

酿酒酵母纤维二糖代谢途径的搭建*

张 梁^{1,2},石贵阳^{1,2},洪剑辉²,王正祥¹,章克昌²

(1.江南大学工业生物技术教育部重点实验室,江苏 无锡 214036 2.江南大学
生物工程学院生物资源研究室,江苏 无锡 214036)

摘要: 酒糟中存在一些未能被酵母消耗的糖,含量较高的如纤维二糖、蜜二糖等,有效利用酒精发酵过程中产生的纤维二糖,具有一定理论和实际意义。采用异硫氰酸胍-酚-氯仿法提取里氏木霉总RNA,分离 poly A⁺ mRNA,通过 RT-PCR 方法扩增得到 β -葡萄糖苷酶基因。构建了重组质粒 pYX-BGL,并在酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A 中获得表达,得到的转化子能以纤维二糖为唯一碳源生长。

关键词: 微生物; 酿酒酵母; β -葡萄糖苷酶; 纤维二糖利用

中图分类号: Q93-33; TS261.1 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2005)03-0030-04

Metabolism Pathway of Cellobiose in *Saccharomyces cerevisiae*

ZHANG Liang^{1,2}, SHI Gui-yang^{1,2}, HONG Jian-hui², WANG Zheng-xiang¹, ZHANG Ke-chang²

(1.The Key Laboratory of Industry Biotechnology, Ministry of Education, Wuxi, Jiangsu 214036 2. Institute of Biomass Resources School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi, Jiangsu 214036, China)

Abstract: There was some unconsumed sugar in distiller's grains such as cellobiose and melibiose etc. Effective utilization of cellobiose produced during alcohol fermentation was of theoretical and practical significance. The total RNA of *Trichoderma reesei* was extracted by guanidine thiocyanate-phenyl-chloroform extraction method, from which the poly A⁺ mRNA was purified. The gene encoding β -glucosidase was amplified by RT-PCR technique using purified mRNA as template. The recombinant plasmid pYX-BGL was constructed and expressed in *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A. The recombinants can grow well on cellobiose as a sole carbon source. (Tran. by YUE Yang)

Key words: microbes; *Saccharomyces cerevisiae*; β -glucosidase; cellobiose utility

在酒糟中存在一些未能被酵母消耗的糖,最常见的含量较高的如纤维二糖、蜜二糖等,用于酒精发酵的酵母不含有相关酶系对它们加以利用。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]。而料水比的减少必将导致酒糟中残糖的升高,其中主要是纤维二糖、蜜二糖、棉籽糖等不能为常规酵母利用的糖的增加。本研究室在前期研究中,运用高效液相法定性定量分析了不同原料浓醪酒糟清液中的纤维二糖,发现其含量都在 500 mg/kg 以上,有的甚至有 1000 mg/kg 左右。因此,如何有效利用酒精发酵过程中产生的纤维二糖,具有一定理论和实际意义。

纤维质原料转化燃料乙醇,更是使全球许多科学家为之奋斗终身。要达到这个目标,高活力的纤维素酶是

其中的一个关键因素。一般普遍认为,纤维素酶是一种多组分的复合酶,复合酶协同作用的结果才能将纤维素大分子转化为葡萄糖^[2]。Mark Holtzapple 等^[3]认为纤维素酶水解纤维素的中间产物纤维二糖是纤维素酶的非竞争性抑制物,会对纤维素酶的催化作用形成强烈的反馈抑制,纤维二糖的水解是纤维素酶降解纤维素的限速步骤。Stockton 等^[4]在利用纤维质原料生产酒精时,认为有效酶法水解纤维素需要高纤维二糖酶活。沈雪亮等^[5]用固定化纤维二糖酶消除了稀酸处理的玉米芯经 *Trichoderma reesei* 的纤维素酶降解时纤维二糖积累所造成的反馈抑制作用。

对 β -葡萄糖苷酶(也叫纤维二糖酶,EC3.2.121)的研究可以追溯到 1837 年 Liebig and Wohler 首次在苦杏仁汁中发现了该酶。该酶分布较为广泛,特别是植物

* 国家科技部“十五”攻关项目(2001BA501A01)资助。

收稿日期: 2004-12-08

作者简介: 张梁(1978-),男,发酵工程博士研究生,研究方向为再生资源生物转化、酶技术。

的种子和微生物中尤为普遍。黑樱桃、水稻、大豆、木薯等作物,酵母、细菌、真菌、链霉等微生物的 β -葡萄糖苷酶都已被分离纯化并对其性质和应用作了研究^[6]。较早对 β -葡萄糖苷酶基因克隆与表达的研究是 Misawa, Nakamura K^[7]于1989年对瘤胃球菌蛋白 β -葡萄糖苷酶基因在 *Z. mobilis* 中的表达和稳定性研究。此后,对许多不同来源的 β -葡萄糖苷酶基因都进行了克隆与表达研究^[8]。但这些改造都是希望宿主微生物能够大量积累 β -葡萄糖苷酶,以获得商业用 β -葡萄糖苷酶,或者使宿主微生物能表达足够量的 β -葡萄糖苷酶酶活,以纤维二糖为底物进行发酵^[9-11]。

如果将 β -葡萄糖苷酶直接像糖化酶一样在酒精生产中添加,虽能达到利用纤维二糖的目的,但生产成本也会受 β -葡萄糖苷酶价格的影响。若能将 β -葡萄糖苷酶基因整合入酒精发酵用酵母并高效稳定表达,结合纤维素酶一起应用于酒精发酵,有可能进一步提高原料出酒率,同时对纤维素原料的高效利用也是一种新的探讨方式。

1 材料与方 法

1.1 菌种和质粒

里氏木霉(*T. reesei*)为生物资源研究室保藏;酵母 *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A、质粒 pYX212、大肠杆菌 *Escherichia coli* JM109 由工业生物技术教育部重点实验室王正祥教授惠赠。

1.2 培养基、工具酶和试剂

1.2.1 培养基

产酶培养基:豆饼粉 4.5%,麸皮 1%,玉米粉 2%,磷酸二氢钾 0.5%,氯化钙 0.3%,氯化铵 0.5%,用于里氏木霉培养菌体。

LB 培养基(g/L):胰蛋白胨 10,酵母提取物 5,氯化钠 10,pH7.0。需要时使用前加入 100 mg/mL 氨苄青霉素,固体培养基添加 1.5%琼脂,用于大肠杆菌培养。

YEPD 培养基(g/L):胰蛋白胨 20,酵母提取物 10,葡萄糖 20,pH 自然。固体培养基添加 1.5%琼脂,用于酵母菌培养。

YNBG 培养基(g/L):酵母氮基(不含氨基酸)6.7,葡萄糖 20,亮氨酸 0.12,色氨酸 0.12,组氨酸 0.12,腺嘌呤 0.12。固体培养基添加 1.5%琼脂,用于 *S.cerevisiae* W303-1A 转化子的筛选和培养。

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

1.2.2 工具酶和药品

碱性磷酸酶(CIAP),T4DNA 连接酶和限制性内切酶 EcoR·,Hind·等为晶美生物工程有限公司产品, λ -E-coT14·digest DNA Marker,Pyrobest 酶购于宝生物工程

有限公司,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、焦碳酸二乙酯(DEPC)、异硫氰酸胍、十二烷基肌氨酸钠等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-吡喃葡萄糖苷为 Sigma 公司产品;其他试剂药品皆为国产或进口的分析纯和生化试剂。

1.3 引物设计及目的基因的 PCR 扩增

扩增里氏木霉 β -葡萄糖苷酶基因 *bgl*·所用的引物根据 Takashima 等^[12]发表的 *T.reesei bgl*·基因的序列设计,由上海生工生物工程有限公司合成。

上游引物 A 为 5',-CCG GAATTC ATGTTGCC-CAAGGACTTTCAGTGGG-3'

下游引物 B 为 5',-CCC TTCGAA ATTTCCC-CTTTGAAGAAGCATCAGG-3'

分别引入 EcoR·,Hind·位点。

在 PCR 管中分别按 QIAGEN ONE-STEP RT-PCR KIT 的方法加入适当体积的引物 A 和引物 B,dNTP 混合液、5 \times RT-PCR Buffer 和无 RNA 酶,QIAGEN RT-PCR enzyme mix,Rnase 抑制剂,最后加入 *T.reesei* 模板 mRNA,加入矿物油后进行 PCR 扩增,设置反应条件为:55 $^{\circ}$ C·30 min,进行反转录,95 $^{\circ}$ C·15 min(94 $^{\circ}$ C·1 min,64.3 $^{\circ}$ C·1 min,72 $^{\circ}$ C·1 min),进行 30 个循环后,在 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.4 里氏木霉总 RNA 的提取

按李春明等^[13]的方法稍作改良。

1.5 常规基因克隆操作方法

外源基因片段与载体的拼接,大肠杆菌 *E.coli* JM109 感受态的制备及简易转化程序,*E. coli* 质粒的快速提取,碱裂解法提取质粒等操作参见《分子克隆实验指南》^[14]和《精编分子生物学实验指南》^[15]。

1.6 *S. cerevisiae* W303-1A 电穿孔转化法

1.6.1 接种 20 mL 液体 YEPD 培养基,30 $^{\circ}$ C 培养 16~18 h;

1.6.2 接种过夜培养菌体 5 mL 至 50 mL 新鲜的液体 YEPD 培养基中,30 $^{\circ}$ C 培养 10 h,使菌体浓度达到 1×10^8 左右;

1.6.3 3000 r/min 离心 10 min,收集菌体;

1.6.4 倒掉上清液,菌体用 20 mL 无菌水悬浮,洗涤一次;

1.6.5 离心收集菌体,用 20 mL 无菌水再洗涤一次;

1.6.6 离心收集菌体,用 1 mL 1 mol/L 山梨醇重新悬浮菌体,洗涤一次,转移至 5 mL 离心管中;

1.6.7 离心收集菌体,移液器吸净上清液,加入 0.2 mL 1 mol/L 山梨醇,混匀菌体,使菌体呈浓浆状;

1.6.8 取 0.2~0.4 mL 浓稠的菌悬液分装 1.5 mL 的离心管,每管中加入 10 μ L ($\leq 1 \mu$ g)质粒 DNA,混匀,冰浴 10

min ;

1.6.9 将转化菌悬液全部转入预冷的转化池中,1500 V 5 ms 条件下电击两次 ;

1.6.10 用等体积的 1 mol/L 山梨醇将转化菌悬液从转化池中洗出,取 200 μ L 涂布 YNNG 平板 ;

1.6.11 30 $^{\circ}$ C 培养箱培养。

1.7 细胞裂解液的制备

接种划线分离的酵母转化子单菌落入 20 mL YNNG 液体培养基,30 $^{\circ}$ C 200 r/min 摇床培养至对数中后期,接种 5 mL 入 50 mL 的 YNNG 液体培养基中,30 $^{\circ}$ C 200 r/min 摇床培养至静止期。离心收集菌体,用 Z 缓冲液^[16]洗涤一次,离心后用适量 Z 缓冲液重悬菌体。超声破碎 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。

1.8 酶活的测定^[17]

取 0.2 mL 细胞裂解物,加入 1.8 mL pH4.5 的 0.2 mol/L Na_2HPO_4 -0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液,30 $^{\circ}$ C 水浴预热 10 min,在加入已预热 10 min 的 5 mmol/L 对硝基酚- β -D-吡喃葡萄糖苷溶液 2 mL,计时,10 min 后立即加入 2 mL 1 mol/L Na_2CO_3 溶液终止反应,室温放置 5 min 400 nm 处测消光值。以加热失活的酶液按照同样方法处理作空白。

酶活定义:每分钟每毫升酶液水解产生 1 μ mol 对硝基酚(pNPG)的酶活力为一个酶活单位。

2 结果

2.1 总 RNA 提取及样品的分析

里氏木霉总 RNA 的提取按 1.4 步骤进行,提取时所用器皿、材料、工作间都用 DEPC 处理或 180 $^{\circ}$ C 高温过夜,所用溶液都用 DEPC 水配制,工作时勤换手套,防止污染。

提取的 RNA 质量的好坏,决定于 RNA 的均一性(即纯度)和完整性。

RNA 的均一性:用紫外分光光度计测量样品在 230 nm 260 nm 280 nm 处的吸光度, A_{260}/A_{230} 应大于 2, A_{260}/A_{280} 在 1.7~2.0 之间。

RNA 的完整性:琼脂糖电泳,28 s RNA 与 18 s RNA 的亮度比大约为 2。

可用吸光度来衡量 RNA 的均一性,表 1 列出了 RNA 样品之间的吸光度的比较,样品 1 和 2 的 A_{260}/A_{280} 均为 1.56,说明 1 和 2 的纯度无差别,样品 1 的 A_{260}/A_{230} 的值为 2.039,大于 2,而样品 2 的此值小于 2,则样品 1 的变性剂和糖原的污染较小。因此样品 1 较样品 2 的纯度更均一。

总 RNA 经琼脂糖凝胶电泳,从图 1 可看出,图的下部有 28 s RNA 与 18 s RNA 两条带,样品 1 的 28 s RNA 与 18 s RNA 的亮度比样品 2 的要大,显示出其与 EB 的

表 1 总 RNA 样品的吸光度的测定和比较

项目	A_{230}	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{230}	A_{260}/A_{280}
样品 1	1.14	2.325	1.49	2.039	1.56
样品 2	1.097	2.011	1.289	1.833	1.56

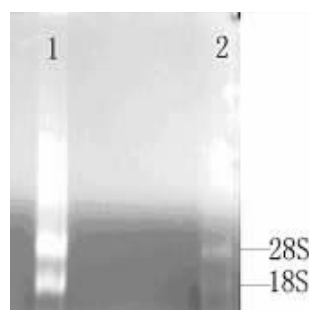


图 1 里氏木霉总 RNA 电泳图

结合较好,同时样品 1 的 28 s RNA 与 18 s RNA 的亮度比大约为 2,而样品 2 的 28 s RNA 与 18 s RNA 的亮度比为 1 左右,说明样品 1 的 RNA 的降解较少,其保持了较高的完整性。

综上所述,样品 1 的均一性和完整性较样品 2 的高,因此选择样品 1 的总 RNA 为后续实验服务。

2.2 从总 RNA 中纯化 mRNA

按 QIAGEN 的 Oligoex KIT 说明书步骤用试剂盒从总 RNA 中分离 poly A⁺ mRNA。

2.3 PCR 扩增目的基因 bgl

按 1.3 的方法与步骤进行,PCR 结果电泳图如图 2 所示,可见成功扩增得到 1.5 kb 左右的 bgl 基因。



1.2. bgl 3. λ -DNA /EcoT14

图 2 PCR 扩增 bgl 电泳图

2.4 基因 bgl 的克隆与表达

选用大肠杆菌-酵母穿梭质粒 pYX-212 为载体,将基因 bgl 用限制性内切酶 EcoR·Hind·酶切后,与用对应限制性内切酶酶切的质粒 pYX-212 通过连接酶连接,转化感受态 *E.coli*,涂布含氨苄青霉素的 LB 平板,挑选转化子,提取质粒后用限制性内切酶 EcoR·Hind·酶切验证,证明获得了重组质粒 pYX-BGL(图 3)。

将重组质粒 pYX-BGL 电转化感受态 *S. cerevisiae* W303-1A,涂布 YNNG 平板,30 $^{\circ}$ C 培养 3 d,挑选转化子,在另一块 YNNG 平板上划线培养后,按 1.7 制取细胞裂解液,测得转化子有 β -葡萄糖苷酶酶活(表 2),初步说明外源基因 bgl 能在酿酒酵母中表达。

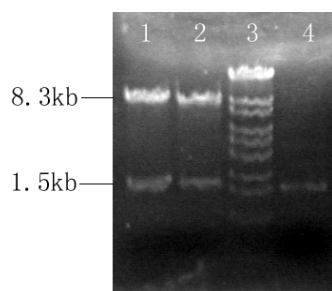
1.2. 酶切验证 3. λ -DNA/EcoT14 4. *bgl*

图3 重组子 pYX-BGL 酶切验证图

表2 转化子酶活

菌株	β -葡萄糖苷酶酶活
<i>S. cerevisiae</i> W303-1A	0.00
pYX-BGL 转化子	0.47 u

2.5 外源基因表达能力验证

将转化子和 *Saccharomyces. cerevisiae* W303-1A 单菌落分别转接入 YNBC 液体培养基, 30 °C 200 r/min 培养 48 h, 取培养液测定 OD₆₀₀ 值(空白为新鲜培养基), 结果见表 3。可见转化子能以纤维二糖为唯一碳源生长, 进一步证明外源基因在酿酒酵母中进行了正确表达, 同时也说明酿酒酵母具有运送纤维二糖进入细胞的系统及酶系, 纤维二糖能够自由进入酿酒酵母细胞为其利用。

表3 转化子在唯一碳源培养基中培养液的 OD₆₀₀ 值

菌株	OD ₆₀₀
<i>S. cerevisiae</i> W303-1A	0.00
pYX-BGL 转化子	0.195

3 讨论

β -葡萄糖苷酶能水解结合于末端、非还原性的 β -D-糖苷键, 同时释放 β -D-葡萄糖和相应的配基; 在纤维素的糖化作用中 β -葡萄糖苷酶能将纤维素二糖和纤维素寡糖水解成葡萄糖。因而在食品工业、饲料工业和医药工业都有较为广泛的应用。研究表明, 一些动植物、细菌和真菌体内都含有 β -葡萄糖苷酶, 科学家也对许多细菌和真菌体内的 β -葡萄糖苷酶进行了分离纯化、基因测序、性质研究等^[18]。

本研究希望通过 DNA 重组技术使 *T. reesei* 的 β -葡萄糖苷酶基因在工业酿酒酵母染色体 DNA 上整合, 使 β -葡萄糖苷酶在细胞内有一定表达量, 但 β -葡萄糖苷酶勿需超量表达或分泌表达, 以防影响酵母本身的产酒精能力; 在整合的同时敲除某个副产物生产的关键酶基因, 使代谢流更多的流向酒精生产。以期得到一种新型的酒精发酵酵母, 在原来的酒精生产能力的基础上, 利用非常规酒精酵母不能利用的进入酒精废糟液中的纤维二糖; 在利用纤维质原料时部分解除纤维二糖的抑制作用。

通过实现里氏木霉 β -葡萄糖苷酶基因的克隆与表

达, 以及转化子能以纤维二糖为唯一碳源生长的现象, 初步证明了继续研究的可行性。

参考文献:

- [1] 章克昌. 发展“燃料酒精”的建议[J]. 中国工程科学, 2000, 2(6):89-93.
- [2] 李宪臻, 黄云战, 徐德贵, 等. 天然纤维素的微生物降解机理研究进展[J]. 食品与发酵工业, 1996(2):74-78.
- [3] Mark Holtzapple, Mona Cognata, Yuancai Shu et al. Inhibition of *Trichoderma reesei* Cellulase by Sugars and Solvents. *Biotech. Bioeng.* [J], 1990, 36:275-287.
- [4] D.C.Stockton, D.J.Mitchell, K.Grohmann et al. Optimum β -Glucosidase Supplementation of Cellulase for Efficient Conversion of Cellulose to Glucose. *Biotech.Lett.* [J], 1991, 13(1):57-62.
- [5] 沈雪亮, 夏黎明. 固定化纤维二糖酶的研究[J]. 生物工程学报, 2003, 19(2):236-239.
- [6] 李远华. β -葡萄糖苷酶的研究进展[J]. 安徽农业大学学报, 2002, 29(4):421-425.
- [7] Misawa, Nakamura K. Expression and Stability of α , β -glucosidase Gene of *Ruminococcus Albus* in *Zymomonas mobilis*[J]. *Agric.Biol.Chem.*1989, 53(3):723-727.
- [8] 曾黎辉, POULTON Jonathan E, 吕柳新. *Pichia pastoris* 表达 β -葡萄糖苷酶基因研究[J]. 福建农林大学学报, 自然科学版, 2003, 32(3):331-335.
- [9] Rajoka MI, Bashir A, Hussain SR et al. Cloning and Expression of beta-glucosidase Genes in *Escherichia Coli* and *Saccharomyces cerevisiae* Using Shuttle Vector pYES 2.0. *Folia*[J]. *Microbiol.* 1998, 43(2):129-135.
- [10] Morana A, Moracci M, Ottombrino A et al. Industrial-scale Production and Rapid Purification of an Archaeal beta-glucosidase Expressed in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotech. Appl. Biochem.*1995, 22(3):261-268.
- [11] Adam AC, Rubio-Teixeira M, Polaina J. Induced Expression of Bacterial beta-glucosidase Activity in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Yeast*, 1995, 11(5):395-406.
- [12] Takashima S, Nakamura A, Hidaka M. et al. Molecular Cloning and Expression of the Novel Fungal beta-glucosidase Genes from *Humicola Grisea* and *Trichoderma reesei*[J]. *J. Biochem.* 1999, 125:728-736.
- [13] 李春明, 王俊琦. 丝状真菌深黄被孢酶 RNA 的提取方法[J]. 菌物系统, 1999, 18(1):108-111.
- [14] J.萨姆布鲁克, D.W.拉塞尔著. 黄培堂, 等译. 分子克隆实验指南(第三版)[M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- [15] F.奥斯伯, R.E.金斯顿, J.G.塞德曼, 等著. 颜子颖, 王海林译. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [16] A.Adams, D.E.Gottschling, C. A. Kaiser et al. *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*[M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998.
- [17] 姚卫蓉, 丁霄霖. pNPG 法测定纤维素酶系中 β -葡萄糖苷酶[J]. 微生物学通报, 1998, 25(3):982-983.
- [18] 姚卫蓉, 丁霄霖. β -葡萄糖苷酶的研究概况[J]. 天津微生物, 1996(2):23-30.