

# CYS3基因的敲除及其对*Saccharomyces cerevisiae* 3-甲硫基丙醇合成代谢的影响

刘 丽<sup>1</sup>, 张 婵<sup>1,2,\*</sup>, 梁婧如<sup>1</sup>, 王成涛<sup>1,2,\*</sup>, 赵吉兴<sup>3</sup>

(1.北京工商大学 北京市食品添加剂工程技术研究中心, 北京 100048; 2.北京市食品风味化学重点实验室, 北京 100048;

3.山东中惠食品有限公司, 山东 惠民 251706)

**摘 要:** 研究胱硫醚 $\gamma$ -裂解酶基因CYS3敲除对*S. cerevisiae* 3-甲硫基丙醇合成代谢的影响。将编码胱硫醚 $\gamma$ -裂解酶的CYS3基因和抗性标记基因Zeocin克隆, 构建敲除组件CYS3 $\Delta$ :Zeocin, 醋酸锂法将其转化导入*S. cerevisiae* S288C表达, 构建CYS3基因敲除的工程菌。结果表明: 摇瓶发酵120 h时, 工程菌*S. cerevisiae* C<sub>3</sub>和*S. cerevisiae* S288C的3-甲硫基丙醇生成量分别为0.60 g/L和0.94 g/L, *S. cerevisiae* C<sub>3</sub>较野生型S288C的3-甲硫基丙醇生成量降低36.2%。说明CYS3基因敲除对*S. cerevisiae*的3-甲硫基丙醇有较大影响, 并呈现负调节作用。

**关键词:** 酿酒酵母; 胱硫醚 $\gamma$ -裂解酶; 基因敲除; 3-甲硫基丙醇合成; 负调节

## Effects of Knockout of Gene CYS3 on Methionol Anabolism in *Saccharomyces cerevisiae*

LIU Li<sup>1</sup>, ZHANG Chan<sup>1,2,\*</sup>, LIANG Jing-ru<sup>1</sup>, WANG Cheng-tao<sup>1,2,\*</sup>, ZHAO Ji-xing<sup>3</sup>

(1. Beijing Engineering and Technology Research Center of Food Additives, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China; 2. Beijing Key Laboratory of Food Flavor Chemistry, Beijing 100048, China;

3. Shandong Zhonghui Food Co. Ltd., Huimin 251706, China)

**Abstract:** This work studied effects of knockout of gene CYS3 on methionol anabolism in *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*). A fragment of gene CYS3 and the resistance marker gene Zeocin were cloned and a construct of knockout of gene CYS3 CYS3 $\Delta$ :Zeocin was built. Using chemical lithium acetate method, the component (CYS3 $\Delta$ :Zeocin) was introduced into *S. cerevisiae* S288C and an engineering bacterium with the knockout of gene CYS3 was obtained. The results showed that methionol yields of *S. cerevisiae* C<sub>3</sub> and *S. cerevisiae* S288C were 0.60 g/L and 0.94 g/L in shake flask fermentation at 120 h, respectively. Compared to that of *S. cerevisiae* S288C, the methionol yield of *S. cerevisiae* C<sub>3</sub> was decreased by 36.2%. These results suggested that knockout of gene CYS3 had a great influence on methionol anabolism, which appeared to play a negatively regulatory role.

**Key words:** *S. cerevisiae*; cystathionine lyase; gene knockout; methionol anabolism; negative regulatory

中图分类号: Q815

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2014) 05-0139-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201405028

3-甲硫基丙醇(又名菠萝醇, methionol)是我国芝麻香型白酒的特征性香味物质,也是葡萄酒、啤酒、威士忌、白兰地、酱油、豆酱、奶酪等多种发酵食品的重要香气组分<sup>[1-2]</sup>。3-甲硫基丙醇的香气阈值较低,在食品中建议添加量为0.1~10 mg/kg,其风味按浓度变化依次呈现出麦芽香味、香油味和熟土豆味,常用于调配菠萝、柑橘、辣根、番茄、洋葱、猪肉、牛肉、鸡肉、巧克力、酒用香精等多种香精<sup>[1-2]</sup>。目前,3-甲硫基丙醇的

生产方法主要是化学合成<sup>[2-3]</sup>,尽管化学合成法成本廉价,但存在诸如原料毒性高、合成过程污染大、有毒副产物难于完全去除等问题。微生物转化制备的天然香料,其构型、手性单一,有助于香气品质的提高,是近年来天然香料制备的重要发展方向<sup>[3-8]</sup>。

Philippe<sup>[5]</sup>和Landaud<sup>[6]</sup>等利用<sup>13</sup>C-核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)、气相色谱-质谱联用仪(gas chromatograph-mass spectrometer-computer, GC-MS)研

收稿日期: 2013-08-17

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31071593); 教育部科学技术研究重点项目(211101); 北京市教委科技面上项目(KM201110011001)

作者简介: 刘丽(1987—),女,硕士研究生,研究方向为食品生物技术。E-mail: 457165343@qq.com

\*通信作者: 张婵(1984—),女,讲师,博士,研究方向为食品生物技术。E-mail: zhangchan@th.btbu.edu.cn

王成涛(1969—),男,教授,博士,研究方向为食品生物技术。E-mail: wct5566@163.com

究酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 的突变株, 初步确定了L-蛋氨酸 (methionine, L-Met) 生成3-甲硫基丙醇的代谢途径和调控酶。L-蛋氨酸首先在氨基转移酶的作用下通过转氨反应生成 $\alpha$ -酮- $\gamma$ -甲硫基-丁酸, 然后在脱羧酶作用下脱羧生成3-甲硫基丙醛, 最后在还原酶作用下还原生成3-甲硫基丙醇。L-蛋氨酸在胱硫醚- $\gamma$ -裂解酶 (cystathionine- $\gamma$ -lyase, EC4.4.1.1, Cys3) 作用下转化生成甲硫醇、 $\alpha$ -酮丁酸和氨气<sup>[9-10]</sup>, 这是酿酒酵母的L-蛋氨酸分解代谢另一个途径。Rebeille等<sup>[11]</sup>克隆了拟南芥编码MGL的cDNA, 发现拟南芥分解代谢蛋氨酸是去甲硫基反应开始的。Alting等<sup>[12]</sup>研究认为, Cys3是广泛底物催化活性的酶, 在不同生物体中参与不同代谢反应, 其作用不尽相同。NCBI数据库资料表明, *S. cerevisiae*的胱硫醚- $\gamma$ -裂解酶由CYS3基因编码表达, 该酶参与蛋氨酸、半胱氨酸、胱硫醚的分解代谢。Caroline等<sup>[13]</sup>研究了*Oenococcus oeni*的Cys3酶参与去硫基团反应, 可催化L-蛋氨酸生成甲硫醇、胱硫醚生成丙酮酸、半胱氨酸生成 $\alpha$ -酮丁酸等, 过量表达该酶基因的工程菌株, 其酶活性显著增高, 相关产物生成量明显增加。本实验克隆*S. cerevisiae* S288C的CYS3基因, 并与抗性标记基因Zeocin连接, 构建敲除组件CYS3 $\Delta$ :Zeocin, 将其转化整合到S288C基因组, 构建CYS3基因敲除的*S. cerevisiae*工程菌, 研究探索CYS3基因敲除对L-蛋氨酸分解代谢的调控效应及其3-甲硫基丙醇合成代谢的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* S288C (ATCC<sup>®</sup>26108<sup>™</sup>)、大肠杆菌 *E. coli* TOP10感受态细胞 天根生化科技 (北京) 有限公司; pPICZa A,B,C 本实验室保存。

质粒提取试剂盒 天根生化科技 (北京) 有限公司; DNA Marker 北京全式金生物技术有限公司; Prime START<sup>™</sup> DNA Polymerase、限制性内切酶、T4 DNA连接酶 美国Promega公司; 酵母提取物、胰蛋白酶 美国Oxoid公司; 甲醇 (色谱纯) 天津市西华特种试剂厂; 3-甲硫基丙醇 (分析纯) 美国Sigma公司; 其余试剂均为国产分析纯。

### 1.2 培养基

Luria-Bertani (LB) 培养基: 蛋白胨1 g/100 mL、酵母粉0.5 g/100 mL、氯化钠1 g/100 mL, 添加100  $\mu$ g/mL氨苄青霉素筛选转化子, 固体培养基添加1.6 g/100 mL琼脂粉。

酵母浸出粉葡萄糖培养基 (yeast extract peptone dextrose, YPD) 培养基: 蛋白胨2 g/100 mL、酵母粉1 g/100 mL、葡萄糖2 g/100 mL, 固体培养基另加

1.5 g/100 mL的琼脂粉。添加不同浓度的Zeocin用于筛选酵母转化子。

发酵培养基<sup>[14]</sup>: L-蛋氨酸 10 g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.24 g/L、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.16 g/L, 调节pH 5.0, 121  $^{\circ}$ C灭菌20 min; 葡萄糖20 g, 溶于0.1 L蒸馏水, 0.22  $\mu$ m滤膜除菌; 无氨基酸氮源1.7 g, 溶解于0.1 L蒸馏水, 0.22  $\mu$ m滤膜除菌。

### 1.3 引物设计

本实验所用引物序列如表1所示。

表1 实验所用引物  
Table 1 The sequences of primers used in this study

引物名称	引物序列 (5'→3')	酶切位点
CYS3-F	ATGACTCTACAAGAATCTGATAAAT	
CYS3-R	TTAGTTGGTGGCTTGTTTC	
Zeocin-F	TCGAT CGATCG CCCACACACCATAGCTTC	Sal I
Zeocin-R	TCGAT CGATCG AGCTTGCAAAATTAAGCC	EcoR I

### 1.4 PCR扩增及敲除组件CYS3 $\Delta$ :Zeocin的构建

对酿酒酵母 *S. cerevisiae* 采用酶法破壁<sup>[15]</sup>后提取其基因组, 根据GenBank公布*S. cerevisiae*的胱硫醚- $\gamma$ -裂解酶基因CYS3 (NM-001178157) 序列设计引物, 以*S. cerevisiae*基因组为模板, 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增CYS3基因。利用表2的PCR反应体系, 总体积为50  $\mu$ L, 反应程序: 94  $^{\circ}$ C、5 min, 94  $^{\circ}$ C、30s, 54  $^{\circ}$ C、40s, 72  $^{\circ}$ C、40~80s, 34个循环, 72  $^{\circ}$ C延伸10 min。利用CYS3基因序列上单一酶切位点SalI和EcoRI将Zeocin基因插入CYS3基因序列中, 构建敲除组件CYS3 $\Delta$ :Zeocin, 实现CYS3基因的敲除和Zeocin抗性基因表达。

表2 PCR反应体系  
Table 2 Components of PCR reaction system

CYS3基因PCR扩增反应体系		Zeocin基因PCR扩增反应体系	
试剂	用量/ $\mu$ L	试剂	用量/ $\mu$ L
CYS3-F	1.0	Zeocin-F	1.0
CYS3-R	1.0	Zeocin-R	1.0
酵母基因组	1.0	pPICZa A,B,C质粒	1.0
DNA polymerase	0.4	DNA polymerase	0.4
5 $\times$ Prime STAR buffer	10.0	5 $\times$ Prime STAR buffer	10.0
dNTP mixture	4.0	dNTP mixture	4.0
ddH <sub>2</sub> O	32.6	ddH <sub>2</sub> O	32.6

### 1.5 敲除组件CYS3 $\Delta$ :Zeocin的构建与鉴定

敲除组件CYS3 $\Delta$ :Zeocin的构建策略如图1所示。将带有Sal I和EcoRI酶切位点的CYS3基因片段, 37  $^{\circ}$ C过夜双酶切, 回收; 回收带有Sal I和EcoRI酶切位点的Zeocin片段。上述两回收片段经T4 DNA Ligase于16  $^{\circ}$ C连接过夜, 连接产物转化于*E. coli* TOP10感受态细胞, 选取阳性菌落扩增繁殖进行重组质粒提取并测序。以测序正确的阳性转化子质粒为模板, 扩增得到敲除组件CYS3 $\Delta$ :Zeocin片段, 用于转化酿酒酵母。

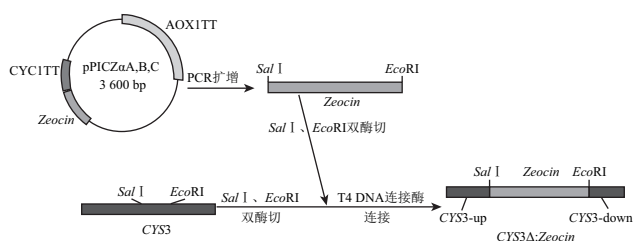


图1 敲除组件CYS3Δ:Zeocin的构建策略

Fig.1 Building strategy of knocking out gene CYS3 CYS3Δ:Zeocin

## 1.6 敲除组件CYS3Δ:Zeocin转化酿酒酵母

采用LiAc法<sup>[16]</sup> (Invitrogen公司提供) 制作酿酒酵母感受态细胞及敲除组件的转化, Zeocin抗性筛选阳性转化子, 获得的转化子经PCR验证。

## 1.7 阳性转化子及野生菌株的发酵培养

将*S. cerevisiae* C<sub>3</sub>、*S. cerevisiae* S288C分别接种到含YPD液体培养基中, 30℃、220 r/min活化24 h, 转入发酵培养基I中发酵。发酵18 h后取适量发酵液, 以后每隔24 h取1次, 高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 检测发酵液中3-甲硫基丙醇含量。

## 1.8 发酵产物3-甲硫基丙醇的检测

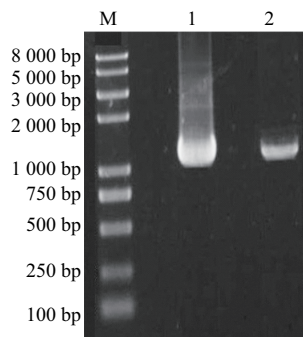
于8000 r/min离心15 min发酵培养液, 上清液于HPLC检测3-甲硫基丙醇<sup>[17-18]</sup>。采用LC-20A岛津液相色谱仪, 检测条件: 色谱柱RP-C<sub>18</sub>色谱柱 (4.6 mm×150 mm, 5 μm), V (甲醇): V (水) = 40:60作为流动相, 检测波长215 nm, 进样量10 μL, 流速1.0 mL/min。

## 1.9 统计分析

所有实验都进行3次重复, 数据采用SPSS18.0软件分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间数据比较用单因素方差分析,  $P < 0.05$ 表示差异显著,  $P < 0.01$ 表示差异极显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 胱硫醚-γ-裂解酶基因CYS3的克隆



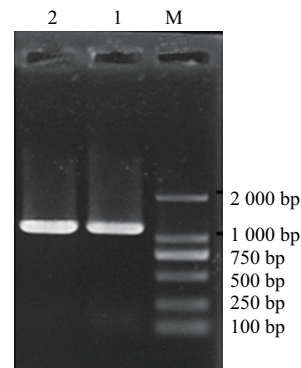
M. DL8000 Marker; 1. CYS3基因片段; 2. 胶回收后的CYS3基因片段。

图2 PCR扩增CYS3基因的电泳图谱

Fig.2 The electrophoretogram of PCR amplification of gene CYS3

根据GenBank报道, CYS3基因大小为1184 bp。以*S. cerevisiae* S288C基因组为模板, 设计引物CYS3-F和CYS3-R, PCR扩增CYS3基因, 1%琼脂糖凝胶电泳PCR产物如图2所示, 泳道1、2的1200 bp左右有一条明显扩增带, 其大小与文献报道的一致<sup>[19]</sup>。

### 2.2 敲除组件中Zeocin基因序列的克隆



M. DL2000 Marker; 1. Zeocin基因片段; 2. 胶回收后的Zeocin基因片段。

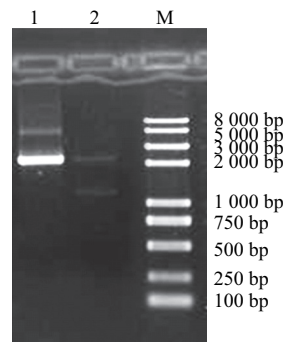
图3 PCR扩增Zeocin基因的电泳图谱

Fig.3 The electrophoretogram of PCR amplification of gene Zeocin

采用引物Zeocin-F和Zeocin-R扩增Zeocin基因。图3的Zeocin基因扩增产物电泳条带大小为1100 bp左右, 与预期大小1128 bp相符, 试剂盒回收后送生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序验证。

### 2.3 敲除组件CYS3Δ:Zeocin的构建及转化

回收片段经T4 DNA Ligase连接过夜, 蓝白斑筛选得到阳性转化子, 提取阳性菌落测序。以测序正确的阳性转化子质粒为模板, 以蓝斑菌为阴性对照, 扩增得到敲除组件CYS3Δ:Zeocin片段 (图4), 并转化导入*S. cerevisiae* S288C, Zeocin抗性筛选阳性克隆子 (图5)。分别提取阳性转化子和野生菌基因组, 并设计引物CYS3-F和CYS3-R PCR验证, 从阳性转化子*S. cerevisiae* C<sub>3</sub>扩增出大小为2100 bp左右的特异性条带CYS3Δ:Zeocin, 野生型基因组条带大小为1200 bp, 与预期相符 (图6), 说明敲除组件CYS3Δ:Zeocin已转入*S. cerevisiae* S288C菌株, 成功构建了工程菌*S. cerevisiae* C<sub>3</sub>。

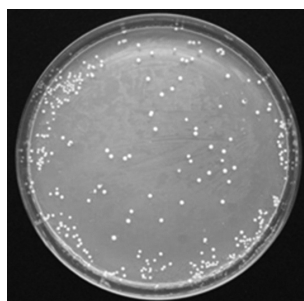
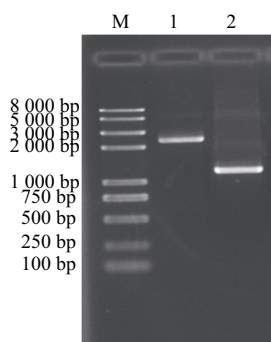


M. DL8000 Marker; 1. CYS3Δ:Zeocin片段; 2. 阴性对照。

图4 敲除组件CYS3Δ:Zeocin的PCR电泳图谱

Fig.4 The electrophoretogram of PCR amplification of CYS3Δ:Zeocin



图5 *S. cerevisiae* C<sub>3</sub>阳性转化子的筛选Fig.5 Screening of the positive transformation of *S. cerevisiae* C<sub>3</sub>M. DL8000 Marker; 1. *S. cerevisiae* C<sub>3</sub>基因组为模板扩增的基因片段; 2. *S. cerevisiae* S288C基因组为模板扩增的基因片段。图6 *S. cerevisiae* C<sub>3</sub>的PCR验证Fig.6 Validation of *S. cerevisiae* C<sub>3</sub>

#### 2.4 CYS3基因敲除对*S. cerevisiae* 3-甲硫基丙醇合成代谢及Cys3酶活性的影响

将工程菌*S. cerevisiae* C<sub>3</sub>和野生型菌株*S. cerevisiae* S288C活化后接种于发酵培养基I, 摇瓶发酵, 定时取样检测。由图7可知, 发酵24 h后, *S. cerevisiae* C<sub>3</sub>和*S. cerevisiae* S288C的3-甲硫基丙醇生成量趋于稳定; 发酵120 h时, *S. cerevisiae* C<sub>3</sub>和*S. cerevisiae* S288C的3-甲硫基丙醇生成量分别为0.60、0.94 g/L, *S. cerevisiae* C<sub>3</sub>的目的产物生成量较野生型菌株降低36.2% ( $P < 0.01$ )。野生型*S. cerevisiae* S288C表现出一定的胱硫醚- $\gamma$ -裂解酶(Cys3)活性, 而工程菌C<sub>3</sub>未检测到Cys3酶活性。

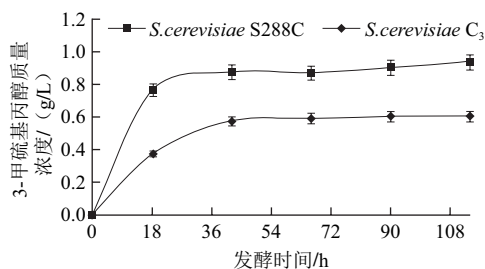


图7 野生型和工程菌株的3-甲硫基丙醇产量比较

Fig.7 Comparison of methionol yields between *S. cerevisiae* S288C and *S. cerevisiae* C<sub>3</sub>

### 3 讨论

微生物的L-蛋氨酸分解代谢主要由胱硫醚- $\gamma$ -裂解酶、去甲硫基酶(EC4.4.1.11, methionine gamma-lyase)或其同工酶(cystathionine  $\beta$ -lyase, CBL)催化完成。Lee等<sup>[20]</sup>发现瑞士乳杆菌在以L-蛋氨酸为底物时, 过量表达去甲硫基酶的同功酶基因CBL, 构建的工程菌比野生型菌株或CBL缺失突变株产生更多甲硫醇。本课题组前期研究中并未检测出*S. cerevisiae* S288C的去甲硫基酶活性存在, 设计引物也未PCR克隆出其MGL基因, 这与Philippe等<sup>[5]</sup>研究报道一致。

本实验构建了胱硫醚- $\gamma$ -裂解酶基因CYS3敲除的工程菌*S. cerevisiae* C<sub>3</sub>, 研究CYS3基因敲除对*S. cerevisiae*的L-蛋氨酸分解代谢途径的影响。结果表明, 敲除胱硫醚- $\gamma$ -裂解酶基因CYS3对*S. cerevisiae*的3-甲硫基丙醇生物合成代谢有显著性影响, 摇瓶发酵120 h时工程菌*S. cerevisiae* C<sub>3</sub>的3-甲硫基丙醇产量较野生型S288C降低了36.2%, 目的产物3-甲硫基丙醇产量有较大幅度的降低, 呈现明显负调节作用。这一结果与国外一些相关性研究有一定差异, Knoll等<sup>[13]</sup>研究了*Oenococcus oeni*的胱硫醚- $\gamma$ -裂解酶参与去硫基团反应, 过量表达CYS3基因的菌株, 其酶活性显著增高, L-蛋氨酸的代谢相关中间产物生成量明显增加。Alting等<sup>[12]</sup>研究认为, Cys3是广泛底物催化活性的酶, 在不同生物体中参与不同代谢反应, 其作用不尽相同, *Lactococcus lactis*裂解酶( $\beta$ -Lyase)在干酪风味物质形成过程中发挥一定作用, 可催化L-蛋氨酸生成甲硫醇、胱硫醚生成丙酮酸、半胱氨酸生成 $\alpha$ -酮丁酸等。NCBI数据库资料表明, *S. cerevisiae*的胱硫醚- $\gamma$ -裂解酶由CYS3基因编码表达, 该酶参与蛋氨酸、半胱氨酸、胱硫醚的分解代谢。本结果是CYS3基因对*S. cerevisiae*的3-甲硫基丙醇合成代谢呈现负调节效应, 推测CYS3基因编码的胱硫醚- $\gamma$ -裂解酶, 可能同时调节多个代谢途径, CYS3基因的敲除可能影响其他代谢途径, 导致酿酒酵母正常代谢失调, 从而影响了3-甲硫基丙醇合成, 其机理有待深入研究。

### 参考文献:

- [1] 孙宝国. 食品添加剂[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008: 59-85.
- [2] 孙宝国, 何坚. 香料化学与工艺学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 1-125.
- [3] 王成涛, 苏伟, 陈钢. 天然食品配料: 生产及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 50-120.
- [4] BURDOCK G A. Fenaroli's handbook of flavor ingredients[M]. Boca Raton: The Chemical Rubber Company Press, 2004.
- [5] PHILIPPE P, OLIVER D. Methionine catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. FEMS Yeast, 2006, 6(1): 48-56.
- [6] LANDAUD S, HELINCK S, BONNARME P. Formation of volatile sulfur compounds and metabolism of methionine and other sulfur compounds in fermented food[J]. Applied Microbiology and

- Biotechnology, 2008, 77(6): 1191-1205.
- [7] TAN A W, LEE P R, SEOW Y X, et al. Volatile sulphur compounds and pathways of *L*-methionine catabolism in *Williopsis* yeasts[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 95(4): 1011-1020.
- [8] ETSCHMANN M M, SELL D, SCHRADER J. Production of 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate from *L*-phenylalanine by coupling whole-cell biocatalysis with organophilic pervaporation[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2005, 92(5): 624-634.
- [9] VURALHAN Z, MORAIS M A, TAI S L, et al. Identification and characterization of phenylpyruvate decarboxylase genes in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(8): 4534-4541.
- [10] EELKO G. TER S, MARCEL T. Pyruvate decarboxylase catalyzes decarboxylation of branched-chain 2-oxo acids but is not essential for fusel alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 12: 1303-1307.
- [11] REBEILLE F, JABRIN S, BLIGNY R, et al. Methionine catabolism in arabidopsis cells is initiated by a gamma-cleavage process and leads to *S*-methylcysteine and isoleucine syntheses[J]. Proceedings of National Academy of Sciences, 2006, 103: 15687-15692.
- [12] ALTING A C, ENGELS W, van SCHALKWIJK, et al. Purification and characterization of cystathionine  $\beta$ -lyase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B78 and its possible role in flavor development in cheese[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(11): 4037-4042.
- [13] KNOLL C, du TOIT M, SCHNELL S, et al. Cloning and characterisation of a cystathionine  $\beta/\gamma$ -lyase from two *Oenococcus oeni* oenological strains[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 89(4): 1051-1060.
- [14] ETSCHMANN M M W, KOTTER P, HAUF J, et al. Production of the aroma chemicals 3-(methylthio)-1-propanol and 3-(methylthio)-propylacetate with yeasts[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 80(4): 579-587.
- [15] 贾艳萍, 魏群, 赵军. 对酵母细胞酶法破壁的研究[J]. 中国酿造, 2005, 24(9): 11-13.
- [16] SCHIESTL R H, GIETZ R D. High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier[J]. Current Genetics, 1989, 16(5/6): 339-346.
- [17] 侯晟, 赵磊, 杨雪莲, 等. 酿酒酵母SC408 转化3-甲硫基丙醇条件的研究[J]. 北京工商大学学报: 自然科学版, 2011, 29(2): 18-21.
- [18] 温明显, 王成涛, 杨雪莲, 等. ARO10基因在*Saccharomyces cerevisiae*中克隆表达及其对3-甲硫基丙醇合成代谢的影响[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(4): 1-5.
- [19] HIRAISHI H, MIYAKE T, ONO B. Transcriptional regulation of *Saccharomyces cerevisiae* CYS3 encoding cystathionine  $\gamma$ -lyase[J]. Current Genetics, 2008, 53(4): 225-234.
- [20] LEE W J, BANAVARA D S, HUGHES J E, et al. Role of cystathionine  $\gamma$ -lyase in catabolism of amino acids to sulfur volatiles by genetic variants of *Lactobacillus helveticus* CNRZ 32[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73: 3034-3039.