

黑曲霉木聚糖酶在工业酒精酵母中的分泌表达

李海燕 祝令香 毛爱军 董志扬*

(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)

摘 要 :用重叠延伸 PCR 方法从黑曲霉 (*Aspergillus niger*) UV-11 的基因组 DNA 中克隆出木聚糖酶的 cDNA 基因,构建了由酵母乙醇脱氢酶 (ADH1) 启动子和终止子引导表达、木聚糖酶自身信号肽引导分泌、rDNA 序列介导的酵母整合型分泌表达质粒 pAX2。用 pAX2 与酵母 YEp 型 G418 抗性质粒共转化野生型工业酒精酵母 *S. cerevisiae* 2.346,获得了整合型分泌表达木聚糖酶的酵母重组菌株 XY2。发酵分析表明该工程菌能够明显提高酒精生产率。

关键词 :木聚糖酶 整合分泌表达 酒精酵母工程菌 酒精生产率

中图分类号 :Q78 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2005)01-0135-04

内切木聚糖酶 (endo-1,4-β-D-xylan xylanohydrolase; EC 3.2.1.8) 能够水解木聚糖分子中 β-1,4 糖苷键,把木聚糖降解成为低聚木糖,具有重要的应用价值。在酒精生产原料中存在一定量的半纤维素——主要成分为木聚糖,影响了酒精发酵过程中对淀粉的充分利用,研究表明,在酒精发酵过程中加入一定量的木聚糖酶能够提高淀粉利用率^[1,2],从而提高产酒率,降低酒精生产成本。通过基因工程技术将外源木聚糖酶基因构建在酒精生产酵母中得到表达是一种提高酒精生产效率的有效途径^[3]。各种微生物来源的木聚糖酶

基因在酒精酵母中得到表达已在国际上有较多研究,但在多倍体的工业酒精酵母中整合型的表达仍未见报道^[4-9]。本研究属首次报道将黑曲霉木聚糖酶基因整合到工业酒精酵母染色体上并获得稳定表达,使酒精酵母在发酵过程中分泌木聚糖酶,从而明显提高了酒精产率。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 :表 1 为本研究所用的菌株和质粒。

表 1 本研究所用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

| Strains and plasmids | Phenotype or genotype | Source or reference |
|---------------------------------------|--|------------------------|
| Strains | | |
| <i>Escherichia coli</i> DH5α | <i>supE44 ΔlacU169, recA1</i> | Laboratory stock |
| <i>Aspergillus niger</i> UV-11 | Wild type | Laboratory stock |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 2.346 | Wild type | Laboratory stock |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 229 # | <i>glyA, α-amy</i> | Provided by Prof. Tang |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> XY2 | <i>xynB</i> | This work |
| Plasmids | | |
| pGBT10 | <i>Ap^r, gal4, 2μori, Col E1ori</i> | Laboratory stock |
| pA15BB4 | <i>Ap^r, 18S rDNA</i> | Laboratory stock |
| pBEJ16 | <i>Ap^r, G418^r, 2μori</i> | Provided by Prof. Tang |
| pAX2 | <i>Ap^r, 18S rDNA, xynB</i> | This work |

1.1.2 试剂和酶 :各种 DNA 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、蛋白质分子量标准均购自北京鼎国公司 ;牛小肠碱性磷酸酶购自 Promega 公司 ;DNA 回收试剂盒购自上海申能博彩公司 ;*Taq* DNA 聚合酶购自 Sangon 公司 ;PCR 扩增引物由 Genecore 公司合成 ;Birchwood 木聚糖酶购自 Sigma 公司 ;市售古船牌标准小麦面粉用于发酵试验 ;α-淀粉酶 (1800U/mL) 葡萄糖淀粉酶 (9 万 U/mL) 由中国科学院微生物研究所的扈芝香老师惠

赠。

1.1.3 培养基 :LB 培养基用于细菌培养 ;YPD 培养基用于酵母培养 ;添加 G-418 用于转化后筛选 ;YPGE 培养基用于检测酵母转化子的木聚糖酶的分泌 ;配方均参照文献 [10]。

1.2 曲霉总 DNA 的提取

参照文献 [11] 的方法从黑曲霉 *A. niger* UV-11 中提取基因组 DNA。

基金项目 :国家 863 计划 (2001AA214151) ;国家自然科学基金面上项目 (30170218)

* 通讯作者。Tel 86-10-62551206 ;E-mail :dongzy@sun.im.ac.cn

作者简介 :李海燕 (1976 -) 女,山东泰安人,硕士研究生,主要从事酶学分子生物学研究。E-mail :lhyy205@sohu.com

收稿日期 :2004-05-09, 修回日期 :2004-10-27

1.3 木聚糖酶 *xynB* 基因的克隆

1.3.1 全基因序列的获得 根据已报道的 *xynB* 基因序列^[12] 设计 PCR 扩增引物。Primer P1 5'-ATGCTCACCAAGAACC-3'; Primer P2 5'-TTACTGAACAGTGATGG-3'。以 *A. niger* UV-11 基因组 DNA 为模板,对 *xynB* 基因进行扩增。PCR 反应体系: 10ng 基因组 DNA, 0.25mmol/L dNTP, 0.5 μ mol/L 每种引物, 1 \times PCR 反应缓冲液, 2.5U *Taq* DNA 聚合酶。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 3min, 94 $^{\circ}$ C 50s, 47 $^{\circ}$ C 50s, 72 $^{\circ}$ C 1min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10min。扩增片段连接到 pGEM-T Easy 载体上并测序鉴定。

1.3.2 去除内含子 根据定点突变的原理,合成一对部分互补的跨过 *xynB* 基因内含子的引物。Primer B1: 5'-TGATGTCTGCGCACTTCCAGG-3'; Primer B2: 5'-AGTGCAGGACATCACCTACAG-3'。以 *xynB* 全基因作为模板,分别以引物对 P1/B1 以及 B2/P2 进行 PCR 扩增,得到部分互补的两个外显子序列,进行胶纯化和回收,再以这两个外显子作为二次 PCR 的模板,以 P1/P2 为引物进行扩增,得到最终的 *xynB* cDNA 序列,然后将 PCR 产物进行纯化、连接、转化及阳性克隆的筛选。并对得到的重组质粒进行测序分析。

1.4 表达载体的构建

DNA 重组操作参考文献 [13] 进行。用 *Hind* III 和 *Pst* I 双酶切质粒 pGBT10, 切下 *gal4* 基因,在原来位置连接上 *xynB* 基因片段,构建成 pGX-2 质粒;用 *Sph* I 酶切 pGX-2,获得的 *P_{ADHI}-xynB-T_{ADHI}* 片段克隆到质粒 pA15BB4 的 *Sph* I - *Sph* I 位点,该位置上的酵母 DNA 序列被替换,从而构建成酵母整合型表达质粒。

1.5 多倍体工业酒精酵母的转化和鉴定

1.5.1 工业酒精酵母的转化 采用 Saki 方法^[14] 和醋酸锂法^[15] 进行工业酒精酵母的转化,并加以改进。将 *S. cerevisiae* 2.346 的单菌落接种到 5mL YPD 液体培养基中,30 $^{\circ}$ C 培养过夜,细胞密度达到 2×10^6 个/ml (OD_{600} 值约为 0.1),取适量过夜培养菌液接种到 50mLYPD 液体培养基中,培养 2~4h,使细胞密度达到 OD_{600} 值约为 0.4。取适量菌液在 5mL 离心管中 4000r/min 离心 5min,收集细胞,无菌超纯水洗涤两次。用 200 μ L 锂盐溶液(80%纯水;10% TE \times 10;10% 醋酸锂)重悬细胞,再加入 14 μ L 鲑鱼精 DNA(200 μ g)作为担体 DNA,5 μ L 用 *Sma* I 线性化的表达载体 pAX2(1 μ g/ μ L)和 1 μ L 抗性质粒 BEJ16(100ng/ μ L),加 1mL PEG 溶液(80% PEG4000;10% TE \times 10;10% 醋酸锂),混匀。30 $^{\circ}$ C 100r/min 振荡培养 30min,42 $^{\circ}$ C 热激 20min,离心彻底去除 PEG 溶液,沉淀中加入 2mL YPD 液体培养基,30 $^{\circ}$ C 100r/min 振荡培养 4~5h。4000r/min 离心 30s,去上清后沉淀加入 100 μ L YPD 培养基,涂布 YPD 平板,30 $^{\circ}$ C 培养 2~3d 至转化子出现。

1.5.2 酵母转化子的 PCR 鉴定 参照文献 [16] 的方法提取酵母转化子基因组 DNA,以此作为 PCR 反应模板,以 P1/P2 为引物进行 PCR 扩增,产物经琼脂糖凝胶电泳分析。

1.5.3 刚果红法检测转化子分泌表达木聚糖酶:滤纸片置于转化子菌株培养数天的发酵上清液中,取出后平铺在含 0.2% 木聚糖的 YPD 平板上,将平板置于 50 $^{\circ}$ C 水浴中约 1h,

去掉滤纸片后用 0.1% 刚果红染色 40min,1mol/L NaCl 脱色 30min,产生透明圈的为阳性转化子。

1.5.4 表达产物的酶学性质测定 采用 DNS 法检测酵母转化子表达的木聚糖酶的酶活^[17]。用不含葡萄糖的 YPGE 培养基培养酵母转化子,取一定量的发酵液上清与用 0.1mol/L 醋酸缓冲液(pH5.0)配成的 1% 的木聚糖溶液混合,50 $^{\circ}$ C 反应 15min,加入 0.6mL DNS 试剂,煮沸 10min,用蒸馏水定容至 5mL 后测 550nm 光吸收。定义每分钟分解木聚糖生成 1 μ mol 还原糖所需酶量为 1 个酶活性单位(IU)。

1.5.5 重组菌株表达产物的 SDS-PAGE 分析:将 PCR 筛选出的酵母转化子接种到 YPD 培养液中,30 $^{\circ}$ C 培养 6d,离心取上清,经冷冻干燥把上清液浓缩 5 倍进行 SDS-PAGE 分析。

1.6 酒精酵母基因工程菌酒精发酵分析

1.6.1 糖化醪的制备:1000g 小麦面粉加入 65 $^{\circ}$ C 的 3500mL 水,调 pH 到 6.2,加热至 95 $^{\circ}$ C,加入液化酶 20000U,搅拌,液化 45min 后,煮沸 10min 灭活酶,降温至 60 $^{\circ}$ C,调 pH 到 4.0,加入糖化酶 200000U 搅拌,60 $^{\circ}$ C 保温糖化 3h。

1.6.2 发酵实验 将重组菌株和对照菌株分别接种于含 5mL YPD 液体培养基的试管中,30 $^{\circ}$ C 振荡过夜,然后转接到三角瓶的 YPD 培养基中培养过夜,细胞密度达到 2×10^7 细胞/mL (OD_{600} 约为 1.0) 作为种子液。100mL 三角瓶 1~3# 分别装入上述糖化醪 100mL,分别接种 18mL 过夜种子液,接种量为 15%,30 $^{\circ}$ C 静置发酵,定时振荡。发酵后,测定其酒精含量。

1.6.3 酒精含量的测定:采用 HPLC 法进行酒精含量测定。测定条件:色谱柱 Aminex HPX-87H,流动相 5mmol/L H_2SO_4 溶液,流速 0.6mL/min,检测器 Refractive Index。酒精含量与酒精峰高成正比,以 10%(W/V) 酒精为标准,测定样品酒精峰高,按比例推算样品酒精含量。

2 结果

2.1 *xynB* 基因的克隆

以 P1/P2 为引物,以黑曲霉 *A. niger* UV-11 基因组 DNA 为模板由 PCR 扩增出约 745bp 的完整木聚糖酶基因 *xynB*,克隆到 pGEM-T Easy 载体上。序列分析表明该基因含有一个 67bp 的内含子和 37 个氨基酸的信号肽。它与 It(1994) *xynB* 序列的同源性为 91%。进一步去除内含子后得到 *xynB* 基因的 cDNA 序列,大小为 678bp。

2.2 酵母整合型表达载体的构建

构建成的酵母整合型表达质粒 pAX-2 携带 Amp 抗性,*xynB* 基因(带自身信号肽),真核生物 18S rDNA 序列以及整合位点 *Sma* I。

2.3 木聚糖酶基因在工业酒精酵母中的整合表达

通过改良的醋酸锂法将整合型表达质粒 pAX-2 与 G418 抗性质粒 pBEJ16 共转化酒精酵母 *S. cerevisiae* 2.346,在含 200 μ g/mL G418 的 YPD 平板上得到抗 G418 的转化子,抗性转化子的转化效率为 10^4 个转化子/ μ gDNA。随机挑取上述转化子,提取酵母基因组 DNA 作 PCR 鉴定。由于质粒 pAX-2 缺少真核复制位点而不能在酵母中独立复制,所以若基因组

经扩增得到有 670bp 大小(木聚糖酶基因)的特异性条带,即表示表达载体 pAX-2 已经整合到酵母染色体上(图 1)。整合转化子的转化效率约为 500 个转化子/ μgDNA 。

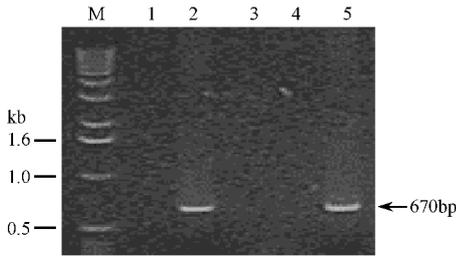


图 1 PCR 筛选转化子的凝胶电泳分析

Fig.1 Identification of the transformant by PCR

M. 1kb Marker; 1. Host strain; 2. Positive control pAX2; 3 and 4.

Strains without *xynB*; 5. Recombinant harboring with *xynB*.

以获得的整合转化子 XY2 进行工程菌的性质研究。SDS-PAGE 分析表明在重组菌株 XY2 的分泌表达产物中出现了分子量为 21kD 左右的蛋白条带,而对照野生型菌株的表达产物没有对应条带。根据氨基酸序列分析,黑曲霉木聚糖酶共有 189 个氨基酸,分子量理论值为 20.7kD,所以初步认为该蛋白条带是分泌表达的木聚糖酶蛋白(图 2)。同时平板刚果红染色法表明,重组菌株 XY2 能够分泌表达木聚糖酶。

2.4 转化子的木聚糖酶酶活分析

将重组工业酒精酵母菌株接种到 250mL 三角瓶的 25mL 培养基中,30℃ 180r/min 摇床培养。以野生型酵母为对照,检测上清液的木聚糖酶酶活。随着培养时间的延长,酶活逐渐升高,到大约 7d 达到最大值 5.5U/mL。测得该重组表达

酶的最适温度为 50℃,最适 pH 值为 5.0。

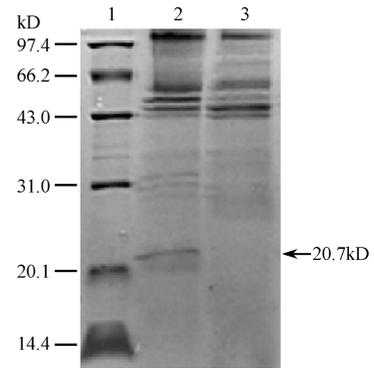


图 2 重组菌株 XY2 表达产物的 SDS-PAGE

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of expression protein of the recombinant

1. Protein molecular weight marker; 2. *S. cerevisiae* XY2 (*xynB*); 3. *S. cerevisiae* 2.346.

2.5 酵母工程菌酒精发酵分析

在以小麦面粉为原料的发酵实验中,重组酵母菌株 XY2 产生的木聚糖酶,降解了原料中半纤维素的网状结构,释放出更多淀粉。为了利用这部分淀粉,我们采用分泌糖化酶的工程菌 *S. cerevisiae* 229# 协助重组酵母菌株 XY2 发酵,并以野生型 *S. cerevisiae* 2.346 与 *S. cerevisiae* 229# 各半的混合菌为对照。在最初的 36h 内,两发酵液的酒精含量大致相同;36h 以后至发酵结束,*S. cerevisiae* XY2/229# 的酒精含量渐渐明显高于 *S. cerevisiae* 2.346/229#,说明重组酵母菌株 XY2 与 *S. cerevisiae* 2.346 相比提高了酒精产量(表 2)。

表 2 分泌木聚糖酶酵母工程菌 XY2 的酒精发酵分析

Table 2 Analysis of alcohol production of XY2 compared with host strain

| Experiment times | Strains | Alcohol production in fermentation course/% (W/V) | | | | | |
|------------------|---------|---|------|------|------|------|------|
| | | 0h | 12h | 24h | 36h | 48h | 60h |
| 1st | ES | 0 | 3.04 | 4.02 | 6.30 | 7.70 | 7.72 |
| | CS | 0 | 3.20 | 4.04 | 6.25 | 7.04 | 7.02 |
| 2nd | ES | 0 | 3.08 | 4.10 | 6.38 | 7.76 | 7.75 |
| | CS | 0 | 3.20 | 4.09 | 6.29 | 7.12 | 7.10 |
| 3rd | ES | 0 | 2.98 | 3.92 | 6.25 | 7.65 | 7.62 |
| | CS | 0 | 3.15 | 3.97 | 6.20 | 7.01 | 6.98 |

ES (experimental strains) :XY2/229# ;CS (control strains) 2.346/229# .

3 讨论

迄今为止,来自于不同微生物的内切木聚糖酶已经在酵母中得到表达,主要用于酶制剂的大量制备^[18]、纸浆漂白和生物质降解^[19,20]。本研究从黑曲霉中克隆得到的木聚糖酶属于酸性木聚糖酶,能够在酒精发酵的酸性环境中有效作用,对降解生产原料中的半纤维素,释放更多淀粉非常有利。

国际上应用重组技术改造野生型酵母菌株的报道较少。Monfort^[8]等采用附加型表达载体把内切木聚糖酶 X24 引入工业面包酵母,工程菌的稳定性有待提高。本研究在国内首次把 *A. niger* UV-11 的木聚糖酶基因引入多倍体野生型的工

业酒精酵母染色体中并得到整合型表达。酶活检测证明,本研究使用的方法对外源基因转化工业酒精酵母是完全可行的。

重组菌株 *S. cerevisiae* XY2 产生的木聚糖酶的最适 pH、最适温度均与原始菌株 *A. niger* UV-11 的性质一致,且分泌到胞外,说明 *xynB* 基因本身的信号肽在工业酵母中也能有效作用。

为使木聚糖酶能在酒精酵母中长期稳定表达并且较少影响其本身的产酒精能力,我们使用了组成型启动子引导目的基因的酵母 YIp 型表达载体。发酵分析结果说明,随着发酵时间的延长,酒精酵母能够分泌表达木聚糖酶,使酒精产

量比原始菌株有明显提高。

将重组菌株在 YPD 平板上连续转接 10 次,并分别在 3 个月和 6 个月后根据上述方法重新检测菌株基因组中的 *xynB* 基因以及发酵液中的木聚糖酶活力,检测结果与转接传代以前相比基本不变,说明该整合型重组工业菌株稳定性较高。

参 考 文 献

- [1] 秦耀宗. 酒精工艺学. 北京:中国轻工业出版社,1998,44-50.
- [2] James J, Simpson B K. Application of enzymes in food processing. *CRC in Food Sci and Nutri*,1996,36(5):437-463.
- [3] Bothast R J, Nichols N N, Dien B S. Fermentations with new recombinant organisms. *Biotechnol Prog*,1999,15:867-875.
- [4] Moreau A, Durand S, Morosoli R. Secretion of a *Cryptococcus albidus* xylanase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*,1992,116(1):109-113.
- [5] Crous J M, Pretorius I S, van Zyl W H. Cloning and expression of an *Aspergillus kawachii* endo-1, 4-beta-xylanase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*,1995,28(5):467-473.
- [6] Perez-Gonzalez J A, De Graaff L H, Visser J, et al. Molecular cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of two *Aspergillus nidulans* xylanase genes. *Appl Environ Microbiol*,1996,62(6):2179-2182.
- [7] La Grange D C, Pretorius I S, Van Zyl W H. Expression of a *Trichoderma reesei* β -xylanase gene (*xyn2*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*,1996,62(3):1036-1044.
- [8] Monfort A, Blasco A, Prieto J A, et al. Combined expression of *Aspergillus nidulans* endoxylanase X24 and *Aspergillus oryzae* α -amylase in industrial baker's yeasts and their use in bread making. *Applied and Environmental Microbiology*,1996,10:3712-3715.
- [9] Nuyens F, van Zyl W H, Iserentant D, et al. Heterologous

expression of the *Bacillus pumilus* endo-beta-xylanase (*xynA*) gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*,2001,56(3-4):431-434.

- [10] Burgers P M, Percival K J. Transformation of yeast spheroplasts without cell fusion. *Analytical Biochem*,1987,163:391-397.
- [11] 朱 衡,瞿 峰,朱立煌. 利用氯化苄提取适于分子生物学分析的真菌 DNA. *真菌学报*,1994,13(1):34-40.
- [12] Fukusaki E, Panbangred W, Shinmyo A, et al. The complete nucleotide sequence of the xylanase gene (*xynA*) of *Bacillus pumilus*. *FEBS Letters*,1984,171:197-201.
- [13] Sambrook J, Frisch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989.
- [14] Sakai K, Yamamoto M. Transformation of the yeast, *Saccharomyces carlsbergensis*, using an antibiotic resistance marker. *Agric Biol Chem*,1986,50:1177-1182.
- [15] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E. 精编分子生物学实验指南. 颜子颖,王海林,译. 北京:科学出版社,1998,509-510.
- [16] Cummings C, Fowler T. Secretion of *Trichoderma reesei* beta-glucosidase by *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*,1996,29:227-233.
- [17] Somogyi M. Notes on sugar determination. *The Journal of Biological Chemistry*,1952,195:19-23.
- [18] 张红莲,姚一斌,王亚茹,等. 链霉菌 *Streptomyces olivaceoviridis* A1 木聚糖酶基因 *xynA* 在大肠杆菌及毕赤酵母中的高效表达. *生物工程学报*,2003,19:41-45.
- [19] Li X, Jungdahl L G. Expression of *Aureobasidium pullulans* *xynA* in and secretion of the xylanase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl and Environ Microbiol*,1996,62:209-213.
- [20] Crous J M, Pretorius I S, Van Zyl V M. Cloning and expression of an *Aspergillus kawachii* endo-1, 4- β -xylanase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*,1995,28:467-473.

Integrative expression of *XynB* of *Aspergillus niger* UV-11 in industrial yeast

LI Hai-yan ZHU Ling-xiang MAO Ai-jun DONG Zhi-yang*

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

Abstract: The cDNA sequence of β -xylanase gene (*xynB*) was cloned from *Aspergillus niger* UV-11. It was inserted into the yeast expression vector and the recombinant plasmid pAX2 was obtained. The plasmid pAX2 was introduced into an industrial *S. cerevisiae* 2.346 and integrated into yeast genome by co-transformation of a YE type plasmid pBEJ16 carrying G418 resistance. The stable engineered yeast strain XY2 was obtained. It could express and secret extracellular xylanase, and enhance the alcohol production in wheat flour fermentation compared with the host strain *S. cerevisiae* 2.346.

Key words β -xylanase, Integrative expression, Industrial yeast, Alcohol production