

# 枯草芽孢杆菌 $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶基因在 啤酒酵母工业菌株中的表达<sup>\*</sup>

郭文洁 何秀萍 铁翠娟 张博润<sup>\*\*</sup>

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

关键词  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶 基因表达 啤酒酵母工业菌株

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1001-6209(2001)01-0105-04

啤酒酿造中,双乙酰是影响啤酒生产熟化期长短及其风味的主要因素。存在于多种细菌中的  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶(EC4.1.1.5,简称  $\alpha$ -ALDC)<sup>[1]</sup>能将双乙酰的前体  $\alpha$ -乙酰乳酸直接转化为对啤酒风味没有影响的乙偶姻,从而大大降低啤酒中双乙酰的含量,缩短啤酒熟化期。但所有的啤酒酵母菌不产生此酶。虽然在发酵过程中添加此酶是一个解决的途径,但解决问题的根本是将 *ALDC* 基因引入到啤酒酵母菌中。国外已开展这方面的研究<sup>[2-3]</sup>,本研究组曾用随机克隆的方法获得了枯草芽孢杆菌  $\alpha$ -ALDC 基因<sup>[4]</sup>,本文报道了枯草芽孢杆菌 *ALDC* 基因在工业用啤酒酵母中的表达研究结果。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和质粒

啤酒酵母工业菌株(*Saccharomyces cerevisiae*)PJ3-5、*E. coli* DH5 $\alpha$  及质粒 YIp5、pBG4(pUC18::*ALDC*)<sup>[4]</sup>均为本实验室保存或构建。质粒 pCM1-1(YEp351  $\Delta$ CUP1-MT1)由 Winge 教授惠赠<sup>[5]</sup>。

### 1.2 培养基

YEPD 及 YEPD + CuSO<sub>4</sub> 培养基用于酵母菌的培养<sup>[6]</sup>。LB 及 LB + Amp/Tet 培养基用于 *E. coli* 菌株及转化子的保存和培养<sup>[7]</sup>。

### 1.3 质粒的提取、酶切、连接和 *E. coli* 转化

均按文献[6]进行。

### 1.4 酵母菌转化

采用完整细胞转化法<sup>[6]</sup>,在含 7mmol/L CuSO<sub>4</sub> 的 YEPD 平板上筛选转化子。

### 1.5 酵母转化子铜抗性测定

将酵母菌受体及转化子于无菌水中饥饿 2~4h 后,分别点种于含不同浓度 CuSO<sub>4</sub> 的 YEPD 平板上,28℃ 培养 48h,观察生长情况。

### 1.6 $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶活性测定

酵母菌 PJ3-5 及转化子在含不同浓度 CuSO<sub>4</sub> 的 YEPD 培养基中培养 24h,离心收集菌体,按文献[2]方法测定酶活。一个酶活单位定义为 pH7.0,30℃ 条件下,每分钟产生 1 $\mu$ mol 乙偶姻所需要的酶量。

### 1.7 发酵液中双乙酰含量的测定

将 PJ3-5 及  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶活性较高的重组菌株活化,接一环菌体于 2mL 麦芽汁中,25℃ 静置培

<sup>\*</sup> 国家自然科学基金资助项目(39970010)

<sup>\*\*</sup> 联系人

作者简介 郭文洁(1974-),女,天津市人,中国科学院微生物研究所微生物分子遗传与育种专业 98 级硕士生,从事酵母菌分子遗传与育种学研究。

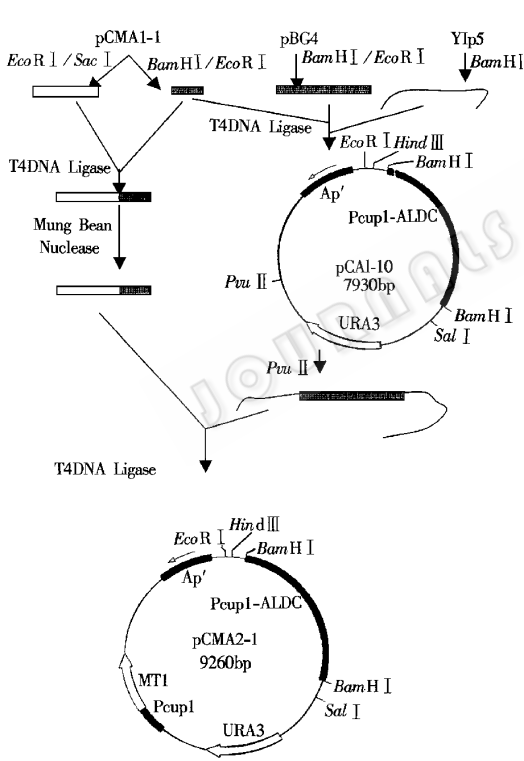
收稿日期 2000-04-06,修回日期 2000-08-22© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

养 24h 后,将培养液转接于 10mL 麦芽汁中,25℃ 静置培养 24h,将菌液转接到含 240mL 麦芽汁的三角瓶中,12℃ 静置培养 15d。每隔 48h 取样分析,按文献[8]方法测定双乙酰含量。

2 结果

2.1 重组表达质粒的构建

分别用 *Bam*HI/*Eco*RI 和 *Eco*RI/*Sac*I 酶切质粒 pCM1-1,用低熔点琼脂糖凝胶分别回收 0.43kb 的 *CUP1* 启动子片段和 0.9kb 的 *MT1* 片段,两片段在 *T*<sub>4</sub>DNA 连接酶作用下重新连接,然后用绿豆核酸酶处理产生平末端,低熔点琼脂糖凝胶回收 1.3kb 片段。用 *Bam*HI/*Eco*RI 酶切质粒 pBG4,低熔点琼脂糖凝胶回收约 2kb,含枯草芽孢杆菌 *ALDC* 基因的 DNA 片段。整合型穿梭载体 YIp5 经 *Bam*HI 酶切线性化,碱性磷酸酶处理。按图 1 所示构建了重组质粒 pCA1-10 和 pCMA2-1。在 pCA1-10 中,*ALDC* 基因的表达受 *CUP1* 启动子的控制,但它的筛选标记是 *URA3*,要求转化的酵母受体必须是尿嘧啶营养缺陷型,才能有效筛选转化子,因此该重组质粒不能用来直接转化工业生产菌株。质粒 pCMA2-1 的构建解决了筛选标记问题,它带有来源于 pCM1-1 的铜抗性基因(*CUP1-MT1*)。由于大多数工业用啤酒酵母菌对铜较敏感,因此可以依据铜抗性的提高有效筛选酵母转化子。



2.2 重组质粒的酶切验证

用限制性内切酶 *Bam*HI 分别酶切重组质粒 pCA1-10 和 pCMA2-1,电泳检测发现 pCA1-10 经 *Bam*HI 酶切给出约 2.4kb 的插入片段和 5.5kb 的线形载体片段;pCMA2-1 酶切后同样有一个约 2.4kb 的插入片段,同时还有两个约 3.9kb 和 2.9kb 的片段,但没有空载体的线形片段(图 2),表明铜抗

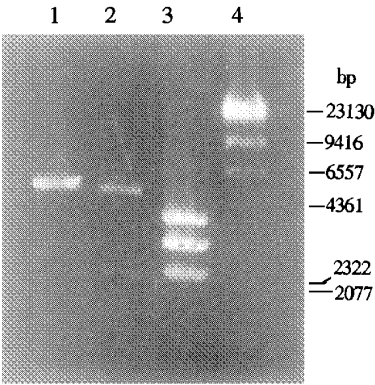


图 2 重组质粒的酶切验证

1. YIp5/*Bam*HI; 2. pCA1-10/*Bam*HI; 3. pCMA2-1/*Bam*HI; 4.  $\lambda$ DNA/*Hind*III.

图 1 酵母菌表达型重组质粒的构建

性基因内有 *Bam*HI 的识别位点,这与文献报道是一致的<sup>[5]</sup>。

2.3 酵母转化子铜抗性测定

采用完整细胞转化法将重组质粒 pCMA2-1 转化啤酒生产酵母菌株 PJ3-5。由于 PJ3-5 最高能在含 6mmol/L *CuSO*<sub>4</sub> 的 YEPD 平板上生长,因此选择含 7mmol/L *CuSO*<sub>4</sub> 的 YEPD 用于转化子的生长。从 7mmol/L *CuSO*<sub>4</sub> 平板上随机挑选 50 个转化子,编号为 YT1~50,按方法所述测其铜抗性。结果表明转化子均能在含 8mmol/L *CuSO*<sub>4</sub> 的 YEPD 平板上生长,而受体菌株 PJ3-5 在 8mmol/L *CuSO*<sub>4</sub> 平板上不能

生长。受体菌与部分转化子的抗铜谱见图 3。

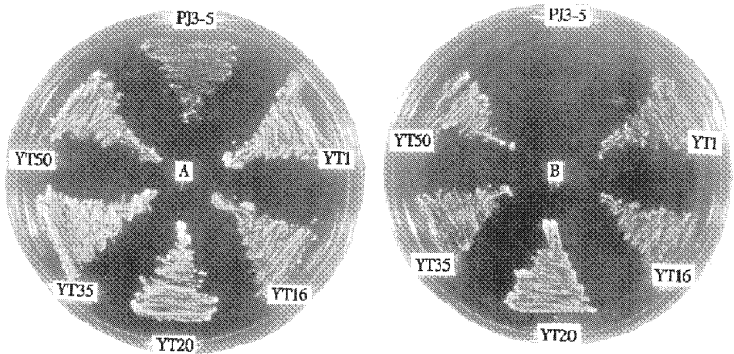


图 3 受体菌及转化子铜抗性比较

A. 6mmol/L  $\text{CuSO}_4$  ; B. 8mmol/L  $\text{CuSO}_4$  .

2.4 转化子中  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶活性的测定

从上述铜抗性的转化子中随机挑选五个转化子 YT1、YT16、YT20、YT35 和 YT50 ,按 Suinko 等方法测定 ALDC 酶活性<sup>[21]</sup>。由于转化子中 ALDC 基因的表达受 CUP1 启动子的控制 ,因此测定了在不同  $\text{CuSO}_4$  浓度的 YEPD 中培养的细胞的 ALDC 酶活性。由表 1 结果可以看出 ,原始菌株 PJ3-5 在任何  $\text{CuSO}_4$  浓度下都没有 ALDC 酶活性 ,而转化子的 ALDC 酶活性明显受不同浓度的  $\text{CuSO}_4$  的诱导。在检测范围内 ,当  $\text{CuSO}_4$  浓度为  $20\mu\text{mol/L}$  时 ,转化子酶活性达到最高 ,而当培养基中没有添加  $\text{CuSO}_4$  时 ,细胞表现的 ALDC 酶活性可能为组成性表达产物或培养基本身所含的微量  $\text{Cu}^{2+}$  诱导所致。上述结果表明 ,枯草芽孢杆菌 ALDC 基因已被成功引入到工业用啤酒酵母 PJ3-5 中 ,并且实现了功能性表达。

表 1 硫酸铜浓度对酵母菌株 ALDC 酶活性的影响

硫酸铜浓度/( $\mu\text{mol/L}$ )	$\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶活性/( U/L 菌液 )					
	PJ3-5	YT1	YT16	YT20	YT35	YT50
0	0	0.34	0.31	0.31	0.34	0.30
5	0	0.78	0.69	0.77	0.82	0.77
10	0	1.94	1.91	1.86	2.03	1.91
15	0	3.45	3.57	3.31	3.79	3.67
20	0	4.91	5.24	4.87	5.71	5.53

2.5 啤酒发酵液中双乙酰含量的变化曲线

按方法所述测定了不同发酵时间原始菌株 PJ3-5 及 YT35 ALDC 酶活性较高的转化子 YT35 发酵液中双乙酰含量(图 4)。结果表明 ,在整个发酵过程中 ,发酵液中双乙酰含量都比较低 ,发酵 6~7d ,就可以使发酵液中双乙酰含量降低到口味阈值 ( $0.13\text{mg/L}$ )以下 ,而作为对照的原始菌株产生的双乙酰量要高的多 ,需要较长的发酵时间(约 12d)才将双乙酰降到阈值以下。可见通过基因重组技术构建的啤酒酵母工程菌在发酵过程中可使啤酒的熟化时间缩短近一半 ,从而极大的提高了设备的利用率。

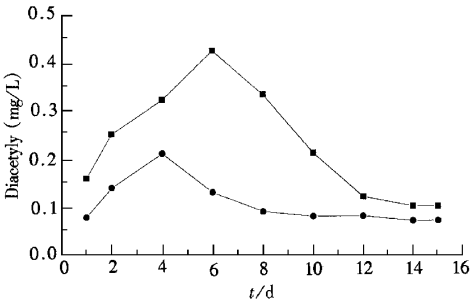


图 4 啤酒发酵过程中双乙酰变化曲线

—■— PJ3-5 ; —●— YT35.

### 3 讨论

啤酒生产中,双乙酰含量是决定熟化期长短的重要因素之一,有多种途径可以降低啤酒中双乙酰的含量,如限制其前体物质— $\alpha$ -乙酰乳酸的合成。Dilemans 等曾对酵母菌中参与缬氨酸和异亮氨酸合成的相关基因进行了详尽的研究,以期控制啤酒酵母中  $\alpha$ -乙酰乳酸的产生<sup>[9]</sup>。但该途径的限制有可能会影响支链氨基酸的合成。将 *ALDC* 基因引入到啤酒酵母中,可能是减少双乙酰的生成一条更有效的途径。本研究将枯草芽孢杆菌的 *ALDC* 基因通过整合型载体引入到工业用啤酒酵母中,可以将双乙酰的生成量明显降低,缩短了啤酒熟化时间,采用铜抗性筛选标记便于对转化子进行有效筛选,而整合型载体的使用可以保证重组菌株的遗传稳定性,该研究为工业用酵母菌种的改良提供了一条可借鉴的有效途径,具有广泛的应用前景。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Godtfredsen S E. *Carlsberg Res Commun* ,1983 **48** :239~247.
- [ 2 ] Suinko M L ,blomqvist K ,Penttilä M , *et al.* *J Biotech* ,1990 **14** :285~300.
- [ 3 ] Yamano S ,Tanaka J ,Inoue T. *J Biotech* ,1994 **32** :165~171.
- [ 4 ] 高 健 ,铁翠娟 ,王忠彦 ,等.微生物学通报 ,1998 **6** :336~338.
- [ 5 ] Thorvaldsen J L , Mehra R K , Wei Y U , *et al.* *Yeast* ,1995 **11** :1501~1511.
- [ 6 ] Alison A ,Daniel E G ,Chris A K , *et al.* *Methods in Yeast Genetics : A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press ,1997.
- [ 7 ] Sambrook J ,Fritsch E F ,Maniatis T (金冬雁等译).分子克隆实验指南.(第二版)北京:科学出版社,1992.
- [ 8 ] 管敦仪主编.啤酒工业手册(中册).北京:轻工业出版社,1985.234.
- [ 9 ] Dilemans M ,Goossens E ,Goffin O , *et al.* *J Am Soc Brew Chem* ,1987 **45** :81~87.

## EXPRESSION OF $\alpha$ -ACETOLACTATE DECARBOXYLASE GENE FROM *BACILLUS SUBTILIS* IN BREWER 'S YEAST\*

Guo Wenjie He Xiuping Tie Cuijuan Zhang Borun

( Institute of Microbiology , The Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 ,China )

**Abstract :** Yeast YIp-type expression recombinant plasmid( pCMA2-1 ) was constructed. The expression of  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase gene from *Bacillus subtilis* was controlled by *CUP1* promoter and its own terminator. The recombinant plasmid pCMA2-1 was introduced into the brewer 's yeast PJ3-5. Transformants were selected using copper resistance as selected marker. The results of activity assay showed that PJ3-5 didn 't produce  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase( *ALDC* ), where as the activity of  $\alpha$ -*ALDC* in transformants were induced by copper sulfate. The laboratory scale fermentation test confirmed that the total diacetyl concentration was reduced effectively by  $\alpha$ -*ALDC* in transformant.

**Key words :**  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase , Gene expression , Brewer 's yeast

\* Project of Chinese National Natural Science Fund(39970010)