

酒类酒球菌 *mleP* 基因的克隆及其在酿酒酵母中的表达

蒋思欣¹ 刘延琳² 何秀萍¹ 郭雪娜¹ 张博润^{1*}

(¹ 中国科学院微生物研究所 北京 100080)

(² 西北农林科技大学葡萄酒学院 杨凌 712100)

摘 要 苹果酸通透酶具有协助苹果酸-乳酸发酵(MLF)的重要功能。以酒类酒球菌(*Oenococcus oeni*)优良菌系 *Oenococcus*-Lee-SD-2a 的总 DNA 为模板,用 PCR 方法克隆到苹果酸通透酶基因 *mleP*,构建了重组质粒 pBM_{mleP}。序列分析表明克隆到的基因序列与已报道的序列同源性为 99%。为使目的基因在酿酒酵母中表达,以大肠杆菌-酿酒酵母穿梭质粒 YEp352 为载体,以 *PGK1* 强启动子和 *ADH1* 终止子为调控元件,构建了重组表达质粒 YEp_{mleP},并转化酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)YS58。酵母转化子用含有亮氨酸、组氨酸和色氨酸的 YNB 平板筛选鉴定。获得的转化子在添加了 L-苹果酸(5g/L)的培养基中培养 4d,取培养液上清用 HPLC 检测,结果显示重组转化子 YSP 的培养液中 L-苹果酸剩余含量均低于空载体转化子 YS352,因此所得酵母重组转化子对苹果酸的转运能力有所提高。

关键词 酒类酒球菌,苹果酸通透酶基因,克隆与表达,酿酒酵母

中图分类号:Q786 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2004)04-0465-04

在葡萄酒酿造过程中,有效降酸在增加葡萄酒风味和微生物稳定性、提高葡萄酒质量等方面起到重要作用,是优质干红葡萄酒生产的必经步骤^[1]。由于酿酒酵母自身没有生物降酸功能,生产上通常利用乳酸菌——主要是酒类酒球菌(*Oenococcus oeni*)在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)乙醇发酵之后进行苹果酸-乳酸发酵(MLF)来降酸。因此,构建具有降酸功能的酿酒酵母重组菌株可使乙醇发酵和苹果酸-乳酸发酵由重组酵母单独完成,缩短葡萄酒的酿造周期。同时也避免了乳酸菌在苹果酸-乳酸发酵过程中产生不必要的代谢副产物,减少细菌引发的葡萄酒酸败。

MLF 主要由苹果酸-乳酸酶来完成,将 L-苹果酸降解为 L-乳酸和 CO₂。苹果酸通透酶是苹果酸转运蛋白,起着协助 MLF 的重要功能。有研究表明,由于酿酒酵母本身缺乏苹果酸转运蛋白,只转入苹果酸-乳酸酶基因(*mleA*)的酿酒酵母重组菌株降解外源苹果酸的效率不高^[2]。近些年来,国外对于 MLF 相关酶基因^[3-5],以及来自粟酒裂殖酵母的苹果酸通透酶基因 *MAE1* 的克隆和表达有一些研究^[6,7],但是将酒类酒球菌的苹果酸通透酶基因转入酿酒酵母的研究未见报道。

本实验将我国自行筛选的酒类酒球菌优良菌系作为供体菌,克隆其苹果酸通透酶基因(*mleP*),通过重组表达质粒在酿酒酵母中进行表达,为探索酿酒酵母重组菌株的降酸途径、方式以及构建优良的降酸酿酒酵母工程菌奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 酒类酒球菌 Lee-SD-2a(*Oenococcus*-Lee-SD-2a)由西北农林科技大学葡萄酒学院提供。大肠杆菌 DH5α(*supE44*, Δ *lac*, U169, *hsdR17*, *rec A1*, *end A1*, *gyrA96*, *thi-1*, *rel A1*)酿酒酵母 YS58(*MAT α* , *ura3*, *trp1*, *leu2*, *his4*)质粒 YEp352(*amp*, *URA3*, *Yeast-E. coli* 穿梭载体), pBluescript M13、pVC727、pEA-1 均由本实验室保存。

1.1.2 工具酶、抗生素和试剂 溶菌酶和 RNase 购自华美生物工程公司;蛋白酶 K 购自上海 Sangon 公司;*Pfu* 酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶购自 TaKaRa 公司;氯苄青霉素购自北京鼎国生物技术的发展中心。分析纯 L-苹果酸购自北京化学试剂公司,色谱纯 L-苹果酸购自 Sigma 公司。

1.1.3 培养基和培养条件 酒类酒球菌用 ATB 培养

* 通讯作者。Tel/Fax: 86-10-62637679; E-mail: zhangbr@sun.im.ac.cn

作者简介 蒋思欣(1977-),女,北京市人,硕士研究生,研究方向为酵母菌分子遗传与育种。E-mail: jiangsx12@sohu.com

收稿日期 2003-10-30,修回日期 2004-03-15

基^[8]22~23℃静置培养;大肠杆菌 DH5 α 保存和培养用 LB 培养基,筛选转化子用含有 50 μ g/mL 氨基青霉素的 LB 培养基^[9],37℃静置或振荡培养;酿酒酵母完全培养基为 YEPD 培养基^[10],转化子用含有色氨酸、亮氨酸、组氨酸的 YNB 选择培养基^[10]进行筛选鉴定,28℃静置或振荡培养。

1.2 DNA 操作技术

1.2.1 基因组 DNA 的提取:参照文献[8]进行 *Oenococcus*-Lee-SD-2a 总 DNA 的提取。

1.2.2 目的基因的 PCR 扩增:根据已报道的 *mleP* 基因序列^[3],设计相应的引物,分别引入 *Eco*R I 和 *Kpn* I 的酶切位点(用下划线标出)。上游引物 PmlePL: 5'-GCGAATTCATGAATGCTTTTATTACGACT-3';下游引物 PmlePR 5'-TCGGTACCAATGACAAACTGCATCAAG-3'。

反应条件:94℃ 5min;94℃ 40s,56℃ 2min,72℃ 3min,共 29 次循环,72℃ 15min。琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。PCR 产物回收纯化参照文献[9]。

1.2.3 DNA 酶切、连接与测序:酶切和连接参照产品说明进行。序列测定由上海 Sangon 公司完成。

1.2.4 大肠杆菌转化与质粒提取:参照文献[9]进行。

1.3 酵母转化

酵母转化采用醋酸锂转化法^[11],转化子用含有色氨酸、亮氨酸、组氨酸的 YNB 平板筛选。参照文献[12]进行转化子的营养缺陷型和交配型鉴定。

1.4 酵母转化子培养液上清中 L-苹果酸含量测定

将转化子以相同的接种量接于添加了 5g/L L-苹果酸的 YEPD 和含 3 种氨基酸(亮氨酸、组氨酸、色氨酸)的 YNB 培养基中,28℃振荡培养 4d,取上清,用高效液相色谱(HPLC)检测 L-苹果酸含量。标样 L-苹果酸(Sigma)为 40mg/L,色谱柱是型号为 Nucleosil 5 μ 100 \AA 的 Phenomenex 柱。检测结果用外标法进行计算,即标样面积/样品面积 = 标样浓度/样品浓度。

2 结果和讨论

2.1 基因克隆和序列分析

2.1.1 *mleP* 基因的 PCR 扩增:用提取的 *Oenococcus*-Lee-SD-2a 总 DNA 作为模板进行 PCR 扩增,经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳,可看到一条约 0.95kb 的特异性条带,其大小与预期相符。

2.1.2 重组质粒的构建、酶切验证及测序分析:回收经 *Eco*R I 和 *Kpn* I 双酶切的 PCR 产物,插入载体 pBluescript M13,构建重组质粒 pBMmleP(图 1),并对

其进行酶切验证。测序结果在 GenBank 中进行比较,与已发表的序列^[3]同源性为 99%。其中 126 位由报道的 A 变为 T,381 位由报道的 T 变为 G,624 位由报道的 G 变为 T,但是这 3 个碱基均位于密码子的第 3 位,因此所编码的氨基酸并未发生改变。

2.2 重组表达质粒的构建

将来自重组质粒 pBMmleP 的 *mleP* 基因片段,与来源于 pVC727 的 *PGK1* 启动子和来源于 pEA-1 的 *ADH1* 终止子,共同插入穿梭质粒 YEp352,构建了重组表达质粒 YEpmlleP(图 1)。由于在 YEp352,*PGK1* 启动子片段和目的基因片段上各有 1 个 *Hind* III 酶切位点,用该酶消化重组表达质粒可以得到 3 个片段。电泳结果片段大小与预期相符。证明各片段均正确插入。

2.3 酵母转化和转化子鉴定

将重组表达质粒 YEpmlleP 及空载体 YEp352 分别转化酿酒酵母 YS58,在含有亮氨酸、色氨酸、组氨酸的 YNB 培养基上筛选。从获得的重组转化子中随机挑选 3 个(记为 YSP₁, YSP₂, YSP₃)与空载体转化子 YS352 一同进行营养缺陷型和交配型鉴定。

营养缺陷型鉴定:由于转化子弥补了受体菌的尿嘧啶缺陷,因而可在含有 3 种氨基酸(亮氨酸、色氨酸、组氨酸)的 YNB 培养基上生长。受体菌则只在含上述 3 种氨基酸及尿嘧啶的 YNB 培养基上才能生长(表 1)。

交配型鉴定:由于受体菌 YS58 是 α 交配型,转化不应使其发生改变,所以转化子的交配型应与受体菌一致。鉴定结果表明转化子与受体菌均与标准交配型的 α 型菌株交配并生孢,证明是 α 交配型(表 1)。

表 1 酵母转化子营养缺陷型和交配型鉴定

Strains	Auxotrophic test		Mating type test	
	YNB+Leu+Tip+His	YNB+Leu+Tip+His+Ura	α	a
YS58	-	+	-	+
YS352	+	+	-	+
YSP ₁	+	+	-	+
YSP ₂	+	+	-	+
YSP ₃	+	+	-	+

2.4 *mleP* 基因的表达对细胞转运 L-苹果酸能力的影响

通过对酵母转化子培养液上清进行 HPLC 检测(表 2),可以看出重组表达质粒的转化子 YSP 培养液上清中 L-苹果酸剩余含量比对照(空载体转化子 YS352)要低。L-苹果酸相对降低率在 YEPD 培养基中

最高可达 12.99% 在含有 3 种氨基酸的 YNB 培养基中最高可达 12.30%。以上结果初步表明 *mleP* 基因

进行了功能性的表达,将培养基中的 L-苹果酸转运到细胞内,使得培养液中的 L-苹果酸含量降低。

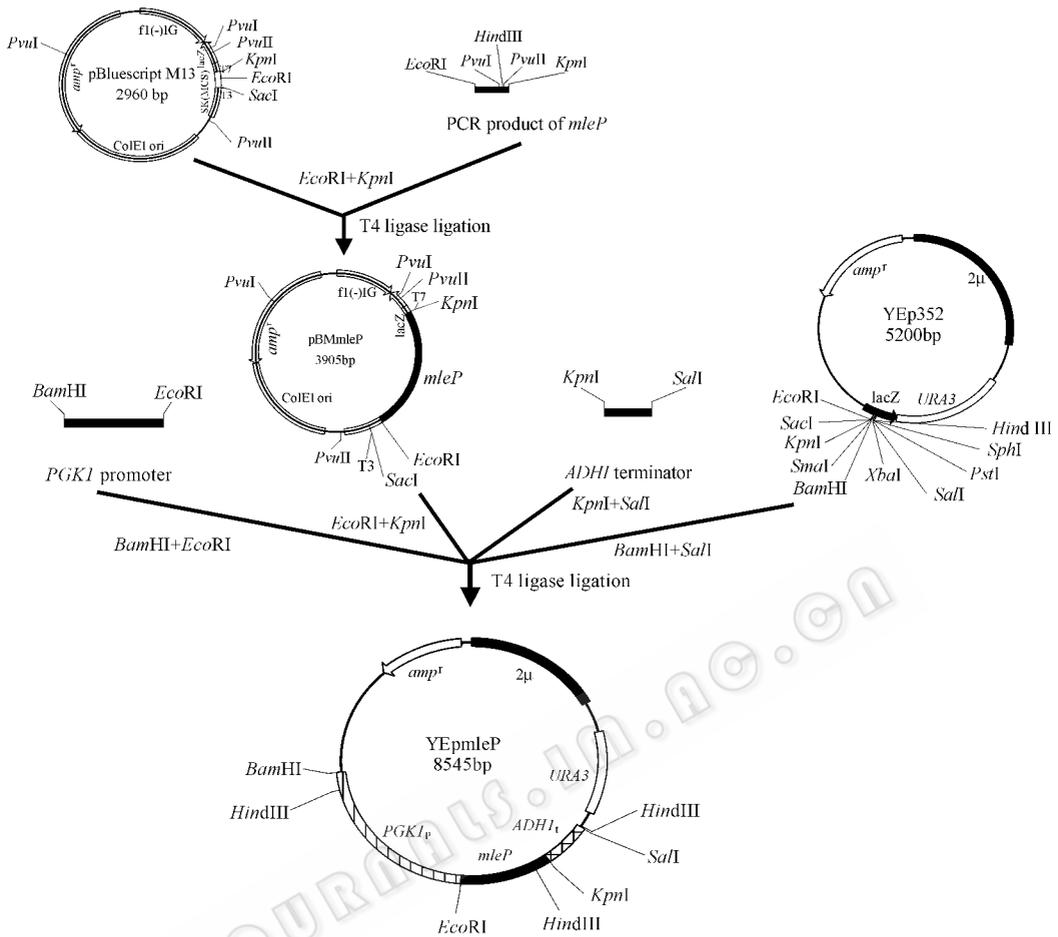


图 1 重组质粒 pBMmleP 及重组表达质粒 YEpmleP 的构建

Fig. 1 Construction of the recombinant plasmid pBMmleP and the recombinant expression plasmid YEpmleP

表 2 酵母转化子培养液中 L-苹果酸含量的检测分析

Table 2 Detection and analysis of L-malate content in culture supernatant of yeast transformants

Strains	YEPD				YNB + Leu + His + Trp			
	Initial content (mg/L)	Residual content (mg/L)	Drop rate (%) ^a	Comparative drop rate(%) ^b	Initial content (mg/L)	Residual content (mg/L)	Drop rate (%) ^a	Comparative drop rate(%) ^b
YSP ₁	5000	4649	7.02	3.97	5000	4660	6.80	5.23
YSP ₂	5000	4321	13.58	10.74	5000	4373	12.54	11.06
YSP ₃	5000	4212	15.76	12.99	5000	4312	13.76	12.30
YS352	5000	4841	3.18	-	5000	4917	1.66	-

a. L-malate drop rate = (Initial content - Residual content) / Initial content × 100%
 b. L-malate comparative drop rate = (Residual content in culture supernatant of YSP - Residual content in culture supernatant of YS352) / Residual content in culture supernatant of YS352 × 100%

由于酿酒酵母在完全培养基 YEPD 上生长较快,代谢也较旺盛,因此从结果可以看出用 YEPD 培养后,培养液上清中 L-苹果酸的剩余量较少。

据报道 L-苹果酸可以通过简单扩散的方式缓慢进入酿酒酵母细胞,而 *mleP* 基因的表达产物作为膜结合转运蛋白,可以提高酿酒酵母转运外源 L-苹果酸的能力^[3,6]。本文首次将我国自行筛选的酒类酒球菌 *mleP* 基因转入酿酒酵母,获得的重组转化子

对培养液中 L-苹果酸的转运能力与空载体转化子相比有所提高,但是由于苹果酸通透酶只是转运蛋白,不参与代谢活动,因此,实际的降酸效果并不十分明显。如果使苹果酸通透酶与苹果酸-乳酸酶协同作用,将会大大降低培养液中的 L-苹果酸含量。因此进行苹果酸通透酶基因与苹果酸-乳酸酶基因在酿酒酵母中共转化和共表达的研究,可以促使酿酒酵母重组菌株进行完全的生物降酸。

参 考 文 献

- [1] 刘延琳,李 华,蒋思欣,等. 苹果酸-乳酸发酵的相关酶和基因的研究进展. 微生物学通报, 2003, **30**(4):103 - 107.
- [2] Ansanay V, Dequin S, Camarasa C, *et al.* Malolactic fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae* as compared with engineered *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*, 1996, **12**: 215 - 225.
- [3] Bony M, Bidart F, Camarasa C, *et al.* Malolactic analysis of *S. cerevisiae* strains engineered for malolactic fermentation. *FEBS Lett*, 1997, **410**(2-3):452 - 456.
- [4] Labarre C, Guzzo J, Cavin J F, *et al.* Cloning and characterization of the genes encoding the malolactic enzyme and the malate permease of *Leuconostoc oenos*. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**(4):1274 - 1282.
- [5] 刘延琳,蒋思欣,李 华,等. 苹果酸-乳酸发酵相关基因克隆及其在酵母中的表达. 中国生物工程杂志, 2003, **23**(5): 27 - 30.
- [6] Camarasa C, Bidard F, Bony M, *et al.* Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* malate permease by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**(9):4144 - 4151.
- [7] Volschenk H, Viljoen M, Grobler J, *et al.* Engineering pathways for malate degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol*, 1997, **15**(3):253 - 257.
- [8] Zavaleta A J, Martinez-Murcia A J, Rodriguez-Valera F, *et al.* Intraspecific genetic diversity of *Oenococcus oeni* as derived from DNA fingerprinting and sequence analyses. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**: 1261 - 1267.
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [10] 贾盘兴,蔡金科,马德钦,等. 微生物遗传学实验技术. 北京: 科学出版社, 1992, 408 - 409.
- [11] Adams A, Gottschling D E, Kaiser C A, *et al.* *Methods in yeast genetics: A cold spring harbor laboratory course manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997, 99 - 102.
- [12] Spencer J F T, Spencer D M, Bruce I J. *Yeast Genetics, A Manual of Methods*. Berlin: Springer, 1989, 4 - 57.

Cloning of *mleP* Gene from *Oenococcus oeni* and Expression in *Saccharomyces cerevisiae*JIANG Si-Xin¹ LIU Yan-Lin² HE Xiu-Ping¹ GUO Xue-Na¹ ZHANG Bo-Run^{1*}⁽¹⁾ Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China⁽²⁾ College of Enology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China

Abstract: The malate permease, encoded by *mleP* gene, is important for assisting malolactic fermentation (MLF). In this paper, *mleP* gene was amplified by PCR from *Oenococcus*-Lee-SD-2a, an excellent *Oenococcus oeni* strain screened in China. The amplified DNA fragment, about 0.95kb, was inserted into pBluscript M13 to construct recombinant plasmid pBMmleP. Sequence analysis showed that it had 99% identity with the reported *mleP* gene. In order to be expressed properly in *Saccharomyces cerevisiae*, the *mleP* gene from pBMmleP, *PGK1* promoter from plasmid pVC727 and *ADH1* terminator from plasmid pEA-1 were ligated and inserted into YEp35X yeast-*Escherichia coli* shuttle vector). The resulted plasmid was named YEpmlleP. Yeast transformants were screened on YNB medium containing leucine, histidine and tryptophan. After transformants were cultured in media containing L-malate (5g/L) for 4d, the culture supernatant was collected and L-malate content was detected by HPLC. The results showed that L-malate residual content in culture supernatant of recombinant YSP was lower than that of control transformant YS352. Hence, the transporting ability of L-malate in *S. cerevisiae* recombinant was improved.

Key words: *Oenococcus oeni*, *mleP* gene, Cloning and expression, *Saccharomyces cerevisiae*

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