

在 *GPD1* 中整合表达 *bgl II* 基因改善酒精发酵*

张 梁^{1,2} 洪剑辉² 章克昌^{1,2} 王正祥¹ 石贵阳^{1,2**}

(江南大学工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214036)¹

(江南大学生物工程学院生物资源研究室 无锡 214036)²

摘要: 依据同源重组的原理将来源于里氏木霉的 β -葡萄糖苷酶基因 *bgl II* 整合到工业酿酒酵母染色体上的 3-磷酸甘油脱氢酶基因 *GPD1* 中, 通过 G418 抗性筛选得到重组子。实验数据表明, 重组子 *Saccharomyces cerevisiae* CG1 利用纤维二糖的能力显著提高, 产甘油能力下降。引入外源基因后酵母性状与亲代相比没有显著差异, 但生长时具自絮凝能力。当 *S. cerevisiae* CG1 以玉米粉为原料进行浓醪酒精发酵, 与亲代工业酿酒酵母比较, 发酵液乙醇浓度得到提高, 甘油含量降低, 纤维二糖含量显著减少。

关键词: 纤维二糖, β -葡萄糖苷酶, 浓醪酒精发酵

中图分类号: Q50 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 04-0015-06

Improvement of Ethanol Fermentation by Expression of *Trichoderma reesei bgl II* Gene and Disruption of *GPD1* in *Saccharomyces cerevisiae**

ZHANG Liang^{1,2} HONG Jian-Hui² ZHANG Ke-Chang^{1,2}

WANG Zheng-Xiang¹ SHI Gui-Yang^{1,2**}

(Key Laboratory of Industry Biotechnology, Ministry of Education, Wuxi 214036)¹

(Lab of Biomass Resources, School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036)²

Abstract: Based on homologous recombination, β -glucosidase gene *bgl II* from *T. reesei* was integrated to the chromosomal DNA of industrial *Saccharomyces cerevisiae* and the key enzyme gene coding glycerol-3-phosphate dehydrogenase (*GPD1*) of the glycerol anabolic pathway was disrupted contemporaneously, and recombinants were screened through increasing G418 concentration. It was shown that cellobiose utility capability of recombinant *S. cerevisiae* CG1 was increased evidently, glycerol productivity was decreased, and the *bgl II* gene was expressed stabilized in the host cell. No impact on the cell character was appeared after introduced extrinsic gene, but the cells were flocculate when growing. When compared with parent industrial *S. cerevisiae* Y in very high gravity (VHG) ethanol fermentation from corn powder, ethanol productivity was increased, glycerol productivity was decreased, and the cellobiose in the broth was decreased obviously detected by HPLC analysis.

Key words: Cellobiose, β -glucosidase, VHG ethanol fermentation

酿酒酵母是以葡萄糖作为底物生物转化为酒精的最优秀微生物之一。随着酒精发酵工艺从稀醪发展到浓醪, 向更小的料水比方向发展, 甚至向固态回归, 以减少成本, 降低污染^[1], 酿酒酵母充分利用酒糟中的残糖(主要为非葡萄糖)对降低酒精工业成本和减轻酒精工业对环境的压力等具有重要意义。

以淀粉质为原料的浓醪酒精发酵工艺中, 纤维二糖是存在于酒糟中未能在发酵过程中被酿酒酵母有效利用的最主要的还原糖之一, 主要是由于淀粉质原料带入的皮壳

* 国家科技部“十五”攻关项目资助 (No. 2001BA501A01)

** 通讯作者 Tel: 0510-85815339, E-mail: gyshi@sytu.edu.cn

收稿日期: 2005-09-27, 修回日期: 2005-11-30

类物质经淀粉酶、糖化酶等所含的少量纤维素酶类部分降解而得。纤维二糖为两个葡萄糖分子经 β -1, 4 糖苷键链接而成的二糖, 已知 β -葡萄糖苷酶 (EC 3.2.1.21) 能水解纤维二糖中的 β -1, 4 糖苷键, 将其水解为两分子葡萄糖^[2], 从而能被常规工业酿酒酵母有效利用。

在前期的研究中, 我们确定了来源于纤维素酶生产菌株里氏木霉 (*T. reesei*) 的 β -葡萄糖苷酶基因 *bgl* II 能够赋予酿酒酵母 W303-1A 代谢纤维二糖能力^[3]。本文试图以酒精工业生产菌株为研究对象, 运用分子克隆等技术, 在减弱甘油生物合成的同时赋予酒精工业生产菌株的纤维二糖利用能力, 并以此研究对酒精生物合成及其相关代谢的影响。

1 材料与方法

1.1 菌种和质粒

酒精工业发酵酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) Y 为生物资源研究室保藏; 大肠杆菌宿主菌株 JM109、质粒 pSKsym Ω Km 由本研究室保藏; 重组质粒 pYX-BGL 由本研究室构建, 是以穿梭质粒 pYX212 为载体, 在其多克隆位点插入了里氏木霉的 β -葡萄糖苷酶基因 *bgl* II, 并已证明在实验酿酒酵母 *S. cerevisiae* W303-1A 中能够表达 β -葡萄糖苷酶活^[3]。

1.2 培养基、工具酶和试剂

1.2.1 培养基: LB 培养基: 胰蛋白胨 10g, 酵母提取物 5g, 氯化钠 10g, 定容至 1L, pH 7.0。需要时使用前加入 100 μ g/mL 氨苄青霉素和 50 μ g/mL 卡那霉素, 固体培养基添加 1.5% 琼脂。用于大肠杆菌培养。

YEPA 培养基: 胰蛋白胨 20g, 酵母提取物 10g, 葡萄糖 20g, 定容至 1L, pH 自然。固体培养基添加 1.5% 琼脂, 用于酵母菌培养。添加 200 μ g/mL G418 (Sigma) 用于重组子的筛选。

YNBC 培养基: 酵母氮基 (不含氨基酸) 6.7g, 纤维二糖 20g, 亮氨酸 0.12g, 色氨酸 0.12g, 组氨酸 0.12g, 腺嘌呤 0.12g, 定容至 1L。

1.2.2 工具酶和药品: 碱性磷酸酶 (CIAP)、T4 DNA 连接酶和限制性内切酶 *Hind*III 等为晶美生物工程公司产品; λ -EcoT14 I DNA marker、Pyrobest 酶购于宝 (TAKARA) 生物工程公司; 胶回收试剂盒为德国 QIAGEN 产品; PCR 产物纯化试剂盒为上海申能博彩生物技术公司产品; 纤维二糖为 Sigma 公司产品; 玉米 (脱胚去皮) 购于无锡市某农贸市场, 粉碎, 过 40 目筛, 淀粉含量 64.76%; 中温 α -淀粉酶 (2,000 u/mL) 购于无锡杰能科生物工程有限公司, 糖化酶 (100,000 u/mL) 购于无锡赛德生物工程有限公司; 其他试剂药品皆为国产或进口的分析纯。

1.3 *bgl* II 整合片段的制备及其鉴定

为了获得重组用 DNA 片段, 根据 pYX-212 载体序列, 在 *TPI* 启动子序列上游和多克隆位点下游设计引物, 并在上下游引物的 5' 端各引入长度为 54bp 的酿酒酵母 3-磷酸甘油脱氢酶 (GPD1) 基因片断 (引物的下划线部分)。序列为:

P1: 5'-AACTTAACTTCCGGCCACTTGAATGCTGGTAGAAAGAGAAGTTCCTCTTCTGTTAACGGGAGCGTAATGGTGATGGAA-3';

P2: 5'-TAATTCTTCAATCATGTCCGGCAGGTTCTTCATTGGGTAGTTGTTGTAACGAT

GAGATATCATGCGTAGTCAGGCAC-3'。

重组载体 pYX-BGL- Ω Km 为模板, PCR 扩增程序: 96℃ 5 min; 94℃ 25 s, 56℃ 1.5 min, 68℃ 5 min 进行 35 个循环后, 再 72℃ 延伸 10 min。

重组子 DNA 水平上的鉴定采用 PCR 法。以重组子染色体 DNA 为模板, 引物 P3: 5'-CCGGAATTCATGTTGCCCAAGGACTTTCAGTGGG-3' 和 P4: 5'-CCCTTCGAAATTTCCCCTTTGAAGAAGCATCAGG-3' 扩增长度约 1.5 kb 的 *bgl* II 基因片段。扩增程序为: 95℃ 5 min; 94℃ 1 min, 64.3℃ 1 min, 72℃ 1 min, 30 个循环; 再 72℃ 延伸 10 min。

1.4 酵母电转化程序

按文献 [4] 进行。

1.5 酵母染色体提取

按文献 [5] 进行。

1.6 酒精发酵工艺

原料按 1: 2 料水比拌料, 按浓醪酒精发酵工艺进行^[6]。

1.7 发酵液检测

培养液中纤维二糖、甘油含量测定用 HPLC 进行^[7]。发酵液中乙醇浓度采用蒸馏比重法测定^[8]。残总糖和残还原糖测定按 3, 5-二硝基水杨酸法进行^[9]。

1.8 酵母形态观察

酵母菌接种固体 YEPD 培养基, 30℃ 培养 20h, 将细胞洗下固定后, 扫描电镜观察。

2 结果

2.1 目的基因在工业酿酒酵母染色体上的整合

卡那基因是一种来自细菌的基因, 编码一种非活性酶 (氨基糖苷酸转移酶)。该基因在酵母中表达能使酵母对 G418 产生抗性, 研究中采用该抗性作为显性选择标记筛选重组子。

用限制性内切酶 *Hind*III 将卡那基因片断从质粒 pSKsym Ω Km 上切下, 胶回收, 获得 Ω Km 片段; 用相同限制性内切酶酶切并去磷酸化重组质粒 pYX-BGL。通过 T4 DNA 连接酶将 Ω Km 片段与 pYX-BGL 连接, 转化 *E. coli* JM109, 以 Amp^r-Kan^r 双抗 LB 平板筛选, 得到了重组载体 pYX-BGL- Ω Km。 Ω Km 片断插入在 *bgl* II 下游 (图 1, 2)。

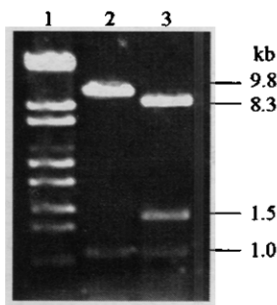


图 1 重组质粒 pYX-BGL:: Ω Km 酶切验证

1 λ DNA / *Eco*T14, 2 *Hind*III 酶切重组质粒,

3 *Eco*RI、*Hind*III 双酶切重组质粒

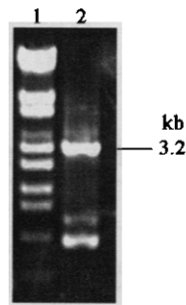


图 2 *gpd1*'::(*P_{TP1}*-*bgl* II - Ω Km) 的 PCR 结果

1 λ DNA / *Eco*T14, 2 PCR 产物

以重组载体 pYX-BGL-ΩKm 为模板, 通过 PCR 方法扩增得到 *GPD1:: (P_{TPI}-bgl II-Km)*。然后将纯化 *GPD1:: (P_{TPI}-bgl II-Km)* 扩增片段, 电击转化 *S. cerevisiae* Y, 以含 200 μg/mL G418 的 YEPD 平板筛选重组子。

2.2 重组子的验证

在含 G418 的选择性平板上生长出的菌落经划线分离获得单菌落后, 命名为 *S. cerevisiae* CG1, CG2, CG3 等。提取 *S. cerevisiae* CG1 的基因组 DNA 作为模板, 采用扩增 *bgl II* 的引物, 通过 PCR 方法进行扩增, 结果显示成功扩增得到 1.5kb 的 *bgl II* 目的条带 (图 3)。将 *S. cerevisiae* CG1 转接至 YNBC 培养基中, 30℃、200 r/min 培养 24h、48h, 以新鲜培养基为对照, 测定培养液的 OD₆₀₀, *S. cerevisiae* CG1 能够较快地利用纤维二糖生长 (图 4)。故以此重组菌进行进一步试验。

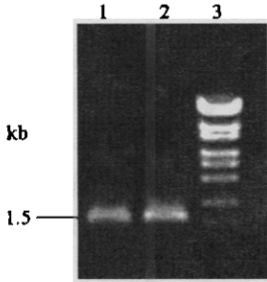


图 3 PCR 验证重组子

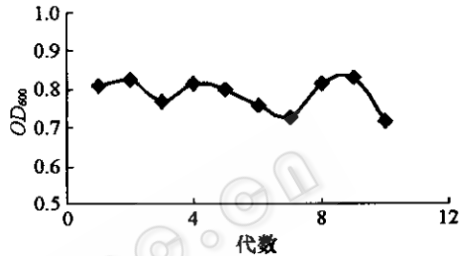


图 4 *S. cerevisiae* CG1 传代时利用纤维二糖能力

2.3 传代能力、增殖能力和酵母形态

S. cerevisiae CG1 转接在 YEPD 斜面上, 30℃ 培养, 每 24h 转接一次。斜面菌种分别转接 YNBC 培养基, 30℃、200 r/min 培养 48h, 测定 OD₆₀₀ 值, 考察对唯一碳源的利用能力, 实验结果表明, 经过 10 次转接后, CG1 在 YNBC 中的生长能力并未减弱。

S. cerevisiae CG1 和 *S. cerevisiae* Y 转接于 YEPD 培养基中, 30℃、200 r/min 振荡培养 2h 后, 静置培养至 24h, 酵母计数并观察形态。培养液中酵母计数结果显示, CG1 增殖能力并没有降低。

通过电镜观察, 在形态上, CG1 细胞的大小与亲株细胞之间无显著差异, 但 CG1 生长时的自絮凝现象十分明显, 这种现象值得作进一步研究。

2.4 发酵实验

2.4.1 摇瓶试验: 在 500 mL 三角瓶中, 称取 100 g 玉米粉为原料, 进行浓醪酒精发酵, 发酵液 10,000 r/min 离心, 取上清液进行各项测定。由实验结果 (表 1) 可得, 重组菌发酵性能有所改善, 醪液酒精度增加, 甘油含量减少, 纤维二糖含量显著减少, 残糖含量降低。

表 1 重组菌以玉米粉为原料浓醪酒精发酵的醪液成分分析

Items assayed	<i>S. cerevisiae</i> Y	<i>S. cerevisiae</i> CG1
Alcohol concentration (v/v, %)	14.64 (1.33)	15.39 (1.19)
Glycerol concentration (mg/L)	5560.78 (443)	5456.32 (367)
Cellobiose concentration (mg/L)	876.54 (46.2)	97.23 (16.5)
Rudimental sugars (mg/mL)	23.3 (1.32)	18.1 (1.43)
Rudimental reductive sugars (mg/mL)	4.0 (0.37)	1.9 (0.54)

注: 各检测项目数据为 3 批实验数据的平均值, 括号内数据为标准差 SD (N=3)

2.4.2 30L 发酵罐试验：在 30L 全自动发酵罐（镇江东方生工）中，加入 7 kg 玉米粉，按 1.6 工艺加水拌料、接种发酵，发酵过程中每 12 h 取样酵母计数、测定糖耗，发酵结束取醪液分析酒精度、甘油含量、纤维二糖含量、残糖等（图 5）。

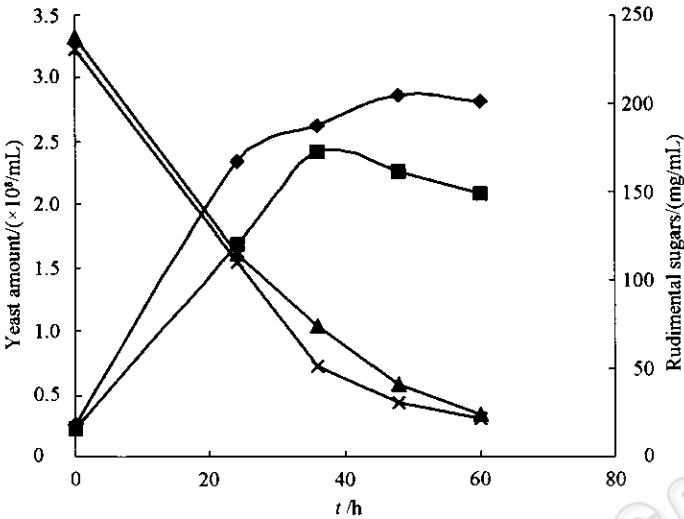


图 5 亲代和重组酵母 30L 发酵罐玉米浓醪酒精发酵状态比较
—◆— *S. cerevisiae* Y 酵母数，—■— *S. cerevisiae* CG1 酵母数，
—▲— *S. cerevisiae* Y 醪液残糖，—×— *S. cerevisiae* CG1 醪液残糖

由图 5 可得，重组酵母和亲代酵母的生长曲线相似，引入外源基因后，生长状态没有显著差异；重组酵母对基质的利用能力亦没有降低，由于被赋予纤维二糖利用能力，其醪液中残糖浓度较亲代有所降低。比较重组菌与亲代醪液组分（表 2），重组菌发酵性能得到改善，醪液酒精度增加，甘油含量减少，纤维二糖含量显著减少，残糖含量降低。表明，在工业酒精酵母染色体上引入纤维二糖酶基因并实现稳定表达，在酿酒酵母体内成功搭建一条新的纤维二糖代谢途径，能够有效利用原料中原先不能被亲代酵母利用的纤维二糖，改善酒精发酵性能。

表 2 *S. cerevisiae* CG1 30L 发酵罐玉米浓醪酒精发酵的醪液成分分析

Strains	<i>S. cerevisiae</i> Y	<i>S. cerevisiae</i> CG1
Alcohol concentration (v/v, %)	13. 81 (1. 21)	14. 26 (1. 69)
Glycerol concentration (mg/L)	8342 (308)	8296 (147)
Cellobiose concentration (mg/L)	1363 (121)	196 (34)
Rudimental sugars (mg/mL)	23. 5 (2. 1)	21. 8 (0. 48)
Rudimental reductive sugars (mg/mL)	5. 7 (0. 78)	4. 9 (0. 91)

3 讨论

本文选取纤维二糖为研究对象，利用基因敲除技术构建了一种新型酿酒酵母，在酵母染色体 DNA 上引入 β-葡萄糖苷酶基因并稳定表达，使其能够利用纤维二糖。同时，由于酵母在发酵糖产生酒精和甘油时都需进入 EMP 途径，产生 1 分子产物都需要 2 分子氢作为还原力^[10]。这样，在整合目的基因时，选择将酵母甘油途径关键酶基因 *GPD1* 敲除，使原先甘油支路的氢还原力为酒精生产所用，用于还原乙醛为乙醇的

NADH 相对增加, 而发酵过程中能量和还原力依然达到平衡, 但更多地流向酒精生产, 不产生新的副产物, 甘油副产物相对减少。

由实验结果可得, 通过实现 β -葡萄糖苷酶基因 *bgl* II 在酿酒酵母染色体上的整合并敲除甘油合成途径关键酶基因 *GPD1*, 得到的重组子 *S. cerevisiae* CG1 在 500 mL 三角瓶和 30 L 发酵罐规模利用玉米粉进行酒精浓醪发酵时, 甘油含量有所降低, 醪液酒精度得到提高, 酒糟清液中纤维二糖浓度显著降低, 说明在亲代酿酒酵母体内成功搭建了一条新的纤维二糖代谢途径, 将原先不能被工业酿酒酵母利用的纤维二糖大部分消耗, 甘油途径亦被部分阻断, 初步表明该实验思路是可行的, 对拓宽工业酒精酵母的基质利用范围, 有效利用其它糖组分有借鉴意义。

参 考 文 献

- [1] 章克昌. 中国工程科学, 2000, 2 (6): 89 ~ 93.
- [2] 姚卫蓉, 丁霄霖. 无锡轻工大学学报, 1997, 16 (3): 8 ~ 13.
- [3] 张 梁, 洪剑辉, 石贵阳, 等. 酿酒科技, 2005, 3: 30 ~ 33.
- [4] Becker D M, Guarente L. Methods Enzymol, 1991, 194: 182 ~ 187.
- [5] Adams A, Gottschling D E, Kaiser C A, *et al.* Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998.
- [6] 章克昌. 酒精与蒸馏酒工艺学. 北京: 中国轻工业出版社, 1995.
- [7] 张 梁, 陈 蕴, 丁重阳, 等. 食品与生物技术学报, 2005, 24 (2): 89 ~ 92.
- [8] 王福荣. 工业发酵分析. 北京: 中国轻工业出版社, 1980. 25 ~ 27.
- [9] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛主编. 生化实验方法和技术. 北京: 高等教育出版社, 1984. 9 ~ 11.
- [10] 陈 琚, 王正祥, 诸葛健. 无锡轻工大学学报, 1999, 18 (3): 1 ~ 6.