

## $\alpha$ -淀粉酶和糖化酶在酿酒酵母中的表达和分泌

罗进贤 何 鸣 李文清 张添元

(中山大学生物工程研究中心, 广州 510275)

**摘 要** 将地衣芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶基因及黑曲霉糖化酶 cDNA 重组进大肠杆菌-酵母穿梭质粒, 转化酿酒酵母, 构建能分解淀粉的酵母工程菌。酶活力测定和酶学性质分析的结果显示: 在酵母 MF- $\alpha$ 1 因子及磷酸甘油酸激酶基因的启动子和终止信号的调控下,  $\alpha$ -淀粉酶和糖化酶基因在酵母中获得高表达并向胞外分泌这两种酶。构建的酵母工程菌在含 10% 淀粉的培养基中 6 天内能水解 97% 的淀粉, 重组质粒能在酵母中较稳定地存在。

**关键词**  $\alpha$ -淀粉酶, 糖化酶, 基因表达, 酿酒酵母

近年来, 国外多个实验室先后把各种来源的  $\alpha$ -淀粉酶基因和葡萄糖淀粉酶 (糖化酶) 基因引入酿酒酵母<sup>[1-5]</sup>, 构建能分解淀粉的菌株。我们曾将地衣芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶基因<sup>[6]</sup>及黑曲霉糖化酶 GAI 的 cDNA<sup>[7,8]</sup>转入酿酒酵母, 获得表达和分泌。本文报道将  $\alpha$ -淀粉酶基因和糖化酶的 cDNA 重组于同一酵母表达载体, 转化酿酒酵母, 利用酵母 MF- $\alpha$ 1 因子及磷酸甘油酸激酶 (PGK) 基因的调控序列, 实现  $\alpha$ -淀粉酶和糖化酶在酿酒酵母中同时表达和分泌, 构建的酵母工程菌能高效分解淀粉。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

1.1.1 地衣芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶基因和黑曲霉糖化酶 cDNA: 为本课题组克隆获得<sup>[9]</sup>。

表 1 菌株和质粒  
Table 1 Strains and plasmids

| Strains & plasmids              | Genotype   | Source                         |
|---------------------------------|--|--------------------------------|
| Strains                         |  |                                |
| <i>Escherichia coli</i>         |  |                                |
| C600                            | thr, leu, thi, sup, tonA   | Jacob & Monod Institute        |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |  |                                |
| GRF18                           | leu2, his3, sta <sup>o</sup> , ihn <sup>o</sup>                          | Jinan University               |
| Plasmids                        |  |                                |
| YE $\mu$ MA8-3                  | Amp <sup>r</sup> , LacZ, pBR322 ori, 2 $\mu$ ori, Leu2, amy <sup>-</sup> | This laboratory <sup>[6]</sup> |
| pMAG69                          | Amp <sup>r</sup> , pBR322 ori, 2 $\mu$ ori, Leu2, GA I                   | This laboratory <sup>[8]</sup> |
| YE $\mu$ MAG27                  | Amp <sup>r</sup> , pBR322 ori, Amy, 2 $\mu$ ori, Leu2, GA I              | This study                     |

**1.1.2 菌株与质粒：** 本研究所用菌株和质粒如表 1，YEpMA8-3 是含地衣芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶基因的大肠杆菌-酵母穿梭质粒，pMAG69 是含黑曲霉糖化酶 GAI cDNA 的大肠杆菌-酵母穿梭质粒。

**1.1.3 培养基：** 大肠杆菌的培养和转化用 LB 培养基，酵母的培养和原生质体转化用的培养基有 YPD、YPSB、YPGE、YNB、SC 及 SORB 等培养基，其成分见文献 [7]。

**1.1.4 生化试剂：** 限制酶 Hind III、T4 DNA 连接酶为 GIBCO-BRL 公司产品；低熔点琼脂糖、BSA、ATP 等分别购自 Sigma 公司和 Serva 公司，其余为国产分析纯试剂。

## 1.2 方法

**1.2.1 质粒的检测和制备：** 大肠杆菌质粒的检测和制备按 Sambrook 的方法<sup>[10]</sup>，酵母质粒的检测按 Sherman 的方法<sup>[11]</sup>。

**1.2.2 质粒的酶解、酶解片段的回收：** 参照文献 [10] 的方法。

**1.2.3 DNA 分子的连接和大肠杆菌转化：** 按 Sambrook 的方法<sup>[10]</sup>。

**1.2.4 酵母原生质体转化：** 按 Burgers 的方法<sup>[12]</sup>。

**1.2.5 淀粉酶阳性菌落的检测和酶活力测定：** 见文献 [7]。一个酶活力单位定义为 pH6.0，30℃ 的条件下每小时产生 1mg 葡萄糖的酶量。

**1.2.6 淀粉水解产物的纸层析鉴定：** 取适量的培养上清液与 1% 可溶性淀粉混匀，在 60℃，pH6.0 的条件下保温 1 小时，在新华 1 号滤纸上点样，以正丁醇：吡啶：水=6：4：3 为展开剂，进行纸层析，上行 2 次，用苯胺-邻苯二甲酸显色，与标准样品比较，分析水解产物的成分。

**1.2.7 培养液中剩余淀粉含量的测定和重组质粒的稳定性检测：** 参考 Kim 的方法<sup>[13]</sup>。

## 2 结 果

### 2.1 含 $\alpha$ -淀粉酶和糖化酶基因的酵母表达载体的构建

为使  $\alpha$ -淀粉酶和糖化酶基因能在酿酒酵母中同时表达，将这两个基因重组进同一酵母质粒，构建表达载体。地衣芽孢杆菌的  $\alpha$ -淀粉酶基因位于质粒 YEp MA8-3 上，该基因在 MF- $\alpha$ 1 因子的启动子和信号序列的调控下已在酿酒酵母中表达和分泌<sup>[6]</sup>。如图 1 所示，用 Hind III 把质粒 pMAG69 上的含 PGK 启动子-糖化酶 cDNA-PGK 终止序列的 4.0kb 的 DNA 片段切出，用低熔点琼脂糖凝胶电泳分离，然后将此 4.0kb 的片段以适当比例与经 Hind III 酶解的质粒 YEpMA8-3 混合，用 T4 DNA 连接酶连接后转化大肠杆菌 C600，在氨苄青霉素平板上筛选转化子并经质粒快速检测找出含插入片段的重组子。图 2 是重组质粒及 YEpMA8-3 和 pMAG69 的 Hind III 酶解片段的凝胶电泳图，pMAG69 经 Hind III 酶切后产生 3 条带，分别为 4.3kb、4.0kb 和 3.3kb，其中 4.0kb 的带是含糖化酶 cDNA 及 PGK 启动子和终止序列的片段，重组质粒经 Hind III 酶解后产生两条带，大的带与 YEpMA8-3 的 Hind III 酶解片段相同，小带来自 pMAG69 经 Hind III 酶切后产生的 4.0kb 片段。这一结果表明，含黑曲霉糖化酶 cDNA 的片段已重组进质粒 YEpMA8-3，将构建的重组质粒命名为 YEpMAG27。

### 2.2 $\alpha$ -淀粉酶和糖化酶在酿酒酵母中的表达和分泌

用原生质体转化法将构建的表达载体 YEpMAG27 引入酿酒酵母 GRF18，在缺亮氨

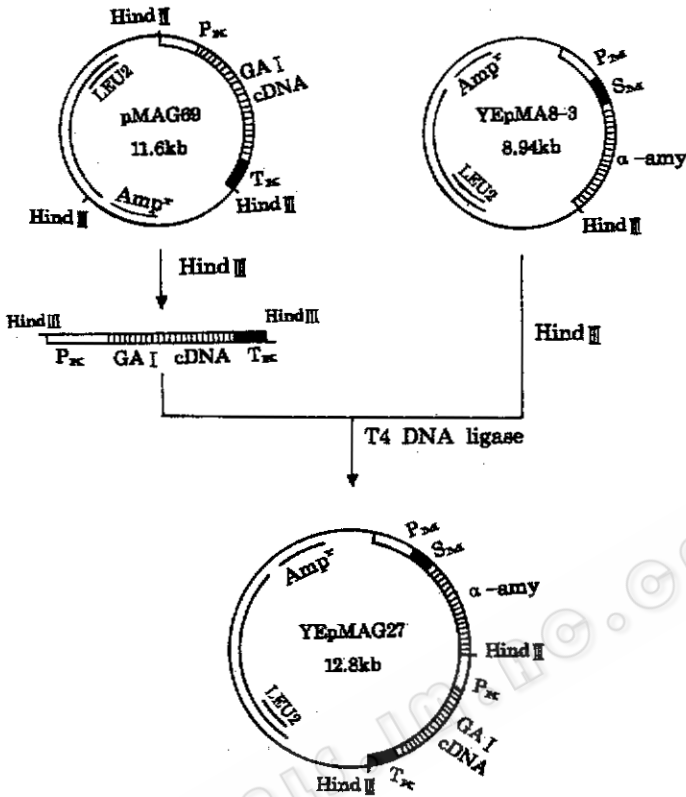


图 1 质粒 YEpmAG27 的构建

Fig. 1 Construction of plasmid YEpmAG27

$P_M$  and  $T_M$  indicate promoter and terminator of PGK gene respectively

$P_M$  and  $S_M$  are promoter and signal sequence of MF- $\alpha$  1 factor gene

酸的 SORB 再生培养基上筛选转化子，转点于缺亮氨酸的 YNB 淀粉培养基上，同时点 GRF18 (YEpmA8-3)，GRF18 (pMAG69) 及 GRF18 受体菌作对照，30℃ 培养 4 天，倒碘液于平板上，可见在 GRF18 (YEpmA8-3)、GRF18 (pMAG69) 及 GRF18 (YEpmAG27) 菌落周围都出现淀粉水解后产生的透明圈 (图 3)，GRF18 在该平板上不生长，而且 GRF18 (YEpmAG27) 形成的透明圈比 GRF18 (YEpmA8-3) 及 GRF18 (pMAG69) 的大，显示前者的酶活较高。

为了研究酶的分泌情况，将以上酵母转化子的单菌落接种于含 2% 葡萄糖的 SC 培养基中，30℃ 振荡培养 60 小时，离心收集细胞，转至不含葡萄糖的 YPGE 培养基中，

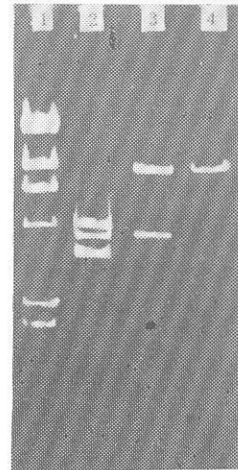


图 2 重组质粒 YEpmAG27 的酶切分析  
Fig. 2 Restriction pattern of plasmid YEpmAG27

1.  $\lambda$  c1857s7 DNA/Hind III, 2. pMAG69/Hind III, 3. YEpmAG27/Hind III, 4. YEpmA8-3/Hind III

30℃振摇 60 小时, 离心, 测定上清液中的酶活, 同时将菌体用蜗牛酶和超声波裂解后测定胞内酶活力, 结果如表 2。

表 2 显示含  $\alpha$ -淀粉酶、糖化酶双基因的转化子 GRF18 (YEpMAG27) 的酶活力比含  $\alpha$ -淀粉酶或糖化酶单基因的转化子 GRF18 (YEpMA8-3) 及 GRF18 (pMAG69) 都高, 而且酶活力基本上分泌到胞外。

表 2 酿酒酵母 GRF18 转化子的酶活力

Table 2 Activities of *S. cerevisiae* GRF18 transformants

| <i>S. cerevisiae</i> | Activity (u/ml) |         |       | Secretion rate (%) |
|----------------------|-----------------|---------|-------|--------------------|
|                      | Extracellular   | Pellets | Total |                    |
| GRF18 (YEpMA8-3)     | 11.2            | 0.42    | 11.64 | 96.2               |
| GRF18 (pMAG69)       | 12.79           | 0.06    | 12.85 | 99.5               |
| GRF18 (YEpMAG27)     | 16.37           | 0.05    | 16.42 | 99.7               |

的活力峰, 分别称为分部 I 和分部 I。



图 3 酵母转化子在淀粉培养基上形成的透明圈  
Fig. 3 White halos formed around yeast transformants

1. *S. cerevisiae* GRF18
2. *S. cerevisiae* GRF18 (YEpMAG27)
3. *S. cerevisiae* GRF18 (pMAG69)
4. *S. cerevisiae* GRF18 (YEpMA8-3)

分别研究了温度和 pH 对分部 I 和分部

II 酶活力的影响, 同时以 GRF18 (YEpMA8-3) 及 GRF18 (pMAG69) 作对照, 结果如图 4 图 5。从图中的曲线可以看出, 温度和 pH 对分部 I 酶活力的影响与对 GRF18 (YEpMA8-3) 的酶的影响是相同的, 而分部 I 与 GRF18 (pMAG69) 的酶学性质是一致的, 从而推测分部 I 含  $\alpha$ -淀粉酶, 分部 II 是糖化酶。

上述结果表明,  $\alpha$ -淀粉酶和糖化酶基因在酿酒酵母 GRF18 (YEpMAG27) 中得到表达并向胞外分泌这两种酶。

为了进一步确认  $\alpha$ -淀粉酶和糖化酶基因已在酵母中同时表达, 把 GRF18 (YEpMAG27) 的培养上清液用 80% 饱和度的  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  盐析后上 DEAE-纤维素柱层析进行初步纯化, 用 DNS 法测酶活, 分别从上柱流出液及 0.5mmol/L 的 NaCl 洗脱液中各测得一个淀粉酶

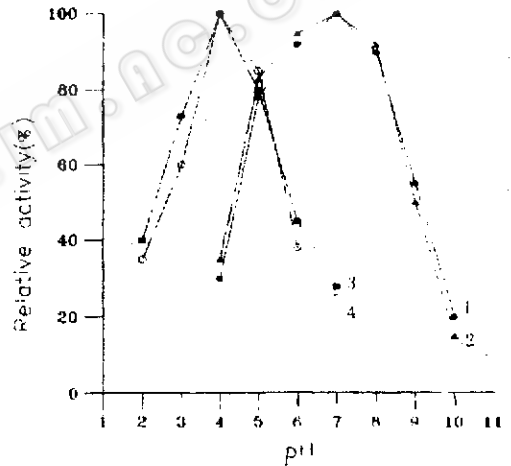


图 4 pH 对酵母转化子 GRF18 (YEpMAG27) 分泌的酶的影响

Fig. 4 pH dependency of enzymes secreted by yeast transformant *S. cerevisiae* GRF18 (YEpMAG27)

1. GRF18 (YEpMA8-3), 2. Fraction I,
3. GRF18 (pMAG69), 4. Fraction II

### 2.3 酿酒酵母转化子 GRF18 (YE<sub>p</sub>MAG27) 对淀粉的水解和利用

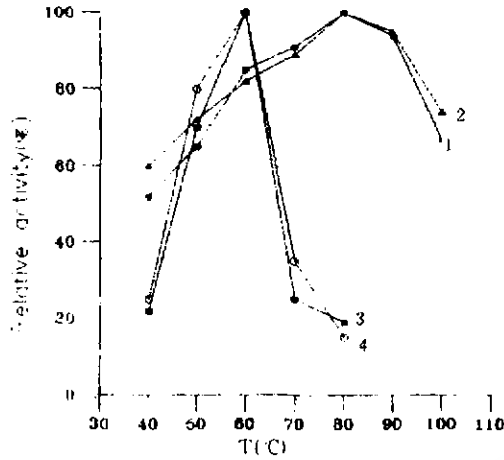


图 5 温度对酵母转化子 GRF18 (YE<sub>p</sub>MAG27) 分泌的酶的影响  
 Fig. 5 Temperature dependency of enzymes secreted by yeast transformant *S. cerevisiae* GRF18 (YE<sub>p</sub>MAG27)

1. GRF18 (YE<sub>p</sub>MA8-3), 2. Fraction I, 3. GRF18 (pMAG69), 4. Fraction II

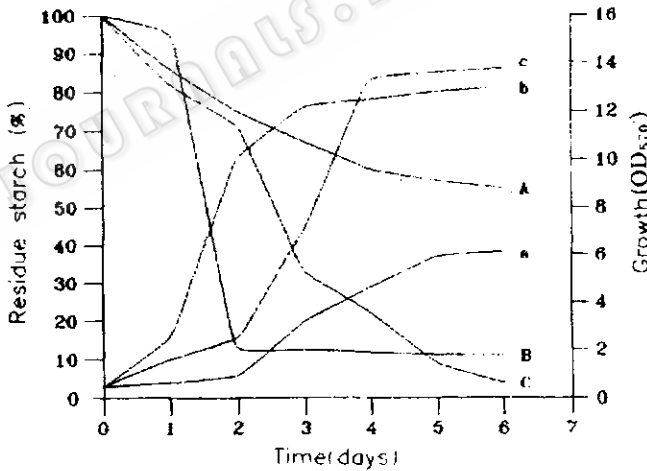


图 6 酿酒酵母工程菌的淀粉水解和生长曲线

Fig. 6 Time course of starch hydrolysis and growth of engineered yeast  
 A. (YE<sub>p</sub>MA8-3), B. (pMAG69) and C. (YE<sub>p</sub>MAG27) show the residue starch  
 a. (YE<sub>p</sub>MA8-3), b. (pMAG69) and c. (YE<sub>p</sub>MAG27) represent the growth curves

为了解酿酒酵母 GRF18 (YE<sub>p</sub> MAG27) 水解和利用淀粉的能力, 挑取 GRF18 (YE<sub>p</sub> MAG27) 单菌落, 接种于含组氨酸的 SC 培养基中, 培养 60 小时后收集菌体, 转接至含 10% 马铃薯淀粉的 YPS 培养基中, 定时取样, 测定淀粉的残留量和细胞生长情况, 同时以只含  $\alpha$ -淀粉酶和糖化酶基因的转化子 GRF18 (YE<sub>p</sub>MA8-3) 及 GRF18 (pMAG69) 作对照。图 6 的结果显示, GRF18 (YE<sub>p</sub>MA27) 利用淀粉的能力比 GRF18 (YE<sub>p</sub>MA8-

3) 及 GRF18 (pMAG69) 强, 经 6 天培养后, GRF18 (YEpmAG27) 对培养基中淀粉的水解率达到 97%。

图 7 是淀粉水解产物的纸层析分析, 转化子 GRF18 (YEpmAG27) 淀粉水解的产物是葡萄糖, 说明水解作用是彻底的, 是两种酶共同作用的结果。

#### 2.4 重组质粒 YEpmAG27 在酿酒酵母中的稳定性

挑取酿酒酵母 GRF18 (YEpmAG27) 单菌落, 接种于 YPD 液体培养基中, 30℃ 振荡培养 5 天后, 取样涂平板, 分离单菌落, 分别点种于亮氨酸缺陷的 SC 选择培养基及 YPD 完全培养基上, 30℃ 培养 2 天。在 YPD 培养基上生长而在 SC 培养基上不能生长者即为丢失质粒的转化子。表 3 的结果可见, 在无选择压力的情况下, 连续培养 5 天, 重组质粒 YEpmAG27 的丢失率只有 2.1%, 表明它能在酿酒酵母中比较稳定地存在。

### 3 讨 论

本文报道利用酵母 MF- $\alpha$ 1 因子和 PGK 基因的调控序列构建表达载体 YEpmAG27, 实现了地衣芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶和黑曲霉糖化酶在酿酒酵母中的同时表达和分泌, 构建的酿酒酵母工程菌培养在含 10% 淀粉的 YPD 培养基中 6 天内能水解其中 97% 的淀粉。

表 3 重组质粒 YEpmAG27 在酿酒酵母 GRF18 中的稳定性

Table 3 Stability of recombinant plasmid YEpmAG27 in *S. cerevisiae*

| Transformant     | Number of colonies in YPD | Number of colonies not grown in SC | Missing rate (%) |
|------------------|---------------------------|------------------------------------|------------------|
| GRF18 (YEpmAG27) | 516                       | 11                                 | 2.1              |

我们曾将  $\alpha$ -淀粉酶基因及糖化酶基因分别转入酿酒酵母, 均获得表达并能利用培养基中的淀粉作底物<sup>[6-8]</sup>, 但限于这两种酶的性质, 它们分别作用时对淀粉的利用有一定的局限。从图 6 可见, 含糖化酶基因的工程菌 GRF18 (pMAG69) 能水解培养基中 87% 的淀粉, 而含  $\alpha$ -淀粉酶基因的 GRF18 (YEpmA8-3) 的淀粉水解率只有 43%。因此, 单独引入  $\alpha$ -淀粉酶或糖化酶基因构建的酿酒酵母工程菌对淀粉的水解和利用是不彻底的。本研究将两个基因重组进同一表达载体引入酿酒酵母获得同时表达, 含双基因的酵母工程菌分泌的淀粉水解酶的活力和降解淀粉的能力都比含单基因的工程菌高, 对 10% 淀粉的水解率达到 97%, 从生产的角度考虑是有利的。含双基因的酿酒酵母 GRF18 (YEpmAG27) 的淀粉水解速度比含糖化酶单基因的 GRF18 (pMAG69) 慢, 其原因有待进一步研究。

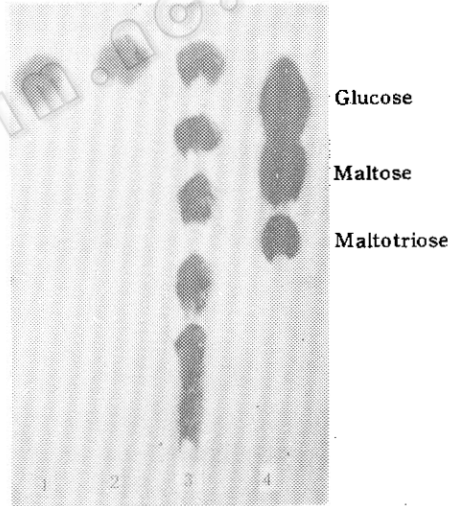


图 7 淀粉水解产物的纸层析分析  
Fig. 7 Paper chromatogram of starch hydrolysed products

1. *S. cerevisiae* GRF18 (YEpmAG27); 2. *S. cerevisiae* GRF18 (pMAG69); 3. *S. cerevisiae* GRF18 (YEpmA8-3); 4. Standards

## 参 考 文 献

- [1] Rothstein S J *et al.* *Gene*, 1987, **55** : 353—356.
- [2] Pretorius I S *et al.* *Current Genetics*, 1988, **14** : 1—8.
- [3] Cole G E *et al.* *Biol/Technology*, 1988, **6** : 417—421.
- [4] Morten Seggaard and Birte Svensson. *Gene*, 1990, **94** : 173—179.
- [5] Shibuya I *et al.* *Bios, Biotech. Biochem.*, 1992, **56** : 884—889.
- [6] 罗进贤等. *中国科学 (B辑)*, 1993, **23** : 1035.
- [7] 李文清等. *中山大学学报*, 1992, **31** (3) : 1—7.
- [8] 李文清等. *中国科学 (B辑)*, 1994, **24** (9) : 942—947.
- [9] 李文清等. *中山大学学报*, 1992, **31** (2) : 67—75..
- [10] Sambrook J *et al.* *Mol. Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Edit. . Cold Spring Harbor Lab. New York, 1989.
- [11] Sherman F *et al.* *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Lab. New York, 1986.
- [12] Burgers P M *et al.* *Anal Biochem.* 1987, **163** : 391—397.
- [13] Kim K *et al.* *Appl Environm Microbiol.* 1988, **54** : 966—971.

## Expression and Secretion of $\alpha$ -amylase and Glucoamylase in *Saccharomyces cerevisiae*

Luo Jinxian    He Ming    Li Wenqing    Zhang Tianyuan

(*Biotech Research Center, Zhongshan University, Guangzhou 510275*)

**Abstract**  $\alpha$ -amylase gene of *Bacillus licheniformis* and glucoamylase cDNA of *Aspergillus niger* were ligated to a *E. coli*-yeast shuttle vector. The resultant plasmid was used to transform *Saccharomyces cerevisiae* to construct starch-degrading yeast strain. The results of enzyme activity assay and enzyme property analysis show that  $\alpha$ -amylase and glucoamylase genes have been expressed simultaneously in yeast under the control of promoters and terminators of yeast MF- $\alpha$  1 factor and PGK genes and over 99% of enzyme activities were secreted to the medium. The engineered yeast strain hydrolyzes 97% of the starch (10%) in the medium. The recombinant plasmid exists stably in yeast.

**Key words**  $\alpha$ -amylase, glucoamylase, gene expression, *S. cerevisiae*