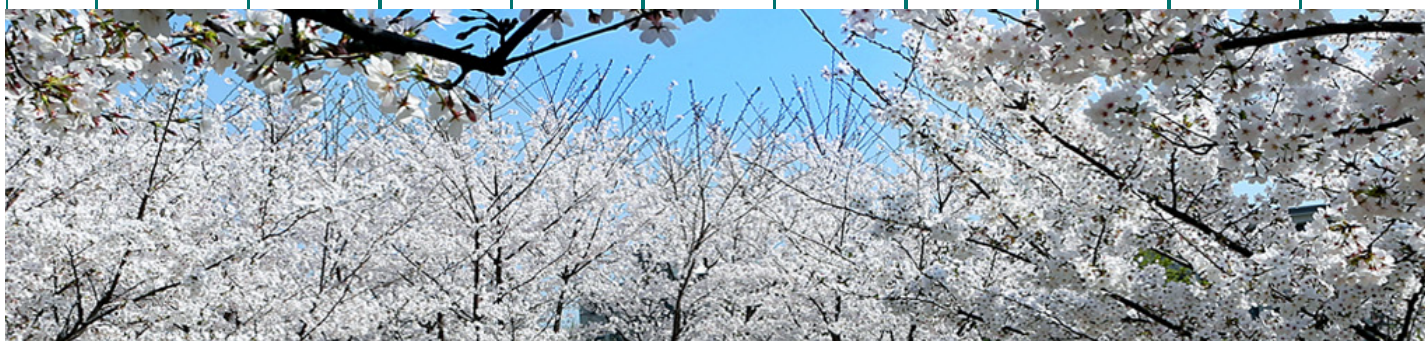




首页	实验室概况	研究方向	承担项目	科研成果	人才培养	学术交流	开放基金	规章制度	测试平台	下载中心
----	-------	------	------	------	------	------	------	------	------	------



人才培养

优秀学位论文

当前位置: 首页 > 人才培养 > 优秀学位论文 > 2012年

毕业生

2015年

2014年

2013年

2012年

2011年

2010年

优秀学位论文

(1) 博士研究生：郭忠鹏（2012年江苏省优秀博士论文）

在读研究生

导师：石贵阳 教授

专业：发酵工程、工业微生物

论文题目：代谢工程改善工业酒精酵母发酵性能

随着石化燃料的日益减少，酒精作为一种清洁可再生的新型能源成为当前各国研究的热点。利用基因工程及代谢工程技术对工业酒精酵母进行改造，可提高菌种的发酵性能，降低酒精的生产成本。本论文以此为出发点，将Cre/loxP重组酶系统与rDNA位点同源重组相结合应用于工业酒精酵母，从以下三个方面对工业酒精酵母进行改造，并在此基础上建立适用于工业酒精酵母的多基因改造策略。

首先，在酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）发酵生产乙醇的过程中，甘油是一种主要的副产物。减少甘油产量可提高乙醇产率和原料利用率。本研究中通过实验设计出最佳的甘油途径改造策略，在敲除工业酒精酵母甘油合成途径关键基因GPD1的同时表达来源于蜡状芽孢杆菌的以NADP⁺为辅酶的非磷酸化3-磷酸甘油醛脱氢酶（GAPN），随后应用Cre/loxP重组酶系统剔除了构建重组菌时引入的抗性标记基因，接着通过rDNA位点同源重组在该重组菌中过量表达了海藻糖合成酶（TPS）及海藻糖磷酸化酶（TPS），获得了重组工业酒精酵母AG1A1（*gpd1^Δ::PPGK1-gapN, PPGK1-TPS1-TPS2*），实现了工业酒精酵母的多基因改造。在葡萄糖浓度为25%的底物发酵中，重组菌AG1A1的甘油得率下降了76.0±0.2%，酒精产量从113.3 g/L提高到123.4 g/L，糖醇转化率提高8.9±0.1%。更为重要的是重组菌AG1A1的最大比生长速率和葡萄糖消耗速率与出发株工业酒精酵母相比基本不变，且该重组菌表现出了更好的耐高糖，耐酒精能力。

其次，作为目前生产酒精的主要原料，淀粉质原料如玉米，饲用大麦等含有较高浓度的蛋白质（玉米：10-13%；饲用大麦：15-18%）。而酿酒酵母无外分泌蛋白酶，不能利用原料中的可溶性蛋白。为提高酒精产率和原料利用率，在本实验中，通过酿酒酵母表面工程技术在工业酒精酵母细胞表面分别呈现表达了其自身以及来源于粗糙脉孢霉（*Neurospora crassa*）的酸性蛋白酶基因，获得重组菌APB2（*PPGK1-PEP4-AG1*）和SA3（*PPGK1-Asp-AG1*）。在以玉米淀粉为基质的酒精发酵实验中，重组菌APB2和SA3生长速率和酒精发酵速率均高于原始酒精酵母，酒精得率分别提高了6.5±0.2%和5.7±0.1%。发酵结束时，重组菌APB2及AS3的酒精产量分别达到126.0 g/L和125.0 g/L，而出发株工业酒精酵母仅为118.2 g/L。由于酵母来源的酸性蛋白酶更适合于目前的同步糖化发酵工艺，因此选择该蛋白酶并继续应用Cre/loxP系统与rDNA位点同源重组在重组菌AG1A1（*gpd1^Δ::PPGK1-gapN, PPGK1-TPS1-TPS2*）细胞表面进行表达，获得重组菌AGS1（*gpd1^Δ::PPGK1-gapN, PPGK1-TPS1-TPS2-PEP4-AG1*）。

另一方面，酒精发酵的糟液中含有一定量的纤维二糖未能被酿酒酵母有效利用。在工业酿酒酵母中引入纤维二糖代谢途径，提高原料利用率的同时也为以后的纤维素酒精发酵打下基础。本研究中，分别在工业酒精酵母的细胞内，胞外和细胞表面表达了来源于扣囊复膜孢酵母（*Saccharomycopsis fibuligera*）的β-葡萄糖苷酶BGL1基因，并对所得的重组菌SBA1（*PPGK1-BGL1*），SBB1（*PPGK1-αF-BGL1*），SBC2（*PPGK1-αF-BGL1-AG1*）进行了有氧条件下的纤维二糖发酵实验，初步说明工业酒精酵母不具有转运纤维二糖的能力。而同时表达纤维二糖透过性酶和β-葡萄糖苷酶的重组菌BPS3（*PPGK1-BGL1-bglP*）不仅具有较好的转运纤维二糖的能力，且该菌株对纤维二糖的利用效率有了明显的提高，在96 h内几乎用尽了10 g/L的纤维二糖并产生4.4 g/L的酒精。因此应用Cre/loxP系统和rDNA位点同源重组，在AGS1（*gpd1^Δ::PPGK1-gapN, PPGK1-TPS1-TPS2-PEP4-AG1*）中同时表达纤维二糖透过性酶和β-葡萄糖苷酶，赋予该重组酵母利用纤维二糖的能力，最终获得重组菌AGPB3（*gpd1^Δ::PPGK1-gapN, PPGK1-TPS1-TPS2-PEP4-AG1-bglP-BGL1*），构建了具有多方面优良性能的新型工业酒精酵母。在以木薯粉为基质的酒精发酵实验中，对重组菌AGPB3以及工业酒精酵母进行发酵性能的比较，结果表

明重组菌AGP3不仅能够利用纤维二糖，且表现出较快的生长速率，耗糖速率和产酒精速率，甘油得率降低了76.8%，酒精产量从118.5 g/L提高到129.3 g/L，酒精得率提高7.5%，达到理论产率的97%。

关键词：酒精；甘油；工业酒精酵母；酸性蛋白酶；纤维二糖

(2) 硕士研究生：闫真（2012年江苏省优秀硕士论文）

导师：徐岩教授

专业：发酵工程

论文题目：重组氧化还原酶体系及其催化不对称还原潜手性羰基化合物的研究

本研究收集了来源于不同微生物的多种立体选择性氧化还原酶，将上述酶编码基因在大肠杆菌中诱导过量表达，并对多种潜手性羰基化合物进行不对称催化反应，研究其催化反应规律。同时，采用了细胞粗酶液作为生物催化剂，构建了粗酶水相催化转化体系及粗酶双相催化转化体系，并研究细胞自生的酶系统，构建了自组装辅酶再生系统，催化多种潜手性羰基化合物，具体内容包括：

(1) 将来源于7种微生物的13个氧化还原酶基因与表达载体pET2lc连接后，转化入 *Escherichia coli* BL21(DE3)中，得到13株重组菌。重组菌在IPTG诱导下进行表达，并对2-羟基苯乙酮进行不对称催化还原。研究发现，在17°C下诱导表达的重组酶比活明显高于30°C和37°C下诱导表达的比活，重组蛋白最适IPTG诱导浓度为1mM。13株菌对苯乙酮、2-羟基苯乙酮和4-氯乙酰乙酸酯(COBE)进行不对称催化还原反应。其中有9株菌能够不对称还原2-羟基苯乙酮得到(R)或(S)型产物，且光学纯度均在90%以上。来源于 *Candida parapsilosis* CCTCCM203011的5株重组菌RCR、SCR、SCR1、SCR2和SCR3均能够不对称还原较高浓度的2-羟基苯乙酮，且光学纯度大于99%，产率大于85%；S1、ADHR和SCR1这3株菌能够不对称还原苯乙酮，其中S1和ADHR效果较好，能够催化还原得到(R)-1-苯基乙醇，光学纯度大于97%，产率分别为47.5%和35.2%；KRD、CR2、S1、C1、C2和SCR1能够不对称还原COBE，其中KRD、CR2和S1效果较好，能得到光学纯度大于98%的(R)或(S)型CHBE，且产率大于50%。

(2) 在构建的13株重组菌中，以SCR1为模式酶，以2-羟基苯乙酮为模式底物，利用细胞自生的酶系统构建自组装NADPH再生系统，以粗酶液的形式构建粗酶催化反应体系。此粗酶反应体系需要葡萄糖及极少量的NADP⁺，此粗酶反应体系能够在水相中还原40 mM 2-羟基苯乙酮，反应时间6h，产率93.9%，光学纯度大于99.9%；同时，鉴于酮类底物在水中溶解度较差的特点，筛选有机溶剂，构建水/十二酸酯两相粗酶反应体系，十二酸酯的比例为20%，此粗酶两相反应体系能够催化还原80 mM 2-羟基苯乙酮，产率87.3%，光学纯度大于99.9%；另外，本研究用此粗酶两相体系催化还原一系列潜手性芳基酮类化合物，在所有15种底物中，2-羟基苯乙酮为此体系的最适底物，2位有取代基的底物的产率明显比2位没有取代基的底物的要高，且在2位有取代的底物中，2-羟基苯乙酮的衍生物效果比2-溴苯乙酮的衍生物效果好；同时，在所有反应中，无论产率高低，只要底物有反应，产物的光学纯度都大于99%；实验结果显示粗酶双相体系的不对称催化还原效果无一例外的优于全细胞反应体系。

(3) 从本研究构建的13株重组菌中，筛选出CR2能够不对称还原COBE得到(R)-4-氯-3-羟基丁酸乙酯(S)-CHBE，S1能够不对称还原COBE得到(R)-CHBE。S1粗酶体系在酶浓度为40%时能够还原底物浓度为125 mM的COBE，得到(R)-CHBE，产率为61.2%，光学纯度为99.9%；CR2粗酶体系在酶浓度为20%时，可以还原底物浓度为125 mM的COBE得到(S)-CHBE，产率为68.6%，光学纯度为99.9%。



技术支持：信息化建设与管理中心
校内备案号：JW备170139

地址：江苏省无锡市蠡湖大道1800号
邮编：214122
联系电话：0510-85912032
服务邮箱：klib@jiangnan.edu.cn



微信服务号



微信订阅号



e江南APP