

逆境轉錄因子 *Msn2* 對 *Scheffersomyces stipitis* 木糖發酵乙醇之保護作用

翁丞姿 金佩瑜 徐嘉慧 李泰林* 張雲祥 黃尉東 劉淑瑛 游志文

大葉大學分子生物科技學系 彰化縣大村鄉學府路 168 號

*tailin@mail.dyu.edu.tw

摘要

More than 98% of energy consumed in Taiwan is imported. Energy research and development are urgent than ever. Taiwan is located at subtropic area and plant growth rate is high that is suitable to develop biomass energy. Biomass energy has some advantage; they are recyclable and also decrease CO₂ exhaust. One of biomass energy is ethanol. However, the 260 tones of rice straws, which are fermentable to produce ethanol, produced in Taiwan are wasted without further using it. Rice straw composes of cellulose and hemicellulose. The cellulose fermentation was well-studied while hemicellulose fermentation was less noticed. In nature, only few microorganisms can use hemicellulose as their carbon sources. *Scheffersomyces stipitis* has the ability to use one of the major components of hemicellulose, xylose, in straws as carbon source to ferment ethanol. However, when ethanol is accumulated in medium, it is toxic to the cell. The sensitivity to low concentration ethanol is the drawback of using this microorganism. By semi-quantitative RT-PCR analysis, *Msn 2*, a stress responsible factor, has increased 40 % in 3% ethanol. In this report, authors establish a fermentable transgenic *S. stipitis* by over-expression of the *s MSN2*, to increase cell surviving in ethanol fermentation. The experimental results showed that *S. stipitis* transformants had higher ethanol tolerance compared to wild-type and pGAPZ transformant.

關鍵字: 乙醇發酵, 木糖, *Msn2*, *Scheffersomyces stipitis*

一、前言

台灣本身不生產能源，98%能源仰賴國外進口。利用風力、太陽能等能源雖可解決部分問題，仍然不足汽車及冷氣成長需求。數年前歐美已經開始使用乙醇汽油，以解決日益減少的石油。此即在汽油內添加一定比例乙醇，以降低汽油銷耗及降低二氧化碳排放，產生很好效果。由於生產乙醇使用原料為甘蔗或玉米等經濟作物，造成市場糧食不足，因而嚴重影響物價。

台灣主要經濟作物為水稻，提供人民主食。水稻除了生產稻米外，每年生產 260 萬噸稻草（李，1997），農民常露天燒毀方式處理稻草，此舉往往造成空氣污染，燒毀產生之煙害，甚至影響交通安全。另外台灣亦每年生產 265 萬噸蔬菜（台南區農業改良場。網路資料），每年產值不穩定，經常生產過剩，造成農民很大損失。這類農作物殘枝，含有 46%纖維素、31%半纖維素及 18%木質素（麥桿為例，Nigam，2001）。纖維素經分解為葡萄糖可由啤酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）發酵產生乙醇。但是酵母菌無法利用半纖維素及木質素部份，因此需要其他菌種協助發酵。半纖維素主要成分為五碳糖木糖（xylose）（Nigam，2001），可由 *Scheffersomyces stipitis* 發酵產生乙醇。*S. stipitis* 菌株可產生木糖還原酶（xylose reductase）和木糖醇去氫酶（xylitol dehydrogenase）這兩種酵素，續將木糖還原為木糖醇，再使木糖醇氧化為木糖酮，最後利用木糖酮發酵產生酒精，除了上述之特點，樹幹畢赤酵母菌量旺盛且在副產物較少，因此認為樹幹畢赤酵母為最佳之木糖發酵菌種（Delgenes *et al.*, 1996）。

在釀酒過程產生之酒精對酵母產生傷害，此種環境改變對細胞生長造成影響被稱為逆境。而細胞為避免逆境傷害會啟動逆境轉錄因子，經由逆境轉錄因子調控，改變細胞基因表現或改變細胞生理而使細胞避免受到傷害。逆境轉錄因子 *Msn2* 與發酵過程產生之各種壓力像是熱休克（heat shock）、滲透壓（osmotic stress）、酒精（alcohol）、弱酸（weak acids）的適應有關（Nicholls *et al.*, 2004）。另外，大量表現 *Msn2* 在清酒酵母（sake yeast）中，已被證實可增加菌株對乙醇的耐受性以及提高清酒的產量（Watanabe *et al.*, 2009）。

已知 *S. stipitis* 每公升最多可以生產 33 克至 57 克之酒精，但是當酒精產量到達每公升有 30 克時，*S. stipitis* 之生長會開始受到限制，因此，對酒精耐受性不高，成為該菌種發酵酒精之一大弱點。木糖之發酵至今仍受制於菌種本身之特性，為了增加 *S. stipitis* 對酒精耐受性，並獲得較高酒精產量，作者將 *Msn2* 轉殖表現於 *S. stipitis* 菌株，我們觀察到 *Msn2* 轉殖表現株，可增加細胞對酒精耐受性。

二、結果

2.1、*S. stipitis* 之生長

為了瞭解 *S. stipitis* 在不同碳源生長情況，我們將細胞生長情形做成下列曲線。由生長曲線可知 *S. stipitis* 在葡萄糖培養液存在下有較快生長速度（圖一），在 18 小時即可達到生長頂端，而在木糖培養液則需要 72 小時才可達到最高點，且吸光值低於培養於葡萄糖培養液中，由此判斷 *S. stipitis* 在木糖環境下菌數較少。因此，未來利用 *S. stipitis* 發酵時，可用葡萄糖先培養一段時間，再將菌體移入木糖（半纖維）培養液，如此可縮短發酵時程，以降低生產成本。

2.2、厭氧條件下 *S. stipitis* 之乙醇耐受性

了解細菌生長情況後，由於酒精發酵是在厭氧下進行，因此在厭氧情況下進行耐受性測試。3%乙醇即抑制或延遲 *S. stipitis* 生長（圖二），尤其在以木糖培養基（YPX）更是明顯，抑制 80%生長速度；而葡萄糖培養基對細胞生存較好只有 20%生長受到抑制。此結果更進一步確認，在木糖發酵情況下，提高 *S.*

stipitis 乙醇耐受性之急迫性，將此問題解決後，可增加乙醇產量。

2.3、逆境轉錄因子 MSN2 與 MSN4 在酒精存在下之表現

當細胞遭受逆境時，細胞會啟動逆境轉錄因子，經由逆境轉錄因子調控細胞抗逆境基因表現，而避免細胞受到傷害。比較兩種逆境轉錄因子之表現（圖四），發現增加乙醇時 MSN2 及 MSN4 隨著顯著增加，其中 MSN2 隨著乙醇濃度增加而改變，但是 MSN4 顯示在 1%酒精存在下及達到最高表現量，而不受酒精濃度提高改變其表現量。也許提高 MSN2 或/及 MSN4，可提高菌對乙醇之耐受性，因而提高菌在發酵液之生存。在 2 至 3%酒精壓力下，MSN2 只增加 1.5 倍而 MSN4 增加 2.5 倍，因此，增加 MSN2 表現是否可提高酒精耐受性值得注意。相似結果在日本清酒發酵已經得到印證，Watanabe 等人將 MSN2 轉植入酒類酵母菌，結果不但增加細胞之酒精耐受性，同時提高乙醇產量（Watanabe 等人，2009）。此結果直得重視，因此，選擇 MSN2 進行構築。

2.4、MSN2 載體之構築及轉染分析

MSN2 構築於 pGAP 持續表現型表現載體(Invitrogen)，構築之表現載體以電破方式送入細胞，經篩選後抽取基因體 DNA 進行 PCR 以確認轉殖株成功將 MSN2（圖四 A），經証實之菌株以 RT-PCR 方式確認 MSN2 之表現（圖四 B、C），此兩株菌株可持續表現約含 2~3%之酒精情況下之 MSN2。

2.5、MSN2 表現與酒精耐受性

經証實可表現 MSN2 之菌株，以 Watanabe 等人描述法(Watanabe et al., 2009)進行酒精耐受性試驗（圖五）。細胞經三天培養後，所有測試菌株在培養液含 3%酒精以上皆呈現抑制情形，但 MSN2 轉殖株受到抑制較小。不含酒精對照組 OD 值達 1.0 至 1.2。而含 3%酒精時，pGAP 空白轉殖株降至 OD0.5，而兩株 MSN2 下降至 0.75 與 0.6。相同趨勢存在於 4%及 5%酒精培養液。在耐受性 6 天試驗中，不含酒精時菌株呈微量增生，但含酒精 3%時，細胞及成現下降趨勢。而兩株 MSN2 轉殖株都有較高吸光質，顯示 MSN2 轉殖株確實增加酒精耐受性。

三、結論

1. 雖然 *S. stipitis* 可利用木糖為其生長能源及碳源，但生長速度較只含葡萄糖培養基慢，因此可適度調整培養基成分，以獲得生長與生產酒精最適化生長條件。
2. 在 3%酒精存在下，細胞生長即受到抑制，此時反應壓力轉錄因子 MSN2 即 MSN4 可提高表現量。
3. 將 MSN2 轉殖入細胞後，可部分將低酒精對細胞傷害。

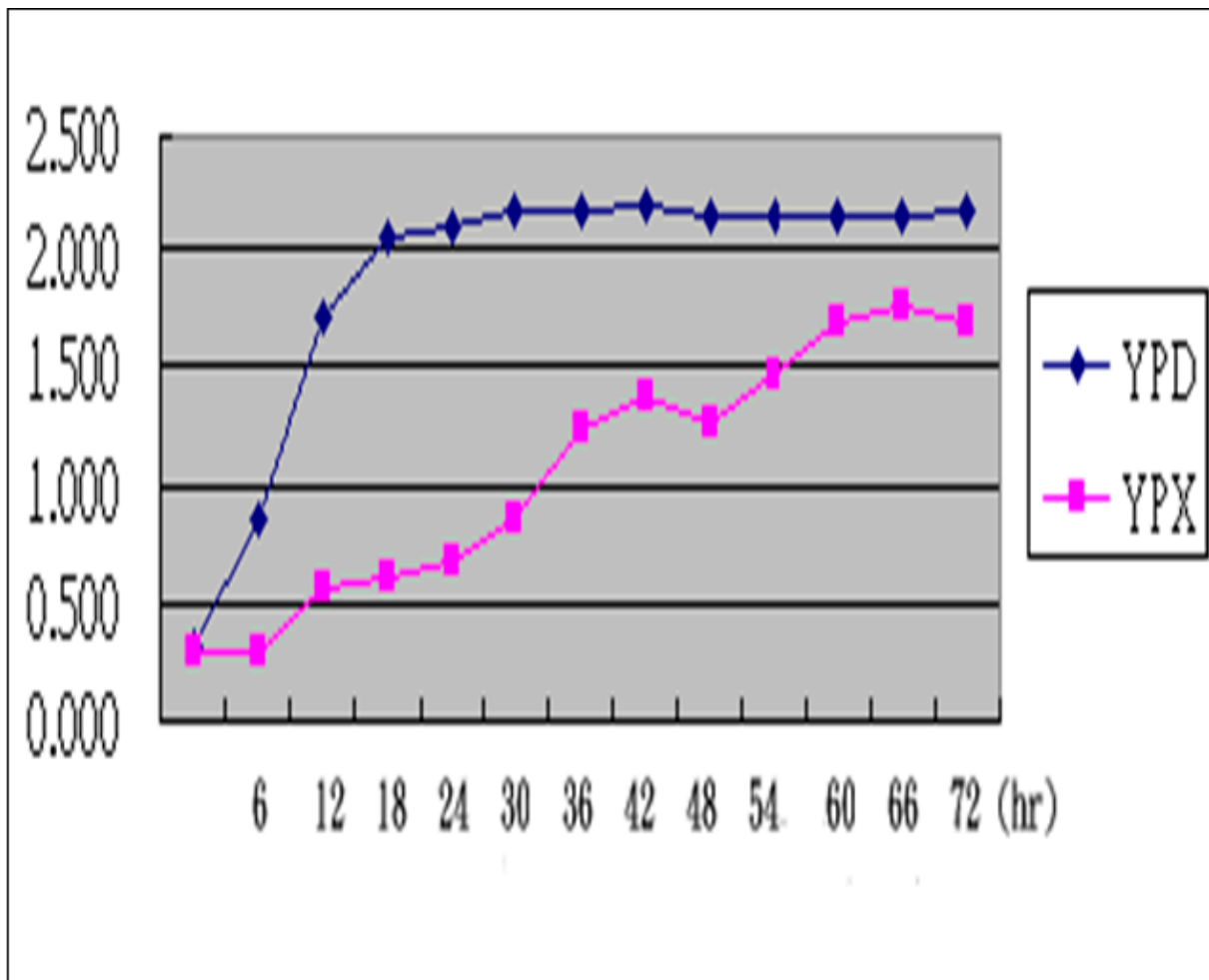
四、誌謝

本計畫獲國科會(98-2623-E-212-001-NU)及大葉大學校內計畫之持(ORD-10055)，特此致謝。

五、參考文獻

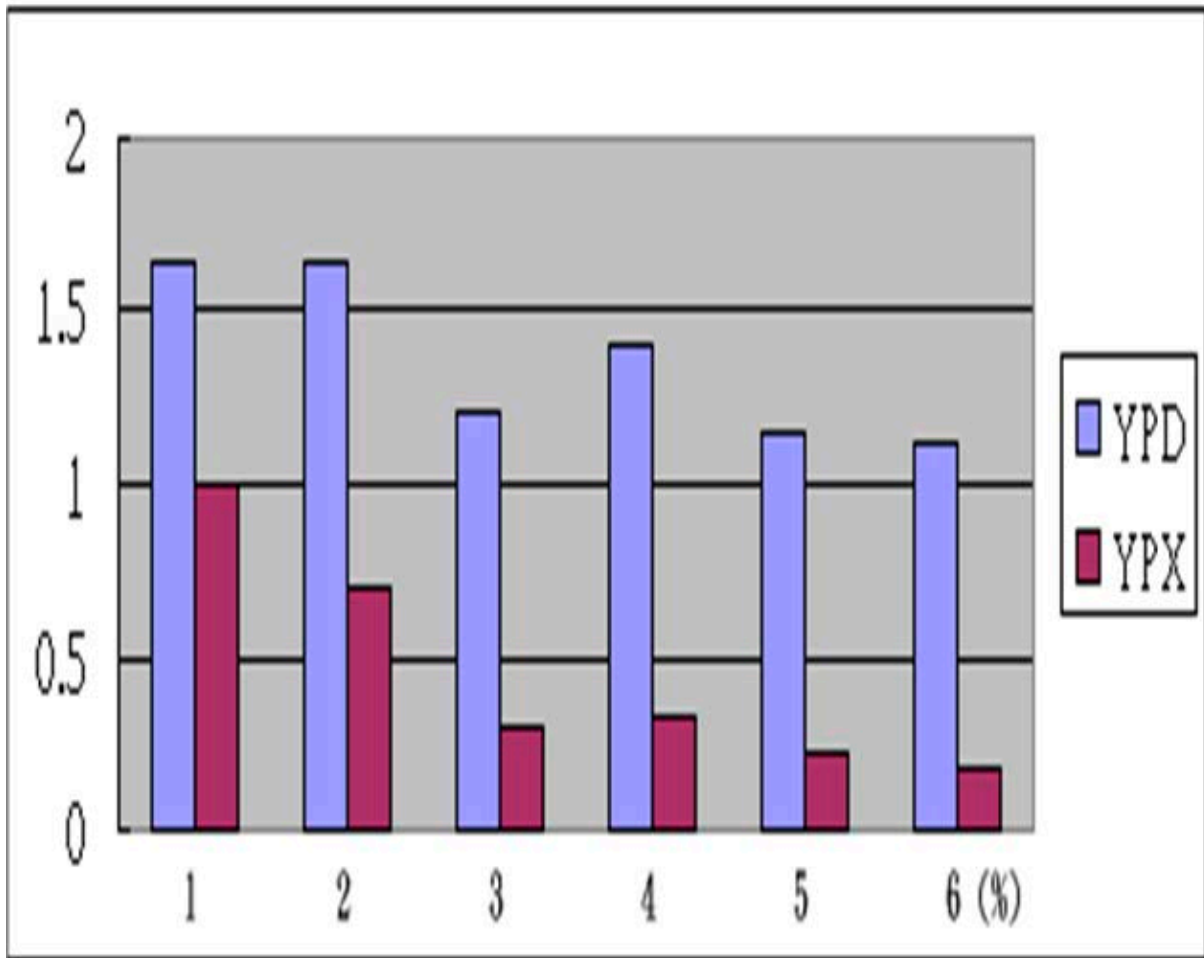
1. 李超運。1997。稻田收穫後稻草掩埋好處多。花蓮區農業改良場農技報導 33:1-3。

2. 台南區農業改良場。台灣蔬菜產業現況與展望。(<http://www.tndais.gov.tw>)
3. Delgenes J.P., Moletta R., and Navarro J.M. 1996. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*. *Enzyme and Microb. Technol.* 19: 220–225.
4. Nicholls, S., Straffon, M., Enjalbert, B., Nantel, A., Macaskill, S., Whiteway, M., Brown, A. J. 2004. Msn2- and Msn4-like transcription factors play no obvious roles in the stress responses of the fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*, 5: 1111-23.
5. Nigam, J.N. 2001. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis* . *J. Biotech.* 87 : 17–27.
6. Skoog K., Hahn-Hagerdal B., Degn H, Jacobsen J P., AND Jacobsen H S. 1992. Ethanol Reassimilation and Ethanol Tolerance in *Pichia stipitis* CBS 6054 as Studied by ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Appl. and Environ. Microbiol.* 58: 2552-2558.
7. Tsai, H. K., Lu, H. HS., Li, W. H. 2005. Statistical methods for identifying yeast cell cycle transcription factors. *PANS* 120, 13532–13537.
8. Watanabe M., Watanabe D., Akao T., and Shimoi H. 2009. Overexpression of MSN2 in a sake yeast strain promotes ethanol tolerance and increases ethanol production in sake brewing. *J. Biosci. Bioengin.* 107 : 516–518.



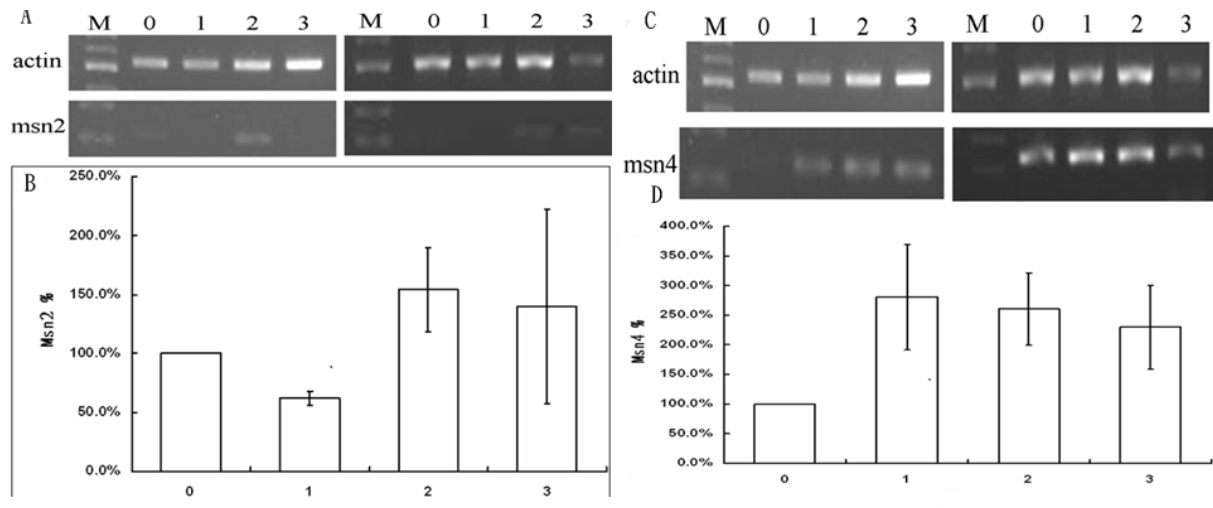
圖一、*S. stipitis* 在葡萄糖與木糖汁生長曲線

YPD培養基每公升含 10 克Yeast extract，20 克 Bacto peptone及 20 g Dextrose (glucose)而YPD則是以等量xylose取代YPD中之 Dextrose. 細胞於接種前一天培養至生長遲滯期，第二天將細胞以培養液稀釋為OD 0.2 後培養，不同時間測量細胞生長情形。



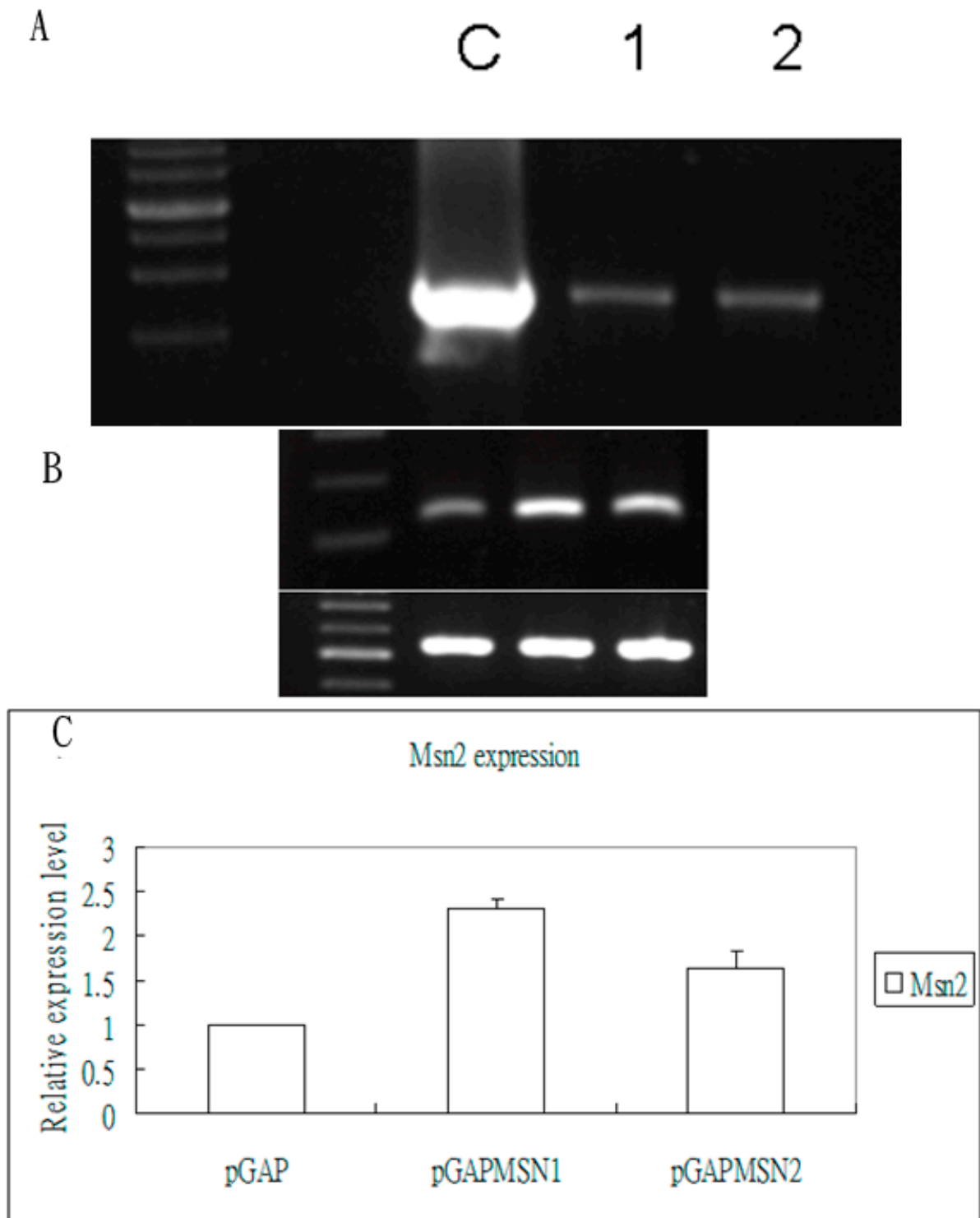
圖二 厭氧情況下，*S. stipitis* 之乙醇耐受性

細胞於接種前一天以YPD培養至生長遲滯期，第二天將細胞以培養液稀釋為OD 0.2 後，細胞移入含不同濃度酒精培養液之試管中，試管添加礦物油以隔絕空氣，細胞經培養 24 小時後測量其吸光值。



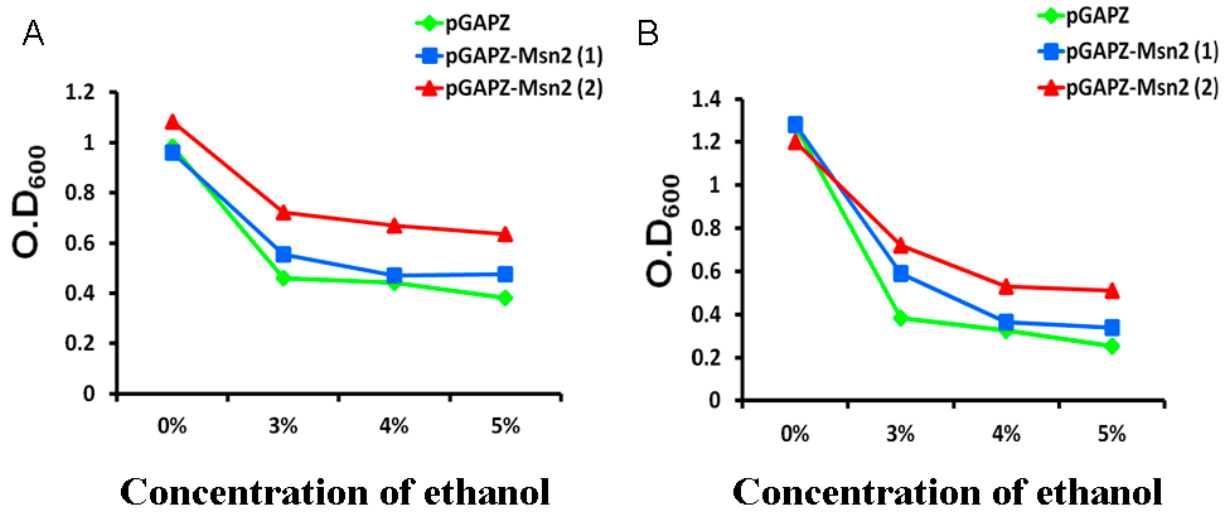
圖三、逆境轉錄因子 MSN2 與 MSN4 在酒經環境下之表現

細胞接種於含不同濃度之乙醇培養液，經 24 小時後，將細胞收集並以熱苯酚法萃取 RNA，以 RT-PCR 方式分析 MSN2 與 MSN4 表現量。以 Actin 為內控制基因。(A)及(C)為 RT-PCR 電泳圖；(B)及(D)將 A、C 電泳圖以 AlphaDigiDoc 程式積分，圖中差異線以標準差表示。



圖四、MSN2 基因在 MSN2 轉殖株之表現

將 MSN2 基因片段以 PCR 方式獲得，將基因片段構築於 pGAP 表現載體，0.5 經純化之質體以電破方式轉殖入細胞。經抗生素 Zeosin 篩選後抽取 DNA 及 RNA 以進行確認。(A) 將 100 ng DNA 以引子 PCR 確認 MSN2 基因嵌插入基因體 DNA。(B) RT-PCR 確認 MSN2 之表現電泳圖，(C) 以 Actin 為內標準，將 MSN2 表現進行半定量，以標準差顯示樣品間差異。



圖五、MSN2 對酒精耐受性之影響(A)3 天耐受性(B)7 天耐受性

經隔夜生長之細胞，將細胞希釋為 OD 1.0 後移入含不同酒精濃度之培養液內，將細胞置於 15°C 環境下靜置至分析時間，以觀察酒精耐受性。