

文章编号: 0529-6579 (1999) 02-0080-05

α -淀粉酶和糖化酶的表达及酿酒酵母工程菌的构建^{*}

吴晓萍¹, 李文清¹, 罗进贤¹, 后茂立², 林资诚²

(1. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275;

2. 广州市微生物研究所, 广东 广州 510250)

摘 要: 将切除了 5' 端非编码区 50 碱基对片段的黑曲霉糖化酶 GAI cDNA 与大麦 α -淀粉酶基因重组进大肠杆菌—酵母穿梭载体, 构建重组表达质粒 pMAG11, 转化酿酒酵母 GRF18 获得含 α -淀粉酶和糖化酶双基因的酵母工程菌 GRF18 (pMAG11). 在酵母 PGK 基因启动子和终止信号的调控下, α -淀粉酶和糖化酶基因获得高效表达, 99% 的表达产物分泌至胞外. 在含 $w=15\%$ 的可溶性淀粉的 YPS 培养基中培养 44 h, 淀粉水解率达到 99%, 并能发酵产生酒精.

关键词: α -淀粉酶; 糖化酶; 基因表达; 酿酒酵母工程菌; 分解淀粉

中图分类号: Q 55 **文献标识码:** A

利用基因工程技术构建能分解和利用淀粉的酵母工程菌可以克服酵母菌由于缺少水解淀粉的酶类, 淀粉需先糊化, α -淀粉酶液化, 糖化酶糖化的复杂工序, 节省能源和酶制剂, 降低成本, 有重要的应用前景. 80 年代末以来国外多个实验室先后将 α -淀粉酶基因和糖化酶基因分别引入酿酒酵母构建能分解淀粉的酵母工程菌^[1~3], 但淀粉水解能力都不高, 不能用于生产. 本实验室曾将地衣杆菌 α -淀粉酶与黑曲霉糖化酶基因同时引入酿酒酵母, 构建的工程菌在酶的表达和分泌水平及降解淀粉的能力方面都高于国外菌株^[4,5]. 本文报道经 PCR 改造的黑曲霉糖化酶 GAI cDNA 与大麦 α -淀粉酶基因重组于同一表达载体, 转化酿酒酵母后获得能高效表达 α -淀粉酶和糖化酶和水解淀粉能力很强的酵母工程菌.

1 材料和方法

1.1 材 料

1.1.1 菌株和质粒 本实验所用菌株与质粒见表 1.

1.1.2 培养基 大肠杆菌 *E. coli* 的培养和转化用 L-肉汤, 酵母的培养用 YPD, SC, YPGE, YPS 培养基, 酵母的转化用 SOS, SSTOP 及 SORB 培养基, 它们的配方见文 [7].

1.1.3 主要的生化试剂 限制酶 *Hind* III, *Eco*RI 及 T₄ DNA 连接酶为 Promega 公司产品. 低熔点琼脂糖、牛血清蛋白、卵清蛋白购自 Sigma 公司. 蜗牛酶、葡萄糖试剂盒、抗生素等为国产分析纯试剂.

^{*} 基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (940628); 广州市重点项目基金资助项目

收稿日期: 1998-02-20 作者简介: 吴晓萍, 女, 1971 年生, 硕士研究生.

表 1 菌株与质粒
Tah 1 Strains and plasmids

菌株/ 质粒	基因型	来源
大肠杆菌 C600	F ⁻ , thi ⁻ 1, thr ⁻ 1, leuB6, lacY ⁻ 1, tonA21, supE44	Jacob Monod 研究所
酿酒酵母 GRF18	leu2 his3 sta ⁰ ihn ⁰	暨南大学
pBAL7	LEU2, 2 μ ori, pBR322 ori, Amp ^r , barley Amy	广东省微生物所
pMAG17	Amp ^r , pBR322 ori, LEU2, 2 μ ori, GAI ⁽¹⁾	本实验室 ^[6]
pMAG15	Amp ^r , pBR322 ori, LEU2, 2 μ ori, GAI, barley Amy	本实验室 ^[5]
pMAG11	Amp ^r , pBR322 ori, LEU2, 2 μ ori, GAI ⁽¹⁾ , barley Amy	本研究工作

1) 切除了 5' 端非编码区的 GAI cDNA

1.2 方 法

1.2.1 DNA 的制备和操作 大肠杆菌质粒的制备, DNA 的酶解, 酶解片段的回收, DNA 的连接反应及转化均按文 [8] 方法. 酵母原生质体转化参照文 [9] 方法.

1.2.2 淀粉酶阳性菌落的检测和总酶活力测定 参照文 [9] 方法.

1.2.3 发酵液中残余淀粉含量的测定和重组质粒的稳定性检测 参照文 [10] 的方法.

1.2.4 发酵液中酒精含量的测定 采用简易的酒精定量测定法. 先配体积分数为 1%, 3%, 5%, 7% 及 9% 的酒精标准液. 加 3 mL K₂Cr₂O₄ (w= 4% K₂Cr₂O₄ 溶于 5 mol/L H₂SO₄) 溶液于 6 mL 刻度试管内, 将刻度试管置于加有 0.2 mL 饱和 K₂CO₃ 的 50 mL 比色试管内, 加 0.5 mL 酒精标准液于比色试管中, 立即盖好盖子, 摇匀, 于 50 ℃ 保温 5 h. 取出后在刻度管内加入 3 mL 蒸馏水, 摇匀, 测 A₅₆₀ 并以双蒸水代替酒精作对照. 以酒精标准液浓度为横坐标, A₅₆₀ 为纵坐标绘制标准曲线. 测定发酵液中酒精含量时, 用 0.5 mL 发酵液取代酒精标准液, 测得 A₅₆₀ 后, 查标准曲线乘以稀释倍数即得发酵液中酒精含量.

2 结 果

2.1 含淀粉酶和糖化酶双基因的酵母表达载体的构建

为了构建含大麦 α -淀粉酶和黑曲霉糖化酶基因的酵母表达载体, 设想将大麦 α -淀粉酶基因插到含经过改造的糖化酶 GAI cD-

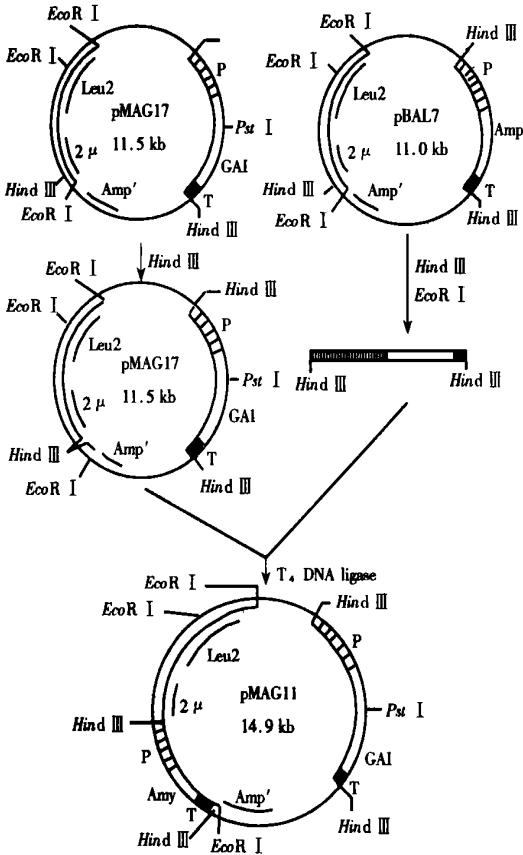


图 1 重组质粒 pMAG11 的构建

Fig 1 Construction of recombinant plasmid pMAG11
GAI 黑曲霉糖化酶基因; Amy 大麦 α -淀粉酶基因;
P, T PCK 启动子及转录终止信号

NA 的质粒 pMAG17 上. 如图 1 所示, 用 *Hind* III 与 *Eco*RI 酶切 pBAL7 (由于 pBAL7 上有 3 个 *Hind* III 位点, 大麦淀粉酶基因在其中 2 个 *Hind* III 位点之间, 若单用 *Hind* III 酶切质粒, 将会产生 3 个大小相似的片段, 不易分开), 用低熔点琼脂糖电泳分离含淀粉酶基因及其两端的 PGK 启动子和转录终止信号的 3.4 千碱基的 *Hind* III 片段与经 *Hind* III 部分酶切的 pMAG17 以适当比例混和, 用 T₄ DNA 连接酶连接后转化大肠杆菌 C600, 在含氨苄青霉素平板上挑选转化子, 经质粒快速检测和酶切分析 (图 2) 找出含大麦 α-淀粉酶基因及其两端调控区的插入片段的重组子, 将该质粒命名为 pMAG11. 从图 2 可见 pMAG11 经 *Eco*RI 酶切后产生 11.5, 2.8 和 0.6 千碱基 3 条带. pMAG17 经 *Eco*RI 酶切后产生 8.1, 2.8, 0.6 千碱基 3 条带, pMAG11 比 pMAG17 大了 3.4 千碱基. pMAG11 经 *Hind* III 酶切后产生 4 条带: 大的 2 条带与 pMAG17 的 2 条大带相同, 小的 2 条带重叠 (这 2 条带的相对分子质量比 2 条大带小, 应该比较窄, 但实际上比另 2 条带宽而亮, 这是 2 条大小相似/相同的带重叠的结果) 分别相当于 pMAG17 的小带及 pBAL7 经 *Hind* III 酶切后产生的小带即大麦淀粉酶基因及其两端的 PGK 启动子及转录终止信号. 这就证明大麦 α-淀粉酶基因已插入 pMAG11, 获得双基因的表达载体.

2.2 α-淀粉酶和糖化酶在酿酒酵母中的表达和分泌

采用原生质体转化法, 将构建的重组质粒 pMAG11 引入酿酒酵母 GRF18, 在不含亮氨酸的 SORB 再生培养基上, 30 ℃ 培养 4 d, 倒碘液于平板上可见菌落周围出现淀粉水解产生的透明圈, 表明酶基因已在酵母中表达并向胞外分泌有活性的酶 (图 3), 为了进一步检测酵母工程菌中 α-淀粉酶和糖化酶的表达和分泌情况, 用 DNS 法测定其总酶活力, 结果如表 2.

表 2 酿酒酵母转化子 GRF18 的酶活力
Tab 2 Enzyme activities of yeast transformants

转化子	酶活力 ¹⁾		分泌率 %
	胞内	胞外	
GRF18 (pMAG11)	1.82	181.99	99.0
GRF18 (pMAG15)	2.28	152.30	98.5
GRF18 (pMAG17)	0.45	109.35	99.5
GRF18 (pBAL7)	0.52	54.59	99.93

1) 单位为 $16.67 \times 10^{-9} \text{ mol}/(\text{s} \cdot \text{mL})$

将 GRF18 (pMAG11)、GRF18 (pMAG17) 及 GRF18 (pBAL7) 的培养上清液走 SDD-PAGE 电泳, 发现 GRF18 (pMAG11) 的泳道上在相对分子



图 2 重组质粒的酶切电泳分析

Fig 2 Electrophoresis analysis of restriction fragments

1 λcl857S7 DNA/ *Hind*III; 2 pMAG17/ *Eco*RI ;
3 pMAG11/ *Eco*RI ; 4 pMAG17/ *Hind*III;
5 pMAG11/ *Hind*III; 6 pBAL7/ *Hind*III



图 3 酵母工程菌的淀粉水解圈

Fig 3 Halos around recombinant yeasts

1 GRF18 (pBAL7); 2 GRF18 (pMAG17);
3 GRF18 (pMAG11)

质量为 43 000 及 71 000 的相应位置上有 2 条新的带与 GRF18 (pMAG17) (71 000) 及 GRF18 (pBAL7) (43 000) 的相应带一致。

表 2 的结果显示大麦 α -淀粉酶和黑曲酶糖化酶已在 GRF18 (pMAG11) 中同时表达, 而且 99.00% 的酶活力都分泌至培养基中。与未切去 5' 非编码区的糖化酶和 α -淀粉酶基因构建的 GRF18 (pMAG15) 相比, GRF18 (pMAG11) 的总酶活力提高了 18.9%。

2.3 酿酒酵母 GRF18(pMAG11)对淀粉的水解和利用

为了检查酿酒酵母 GRF18(pMAG11)水解和利用淀粉的能力, 将其接种于含组氨酸的 SC 选择培养基中, 然后收集菌体转接至含 w 为 15% 的可溶性淀粉的 YPS 培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养, 定时取样, 测定细胞生长情况和淀粉残留量并以 GRF18 (pMAG15) 作对照。图 4a 的结果

显示 GRF18 (pMAG11) 可以在 44 h 内水解 w 为 99% 的淀粉而 GRF18 (pMAG15) 需要 47 h。在含 w 为 10% 淀粉的 YPS 培养基中, 在测定细胞生长, 酶的合成和淀粉水解的过程中亦曾跟踪淀粉水解产物的利用情况, 发现淀粉水解产物可被利用发酵, 24 h 开始即有酒精生成, 而且产率要比 GRF18(pMAG15)高(图 4b)。

2.4 重组质粒 pMAG11 在酵母中的稳定性

为了检测重组质粒在构建工程菌中的稳定性, 挑取 GRF18(pMAG11)单菌落接种于 YPD 液体培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 5 d 后, 取样涂平板, 分离单菌落, 点种于 YPD 完全培养基及缺亮氨酸的选择培养基上, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 d, 在 YPD 培养基上生长而在 SC 培养基上不能生长的即为丢失质粒的转化子。表 3 是重组质粒稳定性检测的结果。

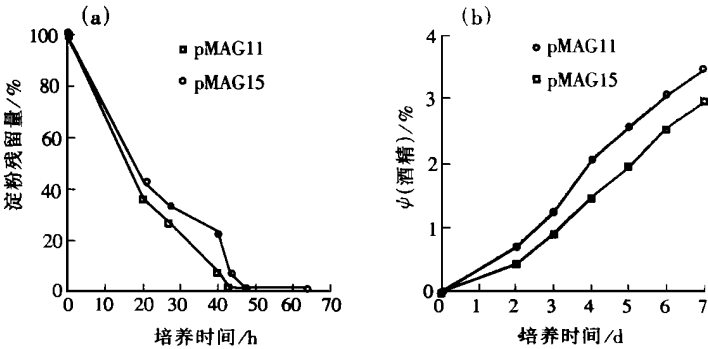


图 4 重组酵母的淀粉水解(a)和酒精生成曲线(b)
Fig 4 Time course of starch hydrolysis(a) and ethanol production(b) of recombinant yeasts

表 3 重组质粒在酿酒酵母工程菌中的稳定性
Tab 3 Stability of recombinant plasmids in *S. cerevisiae*

转化子	生长总菌落数 ¹⁾	不长菌落数 ²⁾	丢失率/ %
GRF18(pBAL17)	516	234	45.3
GRF18(pMAG17)	516	7	1.4
GRF18(pMAG11)	516	26	5.2
GRF18(pMAG15)	516	48	9.3

1) YPD 上生长总菌落数; 2) SC 上不长菌落数

3 讨 论

本文将大麦 α -淀粉酶基因及经过改造切除了 5' 端非编码区的黑曲霉糖化酶 cDNA 重组进同一载体, 获得重组质粒 pMAG11, 引入酿酒酵母后在 PGK 启动子和转录终止信号的控制下获得高效表达, 在本身信号肽引导下, 有 99.0% 的表达产物分泌至细胞外。与未去除 5' 端非编码区糖化酶 cDNA 和大麦 α -淀粉酶基因构建的 pMAG15 相比, GRF18 (pMAG11) 中酶基因的表达水平, 水解淀粉的能力, 产生酒精水平及重组质粒的稳定性等都有提高。去除 5' 端非编码区的 50 碱基对片段除了缩短起始密码 ATG 与启动子的距离外, 50 碱基对片段可能

存在的 RNA 二级结构也会影响基因的表达. 去除 50 碱基对片段的 GAI cDNA 构建的质粒 pMAG17^[6] 在酿酒酵母中的表达水平比未去除 50 碱基对片段的 GAI cDNA 构建的质粒 pMAG69^[11] 要高. 本文中 GRF18(pMAG11) 总酶活力的提高显然是由于其中的糖化酶基因高效表达引起的, 而酶活力的提高又促进淀粉的水解和酒精浓度的增加.

参考文献:

- [1] ROITHSTAIN S J, LARNERS K N, LAZARUS C M, et al. Expression and secretion of wheat α -amylase in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Gene*, 1987, 55: 353.
- [2] PRETORIUS I S, LAING E, PRETORIUS G H J, et al. Expression of *Bacillus* α -amylase gene in yeast [J]. *Current Genetics* 1988, 14: 1.
- [3] COLE G E, McCABE P L, INLOW D, et al. Stable expression of *Aspergillus amawari* glucoamylase in distiller's yeast [J]. *Bio/Technology*, 1988, 6: 417.
- [4] 罗进贤, 何鸣, 李文清, 等. 淀粉酶和糖化酶在酿酒酵母中的表达和分泌 [J]. *生物工程学报*, 1994, 10: 299.
- [5] 李文清, 罗进贤, 叶若邻, 等. 黑曲霉糖化酶 cDNA 的改造及其在酿酒酵母中的表达 [J]. *微生物学通报*, 1998, 25: 205 ~ 209.
- [6] 罗进贤, 李政海, 李文清. 大麦 α -淀粉酶和黑曲霉糖化酶在酿酒酵母中的表达和分泌 [J]. *中国科学(C 辑)*, 1998, 28: 50 ~ 56.
- [7] 李文清, 黎杨, 罗进贤. 黑曲霉糖化酶基因在酿酒酵母中的表达 [J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 1992, 31(2): 1 ~ 7.
- [8] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS J T. *Mol. cloning a laboratory manual* [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Lab, 1994.
- [9] BURGESS P M, PERCIVAL K J. Transformation of yeast spheroplast without cell fusion [J]. *Anal Biochemistry*, 1987, 163: 391.
- [10] KIM K, PARK C S, MATTON J R. High efficiency, one-step starch utilization by transformed *Saccharomyces* cells which secrete both yeast glucoamylase and mouse α -amylase [J]. *Appl Environm Microbiol*, 1988, 54: 966.
- [11] 李文清, 何鸣, 罗进贤. 黑曲霉葡萄糖淀粉酶在酿酒酵母中的表达和分泌 [J]. *中国科学(B 辑)*, 1994, 24: 942.

Expression of α -amylase and Glucoamylase Genes in *S. cerevisiae* and Construction of Starch Degrading Yeast Strain

WU Xiao-ping^{*}, LI Wen-qing, LUO Jin-xian

Abstract: 5' Noncoding region deleted glucoamylase GAI cDNA of *A. niger* were cloned into an *E. coli*-yeast shuttle vector resulting in recombinant plasmid pMAG11 which was then transformed into *Saccharomyces cerevisiae* GRF18. The α -amylase and glucoamylase genes under the control of PGK promoter and terminator were efficiently expressed in engineered strain GRF18(pMAG11) and 99% of the expressed product secreted into the medium. The engineered strain hydrolysed 99% of the starch in YPS medium containing 15% soluble starch within 44 hours. The starch hydrolysate was used for fermentation and ethanol production.

Keywords: α -amylase; glucoamylase; gene expression; *Saccharomyces cerevisiae*; starch degradation

^{*} School of Life Sciences Zhongshan University, Guangzhou 510275, China