

瑞氏木霉内切葡聚糖酶基因在工业啤酒 酵母中的整合和表达

汤晓颖² 秦俊川² 唐国敏¹ 王敖全^{1*}

(¹ 中国科学院微生物研究所 微生物资源前期开发国家重点实验室 北京 100080)

(² 南京大学 医药生物技术国家重点实验室 南京 210093)

摘 要 用 PCR 合成的瑞氏木霉(*T. reesei*) β -内切葡聚糖酶 I(EG I)的 cDNA, 构建了由酵母醇脱氢酶(ADH1)启动子和终止子引导表达、 β -内切葡聚糖酶自身信号肽序列引导分泌、由酵母 rDNA 序列引导同源整合的酵母 YIP 型 β -内切葡聚糖酶表达分泌质粒 pA15-PET。采用 pA15-PET 与酵母 YEP 型 G418 抗性表达质粒的共转化, 将 EG I 表达单元整合到已整合有 α -乙酰乳酸脱羧酶(α -ALDC)表达单元的啤酒酵母工程菌 BE9711 的染色体 rDNA 序列中, 获得同时表达胞内 α -ALDC 和胞外 β -内切葡聚糖酶的啤酒酵母工程菌。

关键词 β -内切葡聚糖酶, 整合表达, 双功能啤酒酵母

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2003)05-0586-06

大麦是啤酒生产的主要原料, 大麦粒中 β -葡聚糖含量高达 4% ~ 8%。 β -葡聚糖属非淀粉糖, 是由葡萄糖以 β -1,4 和 β -1,3 糖苷键连接而成的聚合物, 易溶于水, 水溶液黏度极高。因此, 麦芽汁中过量的 β -葡聚糖会造成啤酒过滤困难, 使啤酒口感不爽, 并使贮存啤酒产生雾状和沉淀。啤酒中的双乙酰也是啤酒质量控制的重点, 双乙酰是啤酒发酵过程的副产物, 它的过量会严重影响啤酒风味, 当麦芽质量不好时, β -葡聚糖和双乙酰问题就更为突出。啤酒生产工艺上目前采取分别添加 β -葡聚糖酶制剂和 α -乙酰乳酸脱羧酶(α -ALDC)酶制剂的方法加以解决。但添加酶制剂不仅成本高, 且商业酶制剂通常是多种酶的混合物, 工艺上不易掌握, 加上制剂中的杂质会影响啤酒风味, 因此最好的解决办法是从菌种本身入手, 国外已有同类研究报道^[1]。本课题组已将 α -ALDC 基因整入工业啤酒酵母, 用建成的工程菌 BE9711 生产啤酒已不再有双乙酰问题。本项研究则进一步将 β -葡聚糖酶基因整合 BE9711, 并使之分泌表达, 以建成既能大幅度降低啤酒液双乙酰又能适度降低 β -葡聚糖含量的双功能啤酒酵母工程菌。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

Escherichia coli DH5 α 用于质粒构建, 啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) BE9711 是已整合 α -ALDC 编码基因的工业啤酒酵母。质粒 pUC19 用作克隆载体, pAJ401-eg1 含瑞氏木霉(*Triconderm reesei*) eg1 cDNA, 由山东大学微生物技术国家重点实验室汪天虹教授惠赠; pGBT9 含酵母醇脱氢酶(ADH1)启动子和终止子, pA15BH 含酵母 rDNA 的 *Bgl* II - *Bam* HI /

* 通讯作者。Tel 86-10-62554397; Fax 86-10-62560912; E-mail: twangaq@sun.im.ac.cn

作者简介 汤晓颖(1976-)女, 江苏常州人, 南京大学生化系, 硕士生, 主要从事工业微生物菌种改良研究。

收稿日期 2002-12-24, 修回日期 2003-07-03

*Hind*Ⅲ 序列 ρ A15TXR 含酵母 G418 抗性表达单元 均由本实验室保存。

1.2 培养基

LB 培养基用于 *E. coli* 生长和保存, YPD 培养基(每升含酵母粉 10g, 蛋白胨 20g, 葡萄糖 20g, 自然 pH)用于 *S. cerevisiae* 的培养, 含 $40\mu\text{g}/\text{mL}$ G418 的 YPD 培养基用于酵母转化, 添加 0.1% 羧甲基纤维素(CMC)的 YPD 培养基用于筛选和鉴定分泌表达 β -内切葡聚糖酶(β -glucanase, EG I)的转化子。

1.3 酶和试剂

G418 购自北京鼎国生物技术的发展中心; *Pfu* DNA 聚合酶为 Sangon 生物技术公司产品; 各种限制性内切酶及 T4 DNA 连接酶为 TaKaRa 生物公司产品; 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.4 酵母转化

参考文献 2 进行。

1.5 大肠杆菌转化、质粒提取等分子操作

参考文献 3 按常规方法进行。

1.6 PCR 引物设计和扩增反应

根据文献 4 给出的酵母醇脱氢酶启动子(P_{ADHI})序列设计一对引物。

P1 5'-CTTGCATGCAACTTC-3';

P2 5'-GCTCTAGAGGAGTTGATTGTATGC-3'。

两引物中分别引入限制性酶切位点 *Sph* I 和 *Xba* I。以 pGBT9 质粒(见图 1)为模板 PCR 扩增 P_{ADHI} 片段, 循环条件: 94°C 3min; 94°C 1min, 55°C 1min, 72°C 50s, 30 个循环; 72°C 10min。根据文献 5 发表的瑞氏木霉 EG I 序列和肖志壮等关于 EG I cDNA 的 3'-UTR 对 EG I 在酿酒酵母中的表达有显著影响的报道^[6], 设计一对引物 P3 和 P4 以扩增带有 3'-UTR 序列的 EG I cDNA 片段。

P3 5'-ATTCTAGAATGGCGCCCTCAGTTACAC-3';

P4 5'-CGGGATCCGATAAGTTCTTTTTCATTT-3'。

两引物中分别引入 *Xba* I 和 *Bam*H I 限制性酶切位点。反应条件: 94°C 3min, 94°C 1min, 53°C 1min, 72°C 4min, 30 个循环; 72°C 10min。

1.7 DNA 核苷酸序列测定

由上海博亚生物技术有限公司完成。

1.8 转化子 EG I 分泌表达的定性和定量测定

1.8.1 定性分析 将酵母转化子点接在含 0.1% CMC 的 YPD 平板上, 30°C 培养 3d 后用 0.1% 的刚果红染色 1h, 再用 1mol/L NaCl 脱色 40min, 产生透明水解圈的为阳性转化子。或将转化子的 24h YPD 培养物上清加入 0.1% CMC 琼脂平板的孔穴中, 37°C 培养 8h, 同样作染色操作, 观察是否有透明水解圈的产生。

1.8.2 定量测定 取 0.5mL 适当稀释的阳性转化子培养上清, 加入 0.5mL 1% CMC(用 0.05mol/L 柠檬酸- 0.1mol/L 磷酸氢二钠缓冲液配制, pH5.0), 50°C 保温 30min, 用 DNS 方法测定生成的还原糖^[7]。定义每分钟产生 1 微克分子葡萄糖的酶量为一个酶活力单位。

1.9 啤酒酵母工程菌中 α -ALDC 表达水平测定

50mL 三角瓶装 30mL 麦芽汁, 接入工程菌于 12°C 进行啤酒发酵 3d, 此时酒液中双乙酰

(DA)值达到高峰,以工程菌受体菌 B1848 同样操作作为对照。细胞内 α -ALDC 表达会导致酒液 DA 峰值下降,因此将工程菌酒液中 DA 含量峰值与 B1848 的比较,其下降幅度即反映工程菌 α -ALDC 表达水平。DA 含量按参考文献 8 的方法测定,并直接以 OD_{335} 值表示。

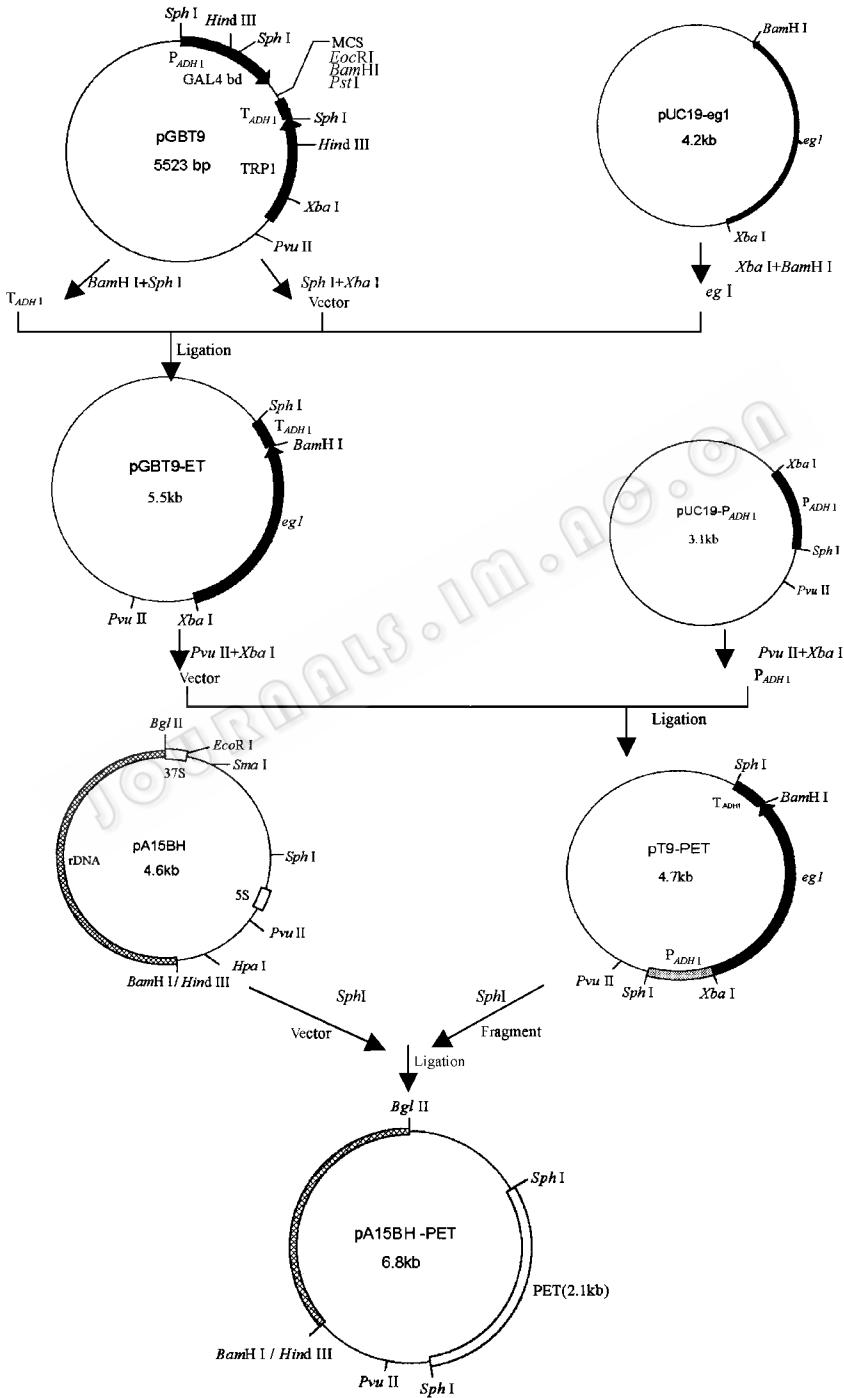


图 1 含 EG I 表达单元的酵母整合型质粒的构建

2 结果

2.1 酵母醇脱氢酶 I (ADH I) 启动子 P_{ADH1} 的 PCR 合成

按材料方法 1.6 所述进行 PCR 扩增产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检查 , 获得了长约 421bp 的 DNA 片段 , 与 P_{ADH1} 的预期值相符。将 PCR 产物用 *Sph* I 和 *Xba* I 双酶切后 , 克隆到 pUC19 相应位点 , 获得重组质粒 pUC19-P_{ADH1}。

2.2 带有 3'-UTR 的 EG I cDNA 的扩增

按材料方法 1.6 所述进行 PCR 扩增获得了 1.5kb 特异条带 , 用 *eg* I 基因内的 *Xho* I 、 *Pst* I 酶切位点进行鉴定 , *Xho* I 酶切应产生 683bp 和 859bp 的两片段 ; *Pst* I 酶切应产生 1085bp 和 457bp 两片段 , 实验结果与预期相符(图未出示)。将 PCR 产物用 *Xba* I 和 *Bam*H I 酶切后克隆到 pUC19 相应位点 , 获得质粒 pUC19-*eg* I。对质粒插入片段进行测序 , 结果与文献报道的带有 3'-UTR 的 EG I cDNA 的序列完全一致。

2.3 EG I 酵母整合型表达质粒的构建

2.3.1 EG I 表达单元的组建 : 用 *Bam*H I 和 *Sph* I 双酶切 pGBT9 , 获 228bp 的 ADH I 终止子 T_{ADH1} 片段 , 然后将 P_{ADH1} (*Sph* I + *Xba* I) λ EG I cDNA (*Xba* I + *Bam*H I) 和 T_{ADH1} (*Bam*H I + *Sph* I) 3 个片段分两步连接成 EG I 酵母表达单元。

2.3.2 EG I 酵母整合型表达质粒的构建 : 将上述 EG I 表达单元用 *Sph* I 切出 , 插入含酵母 rDNA 序列的整合型质粒 pA15BH , 构建 EG I 酵母整合型表达质粒 pA15BH-PET , 构建全过程示于图 1。

2.4 瑞氏木霉 EG I 表达单元在啤酒酵母 BE9711 中的整合及表达

用 *Pvu* II 酶切质粒 pA15BH-PET 使线性化 , 然后与 pA15TXR 质粒按克分子比 4 : 1 共转化 BE9711 , 在 YPD/G418 平板上筛选 G418 抗性转化子。随后按 1.8 所述对转化子作 EG I 分泌表达检测 , 结果在 1024 个抗性转化子中观察到 5 个有透明水解圈的转化子 , 共转化频率为 0.5%。将这 5 个转化子 1/205、3/10、3/293、3/379 和 3/439 再按 1.8 所述的平板孔穴法进行复测。结果表明 , EG I 在这 5 个转化子中确实获得了有功能活性的分泌表达。图 2 给出了其中两个转化子的复测结果。

2.5 整合株 EG I 分泌酶活的定量测定

从斜面上挑取菌 , 接入 2mL YPD , 30℃ 振荡培养 48h , 离心取上清 , 按材料方法中所述测定 EG I 酶活。转化子 1/205、3/10、3/293、3/379 和 3/439 的 EG I 分泌酶活分别为 17.8、12.8、5.6、11.7 和 12.8 U/L。

2.6 EG I 酵母工程菌分泌的 EG I 的酶学性质

选取 1/205 和 3/10 两株工程菌 , 进行分析。

2.6.1 分泌酶活与培养时间的关系 : 将 1/205 和 3/10 分别接种于含 50mL YPD 培养基的

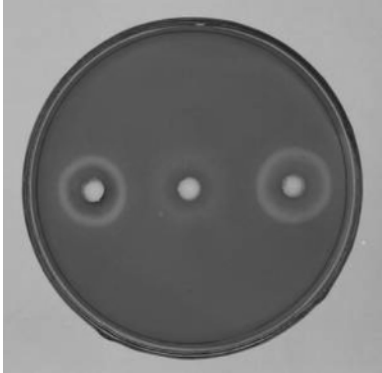


图 2 转化子 EG I 分泌表达的平板检测

Fig.2 Detection of EG I secretion on agar medium
From left to right : Transformant 1/205 ;
BE9711(control) ; Transformant 3/10 .

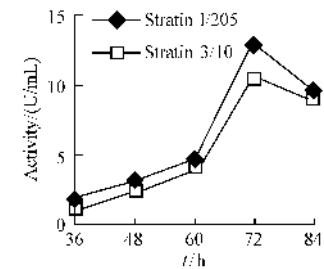


图3 EG I 分泌酶活与培养时间的关系

Fig.3 Relation between EG I enzyme activity and culture time

2.7 β-葡聚糖酶整合株中 α-ALDC 表达水平的测定

为考察单功能工程菌 BE9711 在整入并分泌表达 β-葡聚糖酶后 ,原已整入的 α-ALDC 编码基因的表达是否会受到影响 ,对 5 株又整入 EG I 编码基因的菌株作了 α-ALDC 的表达检测(表 1)。

表 1 工程菌 α-ALDC 表达水平检测							
Table 1 Detection of α-ALDC expressed by engineered brewing yeast							
Strains	* B1848	BE9711	1/205	3/10	3/293	3/379/	3/439
OD ₃₃₅	0.320	0.033	0.301	0.273	0.032	0.244	0.170
Drop/ %		89.7	5.9	14.7	90.0	23.8	53.1

* B1848 : A beer producing strain ,which is the recipiet for constructing α-ALDC engineering strain BE9711 .

由表 1 可知 ,在 EG I 表达株 3/293 中 ,α-ALDC 表达未受任何影响 ,而在 1/205 中 α-ALDC 几乎不再表达 ,在 3/439 中表达受到一定影响。

2.8 双功能工程菌中 EG I 表达的稳定性检测

取 3/293 和 3/439 在 YPD 液体管中连续转移培养 6 次 ,离心取上清后 ,用 CMC 平板法定性观察 EG I 的分泌表达并定量测定 EG I 分泌酶活力 ,每个测定作 3 个重复。结果表明这两株双功能工程菌株连续转移 6 次后 ,β-葡聚糖酶的分泌表达是十分稳定的。转移前 3/293 和 3/439 的平均酶活力分别为 5.5 和 12.8U/L ,连续转移 6 次后 ,测得平均酶活力分别为 6.6 和 11.7U/L。

上述结果表明 ,整入 α-ALDC 工程酵母 BE9711 的 β-葡聚糖酶基因在该菌株中能稳定分泌表达。由于基因整合在染色体上 ,拷贝数少 ,表达酶活较低 ,但在啤酒发酵过程中 ,由于酶的长时间连续作用 ,相当低表达的酶量就足以满足生产要求 ,关键是表达的稳定性^[1]。

3 讨论

从以上实验结果看 ,工程酵母 BE9711 引入 *eg* I 基因后 ,虽然 β-葡聚糖酶的分泌表达是稳定的 ,但对已经整入的 α-ALDC 编码基因的表达在不同的转化子中却产生了不同程度的影响 ,即从不影响表达达到几乎完全消除了 α-ALDC 的表达。初步推测 ,这可能与两个

基因同时整合在 rDNA 区域有关,如果向菌株引入第 2 个基因时,选用不同的同源整合部位,或许会有利于两基因的共同高表达。由于国际上目前尚无构建双功能啤酒酵母工程菌的报道,上述推测是否正确有待进一步试验。

参 考 文 献

- [1] Hammond J R M. Genetically-modified brewing yeast for the 21st century. Progress to date. *Yeast* ,1995. **11** :1613 ~ 1627.
- [2] Johnston J R. Molecular Genetics of Yeast. New York : Oxford University Press , 1994. 121 ~ 130.
- [3] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. 2nd ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989.
- [4] Bennetzen J L , Hall B D. The primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* gene for alcohol dehydrogenase I. *J Biol Chem* , 1982 **257** (6) : 3018 ~ 3025.
- [5] Penttilä M E , Andre L , Saloheimo M. Expression of two *Trichoderma reesei* endo- glucanases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* . *Yeast* , 1987 , **3** (3) : 175 ~ 85.
- [6] 肖志壮,吴志红,王 婷,等.瑞氏木霉 EG I 3'-UTR 对基因在酵母中表达的影响.微生物学报,2001 **41** :587 ~ 591.
- [7] 张树政主编.酶制剂工业(下册).北京:科学出版社,1989.606.
- [8] 管敦仪.啤酒工业手册(中册).北京:轻工业出版社,1985.234.
- [9] Shoemaker S. Characterization and properties of cellulases purified from *Trichoderma reesei* strain L27. *Bio/Technology* , 1983 **1** : 687 ~ 690.

Integration and Expression of β -Endoglucanase I from *Triconderma reesei* in Brewing Yeast

Tang Xiaoying² Qin junchuan² Tang Guomin¹ Wang Aoquan^{1*}

(¹ State Key Laboratory of Microbial Resources , Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China)

(² Department of Biochemistry , State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology , Nanjing University , Nanjing 210093 , China)

Abstract : An integration plasmid pA15-PET for expression and secretion of β -Endoglucanase I (EG I) in yeast was constructed by insertion of EG I cDNA between yeast alcohol dehydrogenase promoter and terminator region. The plasmid contained part of yeast rDNA sequence , which was used as a homologous fragment for integration. The EG I cDNA was introduced into an engineered brewing yeast BE9711 containing α -acetolactate decarboxylase (α -ALDC) encoding gene and integrated onto its rDNA sequence of chromosomal DNA by co-transformation of pA15-PET and a YEP type plasmid pA15TXR carrying G418 resistance. The stable engineered brewing yeast expressing intra-cellulase α -ALDC and extracellular EG I simultaneously were obtained.

Key words β -Endoglucanase I , Integrative expression , Double functional brewing yeast

* Corresponding author. Tel : 86-10-62554397 ; Fax : 86-10-62560912 ; E-mail : wangaq@sun.im.ac.cn