

采用自克隆技术构建高 SOD、低双乙酰的啤酒酵母工程菌

母茜¹, 蔡勇¹, 王肇悦², 张博润², 任正隆^{1,*}

(1. 四川农业大学 植物遗传育种省级重点实验室, 四川 雅安 625014;

2. 中国科学院微生物研究所酵母遗传育种实验室, 北京 100101)

摘要: 用来源于啤酒酵母自身的超氧化物歧化酶基因 *SOD1*、铜抗性基因 *CUP1*、3-磷酸甘油酸激酶基因 *PGK1* 启动子和 α -factor 基因取代 α -乙酰乳酸合成酶基因 *ILV2* 内部约 1.1kb 的片段, 得到重组质粒 pMC572, 采用同源重组的方法将用内切酶酶切质粒 pMC572 得到的含有 *SOD1*、*CUP1*、*PGK1* 和 α -factor 以及 *ILV2* 两端序列的片段转化啤酒酵母工业菌株 YSF31, 并通过铜抗性、PCR 和 AHAS 酶活测定筛选得到转化子。结果表明啤酒酵母工程菌胞内的 SOD 能够分泌到胞外, 乙偶姻的含量也只有受体菌的 50%, 而其他发酵指标并没有发生变化。

关键词: 啤酒酵母; 超氧化物歧化酶; 乙偶姻; 自克隆

Construction of Industrial Brewing Yeast with High-SOD and Low-diacetyl Productivity Using Self-cloning Technique

MU Qian¹, CAI Yong¹, WANG Zhao-yue², ZHANG Bo-run², REN Zheng-long^{1,*}

(1. State Key Laboratory of Plant Breeding and Genetics, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China; 2. Laboratory of Molecular Genetics and Breeding of Yeast, Institute of Microbiology of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: A recombinant plasmid pMC572 was constructed through replacing internal fragment of α -acetoxyacid synthase (AHAS) gene (*ILV2*) with a fused gene that contained a copper resistant gene (*CUP1*), *PGK1* promoter, α -factor sequence and open reading frame of *SOD* gene from *Saccharomyces cerevisiae*. An industrial brewing yeast strain, YSF31, was transformed with plasmid pMC572. The self-cloning strains were selected in terms of resistance ability to CuSO₄, PCR amplification assay and AHAS activity. The engineered industrial strain exhibited fermentation performance and growth properties similar to the wild type in 500 ml conical flask under identical condition of beer fermentation. Moreover, SOD produced in this industrial strain was detected in fermenting liquor and acetoin was 50% lower than that of the control. Due to DNA manipulation without heterogeneous DNA, the self-cloning strain may be acceptable.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*; SOD; acetoin; self-cloning

中图分类号: TS261.11; Q785

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)19-0248-04

啤酒在储存过程中会产生一种纸板味, 这主要是因为啤酒中一些挥发性的长链不饱和醛类发酵时未充分还原所致, 啤酒的氧化作用是其风味稳定性变差的最初来源。啤酒酵母自身也会产生一些具有抗老化功能的物质, 如谷胱甘肽(GSH)、超氧化物歧化酶(SOD)等。SOD 是生物体内防御氧化损伤的一种十分重要的酶, 由于它具有清除体内 O₂·⁻的能力, 能较好地抵御氧自由基和其他氧化物自由基对细胞质膜的毒性, 在机体保护方面起重要作用, 虽然目前对 SOD 的研究比较多, 但是将它

应用于工业菌株方面的研究还很少, 因此在啤酒抗老化方面有较大的研究价值。

双乙酰是啤酒中的主要风味物质, 但它的口味阈值很低, 当它在啤酒中的含量超过风味阈值的时便会产生一种令人不愉快的酸馊味^[1], 随着啤酒发酵双乙酰在还原酶的作用下被还原成乙偶姻, 但乙偶姻的口味阈值远远大于双乙酰。随着对酵母形成双乙酰机理及分子遗传学的了解, 采用基因工程手段来降低双乙酰生成成为可能^[2]。*ILV2* 基因编码的 α -乙酰乳酸合成酶活性与双乙酰

收稿日期: 2008-01-21

作者简介: 母茜(1984—), 女, 硕士研究生, 研究方向为分子遗传学。E-mail: qianqian84119@sina.com

* 通讯作者: 任正隆(1949—), 男, 教授, 博士, 研究方向为分子遗传学。E-mail: auh5@sicau.edu.cn

前体 α -乙酰乳酸的含量水平密切相关。

白克隆技术是利用来源于酵母本身的目的基因构建酵母工程菌,不引入其他任何的外源DNA片段,因此具有生物安全性。本研究通过白克隆技术构建SOD含量高,ILV2基因被破坏的啤酒酵母工业菌株。

1 材料与方法

1.1 菌种和质粒

大肠杆菌DH5[*sup* E44 Δ *lac* U169(Ψ 80*lacZ* Δ M15) *hsd* R17 *rec* A1 *end* A1 *gyr* A96 *thi*-I *rel* A1]用于质粒的构建;啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)YSF31由青岛啤酒集团提供。

质粒YEp352(*amp*^R URA3)是大肠杆菌/酵母菌穿梭载体^[3];质粒Bluescript M13^[4]、含有CUP1基因的质粒pYCUP、含有PGK1的质粒pMP1以及含有ILV2基因的质粒pPILV4均由中科院微生物所酵母遗传育种实验室保存。

1.2 培养基和工具酶

LB培养基按常规配制^[5],使用前根据需要加入50 μ g/ml 氨苄青霉素;培养酵母菌用YEPD培养基;YNB培养基按常规配制^[6]。

限制性内切酶、T₄ DNA连接酶、DNA聚合酶等均购自华美公司。

1.3 DNA操作

大肠杆菌转化按氯化钙法^[5]进行;啤酒酵母总DNA的提取及啤酒酵母的遗传转化按文献[6]的方法进行。

1.4 引物合成与PCR扩增

根据文献报道^[7]的SOD1基因序列设计引物:P1: 5'-CCAGCATGCATGGTTCAAGCAGTCG-3'和P2: 5'-CGAGTTCGACCATTAACATTAGTTGATTAGA-3',其中加框部分分别为Sph I和Sal I的识别位点。以YSF31的总DNA为模板,进行高保真的PCR扩增。PCR的反应参数为:94℃预变性5min;94℃变性40s,55℃退火40s,72℃延伸2min,30个循环;72℃最后延伸10min。

1.5 乙酰乳酸合成酶(AHAS)活性测定

α -乙酰乳酸合成酶活性的测定采用细胞通透测定法^[8,9]。

1.6 遗传稳定性分析

将待测菌在YEPD斜面上活化,然后转到5ml YEPD培养基中(未选择压力),28℃培养,每24h转接1次,共转接5次后,取菌液涂布YEPD平板,28℃培养至长出单菌落。分别挑取100个单菌落于无菌水中,饥饿4h后,分别接种在YEPD及含6mmol/L CuSO₄的YEPD培养基平板上,28℃培养48h,测定单菌落对硫酸铜的抗性。

1.7 小型三角瓶麦芽汁发酵实验

将酵母菌接入5ml 麦芽汁培养基,25℃培养12h,以10%的接种量接种于10ml 麦芽汁培养基,25℃培养

36h,培养液全部接于240ml 麦芽汁中,12℃静置培养15d。

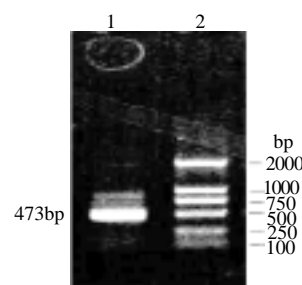
1.8 发酵性能测定

超氧化物歧化酶活测定采用邻苯三酚自氧化法^[10];其他发酵指标按文献[1]进行检测(每个样品均有两个平行样,摇瓶发酵实验至少3批次)。

2 结果与分析

2.1 SOD1基因的PCR扩增

根据1.4节里所述的方法进行PCR扩增,PCR产物经琼脂糖凝胶电泳验证为大小0.47kb左右的DNA片段,与预期结果一样(图1)。



1.PCR产物; 2.Marker: DL2000。

图1 SOD1基因的PCR扩增图

Fig.1 Agarose gel electropherogram of PCR amplification products of SOD1 gene

2.2 重组质粒的构建和酵母的转化

2.2.1 重组质粒pMC572的构建

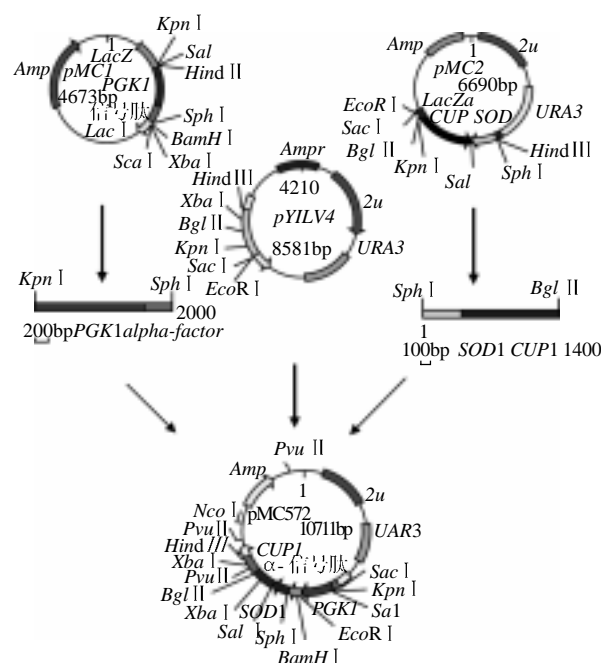
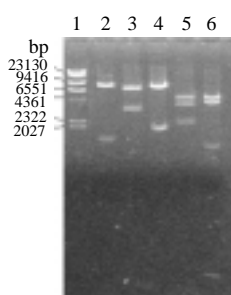


图2 重组质粒pMC572的构建

Fig.2 Construction of recombinant plasmid pMC572



1.Marker; 2.*Xba* I 酶切; 3.*Kpn* I +*Bgl* II 酶切; 4.*Sac* I +*Sph* I 酶切; 5.*Sal* I +*Nco* I 酶切; 6.*Pvu* II +*Sac* I 酶切。

图3 质粒 pMC572 的酶切验证

Fig.3 Digestion patterns of plasmid pMC572

将PCR扩增得到的*SOD1*基因插入到pYCUP的*Sph* I和*Sal* I位点得到一个中间质粒pMC2。将PCR扩增得到的 α -factor基因插入到质粒pMP1的*EcoR* I和*Sma* I位点上得到另外一个中间质粒pMC1。用*Bgl* II和*Sph* I酶切质粒pMC2得到*CUP1*和*SOD1*的片段,用*Kpn* I和*Sph* I酶切质粒pMC1得到*PGK1*和 α -factor的片段,将上述两个基因片段插入到质粒pPILV4的*Kpn* I和*Bgl* II位点,获得最终的重组质粒pMC572(图2)。酶切分析表明重组质粒pMC572构建正确(图3)。该质粒中*ILV2*基因内部约1.09kb大小的片段被*PGK1*、 α -factor、*SOD1*和*CUP1*所替换。

2.2.2 酵母菌的转化

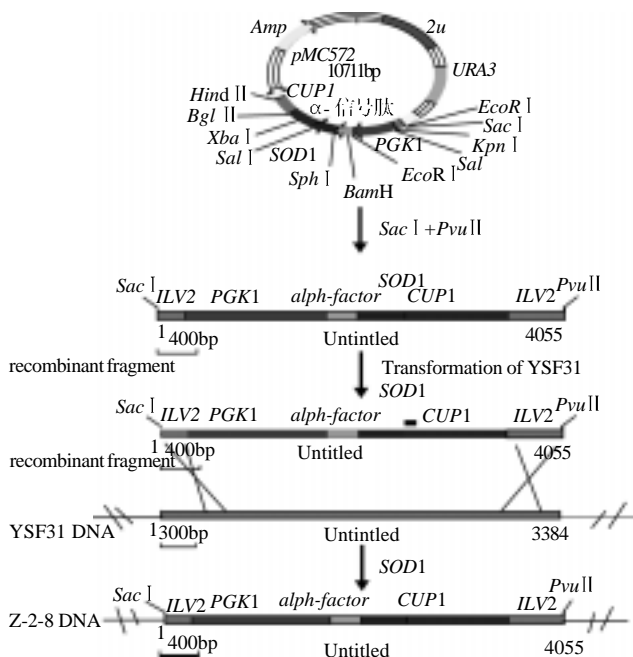


图4 通过同源重组构建Z-2-8工程菌

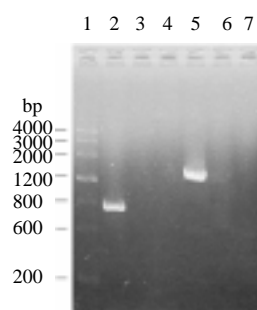
Fig.4 Construction of recombinant yeast strain Z-2-8

用*Sac* I和*Pvu* II酶切重组质粒pMC572得到一个

4.0kb大小的片段。此片段含有*SOD1*、*CUP1*、*PGK1*和 α -factor基因,两端含有 α -乙酰乳酸合成酶基因(*ILV2*)的5'端和3'端序列。用该片段转化啤酒酵母工业菌株YSF31,在*ILV2*位点上与染色体发生同源重组,构建出Z-2-8工程菌(图4)。通过细胞对硫酸铜的抗性初步筛选转化子,分别在5、6、7、8mmol/L的铜抗性平板上筛选,发现受体菌只能在5mmol/L的平板上生长,其他均不能生长,而转化子在5、6、7、8mmol/L的铜抗性平板上都能生长。

2.3 转化子的验证

2.3.1 PCR扩增验证



1. Marker III; 2、5. 转化子的PCR产物; 3、6. 受体菌的PCR产物; 4、7. 阴性对照。

图5 受体菌和转化子进行的PCR分析

Fig.5 PCR analysis of host and recombinant strains

以受体菌和转化子的总DNA为模板,分别用引物 α -信号肽-I(5'-ACGAATCCCCAACGATGAGATTTCCTTC-3')和*SOD1*的引物P2与*CUP1*(5'-CCAAGATCTCGCTATACGTGCATATGTTC-3')和*SOD1*的引物P1,进行PCR扩增。结果在受体菌中没有扩增出任何片段,而在挑选的转化子中,分别扩增出了大小为0.78kb和1.5kb的片段(图5),且大小与预期的结果一致,这说明超氧化物歧化酶基因、铜抗性基因、3-磷酸甘油酸激酶基因和 α -factor基因都已经整合到染色体上。

2.3.2 AHAS酶活

表1 转化子和受体菌的AHAS酶活性的比较

Table 1 Comparison of AHAS activity of host and recombinant strains

菌株	AHAS 酶比活力(U/mg pro)
YSF31	4.05
Z-2-8	1.99

AHAS酶活力测定结果显示,在转化子中AHAS酶活有了明显的降低,只相当于受体菌的50%(表1)。由此可见*SOD1*、*CUP1*、*PGK1*和 α -factor基因已经插入到*ILV2*基因内部,转化子中至少有一条等位基因被破坏,因此相应的转化子命名为Z-2-8。

2.4 转化子的遗传稳定性分析

按照1.6节方法中所述,从YEPD平板上挑选Z-2-8和受体菌的单菌落各100个,在无菌水中饥饿4h后分别接种在不同的培养基上,28℃培养72h后观察生长情况,发现受体菌在YEPD平板上全部生长而在6mmol/L的铜抗性平板上完全不生长;转化子的100个单菌落在YEPD平板上和6mmol/L的铜抗性平板上均能生长。结果表明,该啤酒酵母工程菌具有较高的遗传稳定性。

2.5 啤酒酵母工程菌的三角瓶麦汁小型发酵实验

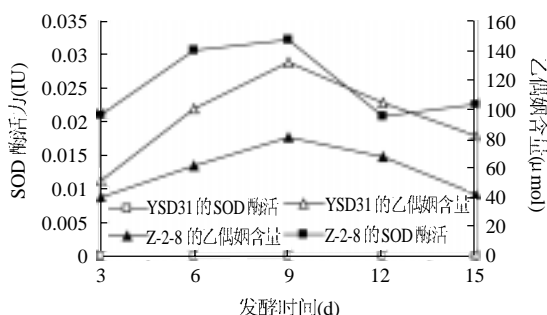


图6 啤酒酵母工程菌和受体菌的SOD酶活和乙偶姻含量的比较

Fig.6 Changing curves of acetoin content and SOD activity of recombinant strain and host during fermentation

表2 转化子和受体菌其他发酵指标的检测

Table 2 Comparisons of other fermentation indicators of host and recombinant strains

项目	YSF31	Z-2-8
pH	4.42	4.40
絮凝性(%)	88.56	84.74
α -N氨基酸同化率(%)	52.7	53.5

按照材料和方法中所述进行小试实验,每三天取样检测一次。由于SOD是一种胞内酶,不能自行分泌到胞外,而本实验通过基因工程手段在其前面增添一个 α -信号肽调控其分泌表达,使胞内的SOD可以分泌到胞外起作用。检测可见,受体菌的发酵液中完全没有SOD的酶活性,而啤酒酵母工程菌的发酵液中一直都有酶活;同时啤酒酵母工程菌的发酵液中乙偶姻的含量一直比受体菌低,而峰值只是受体的61.7%(图6)。可见 α -信号肽基因使SOD成功分泌到胞外;而ILV2基因的破坏,使AHAS酶活明显降低,使双乙酰合成减少,最终导致胞外乙偶姻含量减少。发酵结束后的其他指标如絮凝性、 α -N氨基酸同化率、pH值等啤酒酵母工程菌和受体菌基本相同(表2)。由CO₂减重实验的结果可以看出,啤酒酵母工程菌的发酵速度基本没有发生改变,说明基因ILV2被破坏并没有影响到酵母的其他性质以及繁殖速度。

3 讨论

本实验采用白克隆技术通过同源重组使青岛啤酒酵母染色体上与酿酒酵母同源的等位基因ILV2内部的DNA

片段被PGK1、 α -factor、SOD1和CUP1基因所取代,得到AHAS酶活明显降低的啤酒酵母工业菌株。由于在ILV2基因内部插入了SOD1基因,并且使SOD这种胞内的酶在 α -信号肽的调控作用下能够成功的分泌到发酵液中,使啤酒抗老化的能力得到提高,并且对保持啤酒风味的稳定性有很大的帮助。AHAS酶活降低势必会导致双乙酰合成的减少,而双乙酰的减少可以缩短啤酒的成熟期,同时也有利于啤酒风味性的改善。

近年来啤酒工作者在改善啤酒风味和延长保质期的生产菌株遗传改良研究方面做了大量尝试,中科院微生物研究所的张吉娜等^[11]成功地将 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶基因(GSH1)导入啤酒酵母工业菌株,得到了GSH含量增加,抗老化能力增强的啤酒酵母新的工业菌株。国内也有学者将来源于细菌的 α -乙酰乳酸脱羧酶引入酵母中的报道^[12],但是用引入来源于细菌的 α -乙酰乳酸脱羧酶基因的酵母工程菌生产出的啤酒是否安全,是否能被消费者接受还需要长时间的实践证明。而本研究尝试利用酵母本身的DNA来转化和修饰酵母基因,整个遗传操作过程中涉及到的超氧化物歧化酶基因SOD1、铜抗性基因CUP1、3-磷酸甘油酸激酶基因PGK1和 α -factor基因均来源于啤酒酵母本身,没有任何外源基因的参与,因此具有生物安全性,这种工程菌生产出来的啤酒更容易被广大的消费者所接受,具有重要的应用价值。

参考文献:

- [1] 管敦仪. 啤酒工业手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1982.
- [2] DEQUIN S. The potential of genetic engineering for improving brewing, wine-making and baking yeasts[J]. Appl Microbial Biotechnol, 2001, 56(5/6): 577-588.
- [3] HILL J E, MYERS A M, KOERNER T J, et al. Yeast *E.coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites[J]. Yeast, 1986, 2(3): 163-167.
- [4] SHORT J M, FERNANDEZ J M, SORGE J A, et al. λ ZAP: A bacteriophage λ expression vector with *in vivo* excision properties[J]. Nucleic Acids Res, 1988, 16(15): 7583-7600.
- [5] SAMBROOK J, FRITSEH E F, MANIATIS T. Molecular cloning: A laboratory manual[M]. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 325-331.
- [6] ALISON A, DANIEL E G, CHRIS A K. Methods in yeast genetics: A cold spring harbor laboratory course manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.
- [7] BERMINGHAM-MCDONOGH O, GRALLA E B, VALENTINE J S, et al. The copper, zinc-superoxide dismutase gene of *Saccharomyces cerevisiae*: cloning, sequencing, and biological activity[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85(13): 4789-4793.
- [8] MAGEE P T, ROBICHON-SZULMAJSTER D H. The regulation of isoleucinevaline biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. 2. Identification and characterization of mutants lacking acetohydroxyacid synthase [J]. Eur J Biochem, 1968, 3(4): 502-506.
- [9] PANG S S, DUGGLEBY R G. Regulation of yeast acetohydroxyacid synthase by valine and ATP[J]. Biochem J, 2001, 357(3): 749-757.
- [10] MARKLUND S, MARKLUND G. Involvement of the superoxide anion radical in the autooxidation of pyrogallol and convenient assay for superoxide dismutase[J]. Eur J Biochem, 1974, 47(3): 469-474.
- [11] 张吉娜, 何秀萍, 郭雪娜, 等. 低双乙酰抗老化啤酒酵母工程菌的构建[J]. 生物工程学报, 2005, 21(6): 942-946.
- [12] 秦玉静, 刘巍峰, 高东, 等. 含 α -乙酰乳酸脱羧酶基因重组酿酒酵母的啤酒发酵[J]. 山东大学报: 理学版, 2000, 35(2): 235-239.