

低双乙酰抗老化啤酒酵母工程菌的构建

Genetically Modified Industrial Brewing Yeast with High-glutathione and Low-diacetyl Production

张吉娜^{1,2}, 何秀萍¹, 郭雪娜¹, 刘楠¹, 张博润^{1*}

ZHANG Ji-Na^{1,2}, HE Xiu-Ping¹, GUO Xue-Na¹, LIU Nan¹ and ZHANG Bo-Run^{1*}

1 中国科学院微生物研究所 北京 100080

2 中国科学院研究生院 北京 100039

1 The Laboratory of Molecular Genetics and Breeding of Yeast, Institute of Microbiology of Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100080, China

2 Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100039, China

摘 要 用来源于啤酒酵母的 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶基因(*GSH1*)和铜抗性基因(*CUP1*)取代质粒 pIZ-2 中 α -乙酰乳酸合成酶基因(*ILV2*)内部约 2.3kb 的 DNA 片段,构建成重组质粒 pICG。限制酶酶切质粒 pICG 后获得在基因 *GSH1* 和 *CUP1* 两端含有 *ILV2* 序列的 6.0kb 的 DNA 片段。用此片段转化啤酒酵母 YSF31,得到铜抗性高的转化子。并通过 PCR 和 α -乙酰乳酸合成酶(AHAS)活性测定筛选到酵母工程菌。小试实验结果表明酵母工程菌谷胱甘肽含量比受体高 34%,而双乙酰含量是受体的 75%。其他发酵指标并没有发生改变。中试实验表明酵母工程菌发酵周期缩短 3d,而且成品啤酒的保鲜时间延长 50%。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,具有重要的实际应用价值。

关键词 酿酒酵母,谷胱甘肽,双乙酰,自克隆,工程菌

中图分类号 TQ92 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)06-0942-05

Abstract Recombinant plasmid pICG was constructed by replacing the internal fragment of α -acetoxyacid synthase(*AHAS*) gene(*ILV2*) with a copy of γ -glutamylcysteine synthetase gene(*GSH1*) and copper chelatin gene(*CUP1*) from the industrial brewing yeast strain YSF31. YSF31 was transformed with plasmid pICG linearized by *Kpn* I and *Pst* I. A recombinant strain with high-glutathione and low-diacetyl production was selected. The results of fermentation in 100-L bioreactor showed that the lagering time of beer produced for recombinant strain T2 was shortened by 3 days and the shelf life of the beer was prolonged about 50%. It may be more acceptable for the commercial application, as it does not contain foreign DNA.

Key words diacetyl, glutathione, *Saccharomyces cerevisiae*, self-cloning

双乙酰是啤酒中的主要风味物质,在啤酒中的阈值很低,当啤酒中双乙酰的浓度超过阈值时,就会产生一种不愉快的馊酸味。双乙酰是由酵母菌异亮氨酸-缬氨酸生物合成途径中的中间产物 α -乙酰乳酸渗透到胞外经非酶促氧化脱羧反应生成的。一般

在啤酒发酵后期还原双乙酰需要约 5~10d 的时间,因而双乙酰的形成与消除是啤酒风味成熟的重要限速步骤。随着对酵母形成双乙酰机理及其分子遗传学的逐渐了解,通过基因工程的手段修饰异亮氨酸-缬氨酸生物合成途径,从而降低双乙酰的形成成为

Received: June 3, 2005; Accepted: July 3, 2005.

This work was supported by a grant from the National Natural Sciences Foundation of China(No. 30370025).

* Corresponding author. Tel: 86-10-62637679; E-mail: zhangbr@sun.im.ac.cn

国家自然科学基金资助项目(No. 30370025)

可能^[1]。*ILV2* 基因编码的 α -乙酰乳酸合成酶活性与双乙酰前体 α -乙酰乳酸的含量水平密切相关。

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增加谷胱甘肽的形成量,可以提高啤酒的抗老化能力^[2]。

重组 DNA 技术的飞速发展通过基因工程技术改良工业酵母菌提供了极大的便利。在酵母菌遗传修饰中,根据是否引入外源基因,重组菌株被分为自克隆和非自克隆菌株。自克隆菌株中不含有任何外源 DNA 片段,因此是生物安全的。本文通过自克隆技术构建了低双乙酰抗老化的啤酒酵母工程菌,并对其发酵特性进行了研究。

1 材料和方法

1.1 菌种和质粒

大肠杆菌 DH5 α [*sup*E44 Δ *lac*U169 (Ψ 80*lac*Z Δ M15)*hsd*R17 *rec*A1 *end*A1 *gyr*A96 *thi*-1 *rel*A1]用于质粒的构建。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)YS58(*MAT* α *flo*1 *leu*2-3, 112 *his*4-519 *trp*1-719 *ura*3-52)由本实验室保存。啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)YSF31由青岛啤酒集团提供。质粒 YEpl352(*amp*^R *URA3*)是大肠杆菌/酵母菌穿梭载体^[3]。质粒 Bluescript M13^[4]、含有 *ILV2* 基因的质粒 pLZ-2^[5]和含有 *GSH1* 的质粒 pGF-2^[6]均由本实验室保存。

1.2 培养基和工具酶

LB 培养基按常规配制^[7],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 培养基和 YNB 培养基按常规配制^[8]。限制酶、T4 DNA 连接酶、*Pfu* DNA 聚合酶均购自华美公司。

1.3 DNA 操作

大肠杆菌转化按氯化钙法进行^[7]。啤酒酵母总 DNA 的提取及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 *CUP1* 基因序列^[9]设计引物:P1 5'-CCAAGATCTCGCTAT ACGTGCATATGTTTC-3' 和 P2 5'-CGAGTCGACATCTGTTGTACTATCCGCTT-3',划线部分为 *Bgl* II 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 反应参数为:94℃ 变性 40s,56℃ 退火 1min,72℃ 延伸 2min,30 个循环,72℃ 延伸 15min。

1.5 α -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^[10,11]。

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(没有选择压力),28℃ 培养,每 24h 转接 1 次,共转接 5 次后,取菌液涂布 YEPD 平皿,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 4mmol/L CuSO₄ 的 YEPD 培养基平皿上,28℃ 培养 48h,测定单菌落对硫酸铜的抗性。

1.7 小试及中试发酵实验

1.7.1 小试实验: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 270mL 麦芽汁中,9℃ 静置培养 10d。

1.7.2 中试实验:前期培养同上,在 270mL 麦芽汁中 25℃ 培养 36h,然后将培养液接入 2000mL 大三角瓶,20℃ 培养 36h,接至 100L 发酵罐中。启发后 10℃ 培养,当糖度降到 2.6 时,降温到 0℃ 后储存。

1.8 发酵性能测定

细胞内谷胱甘肽含量测定按文献[6]进行。其他发酵指标按文献[12]方法进行检测。双乙酰的测定方法采用蒸馏法和气相色谱法进行测定^[12]。

2 结果

2.1 *CUP1* 基因的克隆和表达

以 YSF31 的总 DNA 为模板,PCR 扩增出大小 1.1kb 的 *CUP1* 基因。PCR 产物直接插入到质粒 Bluescript M13 的 *Hinc* II 位点,得到质粒 pMCUP。用 *Kpn* I 和 *Sal* I 酶切质粒 pMCUP,将得到的 *CUP1* 插入到穿梭载体 YEpl352 中,构成质粒 pYCUP。用 pYCUP 转化实验室酵母菌株 YS58,在含有 Leu、His 和 Trp 的 YNB 培养基上筛选转化子。铜抗性测定结果表明在含有 3mmol/L CuSO₄ 的 YEPD 中,YS58 与转化子都能生长;而在 5~9mmol/L CuSO₄ 的 YEPD 中,只有转化子能够生长,YS58 不能生长。可见 PCR 扩增到的 *CUP1* 基因能够在酵母菌中表达,使细胞产生对硫酸铜的抗性,可以用作酵母转化的筛选标记。

2.2 重组质粒的构建和酵母菌的转化

2.2.1 重组质粒 pICG 的构建:用 *Bgl* II 和 *Sal* I 酶切质粒 pYCUP 得到 *CUP1* 基因,用 *Sal* I 和 *Xba* I 酶切质粒 pGF-2 得到 *GSH1*,上述两基因插入到质粒

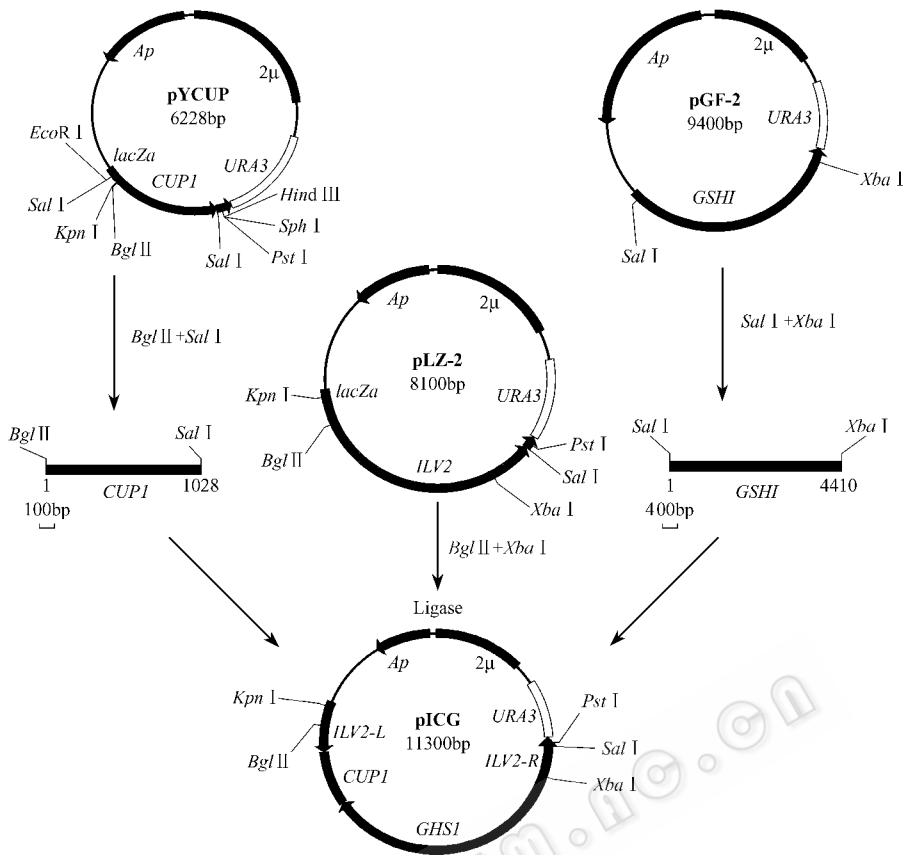


图 1 重组质粒 pICG 的构建

Fig. 1 Construction of recombinant plasmid pICG

pLZ-2 的 *Bgl* II 和 *Xba* I 位点 ,获得质粒 pICG(图 1)。酶切分析表明重组质粒 pICG 构建正确(图 2)。该重组质粒中 *ILV2* 基因内部约 2.3kb 的 DNA 片段被 *CUP1* 和 *GSH1* 替换。

2.2.2 酵母菌的转化 :用 *Kpn* I 和 *Pst* I 酶切重组质粒 pICG 得到一个 6.0kb 大小的 DNA 片段。此片段含有铜抗性基因 *CUP1* 和 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶基因 *GSH1* ,两端含有 *ILV2* 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 *ILV2* 位点发生同源重组(图 3)。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 :以受体和转化子的总 DNA 为模板 ,用引物 *ILV2*-1 (5'-GCAGGATCCTGGCTTCAGTTGCTGTCT-3')和 *CUP1* 的引物 P2 ,进行 PCR 扩增 ,结果在受体中没有扩增出任何 DNA 片段 ,而在挑选的 3 个转化子中 ,都扩增出了大小为 1.3kb 的 DNA 片段(图 4)。说明在转化子的染色体上 ,铜抗性基因和 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶基因已经插入到了 *ILV2* 基因内部。

2.3.2 AHAS 酶活测定 :AHAS 酶活测定结果表明 ,在转化子中 AHAS 的酶活性明显降低 ,只有受体的 50%(表 1)。可见转化子中部分 *ILV2* 基因被破坏。相应转化子被命名为 T2。

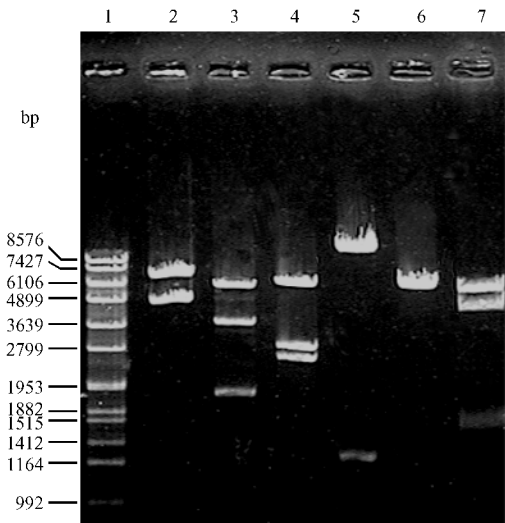


图 2 质粒 pICG 的酶切验证图

Fig. 2 Digestion patterns of plasmid pICG

1 :marker 2 : *Sal*I 3 : *Bam*HI 4 : *Eco*RI 5 : *Bgl*II 6 : *Sac*I 7 : *Sal*I + *Sac*I.

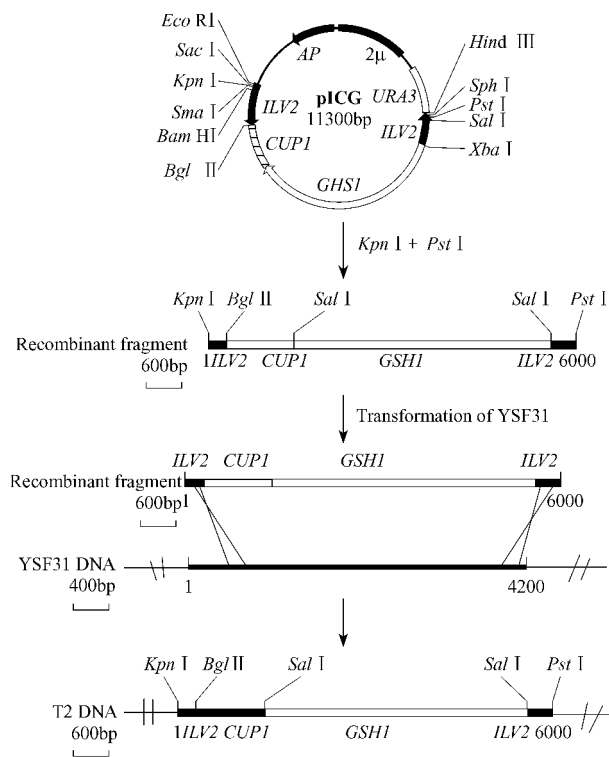


图 3 啤酒酵母工程菌的构建

Fig. 3 Construction of the recombinant strain

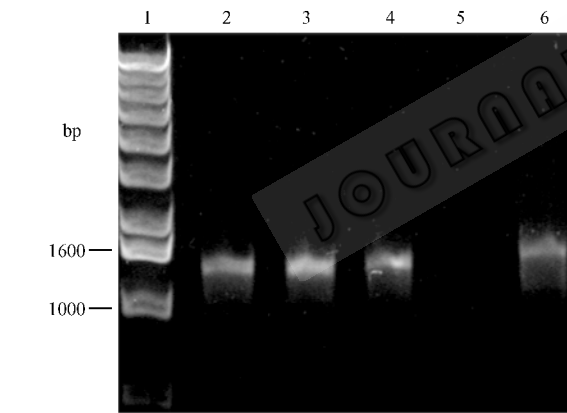


图 4 用引物 ILV2-1 和 CUP1-P2 对受体菌和转化子进行 PCR 分析

Fig. 4 PCR Analysis of the transformants and host

1:1kb ladder marker 2~4:PCR products of the transformants ;
5:PCR product of YSF31 6: the positive control.

表 1 转化子和受体菌的 AHAS 酶活比较

Table 1 AHAS activity of host and recombinant strain

Yeast strains	AHAS specific activity (u/mg protein)
YSF31	4.18
T2	2.33

2.4 转化子的遗传稳定性分析

按方法中 1.6 一节所述 ,分别挑选 YSF31、T2 的单菌落各 100 个 ,在无菌水饥饿后分别接种在不同

的培养基上 ,28℃ 培养 48h 后检测生长情况。受体菌 YSF31 的 100 个单菌落在 YEPD 培养基上全部生长 ,而在含有 4mmol/L CuSO₄ 的 YEPD 培养基上均不能生长。啤酒酵母工程菌 T2 的 100 个单菌落在 YEPD 培养基和含 4mmol/L CuSO₄ 的 YEPD 培养基上都能生长。结果表明啤酒酵母工程菌具有很强的遗传稳定性。

2.5 啤酒酵母工程菌发酵实验

2.5.1 小试实验 按材料和方法中所述进行小试实验 ,每两天取样检测 ,发现第 6 天啤酒酵母工程菌 T2 的谷胱甘肽含量峰值比受体 YSF31 的高 34% ,而啤酒酵母工程菌发酵液中的双乙酰含量比受体的低 ,啤酒酵母工程菌株 T2 双乙酰的峰值是受体的 75%(图 5)。可见 GSH1 基因拷贝数的增加使谷胱甘肽合成提高 ,而 ILV2 基因的破坏 ,使 AHAS 酶活性明显降低 ,导致双乙酰合成的减少。转化子的其他发酵指标如絮凝性、α-N 氨基酸同化率、真正发酵度等与受体基本相同(表 2)。由 CO₂ 减重实验和真正发酵度的检测结果可以看出 ,啤酒酵母工程菌的发酵速度和发酵度基本没有发生改变 ,说明基因 ILV2 的敲除没有影响酵母的繁殖速度。

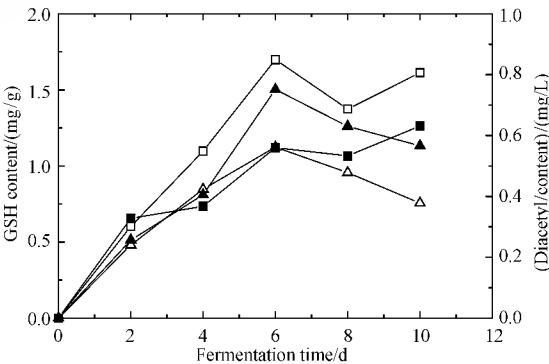


图 5 啤酒酵母工程菌和受体菌的谷胱甘肽含量和双乙酰含量的比较

Fig. 5 The content of GSH and diacetal of the recombinant strain and host

GSH content of the hos(■); GSH content of the recombinant strain(□) ;the diacetyl content of hos(▲) ;the diacetyl content of the recombinant strain(△).

表 2 其他发酵指标的检测

Table 2 Fermentation profiles

Profiles	YSF31	T2
CO ₂ weight reducing(g/L)	11.05	10.07
Flocculation/ %	84.90	88.90
α-N-amino acid assimilation/ %	53.40	53.70
Real degree fermentation/ %	69.40	69.00

2.5.2 中试实验 按方法所述在青岛啤酒集团进行

中试实验。用蒸馏法进行双乙酰测定^[12],当双乙酰含量降到 0.5mg/L 时,降温到 0℃进入后发酵期,实验结果表明啤酒酵母工程菌比 YSF31 提前 3d 进入后发酵期。用代巴比妥酸(TBA)测定羰基化合物法检测啤酒的抗老化能力,结果表明啤酒酵母工程菌的抗老化能力是受体菌的 1.5 倍。其中啤酒酵母工程菌的 TBA 值为 225.60,而受体菌的 TBA 值为 151.82。各种风味物质在发酵后期用高压气相色谱进行了测定,啤酒酵母工程菌与受体菌没有明显区别(表 3)。经过陈化以后,经专家品评,一致认为啤酒酵母工程菌所产啤酒风味优于受体菌。

表 3 各种风味物质的检测
Table 3 Analysis of aroma compounds

Profiles(mm/L)	YSF31	T2
n-propyl alcohol	6.81	7.09
Ethyl acetate	30.72	33.86
Isobutyl alcohol	5.82	5.35
Isoamyl alcohol	64.18	60.91
Isoamyl acetate	1.71	2.26
Ethyl caproate	0.06	0.12
Ethyl octylate	0.32	0.22

3 讨论

在酿酒酵母中 α -乙酰乳酸合成酶(AHAS)催化双乙酰前体 α -乙酰乳酸的合成。在啤酒酵母的染色体上,有两个编码 AHAS 的等位基因,一个与酿酒酵母同源,另一个与卡尔斯伯酵母同源。本研究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 DNA 片段被 *CUP1* 基因和 *GSH1* 基因所取代,获得 AHAS 酶活力明显降低的啤酒酵母工程菌。在发酵过程中双乙酰合成量的减少,不但改进了啤酒风味而且缩短了发酵周期。同时在 *ILV2* 基因内部插入的 *GSH1* 基因,导致啤酒酵母工程菌的 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,加之在发酵后期,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,能使成品酒的保鲜时间适当延长。

啤酒是一种成分复杂的发酵产品,其独特的风味特征是由其中的各种化合物之间保持微妙的平衡所赋予的,任何一种物质过多或过少,都有可能打破这种平衡,影响啤酒的风味。啤酒是一种广泛饮用

的饮料,利用遗传修饰的啤酒酵母发酵生产的啤酒,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,使其获得了优良特性,但并没有改变其他的生理生化特征及发酵性状。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。

REFERENCES(参考文献)

[1] Dequin S. The potential of genetic engineering for improving brewing. Wine-making and baking yeasts. *Appl Microbial Biotechnol*, 2001, **56**: 577 – 588

[2] 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

[3] Hill JE, Meyers AM, Koerner TJ *et al.* A yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast*, 1993, **9**: 163 – 167

[4] Short JM, Fernandez JM, Sorge JA *et al.* λ ZAP: A bacteriophage (expression vector with *in vivo* excision properties. *Nucleic Acids Res*, 1988, **16**: 7583 – 7600

[5] Li Y(李艳), Tie CJ(铁翠娟), Zhang BR(张博润) *et al.* Construction of diacetal-low brew 'yeast. *Liquor Making(酿酒)*, 2002, **29**: 77 – 79

[6] Fan X, He X, Guo X *et al.* Increasing glutathione formation by functional expression of the γ -glutamylcysteine synthetase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett*, 2004, **26**: 415 – 417

[7] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning—A Laboratory Manual*. 2nd, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

[8] Alison A, Daniel EG, Chris AK. *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997

[9] Premakumar R, Winge DR, Rajagopalan KV. Copper-induced synthesis of copper-chelatin in rat liver. *Arch Biochem Biophys*, 1975, **170**: 267 – 277

[10] Magee PT, Robichon-Szulmajster DH. The regulation of isoleucine-valine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. 2. Identification and characterization of mutants lacking acetohydroxyacid synthase. *Eur J Biochem*, 1968, **3**: 502 – 506

[11] Pang SS, Duggleby RG. Regulation of yeast acetohydroxyacid synthase by valine and ATP. *Biochem J*, 2001, **357**: 749 – 757

[12] Guan DY(管敦仪). *Handbook of Brewing Industry(啤酒工业手册)*. Light Industry Press, 1982