

新一代高产甘油重组菌的构建及其初步发酵

刘爱玲, 饶志明, 马正, 诸葛斌, 方慧英, 诸葛健

江南大学工业生物技术教育部重点实验室 工业微生物研究中心, 无锡 214122

摘要: 产甘油假丝酵母(*Candida glycerinogenes* WL2002-5)是一株发酵生产甘油的工业化菌株。为进一步提高其产甘油能力, 本研究利用前期研究中成功克隆的产甘油假丝酵母中甘油合成关键酶 3-磷酸甘油脱氢酶基因 *CgGPD1*, 构建根癌农杆菌二元载体 pCAM3300-*zeocin*-*CgGPD1* 后, 电击转化根癌农杆菌 LBA4404, 通过根癌农杆菌介导法(ATMT)转化产甘油假丝酵母, 构建了产甘油假丝酵母重组菌。并从中筛选出一株酶活力和产甘油性能较好的产甘油假丝酵母重组菌株 C.g-G8。以葡萄糖为底物摇瓶发酵 96 h 后, 重组菌 C.g-G8 的甘油产量比野生型菌株 *Candida glycerinogenes* 提高 18.06%, 平均耗糖速率提高 12.97%, 平均酶活力提高 27.55%。本研究成功利用 ATMT 法转化产甘油假丝酵母构建新一代高产甘油菌株。

关键词: 产甘油假丝酵母, 胞浆-3-磷酸甘油脱氢酶, 根癌农杆菌介导转化

Construction and fermentation of a recombinant *Candida glycerinogenes* strain with high glycerol production

Ailing Liu, Zhiming Rao, Zheng Ma, Bin Zhuge, Huiying Fang, and Jian Zhuge

The Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, Research Center of Industrial Microbiology, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract: *Candida glycerinogenes* WL2002-5 (*C.g*) is an important industrial strain for glycerol production. To further improve glycerol production, we reconstructed a binary vector pCAM3300-*zeocin*-*CgGPD1*, introduced it to *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 by electroporation, and then transformed the T-DNA harboring the *CgGPD1* to *Candida glycerinogenes* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (ATMT). After 96 h fermentation with glucose as the substrate, we screened a transformant named C.g-G8 with high glycerol production. Compared with the wild strain, the glucose consumption rate of C.g-G8 and the glycerol production were 12.97% and 18.06% higher, respectively. During the fermentation, the activity of glycerol-3-phosphate dehydrogenase of C.g-G8 was 27.55% higher than that of the wild strain. The recombinant *Candida glycerinogenes* with high glycerol production was successful constructed by ATMT method.

Keywords: *Candida glycerinogenes*, glycerol-3-phosphate dehydrogenase, *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation

Received: January 10, 2009; **Accepted:** March 17, 2009

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 20676053), National High Technology Research and Development Programs of China(863 Program)(No. 2006AA020103), Jiangsu Provincial Youth Scientific and Technological Innovation Foundation (No. BK2006504) (Academic Leader), Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (No. IRT0532).

Corresponding author: Zhiming Rao. Tel: +86-510-85918109; E-mail: raozm@yahoo.com.cn

国家自然科学基金项目(No. 20676053), 国家高技术研究发展计划(863 计划)(No. 2006AA020103), 江苏省青年科技创新人才(学术带头人)基金(No. BK2006504), 长江学者和创新团队发展计划(No. IRT0532)资助。

甘油是一种重要的轻化工原料, 多年来, 利用耐高渗酵母发酵生产甘油成为国内外研究机构的研究焦点, 在上世纪 50 年代就开始了相关研究^[1-4]。随后, 还有不少研究者对此也进行了大量研究。我国的甘油生产菌株 *Candida glycerinogenes* WL2002-5 是迄今为止所报道的产甘油水平最好的菌种, 在 250 g/L 葡萄糖时胞外积累甘油总量高达 120 g/L 以上, 转化率超过 50%, 已经应用于大规模的发酵甘油工业生产中。中科院等研究单位在产甘油酵母菌种发酵工艺的优化、新型生物反应器的研制等方面开展了工作。

研究者发现, 酿酒酵母中的胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶(ct GPD)和 3-磷酸甘油酯酶(GPP)都至少具有 2 种同工酶 Gpd1p、Gpd2p 和 Gpp1p、Gpp2p, 其中 Gpd2p 和 Gpp1p 为组成型酶, Gpd1p 和 Gpp2p 为渗透压诱导型酶, 细胞中的 ct GPD 和 GPP 活性分别以 Gpd1p、Gpp2p 活性为主^[9-11]。Remize 等^[12]的研究结果表明提高甘油合成最直接的办法就是过量表达编码 3-磷酸甘油脱氢酶 GPDH 的同工酶 Gpd1。本研究室前期通过染色体步移法成功克隆了来源于产甘油假丝酵母的甘油合成关键酶基因 *CgGPD1* 及侧翼序列(Accession No. EU186536), 并进行了功能验证^[13]。

由于 ATMT 具有操作简单、转化效率高等优点, 已广泛应用于转化真菌的研究中^[14]。近期, 研究室利用 ATMT 法转化产甘油假丝酵母获得成功^[15]。在此基础上, 本试验尝试克隆产甘油假丝酵母甘油合成关键酶基因, 构建重组产甘油假丝酵母, 然后以葡萄糖为底物进行发酵实验, 根据实验结果与野生型菌株关键酶的酶活力和甘油产量进行比较, 视其产甘油性能是否有进一步提高。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌(*Escherichia coli*)JM109、产甘油假丝

酵母(*Candida glycerinogenes*)WL 2002-5、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)LBA4404 本实验室保存。质粒 pCAMBIA3300-zeocin 由本实验室构建, 克隆载体 pMD18-T 购自大连宝生物工程公司。

1.1.2 工具酶与试剂

Taq DNA 聚合酶购自大连宝生物公司; 其他工具酶均为精美公司产品。抗生素、乙酰丁香酮和磷酸二羟丙酮(DHAP)购自 Sigma 公司。腐草霉素(Zeocin)购自上海普飞生物科技有限公司。质粒提取、纯化及胶回收试剂盒均购自博大泰克。其他化学试剂均为国产分析纯。细胞洗涤缓冲液(mmol/L): KH₂PO₄ 10; K₂HPO₄ 10; EDTA 2, pH 7.5 细胞破壁缓冲液(mmol/L): KH₂PO₄ 100; K₂HPO₄ 100; DTT 1; MgCl₂ 2; EDTA 2。

1.1.3 培养基及培养条件

LB 培养基和 YPD 培养基分别用于培养大肠杆菌和产甘油假丝酵母。根癌农杆菌 LBA4404 采用 YEB 培养基(g/L): 酵母粉 1, 牛肉膏 5, 蛋白胨 5, 蔗糖 5, MgSO₄·7H₂O 493(mg/L), pH 7.2, 30°C 培养。MM 培养基(g/L): 酵母氮基 6.7, 葡萄糖 20, pH 5.3; IM 培养基(g/L): 酵母氮基 6.7, 葡萄糖 20, 甘油 0.54, MES 7.807, 乙酰丁香酮 200 μmol/L, pH 5.3; SM 培养基(g/L): 酵母氮基 6.7, 葡萄糖 20, 头孢噻唑 200 μmol/mL, Zeocin 150 μg/mL, pH 6.0; 种子培养基(g/L): 玉米浆 15; 尿素 2; 葡萄糖 100; 发酵培养基(g/L): 玉米浆 10; 尿素 2; 葡萄糖 250。

1.1.4 抗生素及使用浓度

100 μg/mL 硫酸卡那霉素, 200 μg/mL 氨苄青霉素, 100 μg/mL 利福霉素, 100 μg/mL 腐草霉素, -20°C 保存。

1.1.5 引物

根据已知的 *CgGPD1* 的读码框及其侧翼序列设计以下引物, 如表 1(斜体部分为限制性酶切位点)。

表 1 用于基因 *CgGPD1* 和 *zeocin* 扩增的引物

Table 1 primers used for *CgGPD1*/*zeocin* genes amplification

Gene	Primer sequence (5'-3')	Product length (bp)	Restriction site
<i>CgGpd1</i>	CgGpd1F: <i>CCCAAGCTTCAGTTCCCGTTTTCCATTTC</i>	2147	<i>Hind</i> III
	CgGpd1R: <i>CCCAAGCTTAAGTGGAATGCAGCTAAAGG</i>		<i>Hind</i> III
<i>Zeocin</i>	Zeocin F: <i>CGCGAATTC</i> CCACACACCATAGCTTC	1200	<i>Eco</i> R I
	ZeocinR: GGAGAGCTCAGCTTGCAAATTAAGCC		<i>Eco</i> R I

1.2 根癌农杆菌 LBA4404 双元载体 pCAM3300-zeocin-CgGPD1 的构建

1.2.1 产甘油假丝酵母染色体 DNA 的制备

产甘油假丝酵母染色体 DNA 的制备按参考文献[5]进行, 略有改进。

1.2.2 PCR 扩增 CgGPD1

采用 50 μ L 反应体系: 10 \times Ex Taq Buffer 5 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 4 μ L, 上下游引物各 1 μ L, 模板 DNA 2 μ L, Ex Taq 酶 1 μ L, ddH₂O 36 μ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 90 s, 55 $^{\circ}$ C 90 s, 72 $^{\circ}$ C 120 s, 循环 35 次, 72 $^{\circ}$ C 10 min, 15 $^{\circ}$ C 10 min。

1.2.3 pMD18-T-CgGPD1 的构建

胶回收 PCR 产物分别与 pMD18-T vector 的连接、转化参照试剂盒说明书。

1.2.4 pCAM3300-zeocin-CgGPD1 的构建

提取质粒 pMD18-T-CgGPD1 和质粒 pCAM3300-zeocin, 用 Hind III 分别酶切, 胶回收 CgGPD1 片段, 将其在 Hind III 位点插入 pCAM3300-zeocin, 质粒构建如图 1 所示。

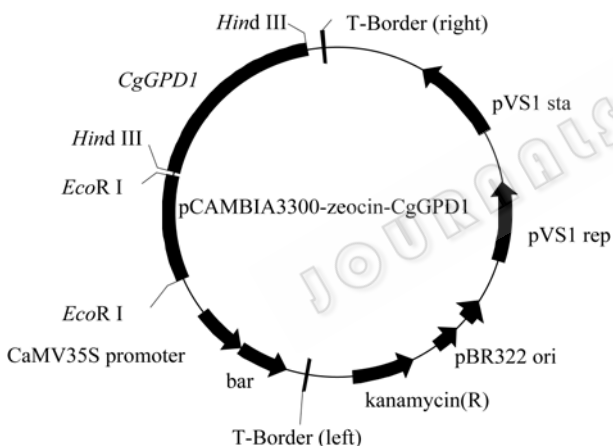


图 1 质粒 pCAM3300-zeocin-CgGPD1 的构建

Fig. 1 Construction of plasmid pCAM3300-zeocin-CgGPD1.

1.3 根癌农杆菌介导转化产甘油假丝酵母

1.3.1 根癌农杆菌介导转化

转化方法参照文献[15]进行。

1.3.2 产甘油假丝酵母阳性转化子验证

转化子于 SM 培养基中培养 2 d, 取单菌落和出发菌株同时在新鲜 SM 上重新划线培养, 30 $^{\circ}$ C, 24 h 后观察生长情况, 对照出发菌株不能生长而转化子生长者即为阳性转化子。

以阳性转化子的染色体 DNA 为模板, 用 zeocin

基因的特异性引物扩增 zeocin 全长基因, 用出发菌株作对照。zeocin 全长基因为 1.2 kb。

1.3.3 产甘油假丝酵母阳性转化子稳定性验证

将上述转化子于 YPD 培养基斜面培养 24 h 后, 挑取菌落再次在 YPD 培养基斜面上划线培养。转接 10 代后, 挑取菌落接种于 SM 培养基上, 用 YPD 培养基对照实验, 能在 SM 生长良好的菌株认为该阳性转化子的遗传稳定性较好。提取染色体, PCR 法验证转化子的稳定性。

1.4 转化子的初步发酵实验

1.4.1 转化子发酵产甘油能力筛选

将产甘油假丝酵母出发菌株与重组菌株, 分别接种于装有 30 mL 种子培养基的 250 mL 的三角瓶, 于 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 18 h。按 5%接种量接种到装有 50 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中, 于 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 摇床发酵。发酵 96 h 测定发酵液中的甘油含量和残糖量。每个样品重复 3 次, 结果取平均值。

1.4.2 发酵过程参数分析

在上述发酵过程中定时取样, 每次取 5 mL 发酵液, 8000 r/min 离心 5 min, 取其上清液分析发酵液中的甘油含量和残糖。每组实验重复 2 次, 结果取平均值。

1.4.3 转化子生长曲线测定

将转化子和出发菌株同时接种 YPD 液体培养基培养, 每隔 2 h 取样, 测定 OD₆₀₀ 值, 绘制生长曲线。

1.4.4 发酵液中甘油含量的测定

用高碘酸法测发酵液中的甘油含量^[16]。

1.4.5 残糖测定

葡萄糖测定参照文献[17], 采用 SBA 生物传感分析仪测定。

1.4.6 生物量的测定

取 10 mL 发酵液高速离心, 菌体用去离子水洗涤 2 次, 再于 80 $^{\circ}$ C 干燥至恒重, 测得菌体干重 (DCW)。

1.4.7 粗酶液的制备

粗酶液的制备参照文献[11]略作改动。

1.4.8 胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶酶活测定

胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶(ct GPD)酶活测定: 按 Blomberg 等^[18]的方法, 略做改动。一个单位酶活定

义为一分钟消耗 $1 \mu\text{mol}$ NADH 所需的酶量^[19]。粗酶液蛋白含量的测定用 Bradford 法^[20], 以牛血清白蛋白为标准蛋白。

2 结果

2.1 *CgGPD1* 基因的 PCR 扩增

以产甘油假丝酵母基因组 DNA 为模板, 以 *CgGPD1* 的引物进行 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳结果显示 PCR 扩增产物中有一条大小为 2.1 kb 的特异性条带, 该条带大小与预期的 *CgGPD1* 基因一致, 如图 2 中泳道 2 所示。

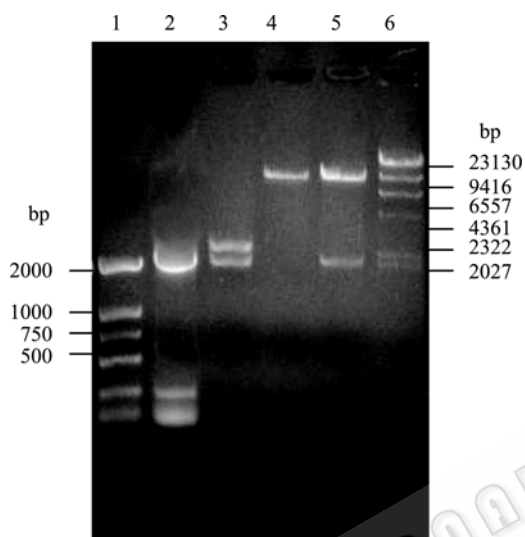


图 2 *CgGPD1* 的 PCR 和质粒 pMD18-T-*CgGPD1*, pCAM3300-*zeocin-CgGPD1* 的酶切

Fig. 2 PCR amplification of *CgGPD1* and restriction enzyme digestion analysis of pMD18-T-*CgGPD1* and recombinant pCAM3300-*zeocin-CgGPD1*. 1: DL2000 marker; 2: *CgGPD1* gene of PCR; 3: pMD18-T-*CgGPD1* digested by *Hind* III; 4: pCAM3300-*zeocin* digested by *Hind* III; 5: pCAM3300-*zeocin-CgGPD1* digested by *Hind* III; 6: λ DNA/*Hind* III marker.

2.2 表达载体 pCAM3300-*zeocin-CgGPD1* 的构建

CgGPD1 基因从 pCAM3300-*zeocin* 的 *Hind* III 酶切位点插入, 重组质粒经 *Hind* III 酶切后释放出 9.6 kb 和 2.1 kb 大小的 2 种片段, 分别与质粒 pCAM3300-*zeocin* 和靶基因 *CgGPD1* 的大小相对应, 如图 2 中 4-5 泳道所示。重组质粒命名为 pCAM3300-*zeocin-CgGPD1*。

2.3 产甘油假丝酵母阳性转化子获得及 PCR 验证

在 SM 培养基上生长良好的转化子确认为阳性转化子。转化子命名为 *C. glycerinogenes-CgGPD1* (简称 *C.g-G*)。PCR 验证结果见图 3。从图

中可以看出阳性转化子可以扩增出 1.2 kb 的 *zeocin* 基因片段, 而出发菌株没有相应片段, 说明 *CgGPD1* 全长基因已经插入到双元载体的 T-DNA 内, 表明 ATMT 法成功将 *CgGPD1* 全长基因重组到产甘油假丝酵母基因组中。转化子传代 10 次后, 在 SM 培养基上仍能正常生长; 提取 10 代内转化子的染色体, PCR 验证结果和图 3 一致(数据未列出); 10 代以内转化子产甘油发酵能力无明显退化现象(数据未列出)。故认为阳性转化子传代 10 次保持稳定。

2.4 高产甘油阳性转化子的筛选

将挑选的 50 个转化子(*C.g-G*)进行发酵实验, 分别取 72 h、84 h、96 h 样品测定发酵液上清液中的甘油含量和残糖量。以 *C.g* 作为对照, 挑选甘油积累量提高 5% 以上的转化子再以甘油产量和转化率为指标进行多轮复筛, 筛选结果见表 1。转化子 *C.g-G6*, *C.g-G8*, *C.g-G18* 发酵 96 h 后甘油产量均高达 120 g/L 以上, 比出发菌株提高了 10% 以上, *C.g-G8* 转化子尤为明显。

2.5 转化子生长曲线的测定

与 *C.g* 相比, 转化子 *C.g-G8* 在 YPD 培养基中的生长并没有表现明显优势, 仅在细胞生长初期生长速率稍快于 *C.g*, 而细胞生长稳定期和后期与 *C.g* 的生长速率几乎完全相似, 生长曲线未列出。

2.6 *C.g-G8* 发酵参数的时序变化

为考察 *CgGPD1* 的插入对 *C.g-G8* 发酵产甘油的

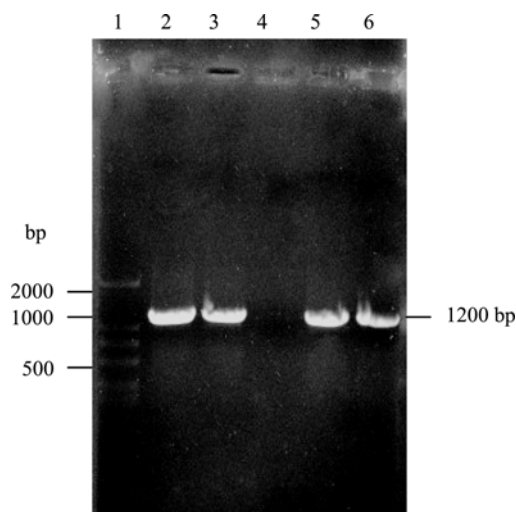


图 3 阳性转化子 PCR 验证

Fig. 3 PCR identification of the transformants. 1: DL2000 marker; 2, 3, 5, 6: the amplification of gene *zeocin* from *C.g-G*; lane 4: the amplification of gene *zeocin* from *C.g*.

表 2 转化子 *C.g-G* 在 250 g/L 初糖条件下的发酵参数Table 2 Fermentation results of *C.g* transformants at initial glucose concentration of 250 g/L

No. of strains	Concentration of glycerol (g/L)	Glycerol increase rate (%)	Residual sugar (g/L)	Conversion rate of sugar (%)
<i>C.g</i>	115.52 (90 h)	0	18.08	49.81
<i>C.g-G</i> 6	129.83 (84 h)	12.39	11.69	54.48
<i>C.g-G</i> 8	136.38 (84 h)	18.06	5.06	55.68
<i>C.g-G</i> 12	120.67 (84 h)	4.46	34.17	55.91
<i>C.g-G</i> 13	123.67 (84 h)	7.06	30.84	56.43
<i>C.g-G</i> 16	126.29 (84 h)	10.77	12.26	53.12
<i>C.g-G</i> 17	125.38 (84 h)	8.54	31.87	57.48
<i>C.g-G</i> 18	129.61 (84 h)	12.20	22.13	56.88

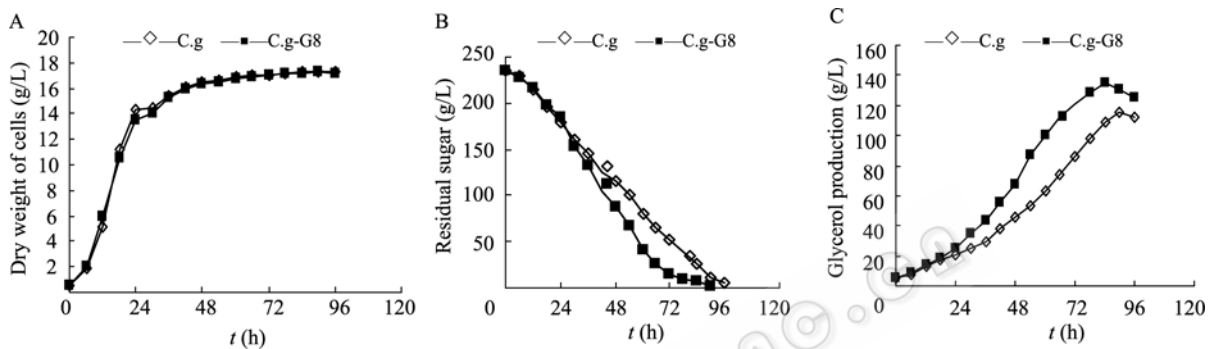
图 4 *C.g-G8* 发酵甘油过程参数随时间的变化

Fig. 4 Time courses of *C.g-G8* glycerol fermentation concentrations. (A) Growth curve of *C.g-G8*. (B) Curve of sugar consumption. (C) Glycerol cumulative curve.

影响, 实验研究了 *C.g* 和 *C.g-G8* 的发酵过程中菌体干重、葡萄糖的消耗和甘油累积随发酵时间的变化规律。结果如图 4 所示, *C.g-G8* 和 *C.g* 的菌体最大干重均为 17 g/L。前 24 h 是菌体快速生长阶段, 24 h 后为稳定期, 该时期甘油快速积累。*C.g-G8* 的平均耗糖速率比出发菌株 *C.g* 快, 产甘油能力也有提高, 当发酵时间为 84 h 时甘油累积达到最高值 136.38 g/L, 平均甘油产率为 1.62 g/(L·h); 而 *C.g* 在 90 h 时甘油累积量才达到最高值 115.52 g/L, 平均甘油产率为 1.28 g/(L·h)。

2.7 *C.g-G8* 发酵过程中 GPDH 酶活的变化

以出发菌株作对照, 实验中检测了 *C.g-G8* 葡萄糖发酵过程中 GPDH 的酶活力随时间的变化情况, 结果如图 5。发酵过程中, *C.g* 的 Gpd1p 的平均酶活力为 98 mU/mg, 在 30 h 和 60 h 出现 2 次峰值, 60 h 时, 酶活力最高可达 170 mU/mg。而菌株 *C.g-G8* 中 Gpd1p 的平均酶活力为 125 mU/mg, 比出发菌株提

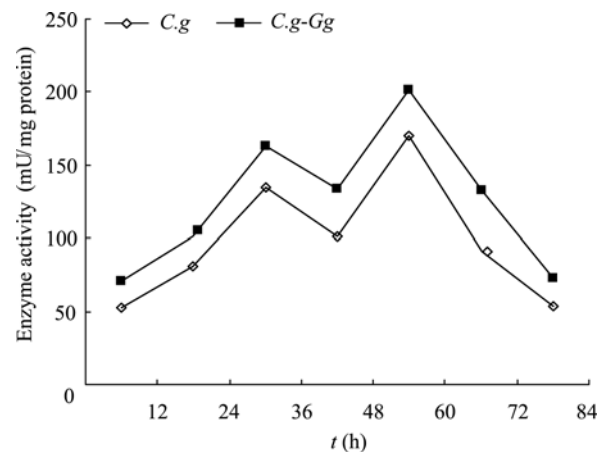


图 5 发酵过程中转化子 Gpd1p 酶活的变化

Fig. 5 The Gpd1p activity of *C.g-G8* in fermentation process.

高 27.55%; 在 30 h 和 60 h 同样出现了 2 次峰值, 其中 60 h 的峰值达到 202 mU/mg。随着发酵结束, *C.g-G8* 和 *C.g* 的胞浆 Gpd1p 活性均下降到相同水平。

3 讨论

本研究利用 ATMT 法成功将 *CgGPD1* 全长基因转入到 *C. glycerinogenes* 染色体 DNA 中。研究发现 *CgGPD1* 基因的插入对阳性转化子的生长没有影响(图 4A), 因而推测 *CgGPD1* 全长基因插入了 *C. glycerinogenes* 染色体上的重复序列或其他与其生长代谢无关的序列中, 与期望获得的转化子类型一致。转化子的发酵产甘油实验结果发现, 约 30% 的转化子产甘油能力低于出发菌株, 可能原因是: 在 ATMT 介导转化 *C. glycerinogenes* 过程中, T-DNA 是随机整合到染色体上的, 因其在染色体上插入位点的不同导致 *CgGPD1* 的表达水平的不同; 或者是靶基因打断了产甘油假丝酵母中甘油代谢基因导致无法正常表达, 从而影响转化子的产甘油能力。具体原因还有待于进一步研究。其他阳性转化子的产甘油能力都与出发菌株相当或者比其更高, 其中转化子 *C.g-G8* 产量最高到达 136.38 g/L, 说明可能是 *CgGPD1* 基因拷贝数的增加使得产甘油能力得到提高。与出发菌株相比, 转化子 *C.g-G8* 不仅产甘油能力获得提高, 同时发酵时间也缩短了 6 h, 对于工业化生产菌株来说, 发酵时间的缩短具有重大的意义。

菌株 *C.g-G8* 甘油产量提高幅度不大可能是因为发酵过程中, *Gpd1p* 的酶活已经达到了一个较高的水平, 形成一个发达的产甘油代谢流, 当其进一步提高时, 在甘油合成过程中的另外一个关键酶 3-磷酸甘油酯酶(*Gpp*)并没有得到相应的提高, 成为限速酶, 影响了甘油产量的进一步提高。关于同时增强 *Gpd1p* 和 *Gpp* 在产甘油假丝酵母中的表达来提高甘油产量的研究正在进行中。

REFERENCES

- [1] Nickson WJ, Carrol WR. On the metabolism of *Zygosaccharomyces*. *Arch Biochem Biophys*, 1945, **7**(2): 257-271.
- [2] Spencer JF, Sallans HR. Production of polyhydric alcohols by osmophilic yeasts. *Can J Microbiol*, 1956, **2**(2): 72-79.
- [3] Spencer JF, Shu P. Polyhydric alcohol production by osmophilic yeasts: Effect of oxygen tension and inorganic phosphate concentration. *Can J Microbiol*, 1957, **3**(4): 559-567.
- [4] Vijaikishore P, Karanth NG. Glycerol production by immobilised cells of *Pichia farinosa*. *Biotechnol Lett*, 1986, **8**(4): 257-260.
- [5] Wang ZX, Zhuge J, Fang HY. A new specie of yeast that tolerant to high hypertonic pressure-*Candida glycerinogenes*. *Acta Microbiol Sin*, 1999, **39**(1): 68-74. 王正祥, 诸葛健, 方慧英. 耐高渗压高产甘油的一个假丝酵母新种—产甘油假丝酵母. *微生物学报*, 1999, **39**(1): 68-74.
- [6] Liu YQ, Liu DH, Ma ZG, *et al.* Main factors affecting preparation of glycerol in repeated batch fermentation. *J Chem Ind Eng (China)*, 2002, **53**(11): 1139-1142. 刘永强, 刘德华, 马志国, 等. 反复分批发酵法制备甘油过程中的影响因素. *化工学报*, 2002, **53**(11): 1139-1142.
- [7] Liu HJ, Liu DH, Zhong JJ. Novel fermentation strategy for enhancing glycerol production by *Candida krusei*. *Biotechnol Prog*, 2003, **19**(5): 1615-1619.
- [8] Xie DM, Liu DH, Zhang Y, *et al.* Enhancement of fermentative glycerol yeild with heat shock treatment. *Chin J Biotech*, 2000, **16**(3): 384-386. 谢东明, 刘德华, 张岩, 等. 应用热冲击处理技术提高发酵甘油的产率. *生物工程学报*, 2000, **16**(3): 384-386.
- [9] Norbeck J, polman AK, Akhtar N, *et al.* Purification and characterization of two isoenzymes of DL-glycerol-3-phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*: Identification of the corresponding *GPP1* and *GPP2* genes and evidence for osmotic regulation of *GPP2* expression by the osmosensing mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Biol Chem*, 1996, **27**(1): 13875-13881.
- [10] Ansell R, Granath K, Hohmann S, *et al.* The two isoenzymes for yeast NAD^+ dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase encoded by *GPD1* and *GPD2* have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *EMBO J*, 1997, **16**(5): 2179-2197.
- [11] Albertyn J, Hohmann S, Thevelein JM *et al.* *GPD1*, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol Cell Biochem*, 1994, **14**(3): 4135-4144.
- [12] Remize F, Barnavon L, Dequin S. Glycerol export and glycerol-3-phosphate dehydrogenase, but not glycerol phosphatase, are rate limiting for glycerol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng*, 2001, **3**(2): 301-312.
- [13] Chen XZ, Fang HY, Rao ZM *et al.* Cloning and characterization of a NAD^+ -dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene from *Candida glycerinogenes*, an industrial glycerol producer. *FEMS Yeast*, 2008, **8**(3): 725-734.
- [14] Sugui JA, Chang YC, Kown-Chung KJ. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Aspergillus fumigatus*: An efficient tool for insertional mutagenesis

- and targeted gene disruption. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**(2): 1798–1802.
- [15] Rao ZM, Ma Z, Shen W, *et al.* Transformation of industrialized strain *Candida glycerinogenes* with resistant gene *zeocin* via *Agrobacterium tumefaciens*. *Curr Microbiol*, 2008, **57**(1): 12–17.
- [16] Tianjin Institute of Light Industry. The analysis of industrial fermentation. Beijing: Chinese Light Industry Press, 1997: 16–18.
天津轻工业学院主编. 工业发酵分析. 北京: 中国轻工业出版社, 1997: 16–18.
- [17] Ning ZX. The handbook of food analysis. 1st Ed. Beijing: Chinese Light Industry Press, 2001: 50–55.
- 宁正祥. 食品成分分析手册. 北京: 中国轻工业出版社, 2001: 50–55.
- [18] Blomberg A, Adler L. Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 1989, **171**(2): 1087–1092.
- [19] Gancedo C, Gancedo JM, Sols A. Glycerol metabolism in yeasts: Pathways of utilization and production. *Eur J Biochem*, 1968, **5**(2): 165–172.
- [20] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **73**(2): 248–254.



2009年《生物工程学报》栏目设置

栏目中文名称	栏目英文名称	具体涵盖内容
综述	Reviews	内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 必须包含作者自己的工作内容和见解
小综述	Mini-review	能尽快反映生物学领域的最新进展的小型综述
科学进展/名家论坛	Perspective	邀请生物领域专家对最新生物技术科研成果进行评述
动物及兽医生物技术	Animal and Veterinary Biotechnology	转基因动物; 动物生物反应器; 动物疾病控制、免疫生物技术
海洋生物技术	Marine Biotechnology	海洋生物资源; 海洋生物基因组学、蛋白质组学和代谢组学; 海水养殖生物技术; 藻类生物技术; 海洋天然产物; 海洋生物产品、生物材料和生物能源
环境生物技术	Environmental Biotechnology	微生物多样性; 分子生物学方法及应用; 环境过程的生物监测; 污染控制新工艺; 生物修复
工业生物技术	Industrial Biotechnology	工业酶和微生物; 代谢工程与应用; 生物催化剂与生物转化; 工业生物原料、生物燃料、生物能源和生物基化学品; 生物过程工程; 生物工程控制及优化
农业生物技术	Agricultural Biotechnology	农业功能基因组; 植物生物反应器; 转基因作物; 转基因产品的生物安全及转化; 农业重组微生物
食品生物技术	Food Biotechnology	食品微生物及功能性食品; 转基因食品; 食品安全及公众健康
系统生物技术	Systems Biotechnology	系统生物学理论在工业、医药、环境、农业生物技术领域的应用
医学与免疫生物技术	Medical and Immunological Biotechnology	基因治疗和干细胞治疗 RNAi 技术及应用; 生物标记与诊断; 单克隆抗体; 工程蛋白和疫苗
组织工程与细胞培养	Tissue Engineering and Cell Cultivation	细胞发育与生物材料; 干细胞工程; 细胞培养工程
生物技术与方法	Methods in Biotechnology	生物技术各个领域中的方法学