

低乙醇脱氢酶 II 活性的抗老化啤酒 酵母工程菌的构建

蔡 勇¹ 母 茜¹ 王肇悦² 张博润² 晏本菊^{1*}

(1. 四川农业大学生命科学与理学院 雅安 625014)

(2. 中国科学院微生物研究所 北京 100101)

摘 要: 采用自克隆技术, 破坏啤酒酵母工业菌株 YSF31 的 *ADH2* 基因, 在 *ADH2* 基因位点插入来源于 YSF31 的编码 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶的 *GSH1* 基因和铜抗性筛选标记 *CUP1* 基因。通过铜抗性筛选转化子, 经 PCR 和乙醇脱氢酶 (ADH) 活性测定验证, 获得了 1 株啤酒酵母工程菌。10°P 麦芽汁发酵实验显示, 自克隆菌株的乙醇脱氢酶 活性是受体菌的 65%, 谷胱甘肽含量比受体菌 YSF31 的高 34%。其他发酵指标并没有发生明显改变。由于 DNA 操作过程中没有外源基因介入, 因此啤酒酵母工程菌为生物安全的自克隆菌株, 具有重要的应用价值。

关键词: 啤酒酵母工业菌株, 谷胱甘肽, 乙醇脱氢酶, 自克隆

Construction of Self-cloning Industrial Brewing Yeast with High-glutathione Production and Low-ADH II Enzyme Activity

CAI Yong¹ MU Qian¹ WANG Zhao-Yue² ZHANG Bo-Run² YAN Ben-Ju^{1*}

(1. College of Life Sciences, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014)

(2. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Science, Beijing 100101)

Abstract: Self-cloning strains of industrial brewing yeast were constructed by integrating *Saccharomyces cerevisiae* genes, γ -glutamylcysteine synthetase gene (*GSH1*) and copper resistant gene (*CUP1*) into the locus of alcohol dehydrogenase II (ADH II) gene (*ADH2*). The self-cloning strains were selected for their resistance to CuSO_4 and identified by PCR amplification. The results of ADH II and glutathione (GSH) assay from fermentation with the self-cloning strains in 500ml conical flask showed that ADH II activity decreased to 65% and GSH content was 1.3 fold compared with that of host yeasts. The self-cloning strains do not contain any heterologous DNA; they may be more acceptable to the public.

Keywords: Industrial brewing yeast, Glutathione, Alcohol dehydrogenase II, Self-cloning

乙醛(CH_3CHO)是啤酒中主要的风味物质之一^[1]。一般啤酒中的含量为 5 mg/L~12 mg/L。国外

优质啤酒的乙醛含量多在 3 mg/L 以下。低浓度的乙醛使啤酒具有芳香味, 高浓度则产生像青草或者苹果

* 通讯作者: Tel: 0835-8525525; ✉ yanbenju@sicau.edu.cn

收稿日期: 2007-12-22; 接受日期: 2008-02-19

腐烂的味道^[2]。乙醛含量已成为国内啤酒风味改良的瓶颈。降低啤酒中乙醛的含量,主要有两种手段:一是通过对发酵工艺的改进降低乙醛含量;二是通过代谢工程,修饰工业菌株的代谢途径达到降低乙醛含量的目的。关于前者有大量的文献报道,但由于啤酒生产对发酵条件要求严格,使此类工艺改进很难在生产中应用。国内外对啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)开展的代谢工程有大量报道,但针对乙醛含量开展的代谢工程研究报道很少。随着对啤酒酵母中乙醛代谢途径的揭示,以及相关基因的克隆,利用基因工程的手段对乙醛代谢过程进行修饰已成为可能。

谷胱甘肽是三肽小分子,具有抗氧化的功能,对细胞有保护作用。增加谷胱甘肽的含量可以提高啤酒的抗老化能力^[3]。 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶基因 *GSH1* 所编码的 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶是谷胱甘肽合成途径中的限速步骤,增强 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶的活性可以达到增加谷胱甘肽含量的目的^[4]。

在发酵后期,发酵液中的葡萄糖不足的情况下,啤酒酵母 *ADH2* 基因编码的ADH II (alcohol dehydrogenase II)催化乙醇脱氢生成乙醛,乙醛氧化生成乙酸盐进入三羧酸循环,为酵母生长提供物质和能量^[5]。*ADH2* 基因在这个代谢途径中是个关键基因。将基因 *GSH1* 通过同源重组插入到啤酒酵母的 *ADH2* 基因位点,成功构建了 1 株低乙醇脱氢酶活性的抗老化啤酒酵母工程菌,为构建低乙醛的啤酒酵母工程菌提供一定的依据和基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 用于克隆实验。啤酒酵母 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。含有 *CUP1* 基因的质粒 pYCUP 和含有 *GSH1* 的质粒 pGF-2 均由实验室保存。

1.2 培养基和工具酶

大肠杆菌培养及所用培养基参照常规方法^[6]。培养酵母菌用 YEPD 培养基按常规配制^[7]。限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA 聚合酶均购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.3 遗传操作

大肠杆菌转化按氯化钙法进行^[6]。啤酒酵母总 DNA 的提取按文献^[7]的方法进行,啤酒酵母的遗传转化按文献^[8]的方法进行。

1.4 引物合成与 PCR 扩增

根据文献报道的 *ADH2* 基因序列^[9]设计引物: P1: 5'-CAAGAATTCAGCACAACAATACCAGTCCG-3'和 P2: 5'-GGCAAGCTTAACATTGATGATACCCTGGG-3'。划线部分为 *EcoR* 和 *Hind* 的识别位点。以 YSF31 的总 DNA 为模板,进行高保真的 PCR 扩增。PCR 反应参数为: 94 变性 40 s; 56 退火 1 min, 72 延伸 2 min, 30 个循环; 72 延伸 15 min。

1.5 自克隆菌株的构建

1.5.1 酵母菌转化: 采用完整细胞转化法,在含 6 mmol/L CuSO₄ 的 YEPD 平板上筛选转化子。

1.5.2 PCR 验证自克隆菌株: 用于 PCR 扩增的引物见表 1。PCR 反应体系为 25 μ L, 2 μ L 10 \times PCR buffer, 1.2 mmol/L MgCl₂, 200 μ mol/L dNTP, 400 ng 模板 DNA, 0.2 μ mol/L 引物, 和 1.5 U Taq 聚合酶。反应参数: 94 预变性 5 min; 94 变性 40 s, 55 退火 1 min, 72 延伸 3 min, 30 个循环; 72 延伸 15 min。

表 1 引物列表
Table 1 List of primers

Primers	Sequence 5'→3'
CUP1-1	CGCTATACGTGCATATGTTTC
CUP1-2	ATCTGTTGTACTATCCGCTT
GSH1-1	ATCTCATATTGACTTCCTT
GSH1-2	TACAAGATCTAACAGGAGCA

1.6 遗传稳定性分析

将待测菌在 YEPD 斜面上活化,然后转到 5 mL YEPD 培养基中(没有选择压力),28 $^{\circ}$ C 培养,每 24 h 转接 1 次,共转接 5 次后,取菌液涂布 YEPD 平皿,28 $^{\circ}$ C 培养至长出单菌落。分别挑取 100 个单菌落于无菌水中,饥饿 4 h 后,分别接种在 YEPD 及含 6 mmol/L CuSO₄ 的 YEPD 培养基平皿上,28 $^{\circ}$ C 培养 48 h,测定单菌落对 CuSO₄ 的抗性。

1.7 谷胱甘肽含量测定

参照文献^[10]测定 GSH 含量。

1.8 乙醇脱氢酶 II 活性测定

参考文献^[11]。

1.9 小试发酵实验

将酵母菌接入 5 mL 麦芽汁培养基, 25 °C 培养 12 h, 以 10% 的接种量接种于 10 mL 麦芽汁培养基, 25 °C 培养 36 h, 培养液全部接于 270 mL 麦芽汁中, 12 °C 静置培养 20 d。

2 结果

2.1 重组质粒的构建

重组质粒 pACG 的构建: 以 YSF31 的总 DNA

为模板, PCR 扩增出大小 1.7 kb 的 *ADH2* 基因。用 *EcoR* 和 *Hind* 酶切 PCR 产物, 插入质粒 YEp352 的 *EcoR* 和 *Hind* 位点。获得质粒 pYA。用 *Sac* 和 *Sal* 酶切质粒 pYCUP 得到 *CUP1* 基因, 用 *Sal* 和 *Sph* 酶切质粒 pGF-2 得到 *GSH1*, 上述两基因插入到质粒 pYA 的 *Sac* 和 *Sph* 位点。获得质粒 Pacg (图 1)。酶切分析表明重组质粒 pACG 构建正确 (图 2)。该重组质粒中 *ADH2* 基因内部约 0.5 kb 的 DNA 片段被 *CUP1* 和 *GSH1* 替换。

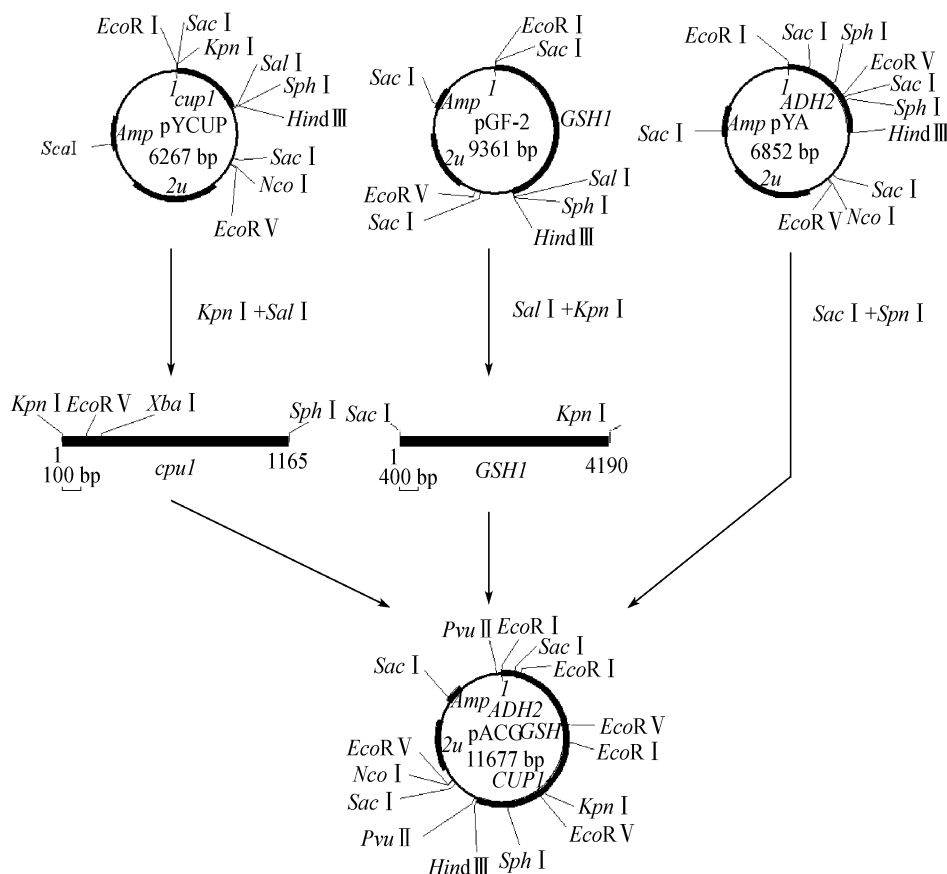


图 1 重组质粒 pACG 的构建

Fig. 1 Construction of recombinant plasmid pACG

2.2 酵母菌的转化与筛选

用 *Pvu* II 酶切重组质粒 pACG 得到 1 个 6.2 kb 大小的 DNA 片段。此片段含有铜抗性基因 *CUP1* 和 -谷氨酰半胱氨酸合成酶基因 *GSH1*, 两端含有克隆的 *ADH2* 基因的 5'端和 3'端序列。用此 DNA 片段转化啤酒酵母 YSF31, 使该片段与染色体在 *ADH2* 位点发生同源重组。通过细胞对硫酸铜的抗性筛选到转化子。

2.3 转化子的验证

2.3.1 PCR 扩增验证: 自克隆菌株的 1 个 *ADH2* 基

因位点的部分序列被 *CUP1* 基因和 *GSH1* 基因替代, 而受体菌的该位点是完整的 *ADH2* 基因序列。以受体菌和自克隆菌株的总 DNA 为模板, 用引物组合 *CUP1*-1/*CUP1*-2, *GSH1*-1/*GSH1*-2, *CUP1*-1/*GSH1*-1 进行 PCR 扩增。结果显示, 受体菌和自克隆菌株都扩增出分别代表 *CUP1* 基因和 *GSH1* 基因的 1.1 kb 和 4.2 kb 的条带, 另外自克隆菌株的 *CUP1*-1/*GSH1*-1 引物组合还扩增出 1 条大约 5.3 kb 的条带, 而受体菌没有扩增出该条带(图 3)。说明 *CUP1* 基因和 *GSH1* 基因被连接整合到了自克隆菌株的染色体上。

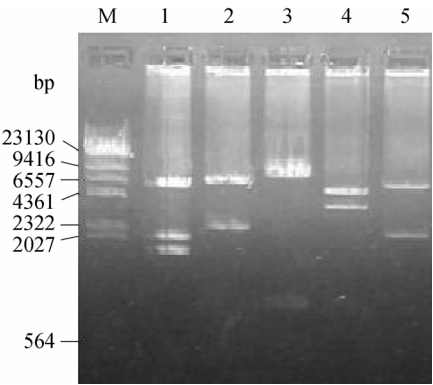


图2 质粒 pACG 的酶切验证图

Fig. 2 Digestion patterns of plasmid pACG

M: DNA marker; 1: *EcoRV* 酶切; 2: *ScaI* 酶切; 3: *SalI* 酶切; 4: *NcoI* 酶切; 5: *EcoRI* 酶切

M: DNA marker; 1: *EcoRV*; 2: *ScaI*; 3: *SalI*; 4: *NcoI*; 5: *EcoRI*

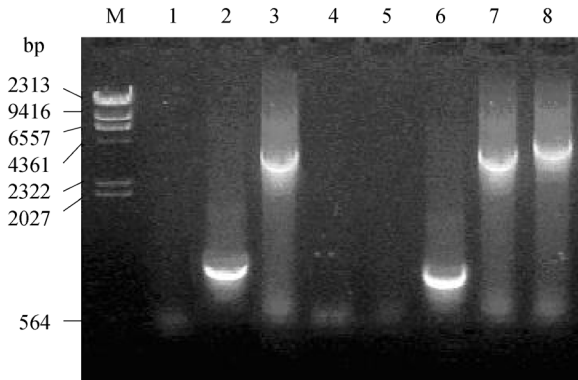


图3 受体菌和转化子的 PCR 分析

Fig. 3 PCR analysis of self-cloning strains and their hosts

M: DNA marker; 1,2,5,6 所用引物为: CUP1-1/ CUP1-2; 3,7 所用引物为: GSH1-1/ GSH1-2; 4,8, CUP1-1/ GSH1-1; 1,5 所用模板为: 阴性对照; 2-4 所用模板为: YSF31 总 DNA; 6-8 所用模板为: 自克隆菌株总 DNA

M: DNA marker; Primers for lane 1,2,5,6: CUP1-1/CUP1-2; Primers for lane 3,7: GSH1-1/GSH1-2; lane 4,8, CUP1-1/GSH1-1; DNA templates for lane 1,5: Negative control; DNA templates for lane 2-4, DNA of YSF31; DNA templates for lane 6-8: DNA of self-cloning strain

2.3.2 ADH II 酶活测定: 按参考文献[10], 对受体菌和自克隆菌株进行培养并诱导酶活。酶活测定结果显示, 自克隆菌株的乙醇脱氢酶 活性是受体菌的 65%。说明自克隆菌株染色体上的 *ADH2* 基因至少有一个被插入破坏。

2.4 遗传稳定性分析

按方法所述, 分别挑选受体菌和自克隆菌株的单菌落各 100 个, 进行遗传稳定性分析。结果显示, 受体菌的 100 个单菌落在 YEPD 培养基上都能生长, 而在含有 6 mmol/L CuSO_4 的 YEPD 培养基上不能生

长。自克隆菌株的 100 个单菌落在 YEPD 培养基和含有 6 mmol/L CuSO_4 的 YEPD 培养基上均能生长。结果说明, 自克隆菌株有很强的遗传稳定性。

2.5 自克隆菌株的小型发酵实验

按方法所述进行小试实验, 每 4 天取样检测, 结果显示(图 4), 第 8 天自克隆菌株的谷胱甘肽含量比受体菌 YSF31 的高 34%。可见 *GSH1* 基因拷贝数的增加使谷胱甘肽合成提高。而 *ADH2* 基因的破坏, 使 ADH II 酶活性明显降低, 自克隆菌株的酶活是受体菌的 65%。自克隆菌株的其他发酵指标如 -N 氨基酸同化率、真正发酵度等与受体菌基本相同(表 2)。由 CO_2 减重实验和真正发酵度的检测结果可以看出, 自克隆菌株的发酵速度和发酵度基本没有发生变化, 说明遗传修饰没有影响酵母的发酵能力。

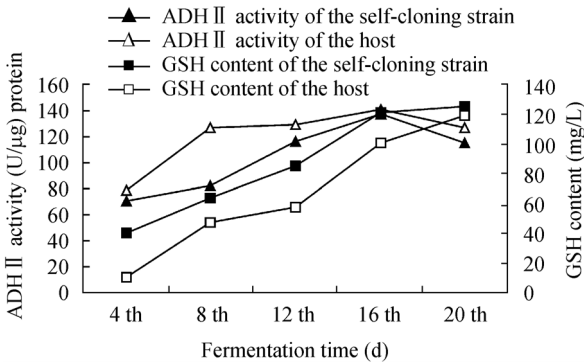


图4 自克隆菌株和受体菌的谷胱甘肽含量和 ADH II 酶活比较

Fig. 4 GSH content and ADH II activity of the self-cloning strain and host

表2 发酵指标的检测		
Table 2 Fermentation profiles		
Profiles	YSF31	Self-cloning strain
CO_2 weight reducing (g/L)	11.84	10.32
Flocculation (%)	88.66	88.70
α -N-amino acid assimilation (%)	53.60	53.12
Real degree fermentation (%)	67.30	66.90

3 讨论

本研究通过同源重组, 使酵母染色体上 *ADH2* 基因内部 DNA 片段被 *CUP1* 基因和 *GSH1* 基因所取代, 获得 1 株低 ADH 酶活, 高 GSH 含量的啤酒酵母工程菌, 并初步测定了工程菌的生理生化指标。在 *ADH2* 基因内部插入的 *GSH1* 基因, 使啤酒酵母工程菌的 GSH 含量增加。由于 GSH 是水溶性的小

分子多肽,在啤酒发酵期间,酵母细胞生成的部分 GSH 能分泌到发酵液。在发酵后期,部分酵母细胞发生自溶,这也能使部分 GSH 释放到发酵液中,因此在成品啤酒中的 GSH 含量也就相应增加,提高啤酒的抗老化能力。*ADH2* 基因被破坏,ADH 酶活降低,理论上将使酵母在发酵后期氧化乙醇的能力变弱,减少后期乙醛生成的量。同时菌株的发酵能力并没有明显的变化,这为下一步低乙醛含量工程菌的获得提供了实验依据和基础。

经过遗传修饰的啤酒酵母用来发酵生产啤酒,其生物安全性是个重要的问题。本研究利用自克隆技术,有针对地对啤酒酵母进行遗传修饰。而且整个遗传操作过程中涉及到的铜抗性筛选标记基因 *CUP1* 和 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶基因 *GSH1* 均来源于啤酒酵母 YSF31 本身,没有任何外源基因的参与,所以具有生物安全性。获得的基因工程菌具有重要的应用价值。

参 考 文 献

- [1] Margalith PZ. Flavor Microbiology. Springfield, Illinois: Charles C Thomas Publishers, 1981, pp.233–234.
- [2] Adams MR, Moss MO. Food Microbiology. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, 1995, p.290.
- [3] Orna CH, Gisela S. Roles of the glutathione- and thioredoxin- dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. *Ann Rev Microbiol*, 2000, **54**: 439–461.
- [4] Fu XY, He XP, Guo XN, *et al.* Increasing glutathione formation by functional expression of the γ -glutamyl-cysteine synthetase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 2004, **26**(5): 415–417.
- [5] Michael GS, Shelley GD, Michael S, *et al.* Microbial synergy via an ethanol- triggered pathway. *Mol Cell Biol*, 2004, **24**(9): 3874–3884.
- [6] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning- a laboratory manual. 3rd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, p.33.
- [7] Burke D, Dawson D, Stearns T. Methods in yeast genetics-A cold spring harbor laboratory course manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000, pp.109–111.
- [8] Schiestl RH, Gietz RD. High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet*, 1989, **16**(5-6): 339–346.
- [9] Russell DW, Smith M, Williamson VM, *et al.* Nucleotide sequence of the yeast alcohol dehydrogenase II gene. *J Biol Chem*, 1983, **258**(4): 2674–2682.
- [10] 赵旭东, 魏东芝, 万 群, 等. 谷胱甘肽的简便测定法. 药物分析杂志, 2000, **20**(1): 34–37.
- [11] Denis CL, Ciriacy M, Young ET. A positive regulatory gene is required for accumulation of the functional messenger RNA for the glucose-repressible alcohol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol*, 1981, **148**(4): 355–368.

稿件书写规范

论文中有关正、斜体的约定

物种的学名: 菌株的属名、种名(包括亚种、变种)用拉丁文斜体。属的首字母大写, 其余小写, 属以上用拉丁文正体。病毒一律用正体, 首字母大写。

限制性内切酶: 前三个字母用斜体, 后面的字母和编码正体平排, 例如: *Bam*H 、 *Hind* 、 *Eco*R 、 *Msp* 、 *Sau*3A 等。

氨基酸和碱基的缩写: 氨基酸缩写用 3 个字母表示时, 仅第一个字母大写, 其余小写, 正体。碱基缩写为大写正体。

基因符号用小写斜体, 蛋白质符号首字母大写, 用正体。