

扣囊复膜孢酵母 *BGL1* 基因在工业酒精酵母中的整合表达

张 梁 周 衍 石贵阳*

(1. 江南大学生物工程学院 无锡 214122)

(2. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214122)

摘 要: 构建了含有工业酿酒酵母自身 *GPD2* 启动子和终止子、扣囊复膜孢酵母 β -葡萄糖苷酶基因(*BGL1*)和潮霉素选择性标记 *hyg* 的重组质粒 pPIC-gpd-bgl-hyg, 通过酵母染色体同源重组, 将 *BGL1* 基因整合进入工业酒精酵母的染色体上。重组酵母可以在以纤维二糖为唯一碳源的培养基上生长, 48 h 时 β -葡萄糖苷酶酶活达到 0.764 U/mL。在玉米浓醪酒精发酵实验中, 与宿主菌株相比, 重组酵母醪液中纤维二糖含量减少约 80%, 达到了消耗醪液中纤维二糖含量的目的。

关键词: 工业酒精酵母, β -葡萄糖苷酶, 同源重组, 潮霉素 B

Integration and Expression of *BGL1* Gene from *Saccharomycopsis fibuligera* in Industrial *Saccharomyces cerevisiae*

ZHANG Liang ZHOU Yan SHI Gui-Yang*

(1. Institute of Biomass Refinery & Processing, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122)

(2. The Key Laboratory of Industry Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122)

Abstract: The recombinant plasmid pPIC-gpd-bgl-hyg was constructed, which contained *GPD2* promotor and terminator from industrial yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, β -glucosidase gene (*BGL1*) from *Saccharomycopsis fibuligera* and *hyg* from hygromycin as the selected marker. With the yeast's high efficiency of homologous integrated, the *BGL1* gene was successfully integrated into industrial yeasts *S. cerevisiae*. The recombined yeast could grow on the cultures with the cellobiose as a sole carbon source, and the β -glucosidase activity achieved 0.764 U/mL after 48 hours' cultivation. In the experiments of VHG ethanol fermentation, the cellobiose concentration in broth of recombined yeast was 80% lower than that of industrial yeast.

Keywords: Industrial yeast, β -glucosidase, Homologous integrated, Hygromycin B

随着石油危机的爆发, 世界各国对于研究开发燃料乙醇来代替日益枯竭的石油资源投入极大的人力物力。提高酒精产量, 降低生产成本, 对于燃料酒

精的生产是至关重要的^[1], 因此学者们纷纷寄希望于基因工程技术, 通过改变、扩展酵母的代谢流、代谢途径来实现^[2]。

淀粉质原料浓醪酒精发酵工艺中, 纤维二糖是存在于酒糟中未能被酿酒酵母有效利用的最主要的二糖之一(张梁: 基质利用和酒精发酵性能改善的重组酿酒酵母, 江南大学博士论文, 2005), 而纤维二糖的有效分解需要 α -葡萄糖苷酶。在酵母的代谢途径中引入 α -葡萄糖苷酶, 一方面将纤维二糖分解成葡萄糖, 进一步为酵母利用发酵, 可提高原料利用率, 另一方面有利于醪液中残糖的分解, 减轻后续处理和对环境的压力。

同源重组是外源目的基因在酿酒酵母中稳定表达的一个有效手段。酿酒酵母一直都被认为是研究同源重组的模式生物, 具有高效同源重组性。一些系统性实验研究表明, 酵母中长为 15 bp 同源区段就有可能取得重组; 当同源区段为 30 bp 长时, 有效同源重组的频率可以接近 80%^[3]。

本研究室计划通过基因工程手段, 利用酵母高效的同源重组, 将外源目的基因整合进入工业酵母染色体上, 赋予工业酿酒酵母稳定表达 β -葡萄糖苷酶的能力, 这对于提高原料利用和减轻环境压力具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒: 工业酒精酵母 Y (*Saccharomyces cerevisiae* Y)、大肠杆菌宿主菌株(*Escherichia coli* JM109)、pRS41H 质粒(含有潮霉素 B 选择性标记 *phpNT1*)、pPIC 质粒等为生物资源研究室保藏; 扣囊复膜孢酵母(*Saccharomycopsis fibuligera*) 购于中国普通微生物菌种保藏中心(CGMCC); 其他质粒均在实验中进行构建。

1.1.2 培养基: LB 培养基: 胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, 氯化钠 10 g, 定容至 1 L, pH 7.0。用于大

肠杆菌培养, 固体培养基添加 1.5% 琼脂; 筛选转化子时, 加入 100 μ g/mL 氨苄青霉素。

YEPD 培养基: 胰蛋白胨 20 g, 酵母提取物 10 g, 葡萄糖 20 g, 定容至 1 L。固体培养基添加 1.5% 琼脂, 用于工业酿酒酵母培养; 添加一定浓度潮霉素 B(hygromycin B)用于重组子筛选。

YEPC 培养基: 胰蛋白胨 20 g, 酵母提取物 10 g, 纤维二糖 20 g, 定容至 1 L。用于重组工业酿酒酵母培养。

扣囊复膜孢酵母生长培养基: 12° 麦芽汁, 固体培养基添加 1.5% 琼脂。

1.1.3 工具酶和药品: 碱性磷酸酶 (CIAP)、T4 DNA 连接酶和限制性内切酶, 潮霉素 B 等为晶美生物工程有限公司产品; λ DNA /Eco130 (Sty⁻) Marker、Taq 酶和引物合成来源于上海生工生物工程公司; Ex-Taq 酶购于宝生物工程公司(TaKaRa); Tris 平衡酚、RNase 购于上海华美生物工程有限公司; Oligoex KIT、ONE-STEP RT-PCR KIT、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有限公司产品; 纤维二糖、对硝基酚- β -D-吡喃葡萄糖苷购于 Sigma 公司, 其他试剂药品皆为国产或进口的分析纯和生化试剂。

1.2 方法

1.2.1 常规基因克隆操作方法: 大肠杆菌感受态制备、外源基因片段与载体连接、简易转化操作、大肠杆菌质粒快速提取、酵母基因组 DNA 制备等操作参见《分子克隆实验指南》^[4]。

1.2.2 质粒构建: 提取扣囊复膜孢酵母染色体作为模板, 用引物 5、6 进行 PCR 扩增, 得到 *BGL1* 基因。扩增条件: 95℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s,

表 1 实验中使用的引物
Table 1 Primers in this study

序号 No.	引物 Primer	酶切位点 Digestion site	作用 Function
1	TAAGGATCCATGTAATAAGCAAACAAGCACGAATG	<i>Bam</i> HI	以工业酿酒酵母染色体为模板, 扩增 <i>GPD2</i>
2	TTAGGATCCTCGTCAACTTCTCTGCATGTGATTAT	<i>Bam</i> HI	
3	ATAATTACCGGAATTCTGATAAGGAAGGGGAGCG	<i>Eco</i> RI	反向 PCR, 扩增酵母 <i>GPD2</i> 启动子和终止子
4	ATACCATGGAGGCCTAGACCTTACTTCCACGTCAA	<i>Nco</i> I	
5	CCGGAATTTCATGTTGATGATAGTACAGCTT TTGG	<i>Eco</i> RI	以扣囊复膜孢酵母染色体为模板, 扩增 <i>BGL1</i>
6	ATGCCATGGGGAATAAATCAACGTCATAGTA AATC	<i>Nco</i> I	
7	GGGACATTTTGATGGCCGCACGG		以 pRS41H 质粒为模板, 扩增 <i>hyg</i>
8	GGGAACCTCCTTCCTTTTCGGTTAGAGCG		

45℃复性 1 min, 72℃延伸 3 min, 进行 30 个循环; 72℃延伸 10 min。

选用工业酿酒酵母 *GPD2* 基因的启动子及其终止子, 在引入启动子的同时, 也有利于同源整合。

提取 pRS41H 质粒为模板, 用引物 7、8 进行

PCR, 扩增得到 *hyg* 基因, 作为选择性标记。扩增条件: 95℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s, 56℃复性 1 min, 72℃延伸 1.5 min, 进行 30 个循环; 72℃延伸 10 min。

具体的质粒构建见图 1, 所用引物见表 1。

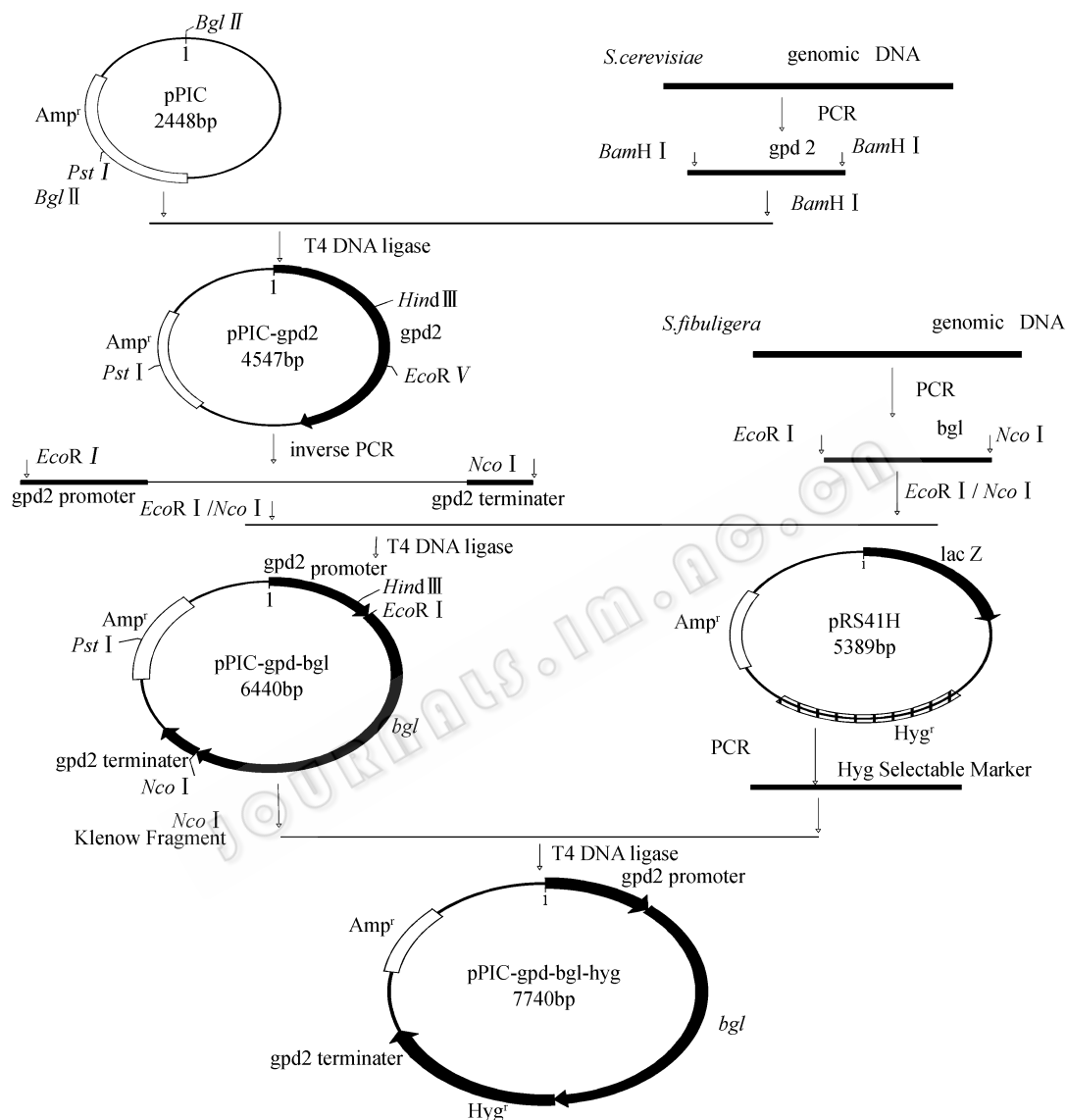


图 1 质粒构建

Fig. 1 Construction of plasmid pPIC-gpd-bgl-hyg

1.2.3 转化方法: 将过夜培养的菌转接至 50 mL YEPD 中, 30℃振荡培养 16 h-18 h, 离心收集细胞, 用冰冷的无菌ddH₂O和 1 mol/L山梨醇洗涤, 加入适量DNA片段, 混匀, 冰浴; 转入预冷转化池中, 1500 V, 5 ms电击转化; 用等体积 1 mol/L山梨醇洗出转化液, 取 200 μL涂布于选择性平板; 置于 30 培养箱培养。

1.2.4 细胞裂解液的制备: 接种酵母转化子单菌落挑入 50 mL YEPC液体培养基, 30℃, 200 r/min培养至静止期。离心收集菌体, 用柠檬酸缓冲液洗涤 1 次, 离心后用适量柠檬酸缓冲液重悬菌体。用超声破碎仪(VCX400 系列)破碎 24 min (工作 1 s停 2 s), 破壁后高速离心, 上清液即为细胞裂解物, 用于酶活测定^[5]。

1.2.5 β -葡萄糖苷酶的酶活测定: 按文献[6]进行。

酶活定义: 每分钟每毫升酶液水解产生 1 μmol 对硝基酚(pNPG)的酶活力为 1 个酶活单位。

1.2.6 转化子稳定性试验: 将 YNBG 平板上的酵母转化子接种到 2 mL YEPD 培养液中即为 0 世代菌, 在 30℃ 摇床培养 24 h 后即为 10 世代菌。取 2 μL 10 世代菌接入 YEPD 培养液中, 培养 24 h 后即为 20 世代菌。依此类推, 连续培养 50 世代。从 0 世代起, 每隔 10 世代取少量菌液, 经适当稀释后, 涂布于 YEPD 平板, 30℃ 培养 24 h 后, 将 YEPD 平板上的菌落转接到 YNBG 平板上, 培养 72 h 后按下列公式计算质粒稳定性:

质粒 n 世代稳定性^[7] =

$$\frac{n \text{ 世代 YNBG 平板菌落数} / n \text{ 世代平板菌落数}}{n \text{ 世代 YNBG 平板菌落数} / n \text{ 世代 YEPD 平板菌落数}} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 质粒构建

以扣囊复膜孢酵母染色体 DNA 为模板, PCR 扩增得到 3.0 kb *BGL1* 基因片段。酿酒酵母 2.1 kb *GPD2* 基因片段, 经 PCR 扩增得到后与 pPIC 质粒连接, 作为反向 PCR 模板, 得到 3.7 kb 含有 *GPD2* 启动子和终止子以及部分 pPIC 质粒基因片段。3.7 kb 片段与 3.0 *BGL1* 片段连接, 得到 pPIC-gpd-bgl 质粒。质粒用 *NcoI* 酶切后, 再用 Klenow Fragment 酶补平。与 1.3 kb 潮霉素选择标记 *hyg* 片段平端连接, 得到 7.7 kb pPIC-gpd-bgl-hyg。电泳结果见图 2。

2.2 酵母的电击转化

用限制性内切酶 *Hind* 将重组质粒 pPIC-gpd-bgl-hyg 线性化后, 电击转化进入感受态

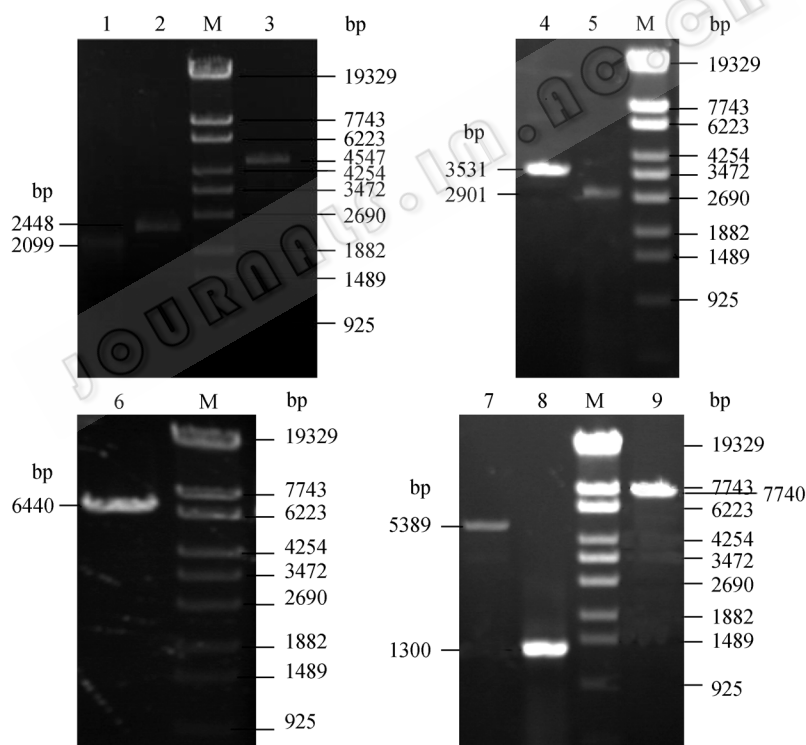


图 2 电泳结果

Fig. 2 Results of electrophoresis

1: *GPD2* 片段; 2: pPIC *Bgl* 酶切; 3: pPIC-gpd *Pst* 酶切; 4: 含有 *GPD2* 启动子、终止子的反向 PCR 产物; 5: *BGL1* 片段; 6: pPIC-gpd-bgl *EcoR* 酶切; 7: pRS41H *BamH* 酶切; 8: *hyg* 片段; 9: 重组质粒 *Hind* 酶切

1: *GPD2* fragment; 2: *Bgl* digestion of plasma pPIC; 3: *Pst* digestion of plasmid pPIC-gpd; 4: the PCR fragment which contains *GPD2* promotor, terminator; 5: *BGL1* fragment; 6: *EcoRI* digestion of plasmid pPIC-gpd-bgl; 7: *BamH* digestion of plasma pRS41H; 8: *hyg* fragment; 9: *Hind* digestion of recombinant plasmid pPIC-gpd-bgl-hyg; M: λ -DNA / *EcoI* 30 (*Sty*) Marker

工业酿酒酵母 *S. cerevisiae* Y。转化酵母涂布在含 200 $\mu\text{g/mL}$, pH8.5 YEPD 筛选平板上, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 d-3 d, 挑取转化子至 300 $\mu\text{g/mL}$ 潮霉素 B 的 YEPD 平板上培养 48 h, 筛选高抗性转化子, 命名为 *S. cerevisiae* Y-BGL。

2.3 转化子的 PCR 验证

提取重组整合酵母的染色体基因组作为模板, 采用扩增 *BGL1* 的引物 5、6 和 *hyg* 的引物 7、8 进行 PCR 验证。

在 200 μL Eppendorf 管中按顺序依次加入以下试剂: 1 μL 重组酵母染色体 DNA, 200 $\mu\text{mol/L}$ dNTP, 1 $\mu\text{mol/L}$ 引物, 10 \times PCR 反应缓冲液, 2.5 U Taq 聚合酶, 补 ddH₂O 至 50 μL 。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 复性 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 270 s, 进行 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

结果如图 3 所示, 分别扩增得到了 2.9 kb *BGL1* 和 1.3 kb *hyg* 条带。由此可以初步说明目的片段已经整合进入了工业酿酒酵母的染色体上。

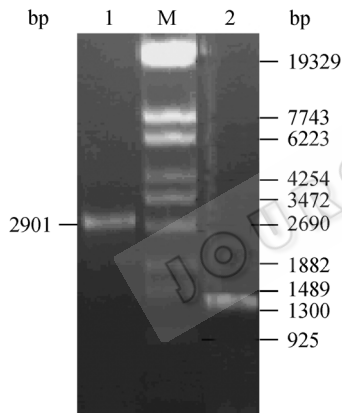


图 3 PCR 电泳图

Fig. 3 Spectrum of PCR electrophoresis

1: *BGL1* 片段; 2: *hyg* 片段

1: *BGL1* fragment; 2: *hyg* fragment; M: λ -DNA/*Ecol* 30 (Sty) Marker

2.4 重组子酶活测定

将宿主工业酿酒酵母 *S. cerevisiae* 和重组酵母 *S. cerevisiae* Y-BGL 分别转接到 YEPD 液体培养基中, 培养至菌体最大值后测定酶活。原宿主工业酿酒酵母不含 *BGL1* 基因, 所以没有检出酶活; 而重组菌 *S. cerevisiae* Y-BGL 经测定有酶活, 结果见表 2。

表 2 β -葡萄糖苷酶酶活比较
Table 2 Enzymatic assay of recombinant

菌株 Strain	β -葡萄糖苷酶酶活(U/mL) β -glucosidase activity(U/mL)			
	12h	24h	36h	48h
<i>S. cerevisiae</i> Y	0	0	0	0
<i>S. cerevisiae</i> Y-BGL-7	0.321	0.472	0.548	0.629
<i>S. cerevisiae</i> Y-BGL-11	0.292	0.377	0.462	0.572
<i>S. cerevisiae</i> Y-BGL-12	0.384	0.524	0.602	0.764

2.5 重组酵母在 YEPC 培养基上生长情况

将工业酒精酵母 *S. cerevisiae* Y 和重组酵母 *S. cerevisiae* Y-BGL 在 20mL YEPD 培养基中培养 24 h 后, 收集菌体, 用无菌 ddH₂O 洗涤 2 次后, 30 $^{\circ}\text{C}$ 饥饿培养 2 h-3 h。

培养细胞于 YEPC 平板, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 d-4 d, 酵母生长情况见图 4。

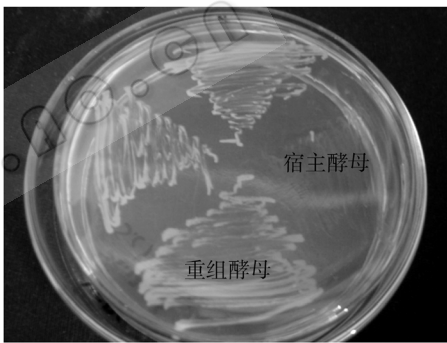


图 4 酵母在纤维二糖唯一碳源培养基上的生长情况

Fig. 4 Growth of yeasts in plates with cellobiose as a sole carbon source

宿主工业酒精酵母由于本身不含有 β -葡萄糖苷酶基因, 无法降解纤维二糖为葡萄糖, 所以不能生长。引入 β -葡萄糖苷酶的 *BGL1* 基因后, 能在以纤维二糖为唯一碳源的培养基上生长。

2.6 重组工业酿酒酵母的稳定性试验

按 1.2.6 实验后计算, 结果见图 5。可见同源整合在酵母染色体上的片段 *gpd-bgl-hyg* 比较稳定, 与前期游离表达方式相比^[8], 稳定性获得显著提高。

2.7 重组工业酿酒酵母的玉米浓醪酒精发酵

500 mL 三角瓶中称取 50 g 玉米粉, 加水拌料, 按酒精浓醪发酵工艺^[9], 30 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 48 h, 取醪液分析。

在玉米浓醪酒精发酵中, 重组酵母醪液中纤维二糖含量显著降低。重组酵母 *S. cerevisiae* Y-BGL

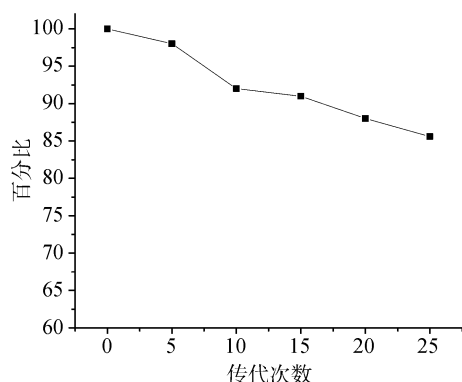


图5 重组酵母的遗传稳定性

Fig.5 Genetic stability of recombinant yeast

醪液中纤维二糖含量为 156.24 mg/L, 普通工业酿酒酵母 *S. cerevisiae* 醪液中含量为 786.25 mg/L, 纤维二糖含量下降了约 80%。

3 讨论

随着能源危机日益加剧, 化石燃料日益减少, 国际原油价格不断上涨。燃料乙醇作为一种清洁能源, 是目前国际上的一个研究热点。酒糟中存在着一些未能被酵母消耗的纤维二糖, 在工业酿酒酵母中引入纤维二糖代谢途径, 可提高原料利用率, 同时是对木质纤维素酒精发酵研究有意义的探索。

近年来, 研究者通过分子生物学手段尝试使酿酒酵母高效分泌表达或细胞表面固定表达 β -葡萄糖苷酶, 构建能够以纤维二糖为唯一碳源生长的酿酒酵母, 但都集中于对实验室酵母进行重组改造, 并仅限于以纤维二糖为基质进行发酵研究^[10,11], 很少涉及工业酒精酵母的改造和重组酵母在淀粉质原料及纤维素原料中的应用。

本文是利用工业酒精酵母为宿主, 利用基因工程技术对工业酵母进行改造, 提高菌种发酵性能, 从而更好的应用于乙醇发酵。由于游离质粒不稳定, 在没有选择压力情况下易丢失。因此构建了含有工业酿酒酵母自身 *GPD2* 启动子和终止子、扣囊复膜孢酵母 β -葡萄糖苷酶(*BGL1* 基因)和潮霉素选择标记 *hyg* 的重组质粒 pPIC-gpd-bgl-hyg, 利用酵母高效的同源重组, 将 *BGL1* 基因整合进入工业酿酒酵母染色体上。获得的重组酵母可以在以纤维二糖为唯一

碳源的培养基上生长, 在玉米浓醪酒精发酵实验中, 重组酵母醪液中纤维二糖含量比原始酵母降低了约 80%, 达到了预期实验目的。由于玉米原料中纤维二糖含量较低, 因此醪液中乙醇含量提高不显著 (0.2%), 进一步将以微晶纤维素为基质协同纤维素酶进行酒精发酵, 以突出其纤维二糖降解的能力, 解除纤维二糖对纤维素酶的“反馈抑制”作用。

参考文献

- [1] 章克昌主编. 酒精与蒸馏酒工艺学. 北京: 中国轻工业出版社, 1993, pp.6-7.
- [2] 陈小坚. 纤维素酶的分子生物学研究及应用进展. 湖北民族学院学报, 2006, 23(4): 48-51.
- [3] 陈向岭, 袁汉英, 何 炜, 等. 通过同源重组构建酿酒酵母新型表达质粒. 中国科学 C 辑生命科学, 2005, 35(1): 37-43.
- [4] Adams A, Gottschling DE, Kaiser CA, *et al.* Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998.
- [5] 洪剑辉, 张 梁, 石贵阳, 等. 利用纤维二糖的酵母工程菌构建. 应用与环境生物学报, 2006, 12(3): 391-394.
- [6] 姚卫蓉, 丁霄霖. pNPG 法测定纤维素酶系中 β -葡萄糖苷酶. 微生物学通报, 1998, 25(3): 982-983.
- [7] 霍克克, 虞兰兰, 陈新杰, 等. 酵母高稳定载体的构建及人 α A 干扰素在酵母中的高表达和分泌. 中国科学 B 辑, 1992, 9: 922-929.
- [8] 周 衍, 张 梁, 王正祥, 等. 扣囊复膜孢酵母 β -葡萄糖苷酶基因在工业酿酒酵母中的表达. 中国生物工程杂志, 2007, 27(2): 64-69.
- [9] 章克昌, 石贵阳, 徐 柔, 等. 一种浓醪发酵酒精的方法. 中国发明专利: z196117189.8.
- [10] McBride JE, Zietsman JJ, Van Zyl WH, *et al.* Utilization of cellobiose by recombinant β -glucosidase-expressing strains of *Saccharomyces cerevisiae*: characterization and evaluation of the sufficiency of expression. *Enzyme Microb Technol*, 2005, 37: 93-101.
- [11] Ronel VR, Barbel HH, Daniel CL, *et al.* Construction of cellobiose-growing and fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J Biotechnol*, 2005, 120: 284-295.