养基(g/L)：胰蛋白胨 10、酵母提取物5、NaCl 10；YPD (yeast extract peptone dextrose) 培养基(g/L)：葡萄糖20、蛋白胨20、酵母提取物10；木糖醇发酵培养基(g/L)：木糖100、葡萄糖10、蛋白胨 1、酵母提取物0.5。

1.3 引物设计

根据GenBank中报道的*C. tropicalis*葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因g6pd编码序列(Accession No. XM_002548907)，利用DNAMAN软件设计引物。

g6pd基因扩增引物：F-g6pd：5'-GG GGT ACC ATG TCT TAT GAT TCA TTC GG-3' (酶切位点Kpn I)；R-g6pd：5'-GC TCT AGA TTA GAT CTT ACC TTT GAC AT-3' (酶切位点Xba I)。酵母转化子鉴定引物：F-T7：5'-CAG CTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'；R-CYC1：5'-TATAATACCGGTGTGGCCGATTTCATTATT-3'。

1.4 g6pd基因的PCR扩增

以*C. tropicalis* CT16的基因组为模板，设计引物F-g6pd和R-g6pd进行PCR扩增。反应体系如下：Ex Taq聚合酶0.3 μL、模板2 μL、上下游引物(10 mmol/L)各1 μL、dNTP混合物(2.5 mmol/L) 2 μL、10×Ex Taq Buffer 2.5 μL、ddH₂O补至25 μL。扩增条件：94℃预变性5 min，94℃ 30 s、55℃ 30 s、72℃ 1.5 min，30个循环，72℃ 10 min。凝胶电泳检测PCR产物。将纯化的PCR产物送至上海生工(生物)工程技术有限公司测序，DNAMAN软件和NCBI(National Center for Biotechnology Information)网站在线BLAST程序(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行序列分析和同源性搜索比对。

1.5 表达载体pYES-pgk-g6pd的构建

表达载体pYES-pgk-g6pd的构建如图1所示。Kpn I和Xba I 分别对g6pd基因片段和pYES-pgk进行双酶切，纯化回收的酶切片断经T4 DNA Ligase于16℃连接过夜，连接产物转化*E. coli* TOP10感受态细胞，在添加抗生素G418的LB平板上筛选阳性重组子，37℃培养过夜，提取阳性菌落质粒鉴定。

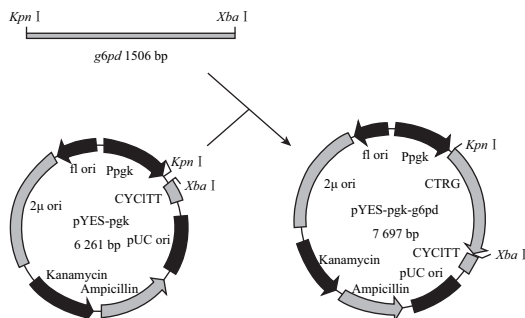


图1 表达载体pYES-pgk-g6pd的构建策略

Fig.1 Construction strategy of the expression vector pYES-pgk-g6pd

1.6 *g6pd*基因在*C. tropicalis*中的过量表达

利用LiAc/ssDNA/PEG方法将重组表达载体pYES-pgk-g6pd转化至*C. tropicalis* CT16感受态细胞中,在添加G418的YPD平板上筛选阳性重组子。提取重组子质粒,设计引物F-T7和R-CYC1进行PCR扩增,回收目的条带,酶切、测序鉴定重组子。*C. tropicalis*感受态细胞的制备及其转化方法参照文献[20]。

1.7 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)的酶活力检测

取30 h的发酵液,1 100 r/min、4℃离心20 min,灭菌蒸馏水洗涤、重悬、再离心,菌体重悬于缓冲液体系:10 mmol/L β-巯基乙醇、2 mmol/L甘氨酸、0.071 mol/L Tris-HCl (pH 7.5),并加入玻璃珠(体积比1:1)振荡破碎,离心取上清液(粗酶液)用于酶活力分析^[13]。

反应体系(2.56 mL):2 mL 70 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)、0.4 mL 35 mmol/L MgCl₂、20 μL 131 mmol/L NADP⁺、40 μL 500 mmol/L 6-磷酸-葡萄糖、0.1 mL粗酶液。30℃、340 nm测定NADPH吸收值变化。340 nm波长处每隔30 s测定一次吸光度,反应10 min,以吸光度 y 与NADPH浓度 x (mmol/L)作标准曲线。G6PDH酶活力定义:反应体系中每分钟还原1 μL NADP⁺所需的酶量为1U。

1.8 发酵实验及木糖和木糖醇的高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)检测

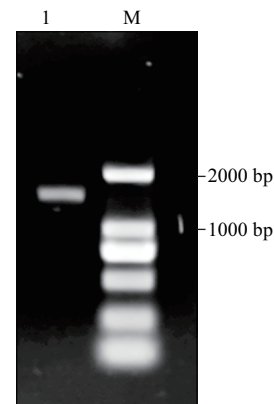
将*C. tropicalis* CT16野生型和重组菌株*C. tropicalis* SYG5以3%的接种量分别接种到木糖醇发酵培养基,30℃、200 r/min振荡培养,每隔10 h取发酵液样品,8 000 r/min离心4 min, HPLC检测木糖及木糖醇浓度。HPLC(岛津LC-20A)检测条件为:色谱柱HPX-87H(300 mm×7.8 mm),示差折光检测器,柱温45℃,流动相0.5 mmol/L H₂SO₄,流速0.5 mL/min,进样量20 μL。

2 结果与分析

2.1 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因*g6pd*的PCR扩增

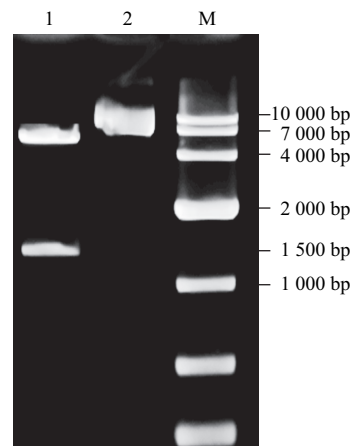
以*C. tropicalis* CT16基因组为模板,扩增目的基因片段,电泳、测序。如图2所示,得到的PCR产物单一DNA

片段大小约为1.5 kb,与预期相符。将纯化的PCR产物测序,经DNAMAN软件和NCBI比对,与GenBank中报道的*C. tropicalis*基因*g6pd*(Accession No. XM_002548907)相似度达100%,表明*g6pd*基因扩增正确。

M.DNA Marker D2000; 1.*g6pd*基因PCR产物。图2 *g6pd*基因PCR产物电泳图Fig.2 Electrophoresis of the PCR product of the *g6pd* gene

2.2 表达载体pYES-pgk-g6pd的构建

使用*Kpn*I和*Xba*I双酶切鉴定重组质粒,电泳检测如图3所示。重组质粒pYES-pgk-g6pd经双酶切得到6.0 kb和1.5 kb的清晰条带,与预期相符,证明表达载体构建正确。



M.DNA Marker Trans2k plus; 1.pYES-pgk-g6pd双酶切产物; 2.pYES-pgk双酶切产物。

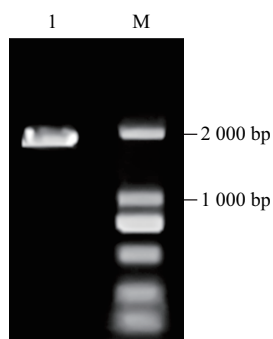
图3 *Kpn*I+*Xba*I双酶切重组质粒pYES-pgk-g6pd电泳图Fig.3 Electrophoresis of the plasmid pYES-pgk-g6pd double digested with *Kpn*I + *Xba*I

2.3 重组*C. tropicalis*的筛选、鉴定及酶活力分析

表达载体pYES-pgk-g6pd转入*C. tropicalis* CT16后,在含抗生素G418的YPD平板上进行筛选。从平板上挑取长势较好的单菌落,在含1 mg/mL G418的培养基培养,筛选获得阳性转化子*C. tropicalis* SYG5。

提取 *C. tropicalis* SYG5 质粒, 设计引物 F-T7 和 R-CYC1-Age PCR 扩增, 电泳检测结果如图4所示。从转化子(工程菌) SYG5 中扩增 *g6pd* 基因表达盒(包括启动子、*g6pd* 基因编码序列和终止子)的特异性条带, 大小约为 1.9 kb, 与预期相符, 且测序验证正确, 表明重组质粒 pYES-pgk-g6pd 已转入 *C. tropicalis* CT16。

分析 30 h 发酵粗酶液的 G6PDH 酶活力, 以吸光度 y 与 NADPH 浓度 x (mmol/L) 作标准曲线, 获得方程 $y=0.0055x-0.0073$ ($R^2=0.9999$)。 *C. tropicalis* CT16 G6PDH 的酶活力为 786 U/L, *C. tropicalis* SYG5 的 G6PDH 酶活力为 3 145 U/L, 说明 *g6pd* 基因的过量表达能显著增强 *C. tropicalis* G6PDH 的活性。



M. DNA Marker D2000; 1. *g6pd* 基因表达盒的 PCR 产物。

图4 重组菌株 *C. tropicalis* SYG5 中 *g6pd* 基因表达盒的 PCR 产物电泳图
Fig.4 Electrophoresis of the PCR product of the *g6pd* gene expression cassette from the recombinant strain *C. tropicalis* SYG5

2.4 野生菌和工程菌转化木糖醇能力比较

将野生型菌 *C. tropicalis* CT16 和重组工程菌 *C. tropicalis* SYG5 分别接种于木糖醇发酵培养液。如图5所示, 在此实验条件下发酵液中木糖和木糖醇能较好的分离, 且峰型较好, 无前延、拖尾、重叠, 其木糖和木糖醇的特征峰分别出现于 11.354 min 和 13.161 min。

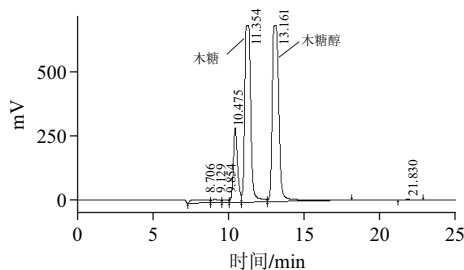


图5 木糖和木糖醇的 HPLC 分析

Fig.5 HPLC analysis of xylose and xylitol

如图6所示, 工程菌 *C. tropicalis* SYG5 的木糖醇生成量随发酵时间延长逐渐增多, 摇瓶发酵 62 h 时木糖醇质量浓度达到最高值 79.90 g/L, 木糖醇产率为 1.29 g/(L·h); 野生菌株 CT16 发酵 80 h 时, 木糖醇生成量达到峰值, 约

为 71.08 g/L, 产率为 0.89 g/(L·h)。与野生型菌株相比, 工程菌 *C. tropicalis* SYG5 的木糖醇产量提高 12.41%, 产率提高 44.94%。发酵 62 h 时, 工程菌 SYG5 的木糖几乎完全消耗, 木糖醇呈现最高质量浓度, 随后木糖醇消耗, 导致其质量浓度下降; 野生菌 *C. tropicalis* CT16 发酵 80 h 时木糖醇浓度才达到最大值, 但其峰值明显低于工程菌 SYG5。上述结果表明, 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因 *g6pd* 的过量表达, 可以显著提高 *C. tropicalis* 的 PPP 途径的 G6PDH 酶活力、代谢通量分配, 增加 NADPH 供应量, 加速木糖醇合成速率和产量, 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶在木糖醇生物合成过程中发挥关键性作用。

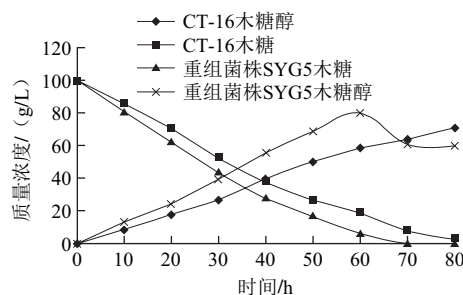


图6 *C. tropicalis* CT16 与 *C. tropicalis* SYG5 摇瓶发酵实验中的木糖和木糖醇质量浓度动态变化曲线

Fig.6 Dynamic curves of xylitol production and xylose consumption in *C. tropicalis* CT16 and *C. tropicalis* SYG5 during fermentation on xylose and glucose in shaking flasks

3 结论

本实验构建了葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 *g6pd* 基因的重组表达载体 pYES-pgk-g6pd, 并将其过量表达于 *C. tropicalis* CT16, 探索 *g6pd* 基因过量表达对木糖醇合成代谢影响。结果表明, 发酵 62 h 时, 携带重组质粒 pYES-pgk-g6pd 的工程菌 *C. tropicalis* SYG5 摇瓶发酵木糖醇产量为 79.90 g/L, 与野生菌株相比, 木糖醇产量提高 12.41%, 产率提高 44.94%; *g6pd* 基因的过量表达, 增强了 G6PDH 的酶活力, 提高了菌体 NADPH 供应量和还原力, 显著促进木糖醇生物合成的代谢流量分配, 提高了木糖醇产量和木糖产率。因此, G6PDH 是木糖醇生物合成途径中的关键酶, 构建的高产木糖醇工程菌为其产业化转化提供了重要基础。

参考文献:

- [1] EMODI A. Xylitol: its properties and food applications[J]. Food Technology, 1978, 32(1): 28-32.
- [2] MAKINEN K K. Xylitol and oral health[J]. Advance in Food Research, 1979, 25: 137-158.
- [3] PRAKASHAM R S, RAO R S, HOBBS P J. Current trends in biotechnological production of xylitol and future prospects[J]. Current

- Trends in Biotechnology and Pharmacy, 2009, 3(1): 8-36.
- [4] 成英, 闫书磊, 明立雪. 木糖醇的生产工艺及应用研究进展[J]. 甘肃石油和化工, 2008, 22(3): 18-21.
- [5] KO C H, CHIU P C, YANG C L, et al. Xylitol conversion by fermentation using five yeast strains and polyelectrolyte-assisted ultrafiltration[J]. Biotechnology Letters, 2008, 30(1): 81-86.
- [6] SÁNCHEZ S, BRAVO V, GARCÍA J F, et al. Fermentation of *D*-glucose and *D*-xylose mixtures by *Candida tropicalis* NBRC 0618 for xylitol production[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24(5): 709-716.
- [7] IN S. Hydrolysate detoxification with activated charcoal for xylitol production by *Candida guilliermondii*[J]. Biotechnology Letters, 2001, 23(20): 1681-1684.
- [8] MOREIRA DOS SANTOS M, THYGESEN G, KÖTTER P, et al. Aerobic physiology of redox-engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains modified in the ammonium assimilation for increased NADPH availability[J]. FEMS Yeast Research, 2003, 4(1): 59-68.
- [9] KIM J H, HAN K C, KOH Y H, et al. Optimization of fed-batch fermentation for xylitol production by *Candida tropicalis*[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2002, 29(1): 16-19.
- [10] NOLLEAU V, PREZIOSI-BELLOY L, NAVARRO J M. The reduction of xylose to xylitol by *Candida guilliermondii* and *Candida parapsilosis*: incidence of oxygen and pH[J]. Biotechnology Letters, 1995, 17(4): 417-422.
- [11] LEATHERS T D, DIEN B S. Xylitol production from corn fibre hydrolysates by a two-stage fermentation process[J]. Process Biochemistry, 2000, 35(8): 765-769.
- [12] OH Y J, LEE T H, LEE S H, et al. Dual modulation of glucose 6-phosphate metabolism to increase NADPH-dependent xylitol production in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2007, 47(1): 37-42.
- [13] CHIN J W, KHANKAL R, MONROE C A, et al. Analysis of NADPH supply during xylitol production by engineered *Escherichia coli*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2009, 102(1): 209-220.
- [14] FERNANDES S, TUOHY M G, MURRAY P G. Cloning, heterologous expression, and characterization of the xylitol and *L*-arabitol dehydrogenase genes, *Texdh* and *Telad*, from the thermophilic fungus *Talaromyces emersonii*[J]. Biochemical Genetics, 2010, 48(5/6): 480-495.
- [15] KANG H Y, KIM Y S, KIM G J, et al. Screening and characterization of flocculent yeast, *Candida* sp. HY200, for the production of xylitol from *D*-xylose [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2005, 15(2): 362-367.
- [16] CHOI J H, MOON K H, RYU Y W, et al. Production of xylitol in cell recycle fermentations of *Candida tropicalis*[J]. Biotechnology Letters, 2000, 22(20): 1625-1628.
- [17] KWON D H, KIM M D, LEE T H, et al. Elevation of glucose 6-phosphate dehydrogenase activity increases xylitol production in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2006, 43(1): 86-89.
- [18] VERHO R, LONDESBOROUGH J, PENTTILÄ M, et al. Engineering redox cofactor regeneration for improved pentose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(10): 5892-5897.
- [19] AHMAD I, SHIM W Y, JEON W Y, et al. Enhancement of xylitol production in *Candida tropicalis* by co-expression of two genes involved in pentose phosphate pathway[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2012, 35(1/2): 199-204.
- [20] 安伯格 D C. 酵母遗传学方法实验指南[M]. 霍克克, 译. 2版. 北京: 科学出版社, 2009: 98-99.