

酿酒酵母GPD 1中整合表达纤维二糖酶基因用于纤维素酒精发酵的研究*

张 梁^a, 石贵阳^a, 王正祥^b, 章克昌^a

(江南大学 a 生物工程学院 生物资源研究室; b 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

[摘 要] 采用基因敲除技术, 在工业酿酒酵母染色体DNA 上的甘油代谢途径关键酶基因GPD 1中, 整合入来源于里氏木霉的 β 葡萄糖苷酶基因bgII, 通过提高G418 浓度筛选得到多拷贝整合子。结果表明, 整合子利用纤维二糖的能力得到提高, 产甘油能力下降, 外源基因表达稳定; 引入外源基因后, 其对酵母增殖能力没有大的影响, 仅形态发生变化; 在以微晶纤维素为原料, 结合纤维素酶发酵时, 与亲代工业酿酒酵母相比, 发酵液乙醇浓度最高增加69%。

[关键词] β 葡萄糖苷酶; 纤维二糖; 纤维素利用; 酒精发酵

[中图分类号] Q 784

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006) 10-0164-07

纤维质原料转化燃料乙醇是全球许多科学工作者研究的热点, 而高活力纤维素酶是影响纤维质原料转化为乙醇的关键因素。一般认为, 纤维素酶是一种多组分的复合酶, 复合酶协同作用才能将纤维素大分子转化为葡萄糖^[1-2]。Holtzapple 等^[3]认为, 纤维素酶水解纤维素形成的中间产物纤维二糖是纤维素酶的非竞争性抑制物, 即纤维二糖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时需要较高活性的纤维二糖酶。沈雪亮等^[5]用固定化纤维二糖酶消除了稀酸处理玉米芯经 *T. reesei* 纤维素酶降解时因纤维二糖积累所造成的反馈抑制作用。 β 葡萄糖苷酶(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, 其分布较为广泛, 特别是在植物种子和微生物中的分布尤为普遍。较早对 β 葡萄糖苷酶基因克隆与表达进行的研究, 是Mitsawaka 等^[6]于1989年对瘤胃球菌蛋白 β 葡萄糖苷酶基因在 *Z. mobilis* 中的表达和稳定性的研究。此后, 对许多不同来源的 β 葡萄糖苷酶基因均进行了克隆与表达研究^[7], 但以上研究均是期望宿主微生物能够大量积累 β 葡萄糖苷酶, 以获得商用 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, 从而以纤维二糖为底物进行发酵^[8-10]。

如果能将 β 葡萄糖苷酶基因整合在酒精发酵用酵母染色体上, 使其能高效稳定表达, 并能结合纤维素酶一起应用于纤维素酒精发酵, 则有可能在不增加成本的前提下提高纤维素的利用率, 对有效利用纤维质原料生产燃料乙醇是一种有益的探索。本研究拟通过分子生物学手段构建1株能稳定表达 β 葡萄糖苷酶的重组酵母, 结合纤维素酶应用于微晶纤维素酒精发酵试验, 以期为提高纤维素的利用率提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌种和质粒

酒精工业生产用酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae* Y)、里氏木霉(*Trichoderma reesei*)、大肠杆菌宿主菌株 *Escherichia coli* JM 109(*recA 1 supE 44 endA 1 hsdR 17 gyrA 96 relA 1 thiΔ (Lac⁻proAB)*) F' [*traD 36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM 15*])、实验酵母 *S. cerevisiae* W 303-A (MAT α *ade2-1 his3-11 leu2-3 trp1-1 ura3-1 can1-100*)、穿梭质粒pYX212(细菌酵母穿梭载体, Novagen 公司产品, 带有TPI 强启动子)和质粒pSKsym Ω Km(带卡那基因片段), 均由本

* [收稿日期] 2005-09-30

[基金项目] 国家科技部“十五”攻关项目(2001BA501A 01)

[作者简介] 张 梁(1978-), 男, 江苏无锡人, 讲师, 博士, 主要从事再生资源生物转化工程及酶技术研究。

[通讯作者] 石贵阳(1963-), 男, 浙江新昌人, 教授, 博士, 主要从事发酵工学、生物资源与能源及酶技术研究。

研究室保藏。

1.2 培养基、工具酶和试剂

1.2.1 培养基 本研究中所用的主要培养基有:

(1)产酶培养基。含豆饼粉45 g/L、麸皮10 g/L、玉米粉20 g/L、磷酸二氢钾5 g/L、氯化钙3 g/L、氯化铵5 g/L,用于培养里氏木霉菌体。(2)LB培养基。含胰蛋白胨10 g/L、酵母提取物5 g/L、氯化钠10 g/L, pH 7.0;使用前需加入100 μ g/mL 氨苄青霉素和(或)40 μ g/mL 卡那霉素。LB固体培养基需添加15 g/L 琼脂,用于大肠杆菌培养。(3)YEPD培养基。含胰蛋白胨20 g/L、酵母提取物10 g/L、葡萄糖20 g/L, pH 自然。YEPD固体培养基中添加15 g/L 琼脂用于酵母菌培养;添加100 μ g/mL G418用于整合子的筛选。(4)YNBG培养基。含酵母氮基(不含氨基酸)6.7 g/L、葡萄糖20 g/L、亮氨酸0.12 g/L、色氨酸0.12 g/L、组氨酸0.12 g/L、腺嘌呤0.12 g/L。YNBG固体培养基中需添加15 g/L 琼脂,用于*S. cerevisiae* W 303-1A 转化子的筛选和培养。(5)YN-BC培养基。含酵母氮基(不含氨基酸)6.7 g/L、纤维二糖20 g/L、亮氨酸0.12 g/L、色氨酸0.12 g/L、组氨酸0.12 g/L、腺嘌呤0.12 g/L。

1.2.2 工具酶和药品 碱性磷酸酶(CIAP)、T₄ DNA 连接酶和限制性内切酶*Hind*III、*Eco*R I 等均为晶美生物工程有限公司产品; λ -*Eco* T14 I digest DNA Marker 和 Pyrobest 酶均购于宝(TAKARA)生物工程有限公司;mRNA 分离、反转录和胶回收试剂盒均为德国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 方法

1.3.1 里氏木霉总RNA 提取 参照文献[11]的方法进行。

1.3.2 里氏木霉总RNA 纯化mRNA 按照QIAGEN 的Oligoex KIT 说明书,用试剂盒从总RNA 中分离poly A⁺ mRNA。

1.3.3 目的基因 *bgl* II 的 PCR 扩增 根据 Takashima 等^[12]发表的*T. reesei* *bgl* II 基因序列,设计扩增里氏木霉 β 葡萄糖苷酶基因 *bgl* II 所用的上、下游引物,并由上海生工生物工程有限公司合成。上游引物A 的序列为:5'-CCG GAA TTC ATG TTG CCC AAG GAC TTT CAG TGG G-3';下游引物B 的序列为:5'-CCC TTC GAA ATT TCC CCT TTG AAG AAG CAT CAG G-3';划线部分分别为

*Eco*R I 和*Hind*III的酶切位点。

分别按QIAGEN 的ONE-STEP RT-PCR KIT 说明书,在PCR 管中加入适当体积的引物等试剂进行目的基因 *bgl* II 扩增。PCR 反应条件为:55 30 min 进行反转录;95 15 min;94 1 min,64 3 1 min,72 1 min,30 个循环;72 延伸10 min。于4 条件下保存扩增产物。

1.3.4 目的基因 *bgl* II 的克隆与表达 选用大肠杆菌-酵母穿梭质粒pYX-212 作为载体,将 *bgl* II 基因片段用限制性内切酶*Eco*R I 和*Hind*III酶切后,与对应限制性内切酶酶切的质粒pYX-212 通过T₄DNA 连接酶连接,构建重组质粒pYX-BGL,转化至*E. coli* JM 109 感受态细胞中,然后涂布于含氨苄青霉素的LB 平板培养基上,挑选转化子,常规方法提取质粒后用限制性内切酶*Eco*R I 和*Hind*III酶切验证。

1.3.5 目的基因 *bgl* II 表达能力的验证 (1)将重组质粒pYX-BGL 电转化至感受态酵母*S. cerevisiae* W 303-1A 中,然后涂布于YNBG 平板培养基上,于30 培养3 d,挑选转化子于另一块YNBG 平板培养基上划线培养,再制取细胞裂解液,测定 β 葡萄糖苷酶活性。(2)将转化子和*S. cerevisiae* W 303-1A 单菌落分别转接入于YNBG 液体培养基中,于30 , 200 r/min 培养48 h,测定培养液OD₆₀₀。

1.3.6 显性标记的引入 卡那基因是一种来自细菌的基因,编码一种非活性酶(氨基糖苷酸转移酶)。该基因在酵母中的表达能使酵母对G418 产生抗性,可作为显性的选择标记。

在本研究中,用限制性内切酶*Hind*III从质粒pSKsym Ω Km 上切下卡那基因片段,将回收得到的基因片段(1 kb),与用*Hind*III酶切并去磷酸化的重组质粒pYX-BGL 通过T₄DNA 连接酶连接后,转化至*E. coli* JM 109 感受态细胞,用含氨苄青霉素和卡那霉素的LB 平板培养基筛选,构建重组载体pYX-BGL Ω Km,其构建流程如图1 所示。

1.3.7 整合用基因簇的PCR 扩增 一般而言,若将通过PCR 方法获得的基因片段(含合适抗性标记)用于整合,其两端各需有50 bp 左右的片段序列作为介导^[13]。根据pYX-212 载体序列,在*TPI* 启动子序列上游和多克隆位点下游设计引物P1 和P2,引物P1 和P2 上下游各引入54 bp 的酿酒酵母磷酸甘油脱氢酶(GDP)基因片段。

上游引物P1 的序列为:

5'-AAC TTA ACT TCC GGC CAC TTG AAT GCT GGT AGA AAG AGA AGT TCC TCT TCT GTT AAC

GGG AGC GTA ATG GTG ATG GAA-3';

下游引物P2的序列为:

5' TAA TTC TTC AAT CAT GTC CGG CAG GTT
CTT CAT TGG GTA GTT GTT GTA AAC GAT GAG
ATA TCA TGC GTA GTC AGG CAC-3'

划线部分为酿酒酵母磷酸甘油脱氢酶(GDP)
基因片段。

以重组载体pYX-BGL ΩKm 为模板进行PCR
扩增, PCR 反应体系为: 10 × Buffer 5 μL, dNTP 4
μL, P1 和P2 各1 μL, DNA 模板1 μL, Pyrobest(酶)
0.25 μL, ddH₂O 补至50 μL。PCR 反应程序为: 96
5 m in; 94 25 s, 56 1.5 m in, 68 5 m in, 35
个循环; 72 延伸10 m in。

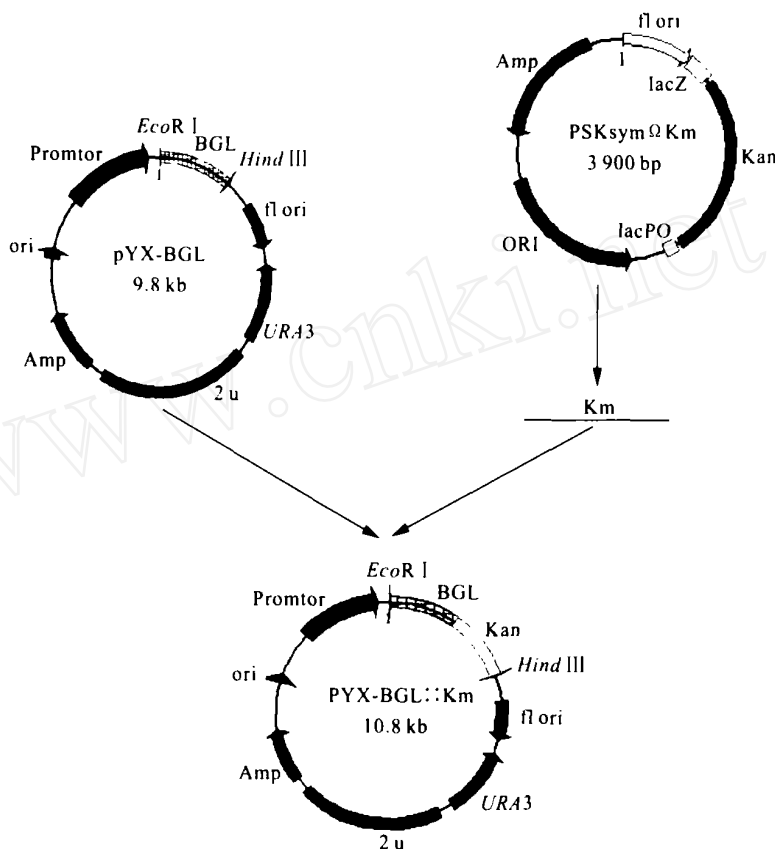


图1 重组质粒pYX-BGL ΩKm 的构建流程

Fig 1 Construction of plasmid pYX-BGL ΩKm

1.3.8 目的基因整合 将1.3.7中经PCR扩增得到的 $gpd1'$ ($P_{TP1}-bgl-\Omega Km$)基因簇纯化后,电转化至工业酿酒酵母*S. cerevisiae* Y中,以含200 μg/mL G418的YEPD平板培养基筛选整合子。

1.3.9 多拷贝整合子的挑选 为提高重组酵母β-葡萄糖苷酶的表达量,需筛选多拷贝整合子。首先挑取1.3.8中获得的阳性整合子,将其转接到YEPD固体培养基上进行培养,然后在含500 μg/mL G418的YEPD固体培养基上挑取生长最快、菌落最大的阳性整合子进行后续研究,该整合子被暂命名为*Saccharomyces cerevisiae* CG1。

1.3.10 整合子*S. cerevisiae* CG1的验证及基本性质考察 (1)*S. cerevisiae* CG1基因组DNA的提取

按文献[14]方法进行。(2)PCR扩增试验。以提取的*S. cerevisiae* CG1基因组DNA为模板,按照扩增 bgl II的引物和条件进行PCR扩增。(3)传代能力。将*S. cerevisiae* CG1转接于YEPD斜面培养基上,于30℃培养,每24 h转接1次,共转接10次,再将斜面菌种分别转接于YNBC培养基中,于30℃, 200 r/min培养48 h,测定OD₆₀₀值,研究*S. cerevisiae* CG1对唯一碳源的利用能力。(4)增殖能力和形态变化。分别将*S. cerevisiae* CG1和亲代酿酒酵母转接于YEPD培养基中,于30℃, 200 r/min振荡培养2 h,静置培养24 h,酵母计数并观察形态。

1.4 重组酵母纤维素试验

将微晶纤维素(Cellulose microcrystalline)以*m*

(微晶纤维素) V (自来水) = 1 : 4 的比例拌料, 调节 pH 为 4.8, 分别添加体积分数 1% 的吐温-80 和纤维素酶, 于 50 °C 恒温水解 1~1.5 h, 添加 200 mg/mL 氨基青霉素后分别按体积分数 10% 的接种量接种 *S. cerevisiae* CG1 和亲代酵母 *S. cerevisiae* Y, 30 °C 培养 72 h。在此发酵过程中, 纤维素酶(滤纸酶活 30 IU/mL)的添加量和添加时间按照下述 3 种发酵方式进行: 在 500 mL 三角瓶中, 加 30 g 微晶纤维素, 补水拌料, 调 pH 为 4.8; (1) 按每克原料添加 6 IU 纤维素酶的比例添加纤维素酶, 水解后接种、发酵; (2) 首先按每克原料添加 4 IU 纤维素酶的比例添加纤维素酶, 于 50 °C 恒温水解 1~1.5 h 后, 再按每克原料添加 2 IU 纤维素酶的比例补加纤维素酶, 接种、发酵; (3) 首先按每克原料添加 4 IU 纤维素酶的比例添加纤维素酶, 于 50 °C 恒温水解 1~1.5 h 后, 再按每克原料添加 2 IU 纤维素酶的比例补加纤维素酶, 接种、发酵, 在发酵过程中, 每隔 12 h 按每克原料添加 2 IU 纤维素酶的比例补加纤维素酶。发酵过程中每隔 12 h 取样测定发酵液中纤维二糖和葡萄糖的含量。

将亲代酵母和本研究构建得到的整合酵母按上

述方法进行纤维素发酵试验, 比较发酵过程中纤维二糖、葡萄糖和酒精的变化。

1.5 发酵液检测

培养液中的纤维二糖和葡萄糖含量采用 HPLC 法^[15]测定; 发酵液中的乙醇浓度采用气相色谱法^[16]测定。

1.6 β 葡萄糖苷酶的酶活测定

按照文献[17]的方法进行 β 葡萄糖苷酶的酶活性测定。

2 结果与分析

2.1 里氏木霉 β 葡萄糖苷酶基因 *bgl II* 的克隆与表达

2.1.1 里氏木霉总 RNA 的分析 提取总 RNA 质量的优劣, 由 RNA 的均一性(即纯度)和完整性决定。用紫外分光光度计分别测定里氏木霉总 RNA 在 230, 260 和 280 nm 处的吸光度 A_{230} , A_{260} 和 A_{280} , 结果表明, A_{260}/A_{230} 大于 2, A_{260}/A_{280} 为 1.7~2.0, 这说明总 RNA 的均一性较好。由里氏木霉总 RNA 的电泳图(图2)可知, 样品 28S RNA 与 18S RNA 的亮度比约为 2, 这说明总 RNA 的完整性较好。

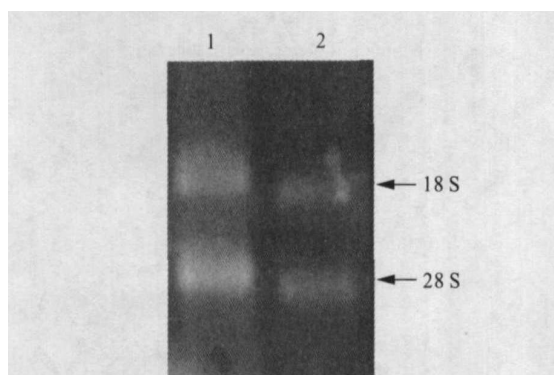


图2 里氏木霉总 RNA 电泳

1. 样品 1 总 RNA; 2. 样品 2 总 RNA

Fig. 2 Total RNA of *T. reesei*

1. Total RNA of sample 1; 2. Total RNA of sample 2

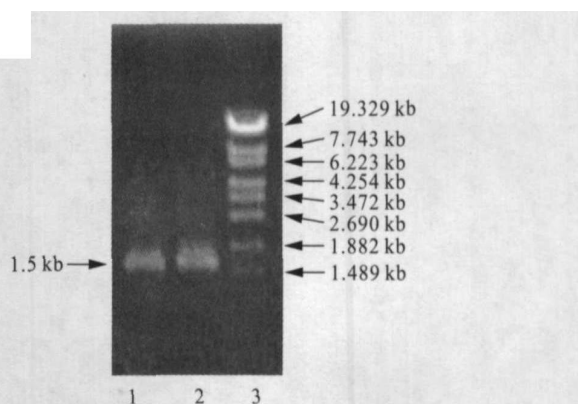


图3 *bgl II* 基因的 PCR 扩增

1, 2. *bgl II*; 3. λ -DNA/*Eco T14*

Fig. 3 Amplification of *bgl* gene by PCR

1, 2. *bgl II*; 3. λ -DNA/*Eco T14*

2.1.2 目的基因 *bgl II* 扩增 由图3可知, 扩增到的目的基因 *bgl II* 的长度约为 1.5 kb, 与预期结果一致。

2.1.3 基因 *bgl II* 的克隆与表达 由图4可知, 重组质粒 pYX-BGL- Ω Km 经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切后得到 1.5 和 8.3 kb 的条带, 与目的基因 *bgl II* 和载体片段相吻合, 初步认为成功获得了重组质粒 pYX-BGL。进一步验证试验表明: 转化子的 β 葡

萄糖苷酶活性为 0.47 U/mL (亲代酵母 *S. cerevisiae* Y 无 β 葡萄糖苷酶活性), 初步说明目的基因 *bgl II* 能在酿酒酵母中表达; 将转化子和 *S. cerevisiae* W 303-1A 单菌落分别转入 YNBC 液体培养基中培养 48 h 后, 培养液的 OD₆₀₀ 分别为 0.195 和 0.06, 说明转化子能以纤维二糖为唯一碳源生长, 而 *S. cerevisiae* W 303-1A 基本不能生长, 进一步证明目的基因 *bgl II* 在酿酒酵母中进行了正确表达。

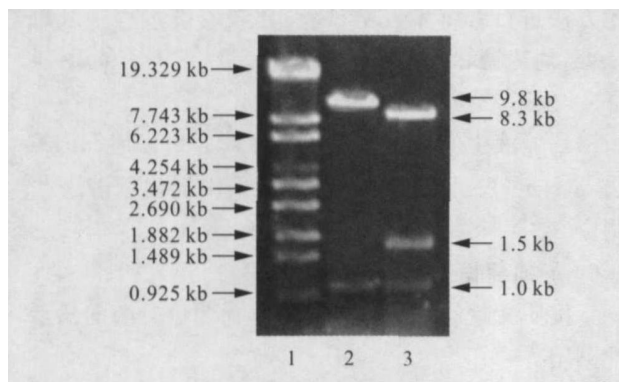


图4 重组质粒pYX-BGL ΩKm的酶切验证

1. λ-DNA/Eco T14; 2. H indIII酶切重组质粒;
3. EcoR I, H indIII双酶切重组质粒

Fig. 4 Identification of recombinant plasmid pYX-BGL ΩKm by digestion

1. λ-DNA/Eco T14; 2. Digested by H indIII;
3. Digested by EcoR I and H indIII

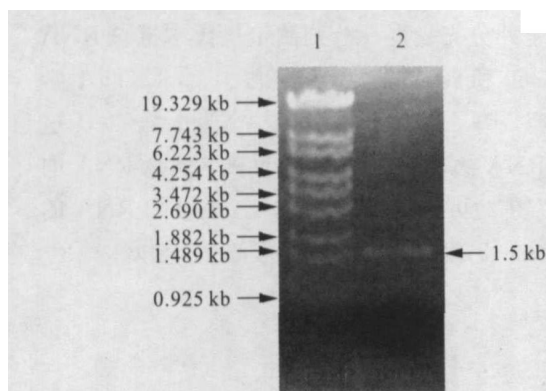


图5 整合子 *S. cerevisiae* CG1 的PCR扩增结果

1. λ-DNA/Eco T14; 2. *bgl* II

Fig. 4 Identification of recombinant plasmid *S. cerevisiae* CG1 by PCR

1. λ-DNA/Eco T14; 2. *bgl* II

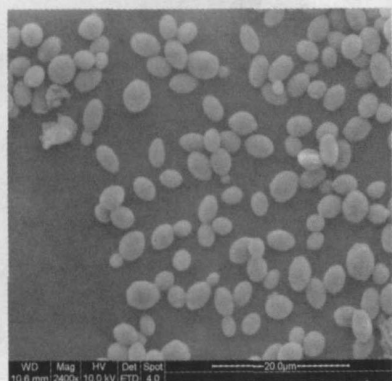


图7 *S. cerevisiae* Y 电镜照片(2 400×)

Fig. 7 Photography of *S. cerevisiae* Y (2 400×)

本研究对酵母增殖能力进行的统计发现, 培养液中整合子酵母数(平均 0.84×10^8 亿/mL)和亲代酵母数(平均 0.91×10^8 亿/mL)差异不明显, 这表明整合子增殖

2.2 目的基因在工业酿酒酵母染色体上的整合

2.2.1 卡那基因的引入 引入卡那基因后, 重组质粒大小应该为10.8 kb, 分别由8.3 kb的pYX-212质粒1.5 kb的目的基因*bgl* II和1 kb的卡那基因串联而成。图4表明, 重组质粒单酶切后分别得到9.8和1 kb大小的片段, 双酶切后得到8.3, 1.5, 1.0 kb 3个基因片段, 与构建过程相吻合, 说明成功构建得到了重组质粒pYX-BGL ΩKm。

2.2.2 整合子的验证及其基本性质 由图5可知, 扩增得到了长度1.5 kb的基因片段, 这与目的基因*bgl* II的长度一致, 表明目的基因*bgl* II已在工业酿酒酵母染色体上整合成功。由图6可知, 经过10次转接后, 整合子*S. cerevisiae* CG1在YNBC培养基中的生长能力并未减弱。

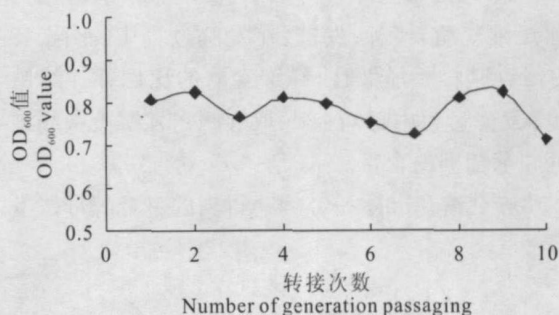


图6 不同转接次数对 *S. cerevisiae* CG1 利用纤维二糖能力的影响

Fig. 5 Effect *S. cerevisiae* CG1 in different of generation passagings on capacity of utilizing cellobiose

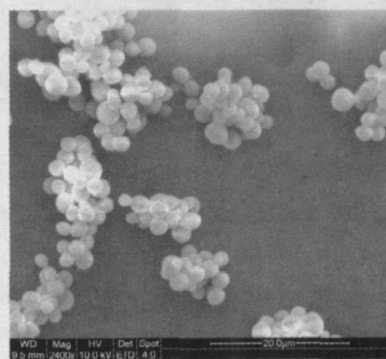


图8 *S. cerevisiae* CG1 电镜照片(2 400×)

Fig. 8 Photography of *S. cerevisiae* CG1 (2 400×)

能力并没有降低。对酵母形态进行的电镜观察发现, 整合子形状较常规酵母略小, 具有较强的自絮凝力。这可能是由于引入纤维二糖后, 使某些细胞膜组成发生

了变化, 从而引起细胞形态上的差异(图 7, 8)。

2 3 整合酵母的微晶纤维素发酵

由表 1 可知, 同步发酵 72 h 后, 在相同的发酵方

式下 *S. cerevisiae* CG1 纤维二糖的平均含量较亲代酵母低, 而发酵液酒精度较亲代酵母高, 说明本研究构建的菌株能部分消除纤维二糖的反馈抑制作用。

表 1 亲代酵母 *S. cerevisiae* Y 与整合酵母 *S. cerevisiae* CG1 发酵微晶纤维素的比较

Table 1 Comparison of fermentation of cellulose microcrystalline by recombinant yeast and its parent yeast

菌株 Strain	发酵方式 Process No.	试验批次 Test No.	酒精度/% Alcohol	纤维二糖/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) Cellobiose	葡萄糖/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) Glucose
<i>S. cerevisiae</i> Y	1	1	1.8	1 019	332
		2	1.3	1 350	354
	2	1	2.8	606	231
		2	2.6	725	124
	3	1	8.3	86	963
		2	8.5	165	883
<i>S. cerevisiae</i> CG1	1	1	2.6	713	1 283
		2	2.2	645	1 099
	2	1	4.3	168	172
		2	4.0	209	155
	3	1	8.9	N. D.	648
		2	9.0	77	916

注: N. D. 表示未检出。Note: N. D. is not detectable

一般来讲, 纤维素酶水解可分为纤维素酶吸附在纤维素表面、纤维素降解生成可发酵性糖、纤维素酶的解吸 3 个步骤。3 步水解过程中纤维素酶的活性会降低, 这种钝化作用部分是由于纤维素酶对纤维素的不可逆吸附造成的。有研究^[18]发现, 在纤维素酶水解过程中添加表面活性剂能够改变纤维素的表面特性, 减少纤维素酶对纤维素的不可逆吸附。在本研究中, 培养液添加了吐温-80 以减缓酶的钝化。同步发酵纤维素 72 h 的发酵过程中, 葡萄糖和纤维二糖的浓度变化如图 9 所示。

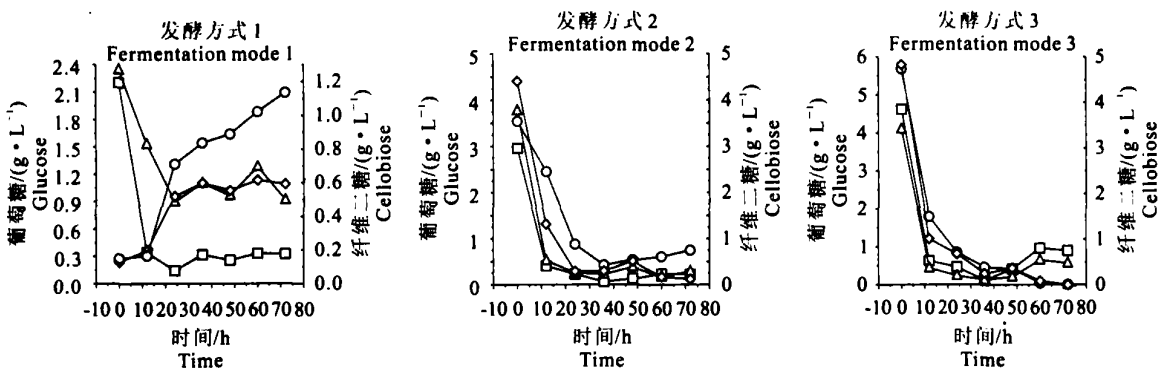


图 9 不同方式发酵过程中葡萄糖和纤维二糖浓度的变化

- □ - *S. cerevisiae* Y (葡萄糖); - ○ - *S. cerevisiae* CG1 (葡萄糖); - □ - *S. cerevisiae* Y (纤维二糖); - ○ - *S. cerevisiae* CG1 (纤维二糖)

Fig 9 Changes of glucose and cellobiose concentration in the different fermentation courses

- □ - *S. cerevisiae* Y (glucose); - ○ - *S. cerevisiae* CG1 (glucose); - □ - *S. cerevisiae* Y (cellobiose); - ○ - *S. cerevisiae* CG1 (cellobiose)

由图 9 可知, 虽然酶的钝化仍然存在, 但发酵方式 (2) 优于发酵方式 (1), 表明补加纤维素酶后纤维素的利用效果较好。由表 1 和图 9 可知, 按照方式 (1) 和 (2) 进行发酵, 与亲代酵母相比, 采用重组酵母 *S. cerevisiae* CG1 发酵时, 因其表达生成的 β 葡萄糖苷酶可协同纤维素酶水解纤维素, 部分解除了纤维二糖对纤维素酶的反馈抑制作用, 提高了纤维素的利用效率; 发酵一段时间后, 其发酵液中纤维二糖的积累相对于亲代酵母发酵液中明显减少, 发酵时间延长, 酒精度升高。方式 (3) 中不断有新的纤维素酶加入, 发酵状态趋于相同, 这是由于纤维素酶的不断加入, 同时带入 β 葡萄糖苷酶, 使其达到一定浓度, 纤维二糖不再积累, 这也再次证明了纤维素的有效发酵需要高活性 β 葡萄糖苷酶的结论^[4]。

3 讨 论

当今世界,能源需求日益增大与可利用能源日益减少的矛盾愈发突出,利用纤维质原料进行清洁能源——燃料酒精的生产越来越受到广泛重视。本研究希望通过DNA重组技术,将*T. reesei*的 β 葡萄糖苷酶基因整合到工业酿酒酵母的染色体DNA上,使其在细胞内有一定表达量,以期得到一种新型的酒精发酵酵母,使其能在利用纤维质原料时部分解除纤维二糖的抑制作用,提高纤维素的水解率,以期有效利用纤维质原料生产燃料乙醇。

国内外已有构建能利用纤维二糖重组酵母的报道,如Machida等^[19]、Cummings等^[20]的酵母分泌表达 β 葡萄糖苷酶的研究及Tanaka等^[21]的酵母细胞表面固定 β 葡萄糖苷酶的研究等。但分泌或表面表

达 β 葡萄糖苷酶时,发酵液的复杂成分和较高的酒精浓度对 β 葡萄糖苷酶的活性非常不利,不利于纤维素的降解利用。本研究提出了 β 葡萄糖苷酶在酵母细胞内适量表达,纤维素酶降解的纤维二糖进入细胞被进一步利用的思路。这样,重组酵母协同纤维素酶就可能有效降解利用纤维素进行酒精发酵。

本试验结果表明,通过实现 β 葡萄糖苷酶基因在工业酿酒酵母染色体DNA上的整合,初步达到了预期的目标,在同步发酵纤维素产生酒精时,纤维二糖的积累降低,部分消除了其对纤维素酶的反馈抑制作用,发酵液酒精度得到较大幅度增加。但是,由于研究过程中目的基因的整合拷贝数不高,因此在酵母中表达时酶活较低。适用于工业酿酒酵母的高拷贝整合质粒的构建、能高活力表达 β 葡萄糖苷酶基因的筛选等进一步的研究工作正在进行。

[参考文献]

- [1] Tolan J S, Foody B. Cellulase from submerged fermentation[J]. *Adv Biochem Engin Biotech*, 1999, 65: 41-67.
- [2] Esterbauer H, Steiner W, Labudova I, et al. Production of *Trichoderma cellulase* in laboratory and pilot scale[J]. *Biores Technol*, 1991, 36: 51-65.
- [3] Holtzapple M, Cognata M, Shu Y C, et al. Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase by sugars and solvents[J]. *Biotech Bioeng*, 1990, 36: 275-287.
- [4] Stockton D C, Mitchell D J, Grohmann K, et al. Optimum β glucosidase supplementation of cellulase for efficient conversion cellulose to glucose[J]. *Biotech Lett*, 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] Misawa, Nakamura K. Expression and stability of a β glucosidase gene of *ruminococcus albus* in *Zymomonas mobilis*[J]. *Agric Biol Chem*, 1989, 53(3): 723-727.
- [7] 曾黎辉, Poulton J 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.
- [8] Rajoka M I, Bashir A, Hussain S R, et al. Cloning and expression of beta-glucosidase genes in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* using shuttle vector pYES 2.0[J]. *Folia Microbiol*, 1998, 43(2): 129-135.
- [9] Morana A, Moracci M, Ottombrino A, et al. Industrial-scale production and rapid purification of an archaeal beta-glycosidase expressed in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotech Appl Biochem*, 1995, 22(3): 261-268.
- [10] Adam A C, Rubio-Teixeira M, Polaina J. Induced expression of bacterial beta-glucosidase activity in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Yeast*, 1995, 11(5): 395-406.
- [11] 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.
- [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] Murphy K C, Campellone K G, Poteete A R. PCR-mediated replacement in *Escherichia coli*[J]. *Gene*, 2000, 246: 321-330.
- [14] Adams A, Gottschling D E, Kaiser C A, et al. Methods in yeast genetics: a cold spring harbor laboratory course manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998.
- [15] 张梁, 陈蕴, 石贵阳, 等. HPLC法测定玉米浓醪发酵酒精醪液中的纤维二糖和蜜二糖[J]. *食品与生物技术学报*, 2005, 24(2): 89-92.
- [16] 柴政强. 气相色谱法测定丢糟中残留酒精分[J]. *酿酒科技*, 2000(6): 102.
- [17] 张梁, 洪剑辉, 石贵阳, 等. 酿酒酵母纤维二糖代谢途径的搭建[J]. *酿酒科技*, 2005(3): 30-33.
- [18] Wu J, Ju L K. Enhancing enzymatic saccharification of waste newspaper by surfactant addition[J]. *Biotechnol Prog*, 1998, 14: 649-652.
- [19] Machida M, Ohtsuki I, Fukui S, et al. Nucleotide sequences of *Saccharomycopsis fibuligera* genes for extracellular beta-glucosidases as expressed in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1988, 54(12): 3147-3155.
- [20] Cummings C, Fowler T. Secretion of *Trichoderma reesei* beta-glucosidase by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Curr Genet*, 1996, 29(3): 227-233.
- [21] Mitsuyoshi U, Atsuo T. Genetic immobilization of proteins on the yeast cell surface[J]. *Biotech Adv*, 2000, 18: 121-140.

(下转第177页)

Study on the obtaining of sterile explants and callus induction of *Carpesium macrocephalum* Franch. et Sav

L I Yu-ping^{a,b}, WANG Yong-hong^b, ZHANG Qiang^b, FENG Jun-tao^b, ZHANG Xing^b

(a College of Life Sciences; b Biotechnological Pesticides Research and Development Center,

Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: It was the first time to induce the callus of *Carpesium macrocephalum* Franch. et Sav by taking its root as the explants from its seeds in this paper. The results indicated that the aseptis germination rate of seed amounted to 98.80% when its seeds were sterilized with 70% alcohol for 5 min, then 50% NaClO₃ for 30 minutes. It also showed that such factors as basic media, types and concentration of hormones had a great effect on the induction rate, growth and browning time of the callus. The proper callus induction media were selected by orthogonal design, moreover, the kind and suitable level of hormone were ascertained. The basic media were the critical factors to callus induction, then NAA, the optimum medium for callus induction of *Carpesium macrocephalum* Franch. et Sav was B₅ + NAA 3.0 mg/L + 6-BA 0.2 mg/L. Moreover the best effects were obtained by using NAA of 2.0-3.0 mg/L + 6-BA 0.2-0.4 mg/L in B₅ solid mediums. The induction rate of the callus was 100%, and the callus was primrose yellow and loose. By adding 500 mg/L Vc or 10 000 mg/L PVP, the callus kept primrose yellow and vigorous.

Key words: compositae plant; *Carpesium macrocephalum* Franch. et Sav; explant; disinfectant; callus induction

(上接第170页)

Abstract ID: 1671-9387(2006)10-0164-CA

Ethanol fermentation from cellulose by expression of cellobiase gene and disruption of *GPD1* in *Saccharomyces cerevisiae*

ZHANG Lian^a, SHI Gui-yang^a, WANG Zheng-xiang^b, ZHANG Ke-chang^a

(a Laboratory of Biomass Resources, School of Biotechnology; b The Key Laboratory of Industry Biotechnology,

Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi, Jiangsu 214036, China)

Abstract: According to homologous recombination theory, β -glucosidase gene *bgII* from *Trichoderma reesei* was integrated into the key enzyme gene *GDP1* of the glycerol metabolism pathway from industrial *Saccharomyces cerevisiae* chromosome DNA. And multi-copy recombinants were screened through increasing G418 concentration in the medium. It was shown, based on the study, that cellobiose utility capability of the recombinants was increased, glycerol productivity of that was decreased, and the *bgII* gene expression was stable in the host cell. No impact on the cell character appeared after the introduction of extrinsic gene, but the cells fluctuated when growing. When compared with parent industrial *S. cerevisiae* Y to ferment with microcrystalline cellulose for raw material incorporation cellulase, ethanol strength increased by 69% and cellobiose accumulation decreased.

Key words: β -glucosidase; cellobiose; cellulose utility; ethanol fermentation