

水解淀粉的酿酒酵母菌的构建

唐国敏 郝乔然 钟丽婵 杨开宇

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 把黑曲霉糖化酶 cDNA、酵母磷酸甘油激酶基因启动子区和终止区以及酵母 Ty 因子的 δ 序列构建成整合型的糖化酶表达分泌质粒 pKG 1。该质粒转化酿酒酵母 Y33 得到整合型转化子。转化子分泌糖化酶活力在 $3.0\mu\text{g/ml}$ 以上,在以 5%可溶性淀粉为碳源的培养基中静止培养 7d,淀粉利用率达 86%,生成酒精的浓度与以 5%葡萄糖为碳源时相等。

关键词 水解淀粉酿酒酵母,淀粉利用,酒精生成

前文已报告从黑曲霉糖化酶高产株 T21 合成的糖化酶 cDNA 在酿酒酵母中的整合、表达和分泌^[1~3],为进一步提高表达分泌水平,我们又构建了由酵母高效的磷酸甘油激酶(PGK)基因启动子控制表达,由黑曲霉糖化酶自身信号序列引导分泌,由酵母 Ty 因子的 δ 序列提供整合所需同源性的整合型糖化酶表达分泌质粒。本文即报告表达质粒的构建、对酿酒酵母的转化及转化子对淀粉的利用。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

E. coli DH5 为细菌宿主, *S. cerevisiae* Y33(α his ura ade leu)为酵母宿主。质粒 pSAK081 的 HindIII 插入片段是含完整 PGK 基因的酵母染色体 DNA 片段, pSAK068 是含酵母 Ty 因子的 δ 序列的整合型质粒,以上两质粒皆系 Dr. A. Sakai 惠赠; pGla5 含有全长的黑曲霉糖化酶 cDNA, pGDH92 含完整的黑曲霉糖化酶结构基因^[4],均由本组构建。

1.2 培养基

LB 培养基、YPD 培养基、补加适当营养的 YNB 培养基、HC 培养基和 YPS 培养基的配制和用途见前报^[2]。

1.3 试剂和酶

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、碱性磷酸酯酶、Taq DNA 聚合酶、Klenow 片段、HindIII 接头购自 Promega 公司和中国协和医科大学医学科学技术开发公司, dNTP 购自 Boehringer, 葡萄糖氧化酶-过氧化物酶试剂盒系本所发酵厂产品。

1.4 DNA 操作

质粒 DNA 提取、限制性内切酶酶切、DNA 片段回收、脱磷、DNA 连接和细菌转化

等均按“Molecular Cloning”书中所述进行^[5], PCR 反应按产品说明书进行, 引物由本所技术室合成。

1.5 完整酵母细胞转化

按略加修改的毛小洪等的方法进行^[6]。

1.6 转化子糖化酶分泌的平板检测

见前报^[2]。

1.7 转化子在淀粉培养基中的生长和酒精发酵

1.7.1 发酵试验: 接种转化子菌细胞至 10ml YPD 培养基, 28℃ 振荡培养 72h, 以此培养物为种子, 按 8% 接种量接入以 5% 可溶性淀粉为碳源的缓冲的 YPS 培养基中, 30℃ 静止培养 7d, 测培养物中分泌的糖化酶活力、细胞干重、残余淀粉和酒精含量。本实验采用两种对照, 一是用含 5% 葡萄糖的 YPD 培养基同时接种培养; 二是把转化受体 Y33 按完全相同的方式接种到分别含 5% 葡萄糖的 YPD 培养基和含 5% 可溶性淀粉的 YPS 培养基中, 同时培养。

1.7.2 分泌糖化酶活力分析: 糖化酶活力分析见前报^[2]。

1.7.3 细胞干重测定: 取定量培养物离心去上清, 沉淀物悬浮于 pH 4.6 的缓冲液中, 加入足够量糖化酶于 37℃ 作用 2h, 离心收集细胞, 60℃ 烘干 2h, 称重。

1.7.4 残淀粉测定: 取定量培养物, 加入等体积 2mol/L HCl, 于沸水浴中水解 35min, 加入等体积 2mol/L NaOH 中和后, 用葡萄糖氧化酶-过氧化物酶试剂测定生成的葡萄糖。

1.7.5 酒精含量测定: 培养物离心, 取 50ml 上清在 SCABA 5600 型啤酒全自动分析仪(瑞典 Tecator 公司生产)上测定。

2 结果和讨论

2.1 整合型糖化酶表达分泌质粒的构建

2.1.1 酵母 PGK 基因启动子的 PCR 合成:

引物 1 5' ATTTTAGAATTCCTGAC 3'

引物 2 5' TTTTATATTTGTTGTA 3'

以 pSAK 081 为模板, 由此对引物合成 PGK 基因翻译起始密码 ATG 上游~760bp 的启动子区。设计引物 1 时, 在原序列 GATTC 中增加了一个碱基 A 变成 GAA* TTC, 从而造成 EcoR I 识别序列。将 PCR 合成片段电泳分离回收后, 连接 HindIII 接头, 再经 EcoR I 和 HindIII 双酶切便获得~760 bp 的 EcoR I-HindIII PGK 基因启动子片段。

2.1.2 酵母 PGK 基因启动子与糖化酶 cDNA 的转录融合: 黑曲霉糖化酶 cDNA 和糖化酶结构基因的部分限制酶的酶切图谱示于图 1。

引物 3 5' CAATGTCGTTCCGAT 3'

引物 4 5' GTCCAGAAGGACTGC 3'

以 pGla 5 为模板, 由引物 3 和 4 PCR 合成从 ATG 翻译起始密码开始的 776 bp 的糖化酶 cDNA 5' 端片段, 该片段包括糖化酶的信号肽序列, 并在近 3' 端含有糖化酶 cDNA 中独一的 Pst I 切点。将此合成片段电泳分离、回收后, 连接 HindIII 接头, 再用

HindⅢ和 Pst I 双酶切, 便获得自 ATG 至 Pst I 切点的糖化酶 cDNA 5' 端片段, 并在 ATG 上游紧接有 HindⅢ切点。

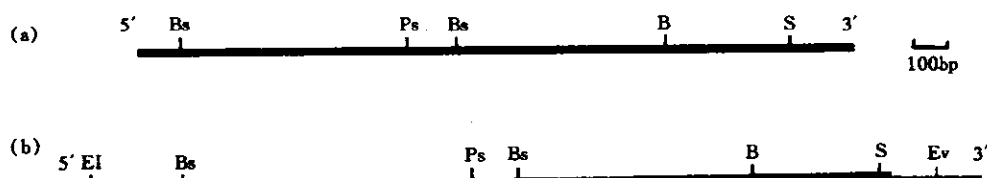


图1 黑曲霉糖化酶 cDNA (a)和染色体糖化酶基因(b)的限制酶谱

Fig.1 Restriction map of (a) glucoamylase cDNA and (b) genomic glucoamylase gene of *A. niger*

■ Protein-encoding regions □ Intron

Bs: BssHⅡ; Ps: Pst I; B: BamH I; S: Sal I; Ei: EcoR I; EV: EcoRV.

把前述 EcoR I-HindⅢ PGK 启动子片段与 HindⅢ-Pst I 糖化酶 cDNA 5' 端片段连接到 pUC 19 的 EcoR I-Pst I 双酶切载体上, 转化 DH5, 得到质粒 pPG_{F1}, 该质粒便含有酵母 PGK 基因启动子与糖化酶 cDNA 5' 端的转录融合。

2.1.3 糖化酶基因 3' 端与 PGK 基因终止区的连接: 质粒 pGDH 92 的 2.5kb 的 EcoR I-EcoR V 片段含有完整的糖化酶结构基因, 把该片段连接到 pUC 19 的 EcoR I-Sma I 上, 产生质粒 pUCGla2。质粒 pSAK 081 的 375bp 的 BglⅡ-HindⅢ片段是酵母 PGK 基因终止区, 把该片段插入到 pUCGla 2 的 BamH I-HindⅢ上, 这样就把 PGK 基因终止区连接到了糖化酶基因的 3' 末端, 产生的质粒命名为 pG_LK_{T4}。

2.1.4 整合型糖化酶表达分泌质粒的建成: 见图 2。从质粒 pG_LK_{T4} 中回收 915bp 的 BamH I-HindⅢ片段, 该片段含糖化酶基因的 3' 端片段(不含有内含子)和 PGK 基因终止区。将该片段插入 pBR322 的 BamH I-HindⅢ, 这样便在 PGK 基因终止区的 3' 端尾加了一个 EcoR I 切点。从产生的质粒酶切回收 944 bp 的 BamH I-EcoR I 片段, 与质粒 pGla 5 中 777bp 的 Pst I-BamH I 这一糖化酶 cDNA 中段连接后, 插入 pUC 19 的 EcoR I-Pst I 双酶切载体, 获得质粒 pG_{ML}K_{T3}。

从 pPG_{F1} 酶切回收~1.5Kb 的 EcoR I-Pst I 片段, 从 pG_{ML}K_{T3} 酶切回收~1.7kb 的 Pst I-EcoR I 片段, 将两片段连接插入 pSAK 068 的 EcoR I 位点, 便获得含酵母 PGK 基因启动子、黑曲霉糖化酶信号肽序列、成熟糖化酶编码区 cDNA 序列和酵母 PGK 基因终止区的 δ 整合型质粒 pKG1。

2.2 糖化酶基因对酿酒酵母的整合转化

用完整酵母细胞转化法将 pKG1 转化至酿酒酵母 Y33, 转化频率为~2 000 个转化子/ μ g DNA。随机挑取 44 个转化菌落点接到 HC 平板, 结果在 40 个菌落周围形成了淀粉透明圈, 即 91% 的转化子具有肉眼可检测的糖化酶表达分泌。我们在文献[2]中报告, 用酵母 α 因子启动子和分泌序列引导糖化酶表达分泌时, 61% 的转化子具有肉眼可检测的糖化酶分泌, 可能 PGK 启动子强于 α 因子启动子是两者间差异的主要原因之一。

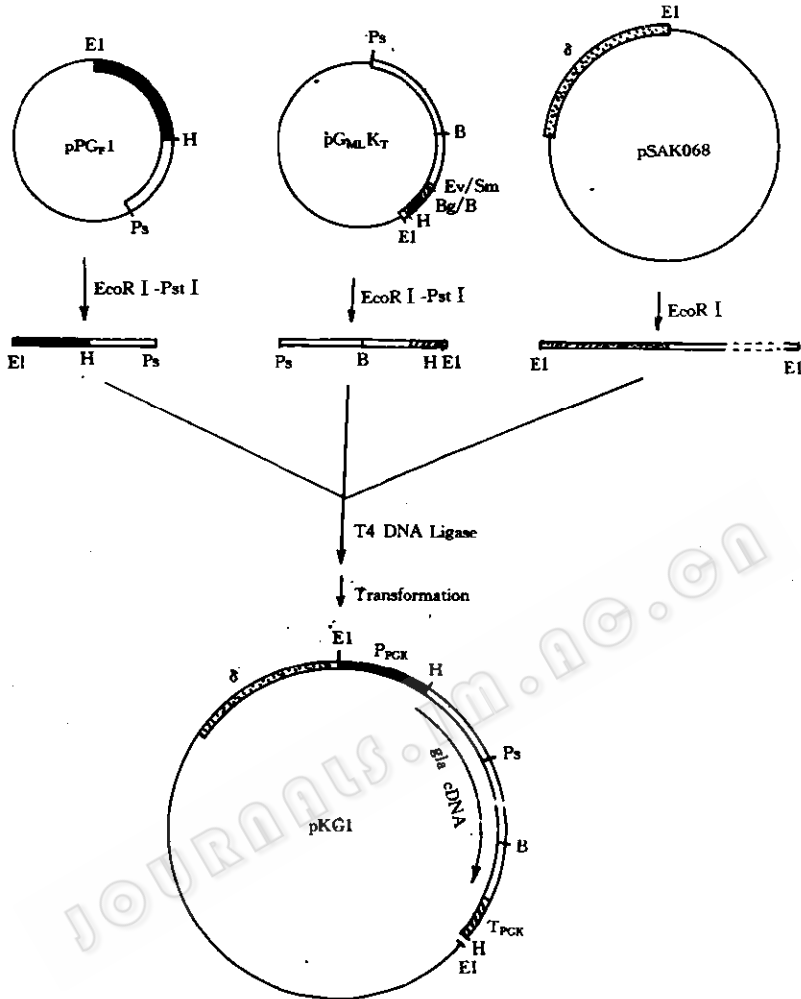


图2 整合型糖化酶表达分泌质粒的构建

Fig.2 Construction of integration type plasmid for expression and secretion of glucoamylase

■ P_{PGK} ■ T_{PGK} □ gla cDNA ▨ δ

E1: EcoR I H: Hind III Ps: Pst I B: BamH I Ev: EcoR V Sm: Sma I Bg: Bgl II

2.3 转化子的糖化酶分泌

转化子在含 2% 葡萄糖或在含不同浓度的可溶性淀粉的培养基中振荡培养后, 培养滤液中的糖化酶活力见表 1。

2.4 转化子的酒精发酵试验

试验结果如表 2。

从以上结果可以看出: (1) 转化子在含 5% 可溶性淀粉的培养基中和在含 5% 葡萄糖的培养基中静止培养时, 生成的酒精量相同。(2) 转化子和受体株在 5% 葡萄糖培养基中的酒精生成量相等, 推测本实验中受体株本身的发酵性能是酒精生成量的决定因素。(3) 酒精发酵试验中由于静止培养, 菌细胞生成量明显减少, 这可能是本项试验中分泌糖化酶

表 1 转化子分泌的糖化酶活力

Table 1 Activity of glucoamylase secreted by transformants

转化子 Transformants	分泌糖化酶活力 / u · ml ⁻¹ Activity of glucoamylase secreted under the condition of			
	YPD 2% 72h [*]	YPS 2% 120h	YPS 5% 168h	YPS 10% 168h
KG15	3.45	3.27	6.27	9.02
KG22	2.73	ND ^{**}	5.54	ND
KG24	3.67	3.13	6.64	ND
KG63	4.29	3.57	6.27	ND
KG64	3.99	3.69	6.42	ND

^{*} 分别指培养基、碳源浓度和培养时间。
Refer to medium, conc. of carbon source, incubation time (h).
^{**} 未测定 No determination.

表 2 转化子的酒精发酵结果分析

Table 2 Analysis of alcohol fermentation by transformants

转化子 Transformant	培养基 Medium	细胞干重	分泌糖化酶活力	淀粉利用	酒精含量
		Dry wt. of cell	Activity of	Starch	Alcohol
		/ mg · ml ⁻¹	glucoamylase / u · ml ⁻¹	utilization / (%)	content / (%)
KG15	YPS	2.2	3.14	86.9	1.50
	YPD	ND [*]	ND	/	ND
KG22	YPS	2.2 (3.4) ^{**}	3.41	88.4	1.53
	YPD	ND	ND	/	ND
KG24	YPS	2.0 (3.1)	3.43	86.5	1.51
	YPD	ND	1.91	/	1.42
KG63	YPS	2.0 (3.5)	3.05	90.0	1.68
	YPD	ND	2.26	/	1.49
KG64	YPS	1.9 (3.6)	2.97	88.6	1.69
	YPD	ND	1.73	/	1.49
Y33	YPD	ND	ND		1.49

^{*} ND 未测定 No determination.
^{**} 括弧中的数值是通气培养时的细胞干重 Values in brackets represent the dry wt. of cell cultivated on the shaker.

活力明显低于表 1 中所列数值的主要原因。(4) 发酵 7d 仍有 14%左右的残淀粉未被水解,因此预计对高发酵性能的菌株,糖化酶对淀粉的水解速度会成为酒精发酵的产量和速度的主要限制因素。为此进一步提高糖化酶表达水平或同时整入 α -淀粉酶基因将是下

一步的努力方向。鉴于本试验所用的酿酒酵母受体株 Y33 是需要四种营养的缺陷型, 生活力弱, 细胞生长浓度低, 如果把糖化酶基因整入生活力远比 Y33 高得多的工业生产菌株中, 预计表达水平会有相应的提高。

致谢 复旦大学李育阳先生赠送酿酒酵母受体株 Y33, Sakai A. 博士赠送质粒 pSAK 068 和 pSAK 081, 北京中策北京啤酒有限公司化验室帮助测定发酵样品酒精浓度, 特此一并致谢。

参 考 文 献

- [1] 唐国敏, 徐雁滴, 龚 辉, 等. 生物工程学报, 1993, 9(2): 117~121.
- [2] 唐国敏, 龚 辉, 钟丽婵, 等. 生物工程学报, 1994, 10(3): 213~217.
- [3] 唐国敏, 杨开宇. 生物工程学报, 1995, 11(4): 321~324.
- [4] 钟丽婵, 唐国敏, 杨开宇, 等. 微生物学报, 1994, 34(3): 184~189.
- [5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [6] 毛小洪, 紫金科. 生物工程学报, 1990, 6(2): 102~107.

THE CONSTRUCTION OF STARCH DIGESTIBLE STRAIN OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Tang Guomin Xi Qiaoran Zhong Lichan Yang Kaiyu

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract An integration type plasmid pKG1 for expression and secretion of glucoamylase was constructed by insertion of glucoamylase cDNA from *Aspergillus niger* between yeast phosphoglycerate kinase (PGK) promoter and terminator regions. The plasmid contained the sequence of yeast Ty element, which was used as a homologous fragment for intergration. The activity of glucoamylase secreted by yeast strain transformed with pKG1 was over 3.0 u/ml. The test of alcohol fermentation with the transformants were conducted in the medium containing 5% of the soluble starch as the sole carbon source at 30℃ for 7 days. The results showed that the transformants utilized over 86% Of the starch and produced the same concentration of alcohol as that in the medium containing 5% of glucose as the carbon source.

Key words Starch digestible *Saccharomyces cerevisiae*, Starch utilization, Alcohol production