

絮凝选择载体的构建及 β -葡萄糖苷酶基因在酿酒酵母中的表达 Construction of Flocculation Selective Vector and Expression of β -glucosidase Gene in *Saccharomyces cerevisiae*

刘小琳, 贺 鹏, 卢大军, 沈 安, 江 宁*

LIU Xiao-Lin, HE Peng, LU Da-Jun, SHEN An and JIANG Ning*

中国科学院微生物研究所, 北京 100080

Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China

摘 要 从强絮凝酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) ABXL-1D 菌株中用 PCR 方法扩增到絮凝基因(Flocculation gene, *FLO1*), 构建以絮凝基因作选择标记的酿酒酵母表达载体。用该载体表达 *Bacillus polymyxa* 的 β -葡萄糖苷酶基因, 转化子可直接从沉淀中筛选。摇瓶培养细胞得到的 β -葡萄糖苷酶比活力为 3.91 u/mg 蛋白。在发酵葡萄糖和纤维二糖混合底物时, 转化子的葡萄糖残存量明显低于受体菌。这将有利于利用纤维素发酵生产酒精。

关键词 絮凝基因, 表达载体, β -葡萄糖苷酶基因, 酿酒酵母

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)01-0167-04

Abstract Selective markers used in yeast vector for gene manipulation were usually drug resistance or autotrophy. Unfortunately, drug resistance selective marker requires drug sensitive host and most industrial strains were not autotrophy. In this paper, flocculation gene (*FLO1*) from *Saccharomyces cerevisiae* ABXL-1D was amplified by PCR, sequenced and cloned to construct an expression vector. The new vector was easy to manipulate and suitable for broad host of yeasts without either autotrophy or drugs. β -glucosidase gene from *Bacillus polymyxa* was cloned with the vector and expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. The specific activity of β -glucosidase of the recombinant yeast cell-free extract was 3.91 u/mg protein. The residue glucose of the recombinant yeast was considerably reduced in mixed fermentation of glucose and cellobiose. It should be favorable for ethanol fermentation when utilize lignocellulosic biomass as raw material.

Key words flocculation gene, expression vector, β -glucosidase gene, *Saccharomyces cerevisiae*

酵母表达载体一般以药物抗性或营养缺陷型作为选择标记, 但这类标记也存在一些问题。抗药性基因的引入可能会出现食品安全等问题, 并且许多酵母菌本身有一定的药物抗性, 也会给实际应用带来困难; 而大多数工业菌株是原养型, 为获得营养缺陷型进行诱变容易使原有性状发生改变。因此, 有必要发展新的选择性标记。

酵母细胞之间可逆的凝集成絮状物的过程被称为酵母

絮凝。科学家已研究发现多个与酵母细胞絮凝相关的显性基因^[1,2,3]和隐性基因^[4,5]。*FLO1* 是迄今为止研究最为详尽的一个。1994 年, Junji 等人报道了完整的 *FLO1* 全序列。它包含一个 4611 的 ORF, 编码一个包含 1537 个氨基酸的蛋白质产物^[6]。因为絮凝有使细胞分离的特性, 有可能用作选择性标记。此外, 利用发酵性能优良并具有强絮凝能力的菌株与细胞固定化技术相结合, 实现酒精连续发酵的研究受到越

Received: June 9, 2004; Accepted: July 12, 2004

This work was supported by CAS Innovation Program (No. KDCX2-SW-206-1).

* Corresponding author. Tel: 86-10-62553081; E-mail: jiangn@sun.im.ac.cn

中国科学院知识创新工程重要方向项目资助 (No. KDCX2-SW-206-1).

来越多学者的重视^[7,8]。

我们以絮凝基因 *FLO1* 为选择性标记构建酵母表达载体,利用该载体克隆并表达了 β -葡萄糖苷酶(EC3.2.1.21)基因。 β -葡萄糖苷酶是纤维素酶中的一个限速酶,催化纤维二糖分解为葡萄糖的反应。在以纤维素降解物为原料发酵产酒精时,由于纤维二糖的存在对酒精发酵有抑制作用,因此提高 β -葡萄糖苷酶的活力不仅可提高纤维素的利用率,并能提高酒精的产率^[9],有较好的应用前景。实验结果表明,该

载体在使用过程中,对宿主与培养基均无特殊要求,适应性强,可以普遍应用。无须平板划线,添加其他营养素等步骤,直接在液体培养基中目测即可。操作十分方便。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:所用菌株和质粒见表1。 β -葡萄糖苷酶基因由本所董志扬博士提供。

表 1 菌株和质粒
Table 1 Strains and plasmids

Strains and plasmids	Characteristics	Source
<i>E. coli</i> DH5 α	amp ^r	Stored in this lab
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ABXL-1D	wild type	Stored in this lab
<i>Saccharomyces cerevisia</i> EF-326	wild type	Stored in this lab
Plasmid pMD18-T	T-vector, 2.7kb amp ^r , <i>lacZ</i>	Purchased from TAKARO Co.
Plasmid pRUL129	amp ^r <i>URA3</i> , <i>SFA1</i>	Stored in this lab ^[10]
Plasmid pVgb-EX2	amp ^r <i>SFA1</i>	Stored in this lab
Plasmid pTF-1	amp ^r	this work
Plasmid pRUF-1	amp ^r <i>SFA1</i>	this work
Plasmid pFE-1	amp ^r <i>SFA1 FLO1</i>	this work
Plasmid pEFA-1	amp ^r <i>FLO1</i>	this work
Plasmid pBglA-T	amp ^r <i>lacZ</i>	provided by Dr. Dong

1.1.2 培养基和培养条件:LB 培养基(每升含 yeast extract 5g, peptone10g, NaCl 10g, 调 pH 值至 7.0)用于培养大肠杆菌, 37℃, 液体培养时 200r/min。YPD(每升含 yeast extract 10g, peptone 20g, glucose 20g, 调 pH 至 5.5)用于培养酵母菌,30℃, 液体培养时 200r/min。

1.1.3 试剂和仪器:所有限制性内切酶, DNA 连接酶等分子生物学试剂均购自 TaKaRa(大连宝生物)公司;生化药品为进口或国产分析纯试剂;质粒提取试剂盒购自上海申能博彩生物工程公司,按其说明书操作。基因扩增仪及离心机为德国 Eppendorf 公司产品。基因电转仪为 Beakon 2000 advanced gene transfersystem。

1.2 方法

1.2.1 DNA 操作:大肠杆菌 DNA 操作参照文献[11], 酵母 DAN 操作和转化参照文献[12,13]。

1.2.2 基因扩增:

(1)PCR 引物:根据序列同源性,参照已报道的酿酒酵母的基因序列^[6],设计出以下特异引物。

上游引物:5'AGT CTA GAT GTA AGC TCT CTT CCG G3'设计酶切位点为 *Xba* I。

下游引物:5'CTC TCG AGC AAT AAG GAC GCA ATG 3'设计酶切位点为 *Xho* I。

(2)扩增条件(用 TaKaRa La Taq DNA 聚合酶)94℃,40s, 50℃, 60s,72℃,240s,30 个循环。

1.2.3 DNA 序列测定:由中国科学院微生物研究所技术中心完成。引物设计用 PRIMER PRIMER 5.0 软件。DNA 序列分析采用 DANMAN4.0。

1.2.4 酵母细胞絮凝的测定:

(1)目测法:将待测菌接种于装有 3mL YPD 液体培养基的试管中, 30℃ 静置培养 48h 后,剧烈振荡 2min, 室温静置, 观察絮状沉淀的产生。

(2)分光光度法:取 48h 培养物离心收集菌体,用 250mmol/L EDTA 溶液及无菌水各洗 2 次,离心收集菌体,并悬浮于絮凝缓冲液中,立刻在 600nm 处测 OD 值;然后将细胞悬浮至三角瓶中,120r/min,25℃轻摇 2h 至絮凝完成。静置 1min 后取上清,600nm 测 OD 值。振荡处理后测定的 OD 值与处理前 OD 值的比值乘以 100% 表示絮凝水平(即自由细胞浓度)。

1.2.5 β -葡萄糖苷酶活力的测定:参照文献[14],酶的活力单位定义为每分钟产生 1 μ mol pNP 的酶量,蛋白质含量用 Bradford 方法^[12]测定。

1.2.6 葡萄糖浓度的测定:利用 SBA-40C 生物传感仪(山东省微生物研究所)测定。

1.2.7 质粒构建:用限制酶和 T4 DNA 连接酶对目的 DNA 片段进行操作。具体过程如图 1 所示。

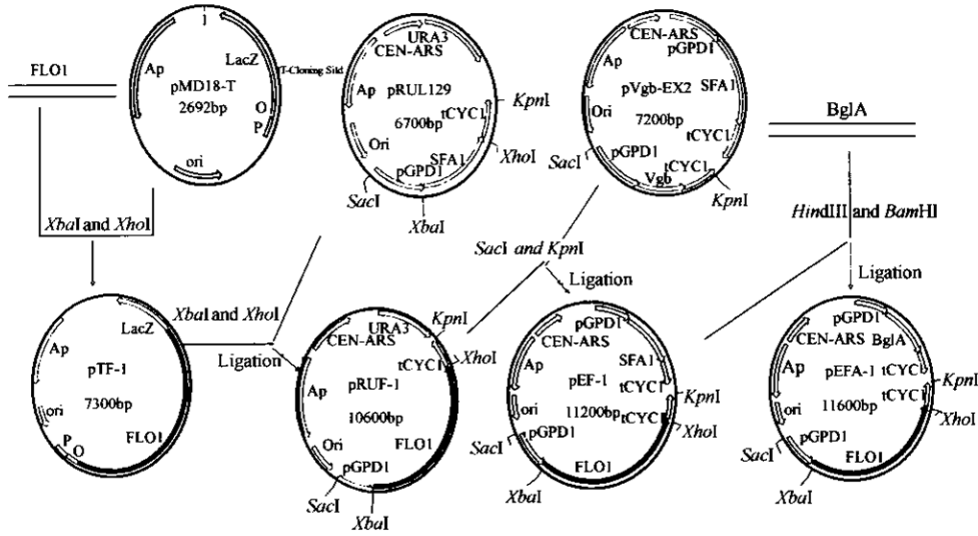


图 1 质粒的构建过程

Fig. 1 Strategy of plasmid construction

2 结果和讨论

2.1 FLO1 基因的 PCR 扩增以及重组质粒的鉴定

以 *Saccharomyces cerevisiae* ABXL-1D 菌株染色体 DNA 为模板,用上述引物进行 PCR 扩增,得到 4.6kb 的 DNA 片段。PCR 产物测序,结果与文献报道有一个碱基的差异,同源性达到 99.39%。出现这种细微差异的原因可能是 PCR 扩增过程中的错配或模板本身存在突变。但氨基酸没有变化。将其与 pMD18-T VECTOR 相连,转化 *E. Coli* DH5α, 挑取转化子点到涂有 IPTG 和 X-GAL 的平板上。挑取白色菌落,提取质粒,以 *Xba* I 和 *Xho* I 进行双酶切,琼脂糖电泳得到 4.6kb 和 2.7kb 两条片段,分别对应于载体(2.7kb)和外源基因(4.6kb)。重组质粒命名为 pTF-1。

2.2 絮凝选择表达载体的构建及酵母转化

pRUL129 和 pTF-1 分别用 *Xba* I 和 *Xho* I 双酶切,分别回收较大片段,连接后得到质粒 pRUF-1。

用 *Sac* I 和 *Kpn* I 分别双酶切 pRUF-1 和 pVgb-EX2,分别回收较大片段,连接后得到质粒 pEF-1。*Sac* I 和 *Kpn* I 酶切 pEF-1 及以 pEF-1 为模板进行 PCR 验证。

将质粒 pEF-1 转入不具絮凝现象的 *Saccharomyces cerevisia* EF-326 中后,在 YPD 培养基中加入 Ca^{2+} 至终浓度 0.2mol/L,培养 20h 后,取出静置 30min,轻轻倒出上清液,沉淀下来的细胞继续用 YPD 加 Ca^{2+} 静置培养。20h 后取出,剧烈振荡 1min,静置观察结果。目测即可见转化子产生明显絮凝现象。如图 2 所示。用分光光度法测定絮凝水平值,供体菌,转化子和受体菌的自由细胞浓度分别为 2.7%、39.3% 和 99.9%。这也表明转化子具备了较强的絮凝能力。但与供体菌相比,其絮凝能力仍然较弱,可能的原因是供体菌的絮凝不仅仅是由 *FLO1* 一个基因引起,供体菌中还可能存在其他与絮凝能力有关的基因。

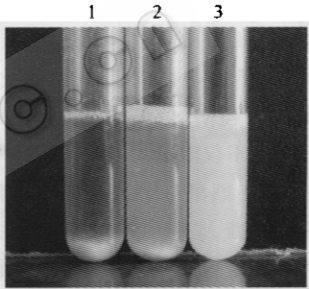


图 2 絮凝性状的比较

Fig. 2 The comparison of flocculation

1: *Saccharomyces cerevisiae* ABXL-1D;

2: transformant; 3: *Saccharomyces cerevisia* EF-326

提取转化子中的质粒,经 *Sac* I 和 *Kpn* I 双酶切后,所得结果与 *Sac* I 和 *Kpn* I 双酶切 pEF-1 相同。表明转化子絮凝确是因为重组质粒 pEF-1 的转入而引起的。

pEF-1 带有的甲醛抗性基因(*SFA1*),也可用作选择标记,但要求宿主对甲醛敏感。因此,在实际应用上,利用絮凝现象作选择标记具有普遍性,*SFA1* 只用作报道基因,也可将其切除后连上其他需要表达的基因,仍可用絮凝进行选择。

2.3 质粒 pEF-1 的稳定性

通过图 1 可以看出, pEF-1 由 pRUL129 衍生而来。pRUL129 属于 YCP 类质粒,在细胞中拷贝数虽较少,但稳定性较好。将转化子在无选择压力的培养基连续培养 5 次,每次 16h,仍具有明显絮凝现象。表明 pEF-1 在细胞中是比较稳定的。

2.4 利用 pEF-1 在酵母中表达 β-葡萄糖苷酶基因及发酵试验

将 β-葡萄糖苷酶基因插入 pEF-1 中(见图 1, pEFA-1),转入酵母细胞后,100r/min 轻摇培养 20h,室温稍稍放置,轻轻倒出上清,沉淀在摇瓶底部的细胞即为转化子。取转化子测得

β -葡萄糖苷酶的比活力为 3.91u/mg 蛋白, 宿主细胞中未检出 β -葡萄糖苷酶的活力。

在 YP 培养基(1% 酵母提取物, 2% 胰蛋白胨)中分别加入 9% 葡萄糖和 9% 葡萄糖, 1% 纤维二糖, 在 30℃ 发酵 72h, 其葡萄糖残存量如表 2 所示。

表 2 宿主菌和转化子发酵后葡萄糖残存量(g/L)的比较

Table 2 The residue glucose(g/L) after fermentation

	Glucose	Glucose and cellobiose
Host	6.64	11.21
Transformant	6.65	6.93

可以看出, 在宿主菌中加入纤维二糖后, 葡萄糖的残存量明显增加。而在转化子中, 葡萄糖的残存量大致相同。由此推断提高 β -葡萄糖苷酶的活性有利于解除纤维二糖对葡萄糖的抑制作用。这对于利用纤维素发酵生产酒精是有意

义的。纤维素是地球上最丰富的可再生资源。在利用纤维素用酶法降解发酵产酒精时, 由于 β -葡萄糖苷酶的活力一般比内切 β -葡聚糖苷酶(EC3.2.1.4)和纤维二糖水解酶(EC3.2.1.91)的活力低一个数量级以上, 因此 β -葡萄糖苷酶成为纤维素降解的限速酶, 使降解产物中含有大量纤维二糖。纤维二糖的存在不仅降低了原料的利用率, 而且还抑制酒精发酵。因此, 在酿酒酵母中高效表达 β -葡萄糖苷酶, 将纤维二糖分解为葡萄糖, 是利用纤维素用酶法降解发酵产酒精时提高酒精产量的有效方法^[9]。另外, 絮凝基因的引入与常规的各种载体固定化细胞技术相比, 具有简单, 无辅助材料附加费用, 对细胞无毒副作用, 反应器内细胞浓度高, 抗污染能力高, 酒精产量高等突出优点。这对酵母发酵产酒精展示了更为现实的工业化前景。

REFERENCES(参考文献)

[1] Russell L, Stewart GG, Reader HP *et al.* Revised nomenclature of genes that control yeast flocculation. *J Inst Brew*, 1980, **86**:120 - 121, III

[2] Yamashita I, Fukui S. Mating signal control expression of both starch fermentation genes and a novel flocculation gene FLO8 in the yeast *Saccharomyces*. *Agric Biol Chem*, 1983, **47**:2889 - 2896

[3] Jeffery AH, David RB, Johnson JR. Discrimination by heat and proteinase treatment between flocculent phenotypes conferred on *Saccharomyces cerevisiae* by the gene *FLO1* and *FLO5*. *J Gen Microbiol*, 1985, **131**:3219 - 3227

[4] Holmberg, Kiell, Brandt MC. A mutant of *Saccharomyces cerevisiae* temperature sensitive for flocculation. Influence of oxygen and respiratory deficiency on flocculence. *Carlsberg Res Commun*, 1978, **43**: 37 - 47

[5] Hinrichs J, Stahl U, Esser K. Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae* and mitochondrial structure. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1988, **29**:48 - 54

[6] Junji W, Yosnihiro T, Mahiro O *et al.* Molecular cloning and analysis of the yeast flocculation gene *FLO1*. *Yeast*, 1994, **10**:211 - 225

[7] Ishida FK, Shingo G, Hiroki S *et al.* Breeding of flocculent industrial alcohol yeast strains by self-cloning of the flocculation gene *FLO1* and repeated-batch fermentation by transformants. *J Gen Appl Microbiol*, 1998, **44**(5):347 - 353

[8] Guo WJ(郭文洁), He XP(何秀萍), Tie CJ(铁翠娟) *et al.* Cloning of flocculent gene and expression in industrial yeast strain. *Acta Microbiologica Sinica*(微生物学报), 2002, **42**(1):110 - 113

[9] Rajoka MI, Farhana S, Ghauri MT *et al.* Kinetics of β -glucosidase production by *Saccharomyces cerevisiae* recombinants harboring heterologous *bgl* genes. *Biotechnol Lett*, 2003, **25**:945 - 948

[10] Marco A, Van DB, Steensma HY. Expression cassettes for formaldehyde and fluoroacetate resistance, two dominant markers in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 1997, **13**:551 - 559

[11] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T *et al.* Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2nd, ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

[12] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE *et al.* Short protocols in molecular biology, 3rd ed. Inc., 1995

[13] Adams A, Gottschling DE, Kaiser CA *et al.* Methods in yeast genetics: A cold spring harbor laboratory course manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998

[14] Hernandez LF, Espinosa JC, Hernandez-Gonzalez F *et al.* β -glucosidase activity in a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. *Inter J Food Microbiol*, 2003, **80**:171 - 176