

行政院原子能委員會
委託研究計畫研究報告

纖維轉化酒精共發酵菌之研究

Development of co-fermentation cells for cellulosic ethanol production

計畫編號：992001INER064

受委託機關(構)：逢甲大學化工系

計畫主持人：趙雲鵬

核研所聯絡人員：林鼎翔

聯絡電話：04-24517250 ext. 3677

E-mail address：ypchao@fcu.edu.tw

報告日期：99. 12. 15

目 錄

目 錄.....	I
中文摘要.....	1
ABSTRACT.....	2
壹、計畫緣起與目的.....	3
貳、研究方法與過程.....	8
一、突變 <i>CANDIDA</i> XYL1 基因.....	8
二、建構染色體鑲箱 <i>PICHA</i> TAL1 基因之麵包酵母菌株.....	9
三、建構在 PHO13 位置鑲箱 <i>CANDIDA</i> XYL1 基因的麵包酵母菌株	11
四、建構在 ADH2 位置鑲箱 <i>CANDIDA</i> XYL1 基因之麵包酵母菌株	12
五、強化 TKL1 基因之表現.....	13
六、篩選木糖代謝較佳之 YX2KL(G) 菌株.....	14
七、建構強化 XYL2 基因表現之菌株.....	15
參、主要發現與結論.....	15
一、突變型 <i>CANDIDA</i> XYL1 基因之影響.....	15
二、強化 TAL1 基因表現對於重組酵母菌酒精發酵之影響.....	16
三、PHO13 基因之破壞對於表現 <i>CANDIDA</i> XYL1 基因之影響.....	17
四、ADH2 基因之破壞對於表現 <i>CANDIDA</i> XYL1 基因之影響.....	18
五、TKL1、XYL2 基因之強化及馴養菌株對於木糖代謝之影響	19
肆、參考文獻.....	22

中文摘要

在本年度的研究中，我們強化了非氧化性五碳糖磷酸代謝途徑中的 TAL1 及 TKL1 基因，同時在 PHO13 及 ADH2 位置上鑲箱 *Candida* XYL1 基因並探討其影響。最後藉由馴養法，我們得到一株重組菌株 YX2KL(g)OD30。實驗結果顯示，以含有 1% 葡萄糖和 4% 木糖的培養基來培養，此一菌株可以在 48 小時內消耗 80% 木糖，於 60 小時內酒精產量可達 2%。

Abstract

To improve the ethanol production from xylose, the expression of *tal1* and *tkl1* gene in the non-oxidative pentose phosphate pathway was enhanced in Yeast. Moreover, genomic insertion of *Candida xyl1* gene into *pho13* or *adh2* gene locus was also applied. The resulting yeast strain was further evolved in the lab and one strain with a higher xylose consumption ability was indentified, renamed YX2KL(g)OD30. This evolved strain was cultivated in medium containing 1% glucose plus 4% xylose. As a result, 80% xylose was consumed by the strain within 48 h and 2% ethanol was obtained after fermentation for 60 h.

壹、計畫緣起與目的

由於世界的能源迅速枯竭，許多國家對於其他替代能源之發展均投注極大的心力。直到現在，人們逐漸領悟到轉化生質（biomass）能源成為其他型態能源策略的重要性，其主要原因是使用生質能源（尤其是由農牧工業生成之廢棄物）是有效降低化石能源的依賴，進而減少造成溫室效應氣體的產生，另外生質能源的利用也可以創造再生能源，並協助解決農業廢棄物的後續處理。在所有生質能源利用的例子當中，由生質能源醱酵來生產酒精的製造程序最具有前瞻性，目前生質酒精的生產國首推美國和巴西，前者的生質來自玉米的澱粉，而後者的生質來自甘蔗的蔗糖。無疑的，這些事實正顯示由農業廢棄物醱酵生產酒精的量化製造技術，實際上是具體可行的，如此更加突顯生質酒精的重要和實用性。然而因環境、人文等特殊條件之迥異性，以致各國的經濟作物不盡相同，不過此項技術卻具有通用性，主要是因為過去的研發技術也著重於使用非食用性植物為生質來源，包括玉米桿、甘蔗渣、稻米梗、木屑和廢棄樹木等(4)，所以其他國家也可根據本身的生質來源特色來發展和運用此項技術以生產生物酒精。

利用生質能源來醱酵生產酒精的可行性關鍵技術在於能選擇或能發展一株能符合工業生產條件需求的微生物，這些條件主要包括(i)酒精轉化率、(ii)細胞抗酒精度、(iii)酒精生產速率和(iv)經濟的醱酵培養基質等。根據過去的研究資料顯示，目前最具有工業生產酒精潛能的微生物包括細菌和酵母菌。前者如分屬

於革蘭陰性菌的大腸桿菌 (*Escherichia coli*)、*Klebsiella oxytoca*、*Zymomonas mobilis*，後者如麵包酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和 *Pichia stipitis*(7)。其中如大眾所週知，麵包酵母菌具有醱酵速率快且能抗高酒精度之特色，在工業上早已普遍被使用來作醱酵製酒生產。

在高能源價格時代的今日，纖維酒精是現今替代能源中最具有經濟效益的產品之一，而再生能源物質中的生質經由酸鹼處理後，其中半纖維素將水解成六碳糖和五碳糖，而五碳糖中主要含有木糖(xylose)。就麵包酵母菌生理代謝而言，由葡萄糖醱酵生成乙醇是一種厭氧代謝程序，當外界的葡萄糖因濃度梯度而傳送至胞內後，即受到 EMP 糖分解途徑(Embden-Meyehof-Parnas glycolytic pathway)上之酵素逐步分解，最後產生丙酮酸(pyruvic acid)，分解過程中所生成之 NADH 則因丙酮酸經由 pyruvate decarboxylase 及 alcohol dehydrogenase 酵素反應生成乙醇而再被氧化，由於這種「氧化還原平衡」的結果，使得 NADH/NAD⁺ 在胞內可以生生不息，以致野生型麵包酵母菌可以有效醱酵葡萄糖生成乙醇達到 30 mmol/g/h 之產量(1)。縱然如此，野生型麵包酵母菌本身卻不具備有代謝木糖之能力，令人驚訝的是，自然界中只存在少數兼性厭氧酵母菌能代謝木糖(29)。

然分析具木糖醱酵能力之兼性厭氧酵母菌的代謝(6)，可以發現該菌株擁有 xylose reductase (XR) 和 xylitol dehydrogenase (XDH) 兩個酵素將木糖代謝和五碳糖磷酸途徑 (pentose phosphate pathway) 聯結 (參見圖 一)，但由於這兩個酵素對於

輔酶因子的需求不同(XR 為 NADPH 依賴性，而 XDH 為 NAD⁺ 依賴性)，所以當木糖轉化成 xylulose 將會生產出 NADP⁺ 和 NADH，為了達到所謂的「氧化還原平衡」以使得 NADPH/NADP⁺ 及 NADH/NAD⁺ 循環再生，其中 NADPH 可藉由五碳糖磷酸途徑將 fructose 6-phosphate 氧化再生，然生成的 NADH 則須仰賴一個終端電子接收者 (electron acceptor) 來氧化，惟於厭氧醱酵條件下欠缺有效的電子接收者如氧氣分子，因此造成胞內「氧化還原」不平衡之結果，導致細胞醱酵木糖生成乙醇的效能不彰。有趣的是，兼性厭氧酵母菌 *P. stipitis* 具有優越的醱酵木糖生成乙醇之效能，經研究分析顯示(3)，該菌株擁有的 XR 酵素可以使用 NADH 和 NADPH 作為輔酶因子，可稍解胞內「氧化還原」不平衡之問題。

基於此，許多研究群開始思考將外源的 XR/XDH 植入麵包酵母菌中。其中有研究群試圖於麵包酵母菌植入 *P. stipitis* 的 XR/XDH(19)，結果發現基因改殖過的麵包酵母菌如預期可以醱酵木糖來生成乙醇，不過卻累積生產過多的副產物—木酮糖 (xylitol)。根據其他的研究結果顯示(27, 31)，設計適當的培養基和培養條件也可以據以改善木酮糖累積的情形，例如在培養基添加一些電子接收者的物質，或是提供微量的氧氣等，不過這些策略在工業醱酵規模的運用上卻因生產成本問題而令人卻步。

此外，解決上述胞內「氧化還原」不平衡之問題，可藉由無須任何輔酶因子的 xylose isomerase (XI) 之反應來轉化木糖至 xylose (參見圖一)，只可惜過去有許多嘗試將外源 XI 植入麵包酵母菌中來增進木糖醱酵乙醇的效能，結果卻多不如預期(26,

32)，究其原因，可能是因為外源 XI 無法在麵包酵母菌中表現或是表現生產後卻無法行成適當的結構。例外的是，來自 *Thermus thermophilis* 的 XI 曾經成功的植入麵包酵母菌中，惟其表現的 XI 活性太低，以致實驗結果仍令人失望(32)。直到最近，研究人員在一株絕對厭氧真黴菌 *Piromyces* sp.E2 中找到 XI 基因 (*xylA*)(10)，經實驗驗證 *Piromyces xylA* 基因在麵包酵母菌中表現且獲得極高之酵素活性，雖然 *xylA* 基因表現的麵包酵母菌可以木糖為唯一碳源的基質中生長，不過生長速率卻十分緩慢(17)。後續的研發現，該菌株經由實驗室的演化突變後，可如同醱酵葡萄糖一般有效醱酵木糖生成乙醇達 0.46 g/g/h，惟生長速率仍稍緩(18)。

儘管是利用 XR/XDH 或 XI 生產的麵包酵母菌均具有木糖醱酵的能力，不過最近的一則研究顯示(15)，在同樣基因背景（如過量表現 *xylulokinase* (XK) 和非氧化性 (non-oxidative) 五碳糖磷酸途徑的酵素群以及自身的 XR 基因(*GRE3*)）的麵包酵母菌中，具有 XR/XDH 活性的菌株要比具有 XI 活性的菌株有較優越的乙醇生產率和木糖消耗率。就代謝途徑分析而論，雖然具備 XI 酵素活性的麵包酵母菌可以避免使用輔酶因子的需求，而免除了胞內「氧化還原平衡」之問題，但是經研究發現卻未如預期，這個結果明白顯示在麵包酵母菌木糖醱酵的代謝生理中仍存在未明的限制因子。另一方面，過去的研究曾利用適應演化 (adaptive evolution) 策略來篩選突變型麵包酵母菌(23)，結果發現其篩選到的菌株可以在厭氧條件下代謝木糖和生產乙醇，進一步分析顯示，該菌株胞內的 glyoxylate cycle 和 tricarboxylate

(TCA) cycle 的中間代謝物增加，顯示這些代謝途徑可能受到限制。同樣的，有研究發現在氧氣限制的條件下，基因改質的麵包酵母菌可以表現過量的 TCA cycle 之酵素和呼吸鏈酵素(12, 13, 25)，這也顯示木糖代謝與葡萄糖代謝十分迥異。

誠如前言，將纖維素和半纖維素轉化成生物能源可謂是未來替代能源最具發展潛力的製程。回顧過去有關發展生物酒精的研究所有的努力均著重在強化生產乙醇代謝途徑上的關鍵酵素反應步驟，所獲致的研究成果也相當振奮人心，尤其就利用代謝工程策略來改質麵包酵母菌以增進乙醇生成速率的例子而言，更加顯示此項技術的前瞻性。可惜的是，使用木質纖維素水解液作為醱酵基質的試驗中，許多在實驗室中研發出來可有效醱酵木糖生成乙醇的基因改質麵包酵母菌菌株均未能如預期般生成乙醇，甚或木糖消耗速率極低，其原因可歸咎於水解生質過程中產生的毒性物質所致(21, 22, 28)，這個結果也顯示發展一株具有工業生產乙醇的優越麵包酵母菌菌株仍有極大的努力空間。

由於能源係屬一個國家生存發展攸關之鑰，發展具有本土特性的生質能源更是確保國力(不受他國政治和經濟干擾)之根本大計，因此本計畫的主旨便著眼於發展麵包酵母菌之木糖醱酵生成酒精的技術平台，以獲得一株具有工業生產乙醇的優越麵包酵母菌菌株為先期目標。

貳、研究方法與過程

前一年(98 年度)計畫中，我們已經成功發展染色體基因鑲嵌方法，以及置換染色體基因啟動子的方法，並藉由這些技術建構了一株能代謝木糖而生成酒精的菌株 YH2K/pCXYL1。該菌株攜帶了一個可表現 *Candida* XYL1 基因的質體，且其染色體上鑲嵌一個 *Pichia* XYL2 基因和 XKS1 基因可被強化表現。雖然該菌株可生產木糖酒精達 0.3-0.4 g/g，惟木糖醇累積量仍隨醱酵木糖的濃度而提高，因之，本年度之計畫重點將試圖減低木糖醇累積量，以期能提升麵包酵母菌轉化木糖成酒精之效能。計畫主要策略敘述如下：(1) 突變 *Candida* XYL1 基因(2)建構染色體鑲嵌突變型 XYL1 基因菌株(3)強化非氧化性五碳糖磷酸途徑代謝路徑關鍵基因活性(4)以適應演化法突變菌株。

一、突變 *Candida* XYL1 基因

已知 *Pichia* XYL1 基因偏好使用輔酶 NADPH，相反的是，*C. parapsilosis* XYL1 基因卻偏好使用輔酶 NADH，經由基因之輔酶結合位置的胺基酸分析可知(如表一)，*Candida* 和 *Pichia* XYL1 基因之輔酶結合位置的胺基酸 269 或 270 皆為 K，而於 *C. parapsilosis* XYL1 基因的相對位置為 R。

表一、相關菌屬 XYL1 基因之輔酶結合位置的胺基酸比較分析

Gene	Coenzyme	Sequence
<i>Pichia</i> XYL1	NADPH	268 IPK S N T VP R LL
<i>C. parapsilosis</i> XYL1	NADH	274 IP R S N S P D R MA
<i>Candida</i> XYL1	NADPH	267 IPK S N N P D RLL

參考文獻及 *Candida* XYL1 基因序列，藉由定點突變法，設

計引子對 Y0944 (CgggATTgTTggACATgggAATCACggC)及 Y0945 (gCCgTgATTCCCATgTCCAACAATCCCg)以改變 *Candida* XYL 基因為 K269M 突變，設計引子對 Y0957 (gCCgTgATTCCCAgATCCAACAAT CCCg)、Y0958 (CTATCgggATTgTTggATCTgggAATCACggCAA g)、Y1001 (CAACAACCTATC gggACTgTTgg ATCTgggAATC)及 Y1002 (gATTCCCAgATCCAACA gTCCCgATAggTTgTTg)以改變 *Candida* XYL1 基因為 K269R 及 K269R/N272S 突變，並檢送 DNA 序列分析以確認其突變位置。把經突變過後之 XYL1 基因片段選殖至基因表現質體中 pCXYL1 中，取得基因表現質體 pCXYL1M(突變位置 K269M)、pCXYL1M2(突變位置 K269R)及 pCXYL1M3(突變位置 K269R/N272S)。將突變的基因表現質體轉型至麵包酵母菌株 YH2K，取得菌株 YH2K/pCXYL1M、YH2K/pCXYL1M2 及 YH2K/pCXYL1M3，檢測突變的 *Candida* XYL1 之活性和輔酶偏好性，另一方面，檢測其木糖酒精生成之效能。

二、建構染色體鑲箱 *Pichia* TAL1 基因之麵包酵母菌株

建構染色體鑲箱 *Pichia* TAL1 基因之麵包酵母菌株以強化非氧化性五碳糖磷酸途徑代謝路徑關鍵基因活性。首先使用引子對 Y0930/Y0931，以 PCR 方式自 *Pichia* 的染色體中選殖出 TAL1 基因，經基因定序確認後，依圖二所示方式進行染色體鑲箱質體 pMig1/TAL 之建構：(一)以引子對 Y0928/Y0929 從質體 pTEF-KanMX 增幅出 1.65 kb 之片段，經 *ApaI/SpeI* 截切處理，再以 *ApaI/SpeI* 截切質體 pGK-XSKm，取得其 4.3 kb 片段，將

兩片段進行黏合作用後可得質體 pGK-KmL。(二)以引子對 Y0942/Y0943 從質體 pGK-KmL 中增幅出 0.3 kb 的 TEF terminator 片段，經 *BglII/BamHI* 截切處理，再以 *BglII/BamHI* 截切質體 pGK-KmL，取得其 5.6 kb 片段，將兩片段進行黏合作用後可得質體 pGK-KLoxT。(三)以引子對 Y0930/Y0931 自 *Pichia* 染色體中增幅出 0.97 kb 的 TAL1 基因，經 *NdeI/BglII* 截切處理，再以 *NdeI/BglII* 截切質體 pGK-KLoxT，取得其 5.6 kb 片段，將兩片段進行黏合作用後可得質體 pGK-pTAL。(四)以引子對 Y0932/Y0933 自麵包酵母菌的染色體中增幅出 0.58 kb 的 Mig1B 基因片段，經 *XhoI/BamHI* 截切處理，再以 *XhoI/BamHI* 截切質體 M4297，取得其 5.1 kb 片段，將兩片段進行黏合作用後可得質體 pMigB。(五)以引子對 Y0934/Y0935 自麵包酵母菌的染色體中增幅出 0.55 kb 的 Mig1A 基因片段，經 *SacI/XbaI* 截切處理，再以 *SacI/XbaI* 截切質體 pMigB，取得其 5.2 kb 片段，將兩片段進行黏合作用後可得質體 pMig1-MCS。(六)以 *BamHI/EcoRV* 截切質體 pGK-pTAL，取得其 3.65 kb 片段，同時以 *BamHI/EcoRV* 截切質體 pMig1-MCS，取得其 4.3 kb 片段，將兩片段進行黏合作用後可取得染色體鑲箱質體 pMig1/TAL。

以質體 pMig1/TAL 為模版，使用引子對 Y0933/Y0934 進行 PCR 反應，增幅出兩端含有 Mig1 基因片段，中央含有 *Pichia* TAL1 基因且具有 LE-RE 位置包夾抗抗生素基因的 4.8 kb 線性基因鑲箱片段。接著將麵包酵母菌株 YH2K 以 YPD 基質進行培養並製作成電穿法之勝任細胞，將上述之線性基因鑲箱片段以電穿法送入麵包酵母菌株 YH2K 中，以含有抗生素 G418 之 YPD

平板培養基篩選轉型菌株，並使用引子對 Y0930/Y0931 以 in-situ PCR 方式進行確認，取得之菌株命名為 YH2KL(g)。為移除鑲箱到染色體上之抗生素基因，再將輔助質體 pMCre-B 轉型到菌株 YH2KL(g)中，以 YPD 基質培養隔夜並以含 galactose 之培養基進行誘導，由其中篩選不具 G418 抗性的菌株，並使用引子對 Y0928/Y0934 以 in-situ PCR 進行確認，可得染色體鑲箱 *Pichia* TAL 基因且不含抗生素基因之麵包酵母菌株，命名為 YH2KL。最後再轉型質體 pCXYL 至 YH2KL 菌株當中，使用引子對 Y0903/Y0904 以 in-situ PCR 進行確認後，可得菌株 YH2KL/pCXYL，並檢測其木糖酒精生成之效能。

三、建構在 PHO13 位置鑲箱 *Candida* XYL1 基因的麵包酵母菌株

建構在染色體 PHO13 基因鑲箱 *Candida* XYL1 基因之麵包酵母菌株，方法如圖三所示：(一)以 *ApaI/SpeI* 截切質體 pGK-pTAL 及 pGK-CXYL1，分別取其 1.7 kb 片段及 5.6 kb 片段，進行黏合作用後可得質體 pGK-CXYL1ox。(二)以引子對 Y1008/Y1009 自麵包酵母菌染色體中增幅出 0.28 kb 的 PHO13A 基因片段，經 *NcoI/MluI* 截切處理，再以 *NcoI/MluI* 截切質體 pMCS-XKS，取得其 4.6 kb 片段，將兩片段進行黏合作用可得質體 pMCS-PHO13A。(三)以引子對 Y1010/Y1011 自麵包酵母菌染色體中增幅出 0.26 kb 的 PHO13B 基因片段，經 *BamHI/KpnI* 截切處理，再以 *BamHI/KpnI* 截切質體 pGK-CXYL1ox，取得其 7.2 kb 片段，將兩片段進行黏合作用可得質體 pGK-CXYL1/PhoB。(四)以 *BamHI/SpeI* 截切質體 pMCS-PHO13A 及 pGK-CXYL1/PhoB，分別取其 3.2 kb 片段及 4.5kb 片段，進

行黏合作用後可得染色體鑲箱質體 pCXYL1-Pho13。

以質體 pCXYL1-Pho13 為模版，使用引子對 Y1008/Y1011 進行 PCR 反應，增幅出一段兩端含有 Pho13 基因片段，中央含有 *Candida* XYL1 基因且具有 LE-RE 位置包夾抗抗生素基因的 4.5 kb 線性基因鑲箱片段。接著將麵包酵母菌株 YH2K 及 YH2KL 以 YPD 基質進行培養並製作成電穿法之勝任細胞，將上述之 4.5 kb 線性基因鑲箱片段以電穿法分別送入麵包酵母菌株 YH2K 及 YH2KL 中，以含有抗生素 G418 之 YPD 平板培養基篩選轉型菌株，並使用引子對 Y0903/Y0904 以 in-situ PCR 方式進行確認，鑲箱 *Candida* XYL1 基因之 YH2K 轉型菌株命名為 YX2K(g)，鑲箱 *Candida* XYL1 基因之 YH2KL 菌株則命名為 YX2KL(g)。

四、建構在 ADH2 位置鑲箱 *Candida* XYL1 基因之麵包酵母菌株

建構於 ADH2 基因位置鑲箱 XYL1 基因之麵包酵母菌株，方法如圖四所示：(一)設計引子對 Y1038、Y1039，以 PCR 方式從 *S.C* chromosome 中增幅出 0.4 kb 的 ADH2A 片段，純化後以 *SpeI/ApaI* 截切，再接合至 *SpeI/ApaI* 截切過的 pTEF-KanMX 質體，得到質體 pADH2A。(二)設計引子對 Y1040、Y1041，以 PCR 方式從 *S.C.* chromosome 中增幅出 0.4 kb 的 ADH2B 片段，純化後以 *BamHI/KpnI* 截切，再接合至 *BamHI/KpnI* 截切過的 pCXYL1-PHO13 質體，得到質體 pCXYL1-ADH2B。(三)取質體 pADH2A 中的 0.7 kb *SpeI/MluI* 片段與質體 pCXYL1-ADH2B 中的 7.2 kb *SpeI/MluI* 片段進行接合作用，得到基因鑲箱質體 pCXYL1-ADH2。

以 pCXYL1-ADH2 為模板，使用引子對 Y1038/Y1041 可增幅出一段兩端含有 ADH2 同源序列，且中間包含 *Candida* XYL1 基因，並具有以 LE-RE site 包夾抗 G418 基因之 5 kb 基因鑲箱片段，將此片段純化後，再將麵包酵母菌株 YH2KL 以 YPD 培養並以電穿法的方式製備成勝任細胞，再將 5 kb 基因鑲箱片段以電穿法送入 YH2KL 中，並以 YPD+G18 之平板培養基進行篩選。挑選到之單一菌落以引子對 Y0903/Y0904 進行 in-situ PCR 檢測，取得在 ADH2 位置鑲箱 *Candida* XYL1 基因之麵包酵母菌株 YY2KL(g)。

將 YY2KL(g) 以方法二所述之方式，使用幫助質體 pM-CreB 移除其 G418 基因，並以引子對 Y0928/Y1038 進行 instu PCR 檢測後，得到不含抗生素基因的菌株 YY2KL。

五、強化 TKL1 基因之表現

以圖五之方式建構基因鑲箱質體 pTEF-TKL1AB：(一)以引子對 Y1030/Y1031 自質體 pPGK-TEF 中 PCR 增幅出 2.1 kb 之片段並以 *EcoRV* 切位選殖至 pMCS5 中，得到質體 pMCS5-TEF。(二)以 pMCS5-TEF 為模板，設計引子對 Y1036 (CCgAACATAAACAACCATAgAACATATgCTgCAgAg) 及 Y1037 (CTCTgCAgCATATgTTCTATggTTgTTTATgTTCgg)，以 PCR 方式進行定點突變，藉由將 TEF promoter 旁的 *NcoI* 切位序列由 CCATgg 變更為 CCATAg，而消除此一 *NcoI* 切位，得到質體 pMCS-TEF(Nc)，並以基因定序進行確認。(三)將質體 pMCS-TEF(Nc) 的 *NdeI/EcoRV* 2.1 kb 片段與質體 pMCS-XKS 的 *NdeI/EcoRV* 4.3 片段進行接合，得到質體 pTEF-XKS'。(四)以引

子對 Y1032/Y1033 自麵包酵母菌之染色體中 PCR 增幅出 0.4 kb 的 TKL1 片段，純化後經 *NdeI/SalI* 截切再與質體 pTEF-XKS' 的 *NdeI/SalI* 5.7 kb 片段進行接合，得到質體 pTEF-TKL1A。(五) 以引子對 Y1034/Y1035 自麵包酵母菌之染色體中 PCR 增幅出 0.9 kb 的 TKL1B 片段，純化後經 *EcoRI/NcoI* 截切再與質體 pTEF-TKL1A 的 *EcoRI/NcoI* 5.3 kb 片段進行接合，即得到基因鑲箱質體 pTEF-TKL1AB。

以 pTEF-TKL1AB 為模板，使用引子對 Y1033/Y1034 可 PCR 增幅出一段兩端具有 TKL1 同源序列，中間增加了 TEF promoter 以強化 TKL1 基因表現，且具有以 LE-RE 包夾抗 G418 基因的 3.3 kb 基因鑲箱片段。取菌株 YY2KL 及 YX2KL-OD20，以 YPD 進行搖瓶培養並分別製備成電穿法之勝任細胞，再以電穿法將 3.3 kb 的基因鑲箱片段送入此兩種菌株中，以 YPD+G418 之平板培養基進行篩選，所得之單一菌落再以引子對 Y0921/Y1033 進行 in-situ PCR 檢測。分別可得到強化 TKL1 基因的重組麵包酵母菌株 YY2KLT(g)及 YX2KLT(g)OD20。

六、篩選木糖代謝較佳之 YX2KL(g)菌株

取 YX2KL(g)菌株，選取單一菌落，以 30°C，150rpm 的條件在 5 ml 的 YP+1% xylose 液體培養基中培養 24 小時，取其菌液檢測其 OD600，並取此菌液 500µl 重新培養至新鮮的 5 ml YP+1% xylose，每日重覆培養及檢測，並記錄菌株之生長曲線。馴養過程中，則於 YPX 平板培養基上劃取單一菌落並進行菌種保存，並以 GC 及 HPLC 檢測其 xylose 消耗。依此方式在不同濃度的 xylose 培養基中分別取得菌株 YX2KL(g)OD20(篩選自

1%)、YX2KL(g)OD29(篩選自 2%)，及 YX2KL(g)OD30(篩選自 4%)。利用方法二所述之方式，使用幫助質體 pM-CreB 移除其抗 G418 基因，並各自以引子對 Y0928/Y1008 進行 in-situ PCR 檢測，分別取得 YX2KL-OD20、YX2KL-OD30。

七、建構強化 XYL2 基因表現之菌株

以圖六之方式建構基因鑲箱質體 pXYL2-ADH2：取質體 pHO-GK/XYL2b，以 *NdeI/BglIII* 截切取得 1.1 kb 片段，再與質體 pCXYL1-ADH2 之 *NdeI/BglIII* 6.8 kb 片段進行接合作用，得到基因鑲箱質體 pXYL2-ADH2。

以基因鑲箱質體 pXYL2-ADH2 為模板，利用引子對 Y1038/Y1041 可 PCR 增幅出一段兩端含有 ADH2 同源序列，中間具有 XYL2 基因，且同時含有 LE-RE site 所包夾之抗 G418 基因的 4.8 kb 基因鑲箱片段。取菌株 YX2KL-OD20，以 YPD 進行搖瓶培養並製備成電穿法之勝任細胞，將純化後的 4.8 kb 基因鑲箱片段以電穿法送入菌體中，再以 YPD+G418 平板培養基進行篩選。所得之單一菌落以引子對 Y0811/Y1041 進行 in-situ PCR 檢測，可得鑲箱二套 XYL2 基因的重組菌株 YX4KL(g)OD20。

參、主要發現與結論

為提升重組酵母菌木糖代謝之效率，我們經由上述之建構過程，建構許多種基因組合的麵包酵母菌株，得以進一步探討比較不同 XYL1 基因突變，以及強化 XYL2 基因、TAL1 基因、TKL1 基因，以及對於木糖代謝之影響。

一、突變型 *Candida* XYL1 基因之影響

將前述所得之 K269M、K269R、K269R/N272S 突變菌株

YH2K/pCXYL1M、YH2K/pCXYL1M2 及 YH2K/pCXYL1M3 以含有 1% 葡萄糖及 0.5% 木糖的 YP 培養基於 30°C 下搖瓶培養 48 小時，再以起始 O.D 600=3 的細胞濃度接種至含有 1% 葡萄糖及 4% 木糖的 YP 培養基 (70ml)，以 30°C 及 150rpm 之條件持續進行培養，隨時間擷取樣本以檢測細胞密度及量測其葡萄糖、木糖、酒精和其他代謝物的濃度，並以菌株 YH2K/pCXYL1 進行相同之培養以作為對照。實驗結果如圖七(A)-(C)所示：YH2K/pCXYL1M、YH2K/pCXYL1M2 及 YH2K/pCXYL1M3 菌株幾乎都不消耗木糖也無法生產酒精，顯示此三種突變皆喪失代謝木糖的能力。然檢測其活性，可發現帶有 K269M 突變的 YH2K/pCXYL1M 菌株喪失木糖代謝能力同時也失去 XYL1 的相關活性，而帶有 K269R 突變的 YH2K/pCXYL1M2 菌株及帶有 K269R/N272S 突變的 YH2K/pCXYL1M3 菌株，雖然失去代謝木糖的能力，卻仍保留部份的 XYL1 活性，可測得部份的 NADH 依賴活性。

二、強化 TAL1 基因表現對於重組酵母菌酒精醱酵之影響

為了提升重組酵母菌代謝木糖生產酒精之效率，我們強化了 TAL1 基因，取得鑲籍 *Pichia* TAL1 基因的菌株 YH2KL(g)。以引子對 Y0930 及 Y0931 進行 in-situ PCR 檢測，可偵測到 0.97 kb 的片段(圖八(A), lane 2~ lane 6)。在移除抗生素基因後所得之菌株 YH2KL，以引子對 Y0928 及 Y0934 進行 in-situ PCR 檢測，可偵測到較短的 0.6 kb 片段 (圖八(B), lane 2~ lane 6)。最後再轉型質體 pCXYL1 至菌株 YH2KL，所取得的轉型菌株 YH2KL/pCXYL1，以引子對 Y0903 及 Y0904 進行 in-situ PCR

檢測，可偵測到 1 kb 的片段(圖八(C), lane 2~ lane 4)

將建構的 YH2KL/pCXYL 菌株以含有 1% 葡萄糖及 0.5% 木糖的 YP 培養基於 30°C 下 200rpm 搖瓶培養 24 小時，再以起始 O.D 600=3 的細胞濃度接種至含有 1% 葡萄糖及 4% 木糖的 YP 培養基 (70ml)，以 30°C 及 150rpm 之條件持續進行培養，隨時間擷取樣本以檢測細胞密度及量測其葡萄糖、木糖、酒精和其他代謝物的濃度，並以菌株 YH2K/pCXYL1 進行相同之培養以作為對照。

實驗結果顯示，在鑲箱 TAL1 基因之後，菌株 YH2KL/pCXYL1 比做為對照組的 YH2K/pCXYL1 菌株有較佳的木糖消耗及酒精生成速率(圖九)。

三、PHO13 基因之破壞對於表現 *Candida* XYL1 基因之影響

為了在染色體中表達 *Candida* XYL1 基因，經由前述之過程，取得在 PHO13 基因位置鑲箱 *Candida* XYL1 基因的菌株 YX2K(g)及 YX2KL(g)，以引子對 Y0903 及 Y0904 進行 in-situ PCR 檢測，可偵測到 1 kb 的片段(圖十(A), lane 2~ lane 6；圖十(B), lane2~ lane 3)

將建構的 YX2K(g)及 YX2KL(g)菌株以含有 1% 葡萄糖及 0.5% 木糖的 YP 培養基於 30°C 下 200 rpm 搖瓶培養 24 小時，再以起始 O.D 600=3 的細胞濃度接種至含有 1% 葡萄糖及 4% 木糖的 YP 培養基 (70ml)，以 30°C 及 150 rpm 之條件持續進行培養，隨時間擷取樣本以檢測細胞密度及量測其葡萄糖、木糖、酒精和其他代謝物的濃度，並取菌株 YH2K/pCXYL1 及 YH2KL/pCXYL1 進行相同之培養以作為對照。

實驗結果如圖十一所示，鑲箱 *Candida* XYL1 基因的

YX2K(g)及 YX2KL(g)可以消耗木糖並生成酒精，然相較於做為對照的菌株 YH2K/pCXYL1 及 YH2KL/pCXYL1，其消耗木糖的速率及生成酒精的速率都比使用質體表現 *Candida* XYL1 基因時下降。此一結果可能跟鑲箱 *Candida* XYL1 基因時所破壞到的 Pho13 基因有關，也因此後續不但以 YX2KL(g)進行演化突變法及菌株突變法來篩選提升 XYL1 活性的菌株外，同時也另外選擇了 ADH2 基因位置來重新進行 *Candida* XYL1 基因的鑲箱，以期改善大幅度下降的木糖代謝活性。

四、ADH2 基因之破壞對於表現 *Candida* XYL1 基因之影響

ADH2 基因會代謝酒精，因此我們嘗試改在此一位置鑲箱並表現 *Candida* XYL1，除了可以保留 Pho13 基因原先之生理功能並且可破壞 ADH2 基因而減少酒精之消耗。我們取得在改在 ADH2 位置鑲箱 XYL1 基因的重組麵包酵母菌株 YY2KL(g)，以引子對 Y0903/Y0904 進行 in-situ PCR 檢測，可增幅出 1 kb 之 XYL1 片段(圖十二(A), Lane 5~7)。而在移除抗 G418 基因後得到菌株 YY2KL，以引子對 Y0928/Y1038 進行 in-situ PCR 檢測，則可偵測到較短的 0.4 kb 片段(圖十二(B), Lane 2~6)。

將建構的 YY2KL(g) 以含有 1% 葡萄糖及 0.5% 木糖的 YP 培養基於 30°C 下 200 rpm 搖瓶培養 24 小時，再以起始 O.D 600=3 的細胞濃度接種至含有 1% 葡萄糖及 4% 木糖的 YP 培養基 (70ml)，以 30°C 及 150 rpm 之條件持續進行培養，隨時間擷取樣本以檢測細胞密度及量測其葡萄糖、木糖、酒精和其他代謝物的濃度，並取菌株 YH2KL/pCXYL1 及 YX2KL 做為對照。實驗結果如圖十三所示，當鑲箱 *Candida* XYL1 的位置從 PHO13

改至 ADH2 後，YY2KL(g)在木糖代謝及酒精生成的能力上有大幅度的回升，已與使用質體表現 XYL1 基因的 YH2KL/pCXYL1 菌株相似，約在 84 小時可消耗 8 成的木糖，且在木糖醇的堆積上優於 YH2KL/pCXYL，具有較少的木糖醇堆積。

五、TKL1、XYL2 基因之強化及馴養菌株對於木糖代謝之影響

為了提升 YX2KL(g)之木糖代謝效率，我們以木糖做為單一碳源，透過馴養及不同木糖濃度的篩選下，依序得到菌株 YX2KL(g)OD20、YX2KL(g)OD29 及 YX2KL(g)OD30。為了方便後續其他基因之鑲箱及探討，YX2KL(g)OD20 及 YX2KL(g)OD30 亦移除了抗 G418 基因，得到菌株 YX2KL-OD20 及 YX2KL-OD30，且可使用引子對 Y0928/Y1008 進行 in-situ PCR 檢測並增幅出因移除抗 G418 基因而縮短的 0.4 kb 片段(圖十四(A), Lane2~6，圖十四(B), Lane 2, 3)。

另外，我們嘗試強化其他非氧化性五碳糖磷酸代謝途徑的基因，對 YY2KL 及 YX2KL-OD20 菌株進行了 TKL1 基因的強化，其中分別取得了 YY2KLT(g)及 YX2KLT(g)OD20，且使用引子對 Y0921/Y1033 進行 in-situ PCR 可增幅出 0.8 kb 之片段(圖十五(A), Lane 2；圖十五(B), Lane 2, 3)。此外，為了減少木糖醇的堆積以提升重組酵母菌代謝木糖之速度，我們也嘗試建構強化 XYL2 基因表現的重組酵母菌株。利用菌株 YX2KL-OD20 的 ADH2 位置，在上面鑲箱了第二套 XYL2 基因，得到重組酵母菌株 YX4KL(g)OD20，此菌株使用引子對 Y0811/Y1041 進行 in-situ PCR 檢測可增幅出 2 kb 片段(圖十六, Lane 3)。

為了比較強化 TKL1 基因與馴養法之成效，首先取強化了

TKL1 基因的 YY2KLT(g)及馴養時先得到的 YX2KL(g)OD20，以含有 1%葡萄糖及 0.5% 木糖的 YP 培養基於 30°C 下 200 rpm 搖瓶培養 24 小時，再以初始 O.D 600=3 的細胞濃度接種至含有 1%葡萄糖及 4%木糖的 YP 培養基 (70ml)，以 30°C 及 150 rpm 之條件持續進行培養，隨時間擷取樣本以檢測細胞密度及量測其葡萄糖、木糖、酒精和其他代謝物的濃度，並以菌株 YY2KL(g) 做為對照。實驗結果如圖十七(A)-(C)所示，YY2KLT(g)與沒有強化 TKL1 基因的 YY2KL(g)並無顯著的差別，但酒精最高產量略低。然而，馴養所得的 YX2KL(g)OD20，雖然其生長速度較慢，但是其木糖消耗速度已比 YY2KL(g)來的快，且酒精生成與 YY2KL(g)相近，唯累積了較多木糖醇。此一結果顯示，經過馴養的過程，YX2KL(g)OD20 不僅去除了原先因為 PHO13 基因被破壞而造成的抑制效果，反而還在木糖消耗上超越了在 ADH2 基因位置鑲嵌 *Candida* XYL1 基因的 YY2KL(g)菌株。

經由馴化過程，我們陸續取得 YX2KL(g)OD29 及 YX2KL(g)OD30。取得 YX2KL(g)OD29 後，挑選 3 顆單一菌落，以前述相同方式進行醱酵及檢測，並與 YX2KL(g)OD20 進行比較。結果如圖十八(A)-(C)所示，在生長速度方面，馴養所得之菌落，其不同個體在生長速度上會有部份的差異，然木糖代謝及酒精與木糖醇生成卻是近似的。若與較早所得的菌株 YX2KL(g)OD20 相較，YX2KL(g)OD29 在木糖代謝上與 YX2KL(g)OD20 相同，約在 72 小時可消耗掉 8 成木糖，然在酒精轉化速度上則有相當的提升，約 72 小時可達最高的酒精生成。在木糖醇的堆積上則是相近的。

而取得 YX2KL(g)OD30 後，同樣也挑選 3 顆單一菌落，並與強化了 TKL1 基因的 YX2KLT(g)OD20 及強化了 XYL2 基因的 YX4KL(g)OD20 進行比較。以前述相同的方法進行醱酵及檢測，結果如圖十九 (A)-(C) 所示，在生長速度方面，YX2KL(g)OD30 有較多的個體差異，且大多比 YX2KLT(g)OD20 及 YX4KL(g)OD20 來的慢，在木糖消耗速度上，YX2KL(g)OD30 有顯著的速度提升，可在 48 小時消耗約 8 成木糖，約 60 小時可消耗完木糖。而 YX2KLT(g)OD20 及 YX4KL(g)OD20 則也有近似但略低的木糖消耗，約在 48 小時消耗 7 成多之木糖。而在酒精生成及木糖醇堆積上，YX2KLOD30 在酒精生成量及木糖醇累積量有大幅度的個體差異，其中以 3 號菌有較佳之酒精生成及較少的木糖醇堆積，相反的，1 號菌則有最多的木糖醇堆積及最低的酒精產量。而強化 TKL1 的 YX2KLT(g)OD20 及強化 XYL2 的 YX4KL(g)OD20，也有近似 3 號菌的酒精生成速度，但這兩者之木糖醇堆積則明顯比 YX2KL(g)OD30 來的低。此一結果顯示，藉由馴養篩選，YX2KL(g)OD30 展現了大幅度的提升，而稍早所得的馴養菌株 YX2KL(g)OD20 在強化了 TKL1 或 XYL2 後，則也達到近似 YX2KL(g)OD30 的效率。因此強化這兩個基因應有助於提升木糖代謝之效率。較另人意外的是，相較於 YY2KLT(g)強化了 TKL1 基因後沒有顯著效果，YX2KLT(g)OD20 強化了 TKL1 則有顯著的提升。

綜合比較 YX2KL(g)、YX2KL(g)OD20 及 YX2KL(g)OD30 之混合糖醱酵能力，則如圖二十(A)、(B)所示，YX2KL(g)在馴養過程後，木糖代謝及酒精轉化速度皆呈現大幅度之提升，木糖醇累積量及速度

亦有上升，但約維持在 0.5% 左右。

肆、參考文獻

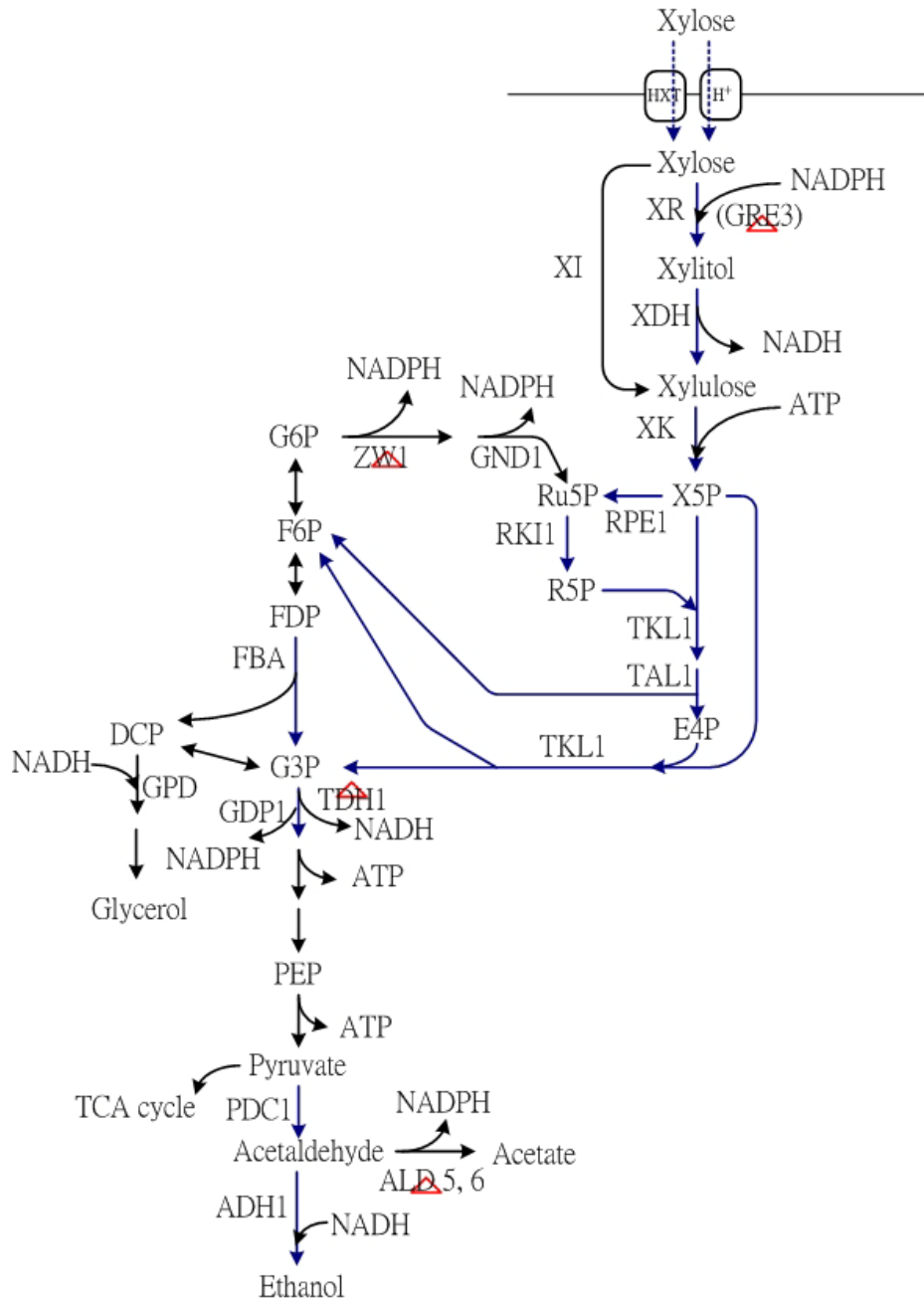
1. **Bakker, B. M., C. Bro, P. Kotter, M. A. Luttik, J. P. van Dijken, and J. T. Pronk.** 2000. The mitochondrial alcohol dehydrogenase Adh3p is involved in a redox shuttle in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* **182**:4730-4737.
2. **Bisson, L. F., D. M. Coons, A. L. Kruckeberg, and D. A. Lewis.** 1993. Yeast sugar transporters. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* **28**:259-308. .
3. **Bruinenbeg, P. M., P. H. M. de Bot, J. P. van Dijken, and W. A. Scheffers.** 1984. NADH-linked aldose reductase: the key to ethanolic fermentation of xylose by yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol.* **18**:287-292.
4. **Galbe, M., and G. Zacchi.** 2002. A review of the production of ethanol from softwood. *Appl Microbiol Biotechnol.* **59**:618-628.
5. **Gardonyi, M., M. Osterberg, C. Rodrigues, I. Spencer-Martins, and B. Hahn-Hagerdal.** 2003. High capacity xylose transport in *Candida intermedia* PYCC 4715. *FEMS Yeast Res.* **3**:45-52.
6. **Gunsalus, I. C., B. L. Horecker, and W. A. Wood.** 1995. Pathways of carbohydrate metabolism in microorganisms. *Bacteriol Rev.* **19**:79-128.
7. **Hahn-Hagerdal, B., M. Galbe, M. Gorwa-Grauslund, G. Liden, and G. Zacchi.** 2006. Bio-ethanol--the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends Biotechnol.* **24**:549-556.
8. **Hahn-Hägerdal, B., K. Karhumaa, C. Fonseca, I. Spencer-Martins, and M. F. Gorwa-Grauslund.** 2007. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Appl Microbiol Biotechnol.*

- 74:937-953.
9. **Hamacher, T., J. Becker, M. Gardonyi, B. Hahn-Hagerdal, and E. Boles.** 2002. Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transporters and their influence on xylose utilization. . *Microbiology*. **148**:2783-2788.
 10. **Harhangi, H. R., A. S. Akhmanova, R. Emmens, C. van der Drift, W. T. de Laat, J. P. van Dijken, M. S. Jetten, J. T. Pronk, and H. J. Op den Camp.** 2003. Xylose metabolism in the anaerobic fungus *Piromyces* sp. strain E2 follows the bacterial pathway. *Arch Microbiol*. **180**:134-141.
 11. **Jeppsson, M., O. Bengtsson, K. Franke, H. Lee, B. Hahn-Hagerdal, and M. F. Gorwa-Grauslund.** 2006. The expression of a *Pichia stipitis* xylose reductase mutant with higher $K(M)$ for NADPH increases ethanol production from xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng*. **93**:665-673.
 12. **Jin, Y. S., and T. W. Jeffries.** 2003. Changing flux of xylose metabolites by altering expression of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Biochem Biotechnol*. **105**:277-286.
 13. **Jin, Y. S., J. M. Laplaza, and T. W. Jeffries.** 2004. *Saccharomyces cerevisiae* engineered for xylose metabolism exhibits a respiratory response. *Appl Environ Microbiol*. **70**:6816-6825.
 14. **Jin, Y. S., H. Ni, J. M. Laplaza, and T. W. Jeffries.** 2003. Optimal growth and ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* require moderate D-xylulokinase activity. . *Appl Environ Microbiol*. **69**:495-503.
 15. **Karhumaa K, R. Garcia Sanchez, B. Hahn-Hägerdal, and M. F.**

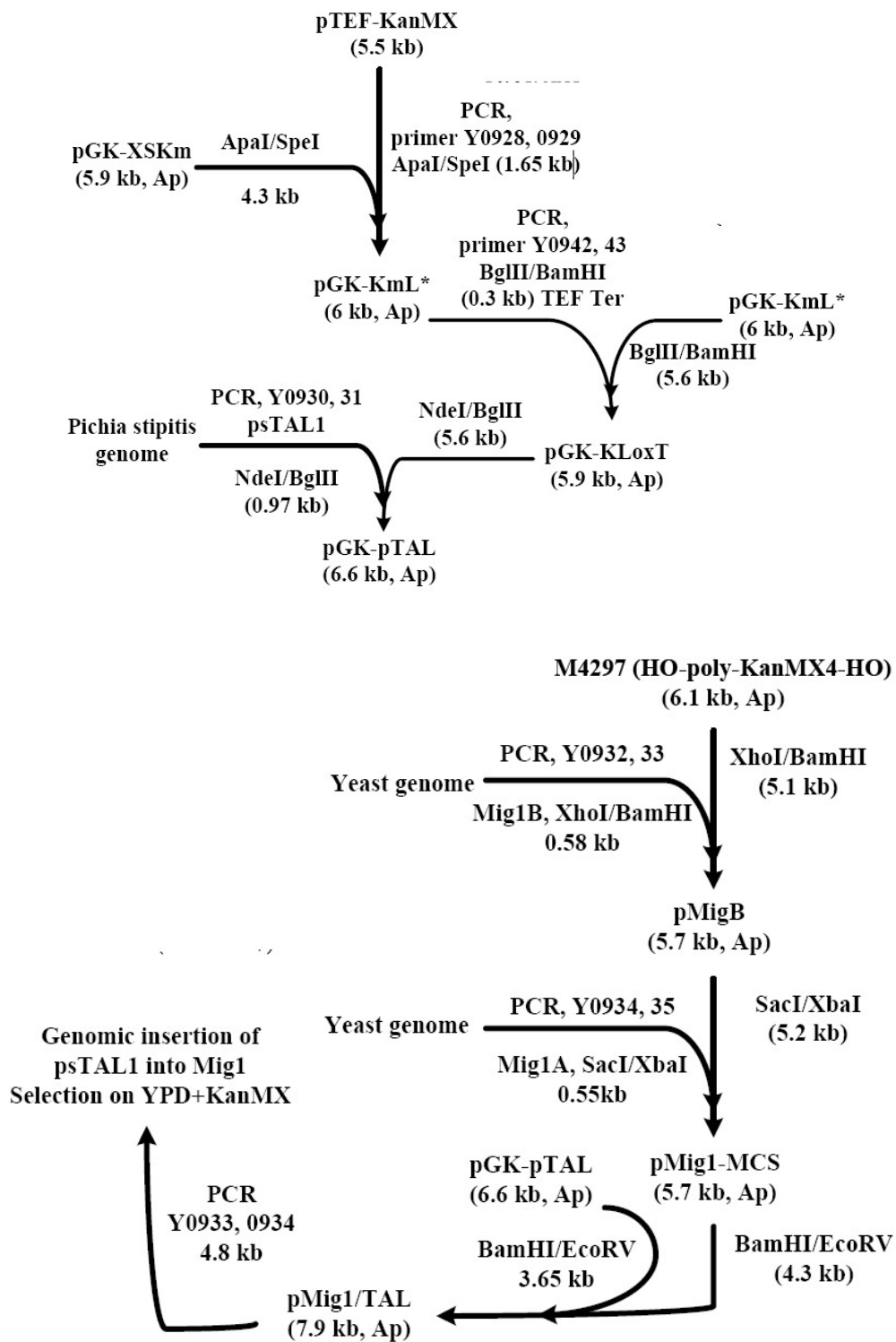
- Gorwa-Grauslund.** 2007. Comparison of the xylose reductase-xylitol dehydrogenase and the xylose isomerase pathways for xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact.* **5**:1-10.
16. **Kuhn, A., C. van Zyl, A. van Tonder, and B. A. Prior.** 1995. Purification and partial characterization of an aldo-keto reductase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol.* **6**:1580-1585.
17. **Kuyper, M., H. R. Harhangi, A. K. Stave, A. A. Winkler, M. S. Jetten, W. T. de Laat, J. J. den Ridder, H. J. Op den Camp, J. P. van Dijken, and J. T. Pronk.** 2003. High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: the key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae*? *FEMS Yeast Res.* **4**:69-78.
18. **Kuyper, M., M. J. Toirkens, J. A. Diderich, A. A. Winkler, J. P. van Dijken, and J. T. Pronk.** 2005. Evolutionary engineering of mixed-sugar utilization by a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain. *FEMS Yeast Res.* **5**:925-934.
19. **Kuyper, M., A. A. Winkler, J. P. van Dijken, and J. T. Pronk.** 2004. Minimal metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: a proof of principle. *FEMS Yeast Res.* **4**:655-664.
20. **Lee, W. J., M. D. Kim, Y. W. Ryu, L. F. Bisson, and J. H. Seo.** 2002. Kinetic studies on glucose and xylose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **60**:186-191.
21. **Modig, T., G. Liden, and M. J. Taherzadeh.** 2002. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. *Biochem J.* **363**:769-776.
22. **Palmqvist, E., H. Grage, N. Q. Meinander, and B.**

- Hahn-Hagerdal.** 1999. Main and interaction effects of acetic acid, furfural, and p-hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts. . *Biotechnol Bioeng.* **63**:46-55.
23. **Pitkanen, J. P., E. Rintala, A. Aristidou, L. Ruohonen, and M. Penttila.** 2005. Xylose chemostat isolates of *Saccharomyces cerevisiae* show altered metabolite and enzyme levels compared with xylose, glucose, and ethanol metabolism of the original strain. *Appl Microbiol Biotechnol.* **67**:827-837.
24. **Richard, P., M. H. Toivari, and M. Penttila.** 1999. Evidence that the gene YLR070c of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a xylitol dehydrogenase. *FEBS Lett.* **457**:135-138.
25. **Salusjarvi, L., J. P. Pitkanen, A. Aristidou, L. Ruohonen, and M. Penttila.** 2006. Transcription analysis of recombinant *saccharomyces cerevisiae* reveals novel responses to xylose. *Appl Biochem Biotechnol.* **128**:237-261.
26. **Sarthy, A. V., B. L. McConaughy, Z. Lobo, J. A. Sundstrom, C. E. Furlong, and B. D. Hall.** 1987. Expression of the *Escherichia coli* xylose isomerase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol.* **53**:1996-2000.
27. **Slininger, P. J., B. S. Dien, S. W. Gorsich, and Z. L. Liu.** 2006. Nitrogen source and mineral optimization enhance D: -xylose conversion to ethanol by the yeast *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. *Appl Microbiol Biotechnol.* **72**:1285-1296.
28. **Taherzadeh, M. J., L. Gustafsson, C. Niklasson, and G. Liden.** 2000. Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **53**:701-708.
29. **Toivola, A., D. Yarrow, E. van den Bosch, J. P. van Dijken, and W. A. Scheffers.** 1984. Alcoholic Fermentation of d-Xylose by Yeasts.

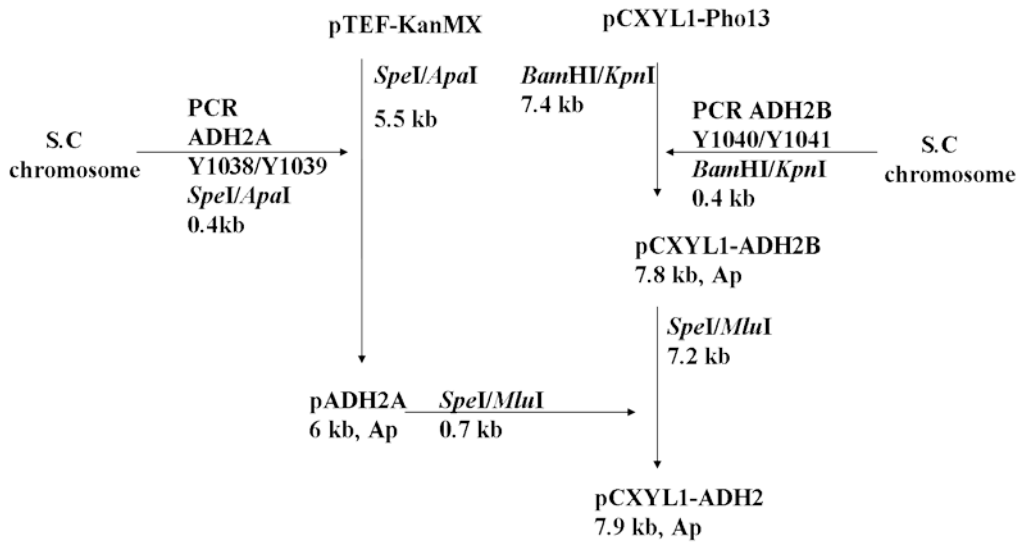
- Appl Environ Microbiol. **47**:1221-1223.
30. **Verho, R., J. Londesborough, M. Penttila, and P. Richard.** 2003. Engineering redox cofactor regeneration for improved pentose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. . Appl Environ Microbiol. **69**:5892-5897.
31. **Wahlbom, C. F., and B. Hahn-Hagerdal.** 2002. Furfural, 5-hydroxymethyl furfural, and acetoin act as external electron acceptors during anaerobic fermentation of xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol Bioeng. **78**:172-178.
32. **Walfridsson, M., X. Bao, M. Anderlund, G. Lilius, L. Bulow, and B. Hahn-Hagerdal.** 1996. Ethanolic fermentation of xylose with *Saccharomyces cerevisiae* harboring the *Thermus thermophilus* xylA gene, which expresses an active xylose (glucose) isomerase. Appl Environ Microbiol. **62**:4648-4651.



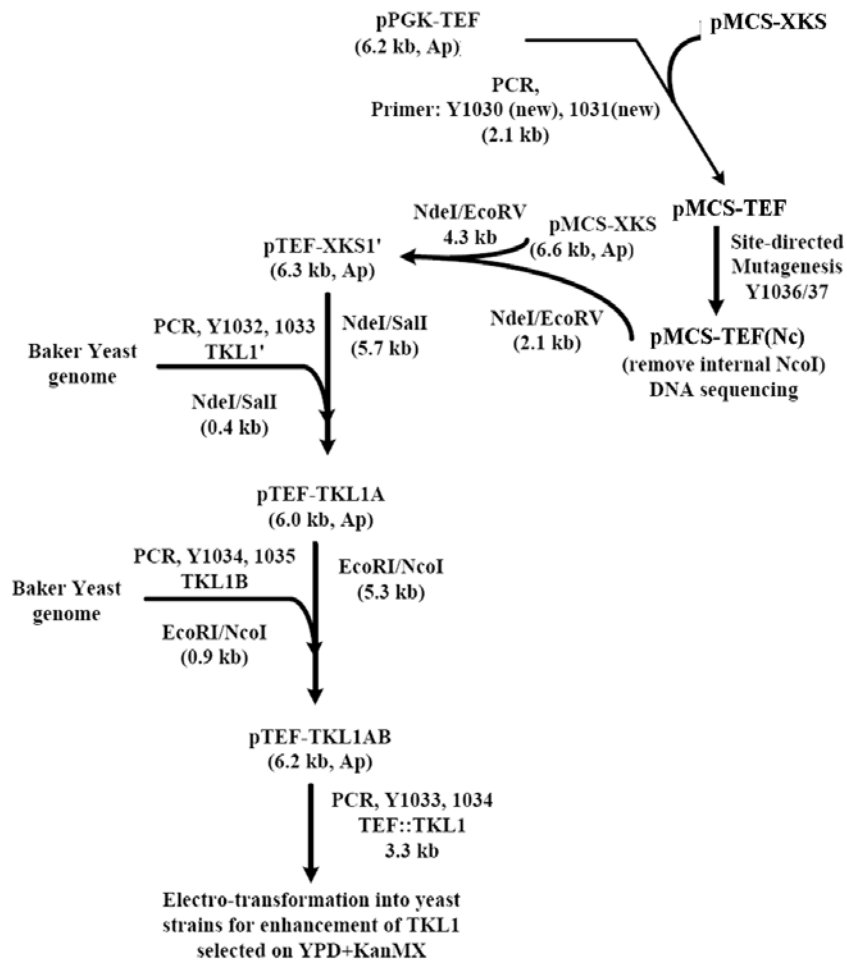
圖一：麵包酵母菌木糖酒精發酵代謝路徑示意圖。酵素縮寫：XR, xylose reductase; XDH, xylitol dehydrogenase; XI, xylose isomerase; GRE3, aldose reductase; XK, xylulose kinase; RPE1, ribulose 5-phosphate epimerase; RKI1, ribose 5-phosphate isomerase; TKL1, transketolase; TAL1, transaldolase; TDH1, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; FBA, fructose biphosphate aldolase; PDC1, pyruvate decarboxylase; ADH1, alcohol dehydrogenase; ALD, acetaldehyde dehydrogenase; HXT, hexose transporter; H⁺, H⁺/xylose symporter; GDP1, *K. lactis* glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.



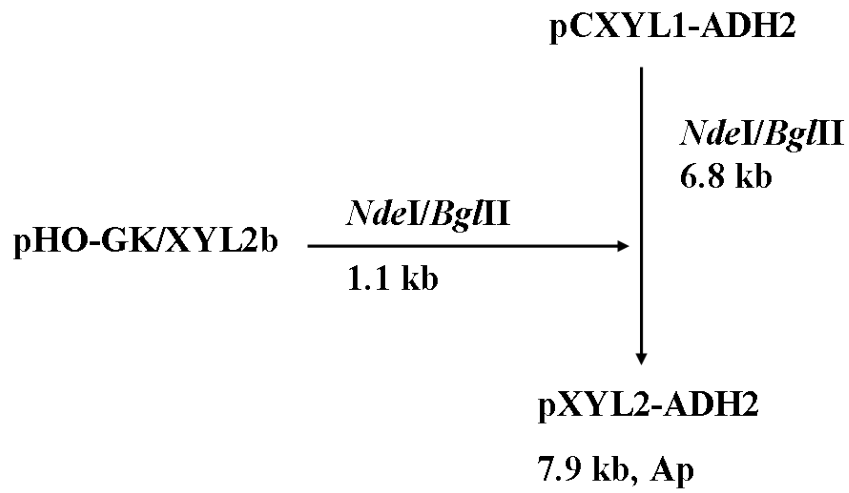
圖二、基因鑲箱質體 pMig1/TAL 之建構流程



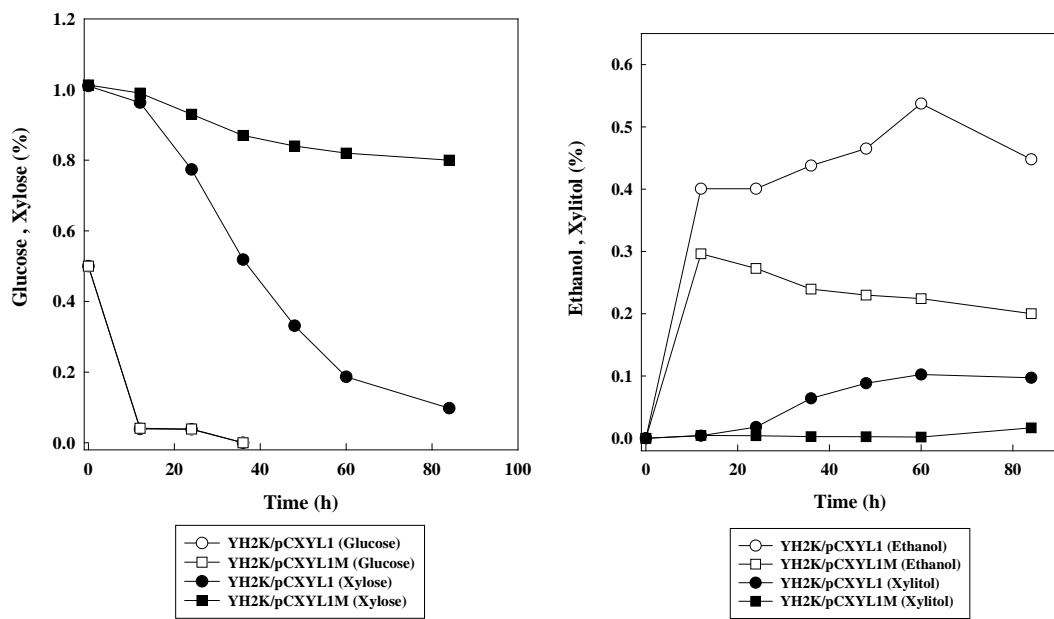
圖四、基因鑲箱質體 pCXYL1-ADH2 之建構流程



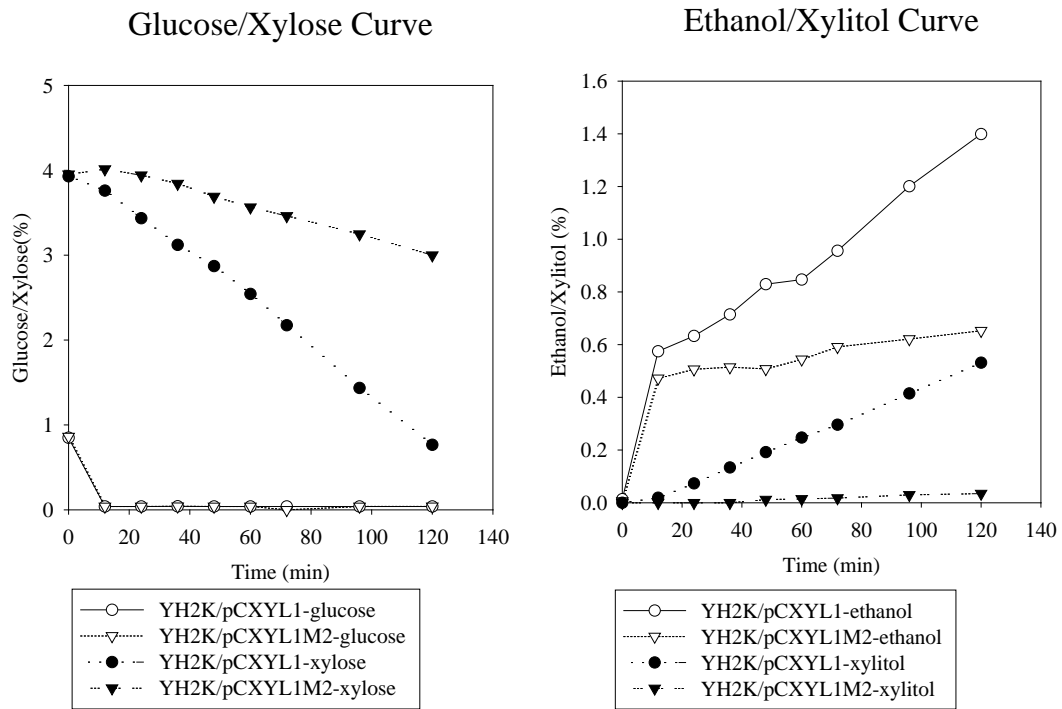
圖五、基因鑲箱質體 pTEF-TKL1AB 之建構流程



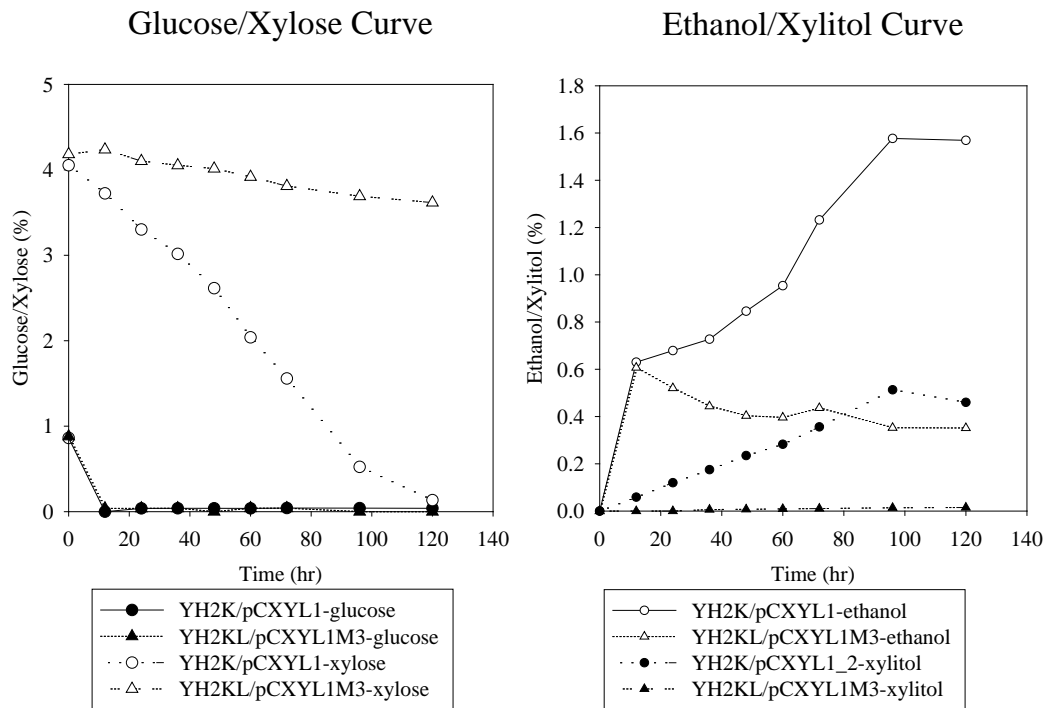
圖六、基因鑲箱質體 pXYL2-ADH2 之建構流程



(A)



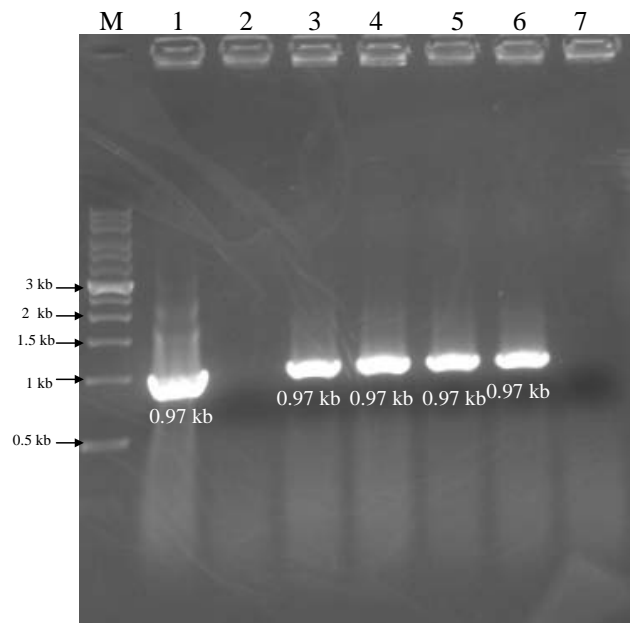
(B)



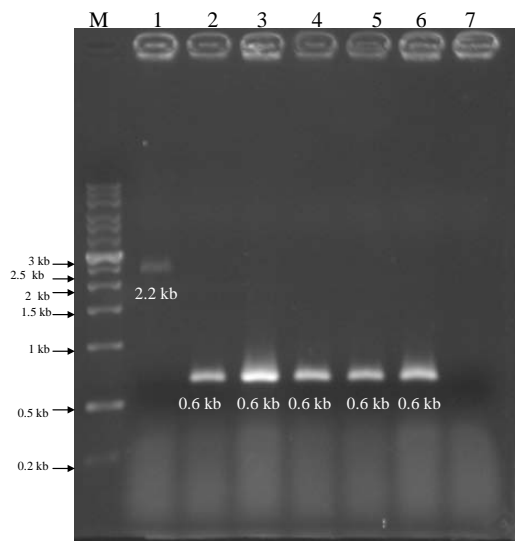
(C)

圖七、重組菌株 YH2K/pCXYL1M、YH2K/pCXYL1M2 及

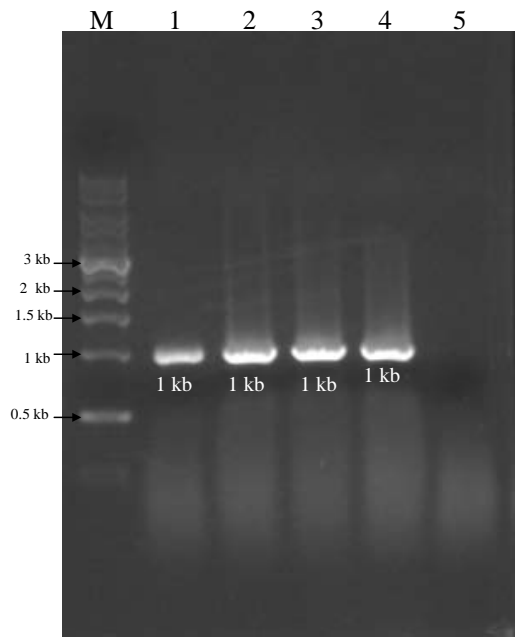
YH2K/pCXYL1M3 之酒精醱酵情形。(A) 重組酵母菌株
YH2K/pCXYL1M 之葡萄糖及木糖消耗、酒精及木糖醇生成；(B)
重組酵母菌株 YH2K/pCXYL1M2 之葡萄糖及木糖消耗、酒精及木
糖醇生成；(C) 重組酵母菌株 YH2K/pCXYL1M3 之葡萄糖及木糖
消耗、酒精及木糖醇生成



(A)

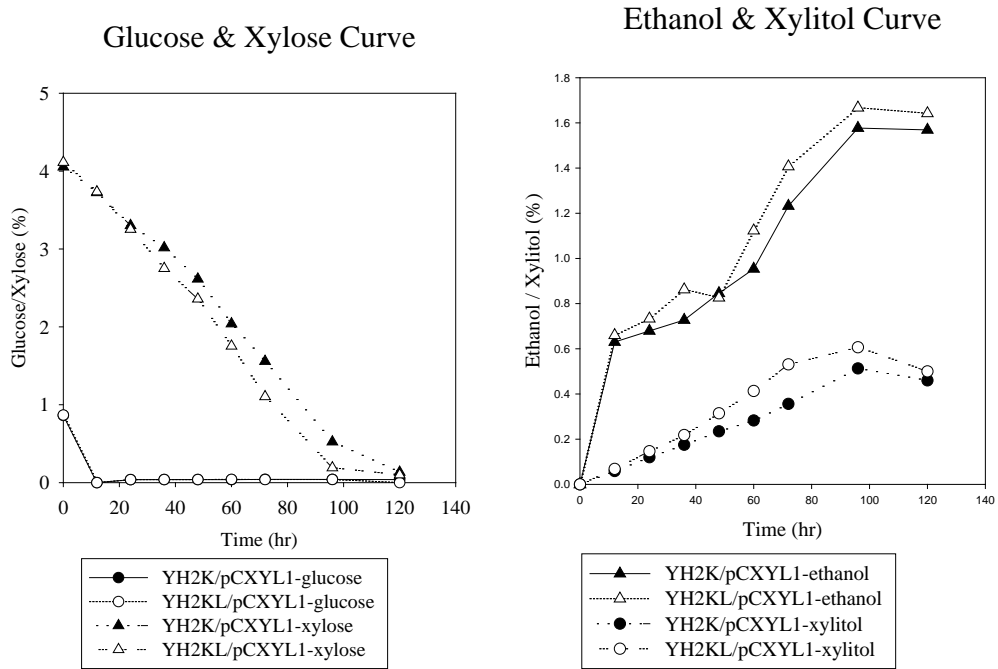


(B)

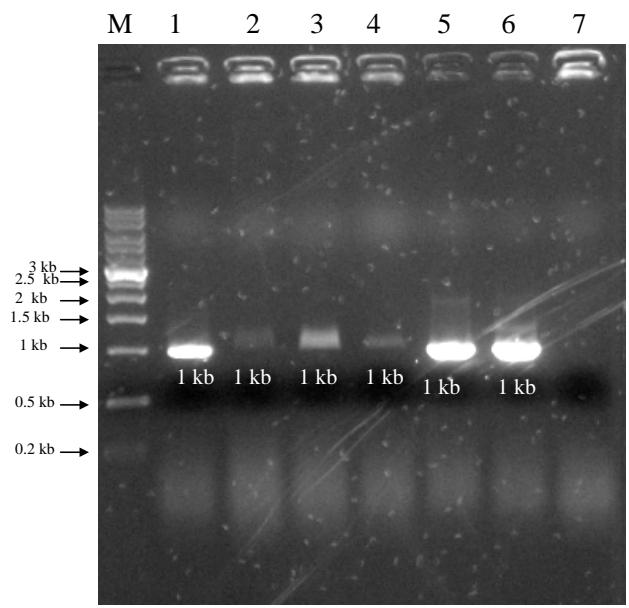


(C)

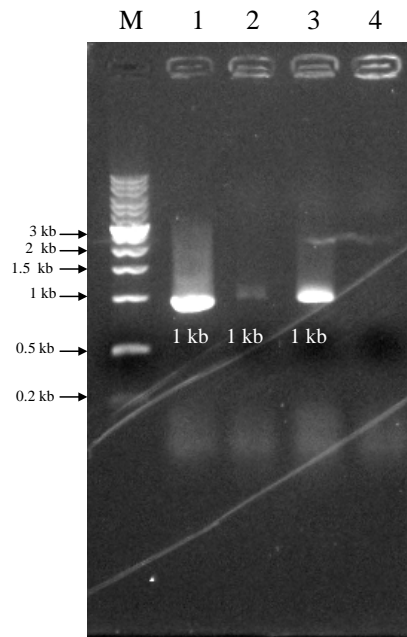
圖八、(A) 以引子對 Y0930, Y0931 進行 In-situ PCR 檢測，篩選鑲箱 TAL1 的轉型菌株，鑲箱 TAL1 基因後可增幅出 0.97kb 的片段。M：1 kb DNA marker； Lane 1: 正控制組，質體 pMig1/pCXYL1； Lane 2 ~Lane 6：可抗 G418 的轉型菌株； Lane 7：負控制組麵包酵母菌株 YH2K。(B) 以引子對 Y0928, Y0934 進行 In-situ PCR 檢測，篩選移除抗 G418 基因的 YH2KL(g) 菌株。若未移除可增幅出 2.2 kb 的片段，移除後則可增幅出較短的 0.6 kb 片段。M：1 kb DNA marker； Lane 1: 正控制組 YH2KL(g)； Lane 2 ~lane 6：不抗 G418 的 YH2KL(g) 轉型菌株； Lane 7：負控制組麵包酵母菌株 YH2K。(C) 以引子對 Y0903, Y0904 進行 In-situ PCR 檢測，篩選轉型 pCXYL1 質體的 YH2KL 菌株，可增幅出 1 kb 的片段。M：1 kb DNA marker； Lane 1: 正控制組 YH2K/pCXYL1； Lane 2 ~lane 6：轉型 pCXYL1 質體且可抗 G418 的 YH2KL 轉型菌株； Lane 7：負控制組 YH2KL



圖九、重組菌株 YH2KL/pCXYL1 進行酒精發酵所得之葡萄糖及木糖消耗曲線、酒精及木糖醇生成曲線。

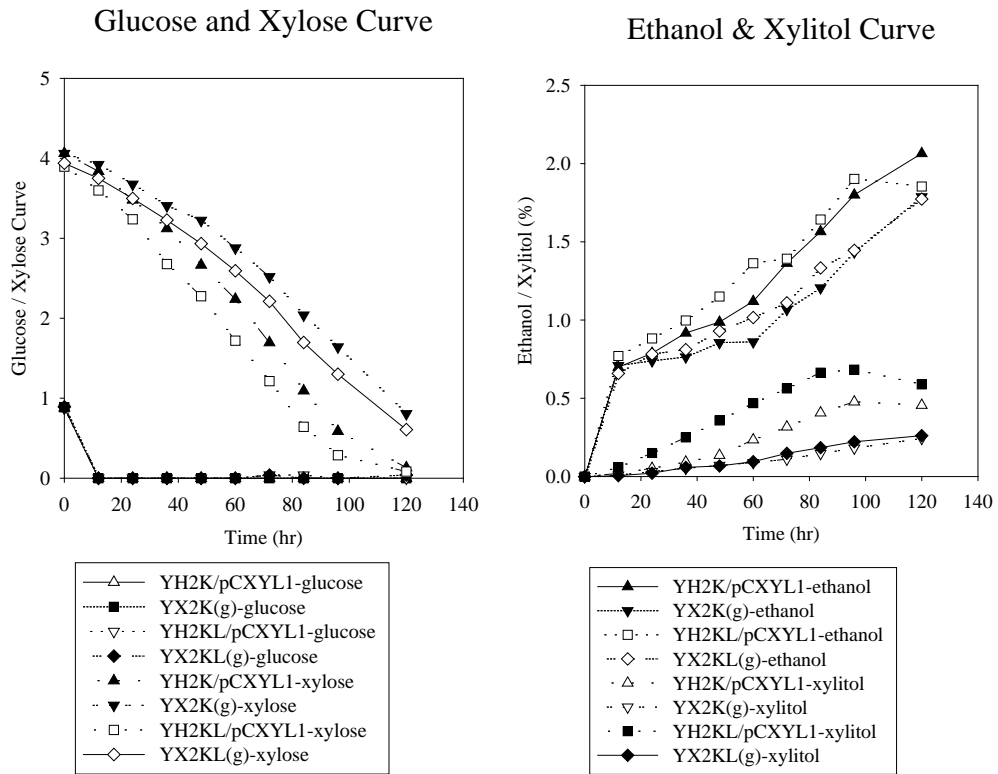


(A)

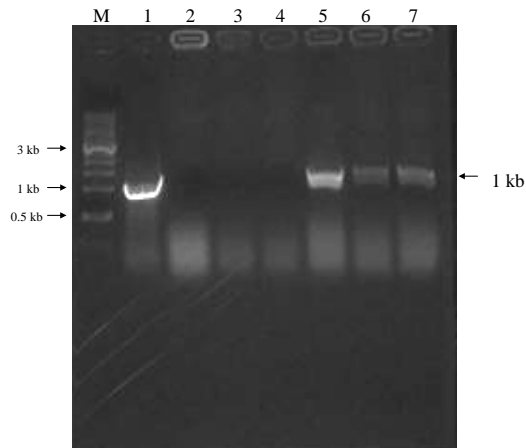


(B)

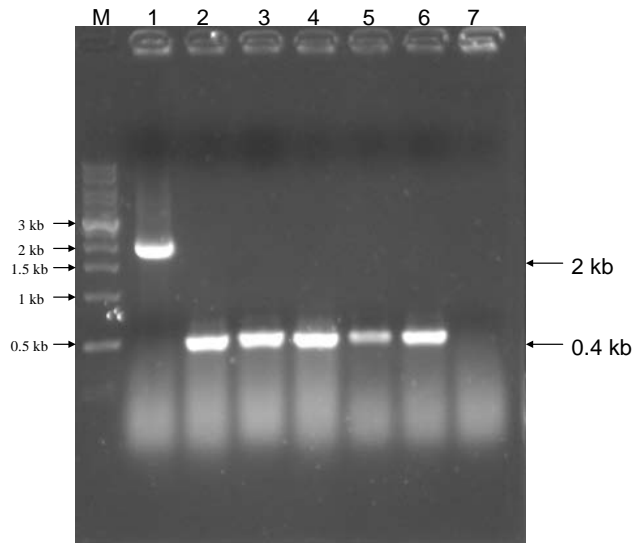
圖十、(A)以引子對 Y0903, Y0904 進行 In-situ PCR 檢測，篩選在 Pho13 位置鑲箱 *Candida* XYL1 的 YH2K 轉型菌株，鑲箱 XYL1 基因後可增幅出 1 kb 的片段。M：1 kb DNA marker; Lane 1: 正控制組麵包酵母菌株 YH2K/pCXYL1; Lane 2 ~Lane 6：可抗 G418 的轉型菌株; Lane 7：負控制組麵包酵母菌株 YH2K。(B)以引子對 Y0903, Y0904 進行 In-situ PCR 檢測，篩選在 Pho13 位置鑲箱 *Candida* XYL1 的 YH2KL 轉型菌株，鑲箱 XYL1 基因後可增幅出 1 kb 的片段。M：1 kb DNA marker; Lane 1: 正控制組麵包酵母菌株 YH2KL/pCXYL1; Lane 2 ~Lane 3：可抗 G418 的轉型菌株; Lane 4：負控制組麵包酵母菌株 YH2KL。



圖十一、重組菌株 YX2K(g)及 YX2KL(g)進行酒精醱酵後所得之葡萄糖、木糖消耗曲線及酒精、木糖醇生成曲線



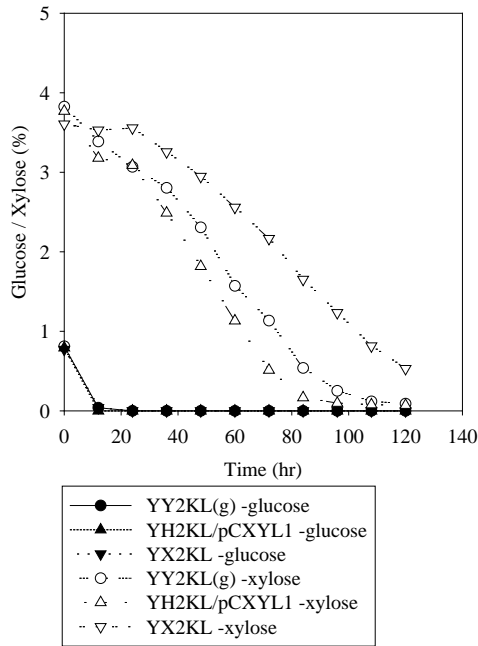
(A)



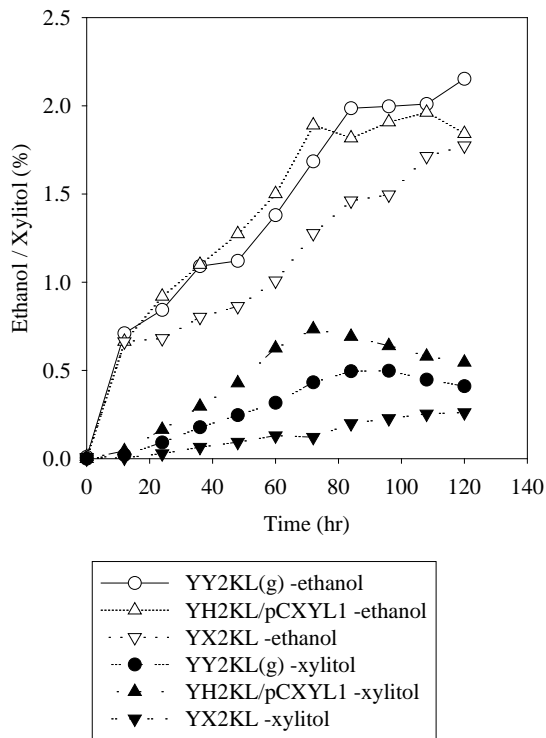
(B)

圖十二、(A)以引子對 Y0903, Y0904 in-situ PCR 篩選在 ADH2 位置鑲箱 *Candida* XYL1 基因的 YH2KL 轉型菌株。鑲箱 XYL1 基因後可增幅出 1 kb 的片段。M：1 kb DNA marker； Lane 1: 正控制組麵包酵母菌株 YH2K/pCXYL1； Lane 2 ~Lane 7：可抗 G418 的 YH2KL 轉型菌株。(B)以引子對 Y0928, Y1038 進行 in-situ PCR 檢測篩選移除抗 G418 基因的 YY2KL(g) 菌株。若未移除可增幅出 2 kb 的片段，移除後則可增幅出較短的 0.4 kb 片段。M：1 kb DNA marker； Lane 1: 正控制組 YY2KL(g)； Lane 2 ~lane 6：不抗 G418 的 YY2KL(g) 轉型菌株； Lane 7：負控制組麵包酵母菌株 YH2KL

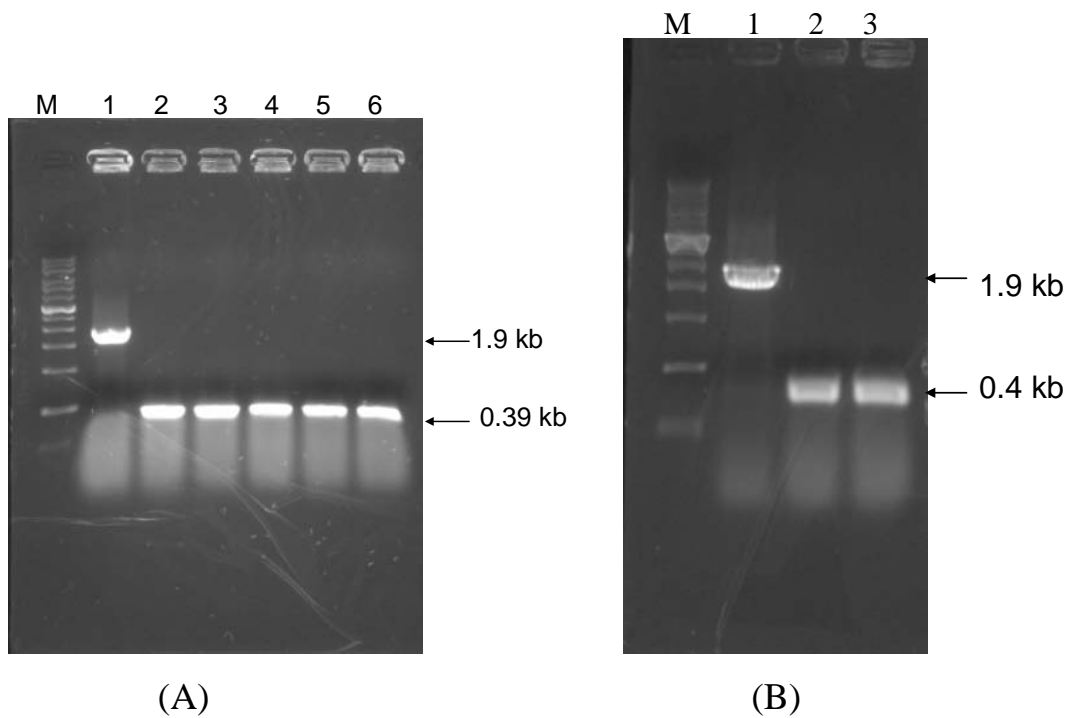
Glucose & Xylose Curve



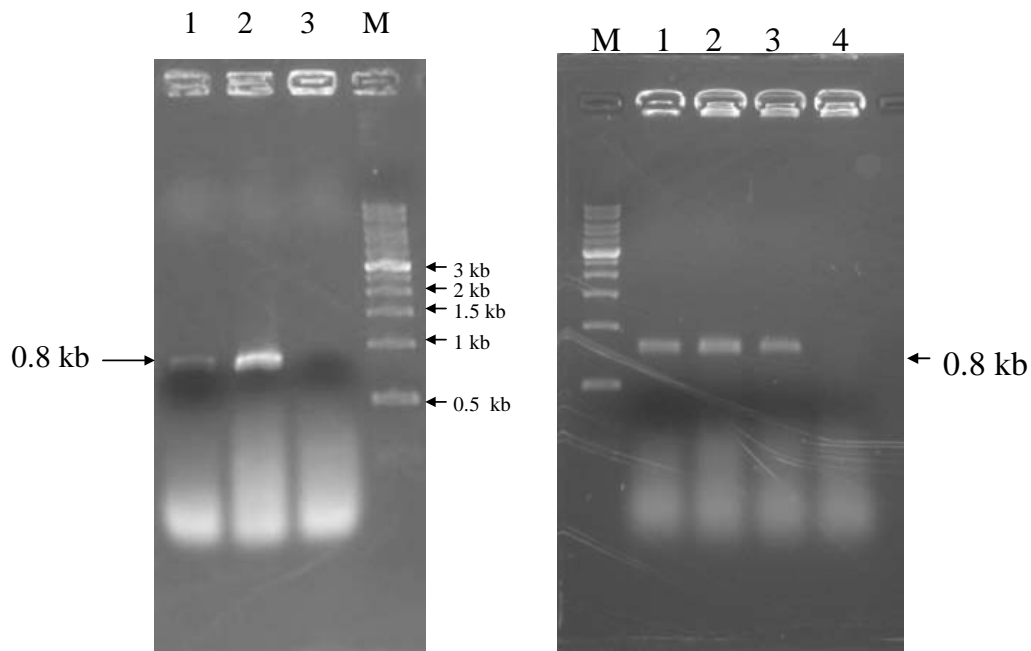
Ethanol & Xylitol Curve



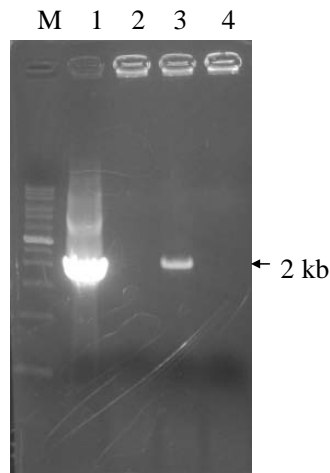
圖十三、重組菌株 YY2KL(g) 進行酒精醱酵後所得之葡萄糖、木糖消耗曲線及酒精、木糖醇生成曲線，並與 YX2KL 及 YH2KL/pCXYL1 進行對照



圖十四、(A)以引子對 Y0928,Y1008 進行 in-situ PCR 檢測篩選移除抗 G418 基因的 YX2KL(g)OD20 轉型菌株。若未移除可增幅出 1.9 kb 的片段，移除後則可增幅出較短的 0.4 kb 片段。M：1 kb DNA marker；Lane 1: 正控制組 YX2KL(g)OD20；Lane 2 ~lane 6：不抗 G418 的 YX2KL(g)OD20 轉型菌株。(B)以引子對 Y0928,Y1008 進行 in-situ PCR 檢測篩選移除抗 G418 基因的 YX2KL(g)OD30 轉型菌株。若未移除可增幅出 1.9 kb 的片段，移除後則可增幅出較短的 0.4 kb 片段。M：1 kb DNA marker；Lane 1: 正控制組 YX2KL(g)OD30；Lane 2 ~lane 3：不抗 G418 的 YX2KL(g)OD30 轉型菌株。

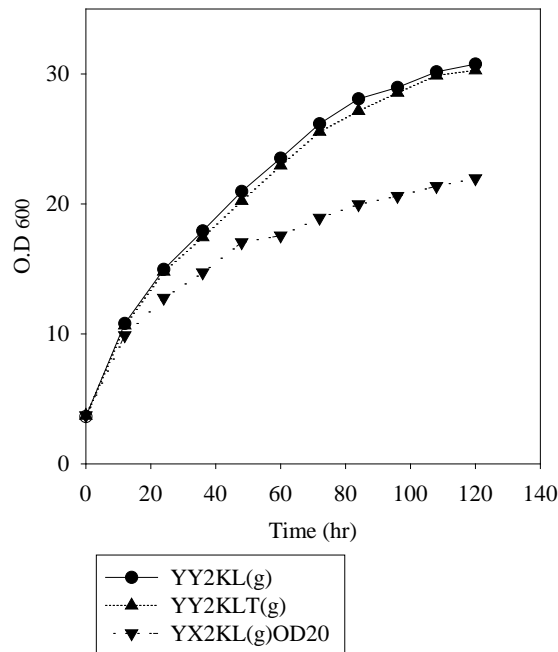


圖十五、(A)以引子對 Y0921, Y1033 進行 in-situ PCR 檢測，篩選鑲箱 TEF promoter 以強化 TKL1 基因的 YY2KL 轉型菌株。若有鑲箱 TEF promoter 至 TKL1 基因前端，則可增幅出 0.8 kb 片段。M：1 kb DNA marker；Lane 1: 正控制組,質體 pTEF-TKL1AB；Lane 2 ~lane 3: 可抗 G418 之 YY2KL 轉型菌株。(B)以引子對 Y0921, Y1033 進行 in-situ PCR 檢測，篩選鑲箱 TEF promoter 以強化 TKL1 基因的 YX2KL-OD20 轉型菌株。若有鑲箱 TEF promoter 至 TKL1 基因前端，則可增幅出 0.8 kb 片段。M：1 kb DNA marker；Lane 1: 正控制組,質體 pTEF-TKL1AB；Lane 2 ~lane 4：可抗 G418 之 YX2KL-OD20 轉型菌株。

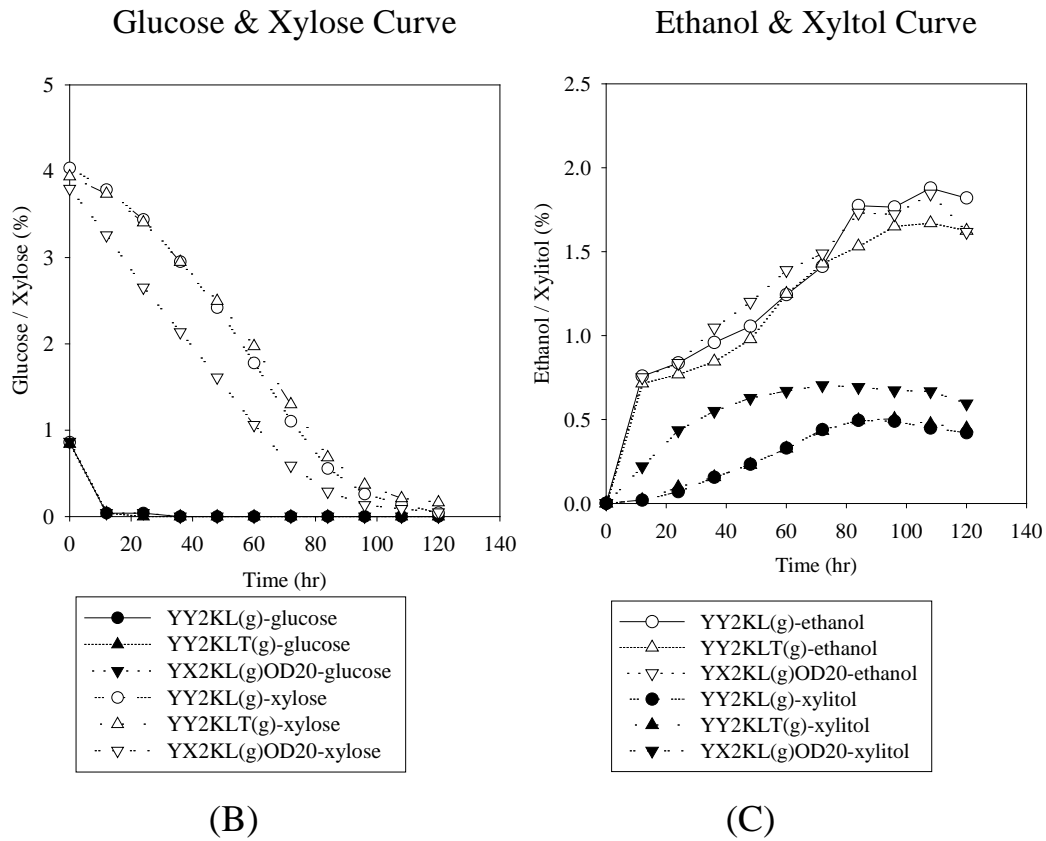


圖十六、以引子對 Y0811, Y1041 進行 in-situ PCR 檢測，篩選在 ADH2 位置上鑲箱第二套 XYL2 基因的 YX2KL-OD20 轉型菌株，鑲箱 XYL2 後可測得 2 kb 之片段。M：1 kb DNA marker; Lane 1: 正控制組，質體 pXYL2-ADH2; Lane 2 ~Lane 3: 可抗 G418 的轉型菌株; Lane 4: 負控制組，麵包酵母菌株 YX2KL。

Growth Curve

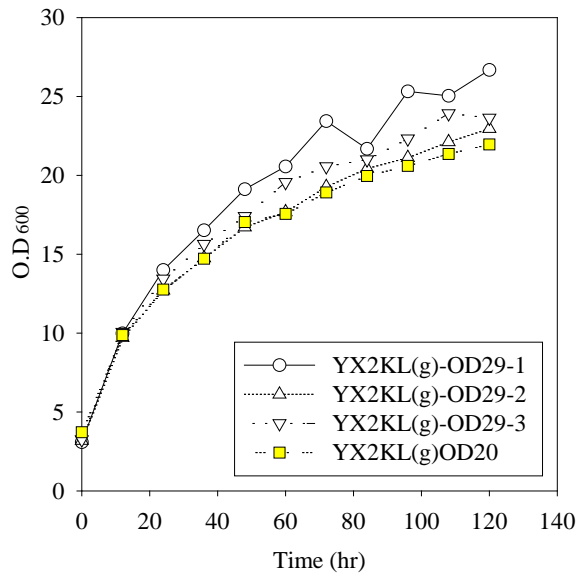


(A)



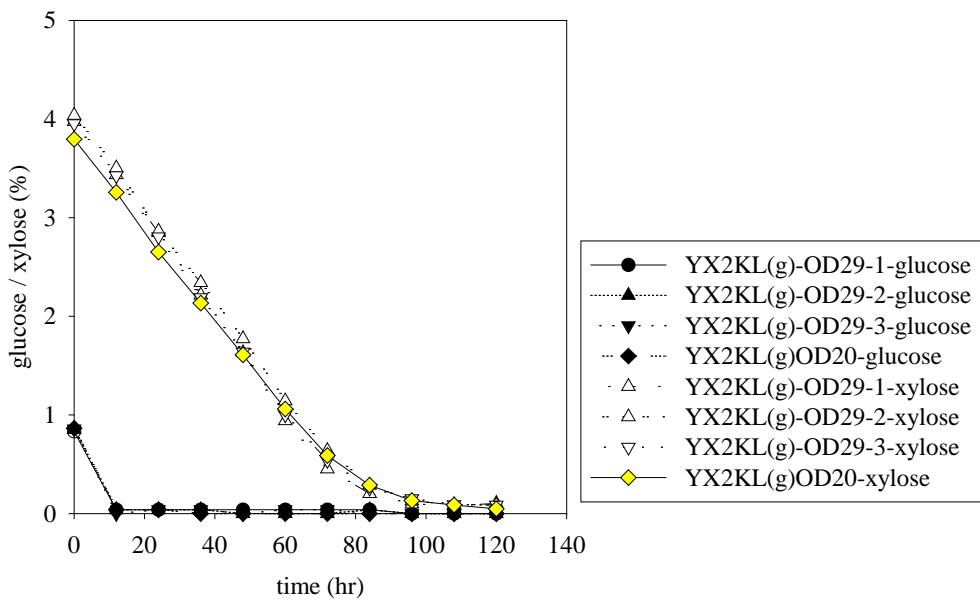
圖十七、(A) 重組菌株 YY2KLT(g)及 YX2KL(g)OD20 進行混合糖醱酵之生長曲線；(B)重組菌株 YY2KLT 及 YX2KL(g)OD20 進行混合糖醱酵所得之葡萄糖及木糖消耗曲線，(C)酒精及木糖醇生成曲線。

Growth Curve



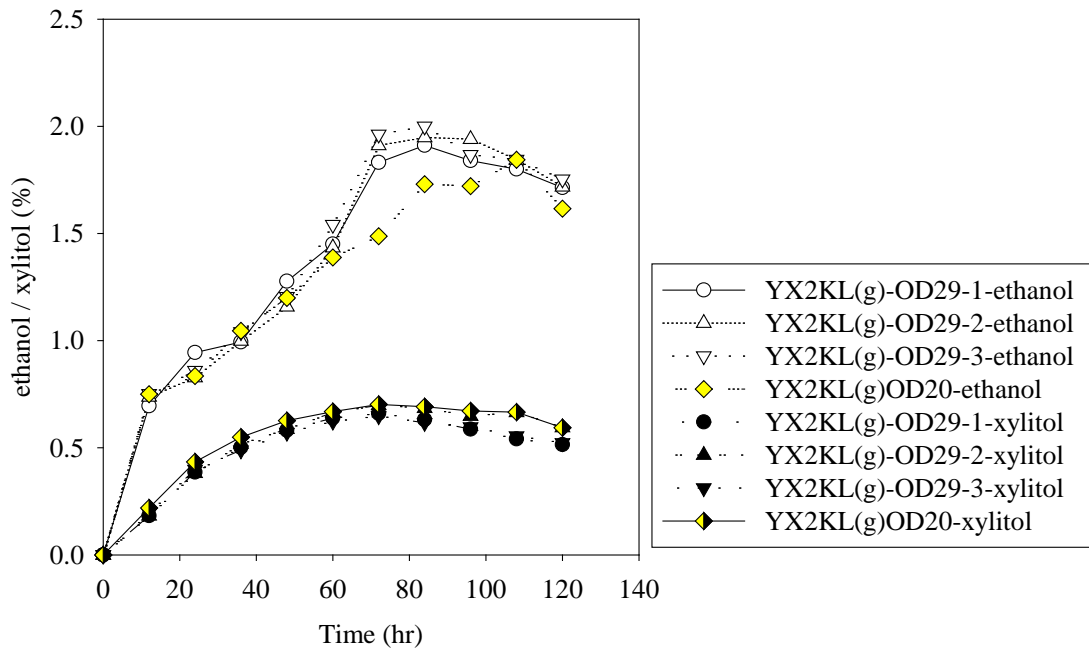
(A)

Glucose and Xylose Curve



(B)

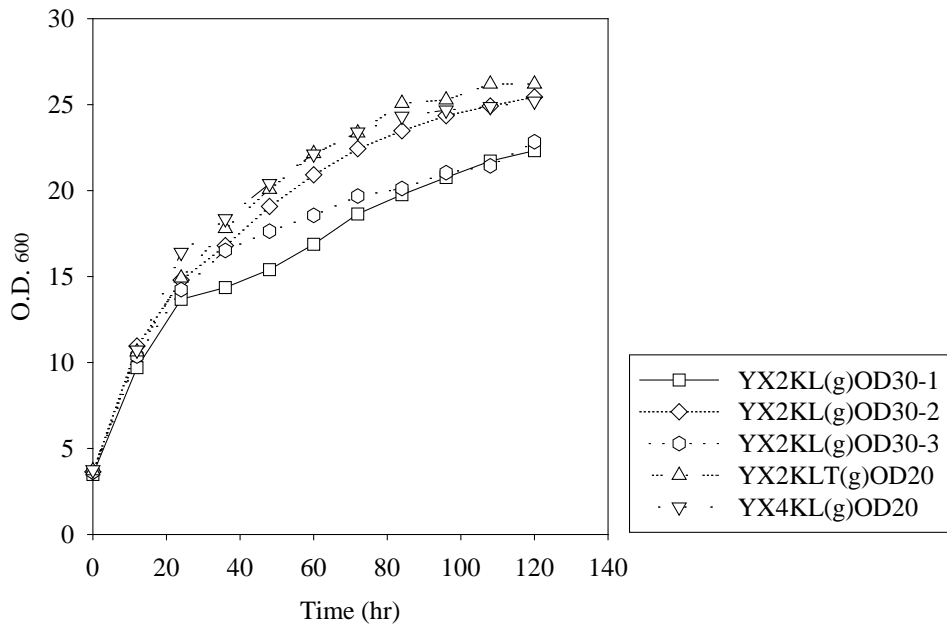
Ethanol and Xylitol Curve



(C)

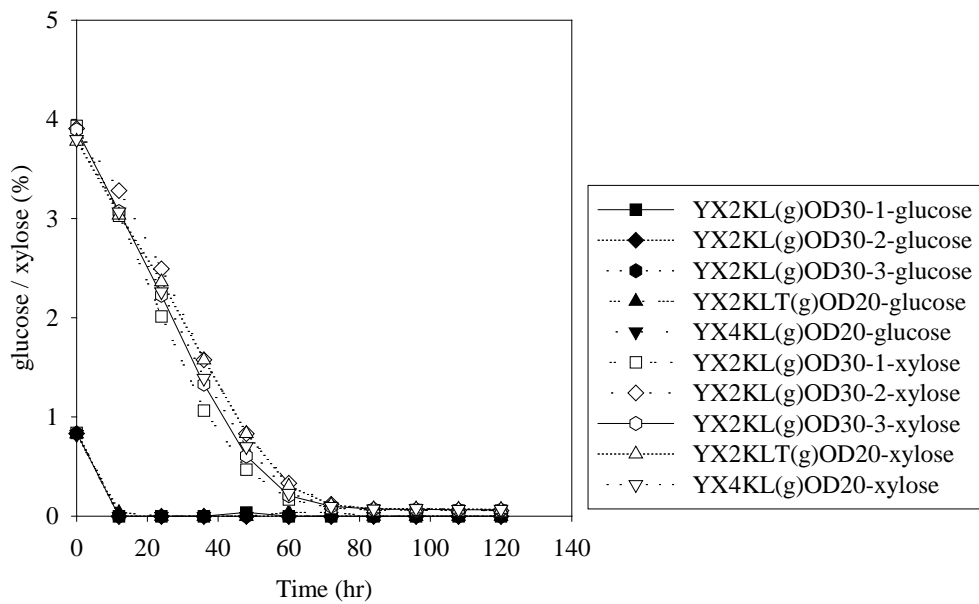
圖十八、(A) 重組菌株 YX2KL(g)OD29 進行混合糖醱酵之生長曲線；(B) 重組菌株 YX2KL(g)OD29 進行混合糖醱酵所得之葡萄糖及木糖消耗曲線；(C)重組菌株 YX2KL(g)OD29 進行混合糖醱酵所得之酒精及木糖醇生成曲線。

Growth Curve



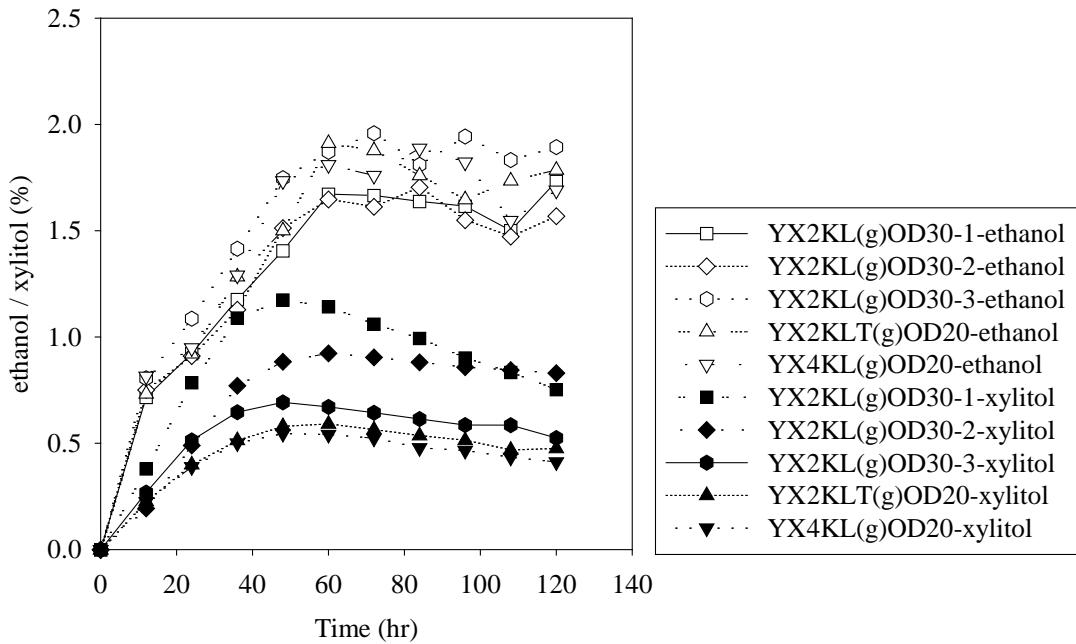
(A)

Glucose / Xylose Curve



(B)

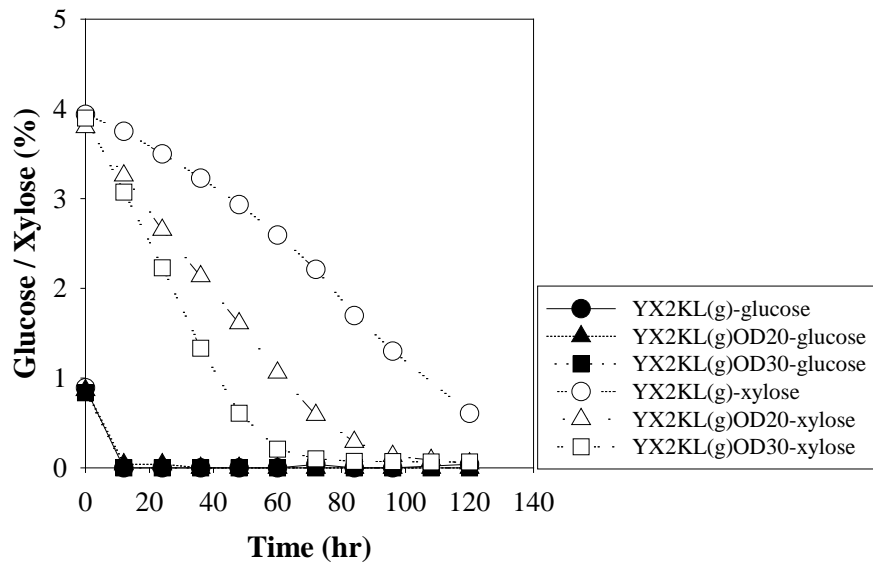
Ethanol / Xylitol Curve



(C)

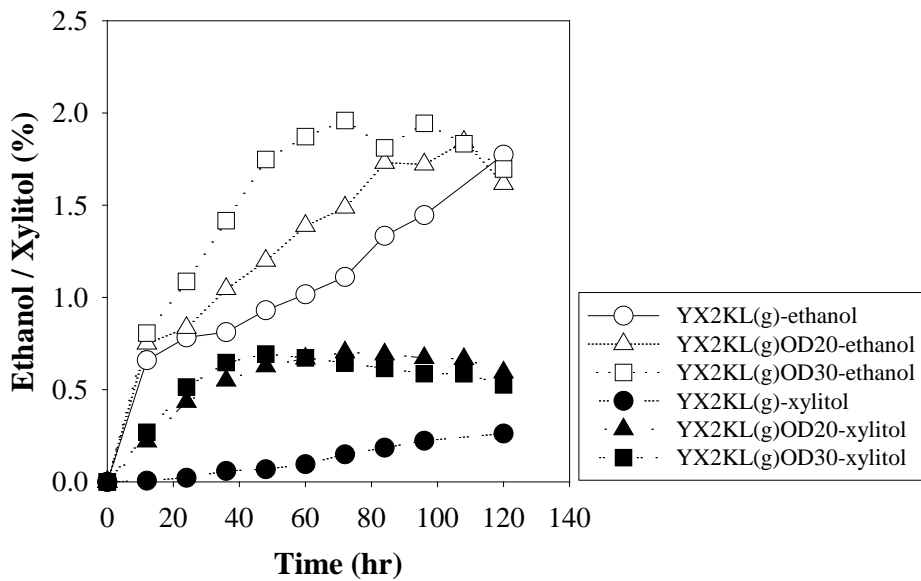
圖十九、(A) 重組菌株 YX2KL(g)OD30、YX2KLT(g)OD20 及 YX4KL(g)OD20 進行混合糖醱酵之生長曲線；(B) 重組菌株 YX2KL(g)OD30、YX2KLT(g)OD20 及 YX4KL(g)OD20 進行混合糖醱酵之葡萄糖及木糖消耗曲線；(C)重組菌株 YX2KL(g)OD30、YX2KLT(g)OD20 及 YX4KL(g)OD20 進行混合糖醱酵之酒精及木糖醇生成曲線。

Glucose & Xylose Curve



(A)

Ethanol & Xylitol Curve



(B)

圖二十、(A) 重組菌株 YX2KL(g)、YX2KL(g)OD20 及 YX2KL(g)OD30 進行混合糖醱酵之葡萄糖及木糖消耗曲線比較；
 (B)重組菌株 YX2KL(g)、YX2KL(g)OD20 及 YX2KL(g)OD30 進行混合糖醱酵之酒精及木糖醇生成曲線比較。