

高 SO₂ 产量啤酒酵母工业菌株的构建

曲 娜^{1,2}, 何秀萍¹, 郭雪娜¹, 刘 楠¹, 张博润^{1*}

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

(中国科学院研究生院 北京 100049)

摘 要 二氧化硫在啤酒中具有抗氧化的重要功能,而在其形成过程中 APS 激酶(*MET14* 编码)起着非常重要的作用。以二氧化硫产量较高的青岛啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) YSF-5 的总 DNA 为模板,用 PCR 方法克隆得到 *MET14* 基因。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* 强启动子为调控元件,构建了重组表达质粒 pPM,并转化酿酒酵母 YS58。转化子在 YNB 添加亮氨酸、组氨酸和色氨酸的选择性培养基上筛选鉴定,盐酸副玫瑰苯胺法测得转化子的 SO₂ 产量是受体菌的 2 倍左右。在重组表达质粒 pPM 的基础上添加铜抗性标记基因构建了重组表达质粒 pCPM,并转化青岛啤酒工业酵母菌株 YSF-38,转化子在 YEPD + 4mmol/L CuSO₄ 的选择性培养基上筛选鉴定,实验室条件下培养后,测得转化子 YSF-38(pCPM)的 SO₂ 产量是受体菌的 3.2 倍。用该转化子在青岛啤酒厂进行小型发酵实验,结果表明在发酵结束时,YSF-38(pCPM)转化子的 SO₂ 产量是受体菌的 1.4 倍。因此,*MET14* 基因的有效表达可以提高啤酒工业酵母的 SO₂ 产量。

关键词 二氧化硫产量; *MET14* 基因; 克隆与表达; 酿酒酵母

中图分类号: Q785, Q815 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2006)01-0038-05

在啤酒生产过程中,有效控制 SO₂ 的产量对于降低啤酒的氧化作用,提高啤酒的风味稳定性具有非常重要的作用^[1],由于发酵过程中,酵母代谢产生的 SO₂ 不能够满足啤酒中应有的 SO₂ 含量,因此在啤酒包装前需要人为的添加部分亚硫酸盐,但是要从根本上解决啤酒氧化问题还是需要利用基因重组的方法构建抗氧化的啤酒酵母。

SO₂ 是硫酸盐还原形成硫化物的中间产物,其产生过程复杂,主要依赖于 3 个关键酶:ATP 硫化酶(*MET3* 编码),APS 激酶(*MET14* 编码),PAPS 还原酶(*MET16* 编码)。亚硫酸盐进一步被其还原酶(*MET5*, *MET10* 编码)还原形成硫化物,从而最终形成甲硫氨酸和半胱氨酸。有研究表明,在强启动子(如 *HSP26* 或 *HSP30* 启动子)的控制下,即使在具有亚硫酸盐还原酶活性的实验室菌株中过量表达 *MET14* 都可导致 SO₂ 的有效增加^[1]。近些年来,对于 SO₂ 形成相关酶基因 *MET14*, *MET16*, *MET5*, *MET10* 等均有一些研究^[2,3],但是通过 *MET14* 基因在酿酒酵母中的高表达来构建抗氧化啤酒酵母工业菌株的研究未见报道。

本实验室利用二氧化硫产量较高的青岛啤酒酵母 YSF-5 作为供体菌,克隆其 *MET14* 基因,通过重

组表达质粒在啤酒工业酵母中表达,为构建优良的抗氧化抗老化啤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 啤酒工业酵母 YSF-5、YSF-38 由青岛啤酒科研中心提供。大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α (*supE44*, Δ *lac*, U169, *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*) 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) YS58(*MAT α* , *ura3*, *trp1*, *leu2*, *his4*) 质粒 YEp352(*amp*, *URA3*, *Yeast-E. coli* 穿梭载体), pVC727、pGMF 均由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂 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;氯霉素青霉素购自北京鼎国生物技术发展中心;盐酸副玫瑰苯胺购自北京通县育才精细化工厂。

1.1.3 培养基和培养条件 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 氯霉素青霉素的 LB 培养基^[4], 37 $^{\circ}$ C 静置或振荡培养;酿酒酵母 YS58 用 YEPD 培养基^[5]或麦芽汁培养基保存和培养,转化子用含有色氨酸、亮氨酸、组氨酸的

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

作者简介 曲 娜(1980-),女,山东滨州人,硕士研究生,研究方向为酵母菌分子遗传与育种。E-mail: quna2005@sohu.com

收稿日期 2005-05-26,接受日期 2005-06-06,修回日期 2005-07-11

YNB 选择培养基^[5]进行筛选鉴定 ,28℃ 静置或振荡培养 ,啤酒工业酵母 YSF-38 用麦芽汁培养基培养 ,转化子用含有 4mmol/L CuSO₄ 的 YEPD 培养基筛选鉴定 28℃ 振荡培养或 12℃ 静置培养。

1.2 DNA 操作技术

1.2.1 基因组 DNA 的提取 :参照文献[6]进行 *S. cerevisiae* YSF-5 总 DNA 的提取。

1.2.2 目的基因的 PCR 扩增 :根据已报道的 *MET14* 基因序列^[7] ,设计相应的引物 ,分别引入 *EcoR*Ⅰ 和 *Hind*Ⅲ 的酶切位点(用下划线标出)。上游引物 :5'-TGTGAATTCCTGTACACCAATGGCTACT-3' ;下游引物 :5'-TATAAGCTTGATGAGGTGGATGAAGACG-3'。反应条件 :94℃ 5min ;94℃ 40s ,56℃ 2min ,72℃ 3min ,29 次循环 ,72℃ 15min。琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。PCR 产物回收纯化参考文献[4]。

1.2.3 DNA 酶切与连接 酶切和连接参照产品说明进行。

1.2.4 大肠杆菌转化与质粒提取 :参照文献[4]进行。

1.3 酵母转化

酵母转化采用醋酸锂转化法^[8] ,营养缺陷型菌株 YS58 的转化子用含有色氨酸、亮氨酸、组氨酸的 YNB 平板筛选 ,啤酒酵母工业菌株 YSF-38 的转化子用含有 4mmol/L CuSO₄ 的 YEPD 平板筛选。

1.4 酵母转化子培养液上清中二氧化硫含量测定

将受体菌和相应的转化子以相同的接种量接于麦芽汁培养基中 ,28℃ 振荡培养 48h 或 12℃ 静置培养 10d 培养液上清中二氧化硫含量用盐酸副玫瑰苯胺法测定^[9]。

1.5 酵母转化子的稳定性检测

参考文献[10]进行检测。

2 结果

2.1 基因克隆

2.1.1 *MET14* 基因的 PCR 扩增 :用提取的 *S.*

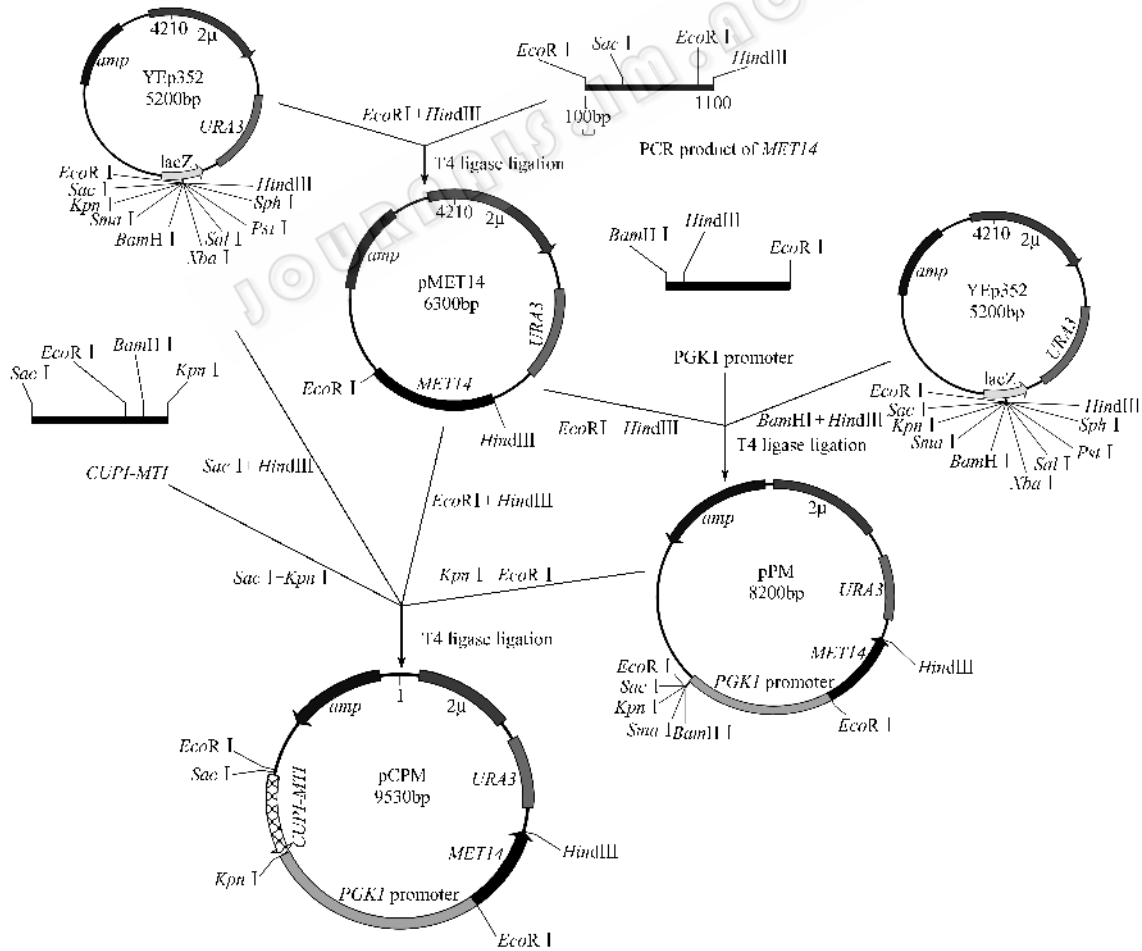


图 1 重组质粒 pMET14 及重组表达质粒 pPM 和 pCPM 的构建

Fig.1 Construction of the recombinant plasmid pMET14 and the recombinant expression plasmid pPM , pCPM

cerevisiae YSF-5 总 DNA 作为模板进行 PCR 扩增,经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳,可看到一条约 1.1kb 的特异性条带,其大小与 *MET14* 的编码序列和终止子序列相符。

2.1.2 重组质粒的构建:回收经 *Eco*R I 和 *Hind*III 双酶切的 PCR 产物,插入载体 YEp352,构建重组质粒 pMET14(图 1),酶切分析表明重组质粒构建正确。

2.2 重组表达质粒的构建

将来自重组质粒 pMET14 的 *MET14* 基因片段与来源于 pVC727 的 *PGK1* 启动子共同插入穿梭质粒 YEp352,构建了重组表达质粒 pPM(图 1)。酶切分析表明构建的质粒正确。

将来自重组质粒 pMET14 的 *MET14* 基因片段与来源于 pPM 的 *PGK1* 启动子和来源于 pGMF 的 *CUP1-MTI* 铜抗性片断,共同插入穿梭质粒 YEp352,构建了重组表达质粒 pCPM(图 1)。用相应的酶切电泳检测,各片断大小与预期相符,证明该重组质粒构建正确。

2.3 酵母转化

将重组表达质粒 pPM 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 培养基上筛选转化子。

将重组表达质粒 pCPM 转化啤酒工业酵母 YSF-38,在含有 4mmol/L CuSO_4 的 YEPD 培养基上筛选相应转化子。

2.4 MET14 基因在实验室菌株 YS58 中的表达

将各菌株在 10mL 麦芽汁培养基中培养 48h,测定培养上清液中 SO_2 含量,可以看出转化子 YS58(pPM)的 SO_2 产量是受体菌 YS58 和空载体转化子 YS58(YEp352)的 2 倍左右。受体菌 YS58 和转化子 YS58(YEp352)的 SO_2 产量没有显著差异,说明 YEp352 转入受体菌对其 SO_2 生成量没有显著影响,所以转化子 YS58(pPM)的 SO_2 含量增加是重组质粒上的 *MET14* 基因表达的结果(表 1)。转化子 YS58

(pPM)、YS58(YEp352)与受体菌 YS58 的生物量没有明显差异,说明质粒 pPM、YEp352 转入受体菌没有对其生物量产生明显影响(表 1)。

2.5 MET14 基因在啤酒酵母工业菌株 YSF-38 中的表达

2.5.1 转化子的二氧化硫产量测定:分别接受体菌 YSF-38 及转化子 YSF-38(pCPM)-1, YSF-38(pCPM)-2(二者为同种质粒的不同克隆)于 10mL 麦芽汁培养基中,摇床培养 48h,并对其上清进行 SO_2 的含量测定,结果表明转化子的 SO_2 产量是受体菌的 3.2 倍(大约 41mg/L),同时转化子的生物量与受体菌没有明显差异(表 2)。对转化子 YSF-38(pCPM)-1 进行遗传稳定性检测,在无选择压力条件下,连续传代培养 120h,仍有 82% 的转化子带有重组质粒。

表 2 转化子与受体菌的 SO_2 产量和生物量对比
Table 2 Comparison of the sulphite content and biomass among the control strain and recombinant strains

Stains	Biomass(g dry wt/L)	Sulphite content(mg/L)
YSF-38	8.9 ± 0.1	12.8 ± 1.0
YSF-38(pCPM)-1	8.6 ± 0.2	41.3 ± 2.4
YSF-38(pCPM)-2	8.7 ± 0.1	40.8 ± 1.8

The control strain YSF-38 and recombinant strains YSF-38(pCPM)-1, YSF-38(pCPM)-2 were cultured in wort at 28°C for 48h. Values are means of three replicated cultures ± standard deviation.

2.5.2 转化子的小型发酵实验:分别接受体菌 YSF-38 与转化子 YSF-38(pCPM)-1 于 270mL 麦芽汁培养基中,12°C 静置培养 10d,每两天取 10mL 样品用来测定其二氧化硫含量,转化子的 SO_2 产量从第 4 天开始上升,约第 8 天达最高峰(大约 15.6mg/L),在发酵末期(10d)转化子的 SO_2 产量是受体菌的 1.4 倍(大约 10.4mg/L)(图 2)。

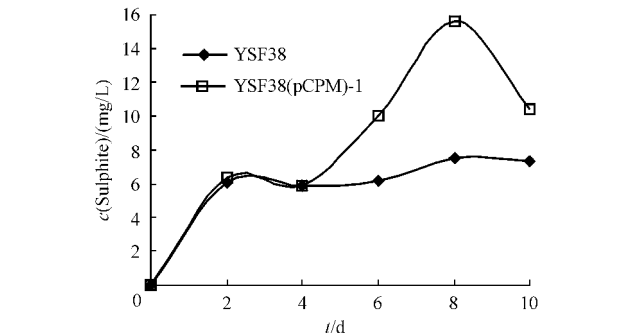


图 2 受体菌与转化子在发酵不同时期的 SO_2 产量
Fig.2 Comparison of the sulphite formation between the host strain and the transformant at the different time of fermentation
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

3 讨论

在啤酒酵母的二氧化硫形成过程中,主要依赖于3个关键酶,分别是由 *MET3*、*MET14* 和 *MET16* 基因编码的 ATP 硫化酶、APS 激酶和 PAPS 还原酶。Korch 等^[3]发现,在 *MET5* (编码亚硫酸盐还原酶)突变时,过量表达在自身启动子操纵下的 *MET14* 基因能显著增加 SO₂ 的生成,但在野生型中过量表达该基因则无此效果;然而,Donalies 等^[1]发现,在强启动子(如 *HSP26* 或 *HSP30* 启动子)的控制下,即使在具有亚硫酸还原酶活性的实验室菌株中过量表达 *MET14*,也可导致 SO₂ 的有效增加。这些研究表明,过量表达 *MET14* 能够增加 SO₂ 的形成,但其效果在很大程度上依赖于调控 *MET14* 的启动子。因此,通过强启动子来控制 *MET14*,使其在啤酒酵母中过量表达,从而获得高二氧化硫产量的啤酒酵母工业菌株是可行的。

本研究中,利用 *PGK1* 强启动子来调控 *MET14*,使其不仅在实验室菌株 YS58 中有效表达,而且在啤酒酵母工业菌株 YSF-38 中也成功表达,得到了 SO₂ 产量较高的啤酒工业酵母。在该转化菌株的小型发酵实验中,发酵 8d 后,转化子 SO₂ 产量显著回落,而受体菌没有明显变化,分析原因可能有两点:一是由于转化子的重组质粒丢失,致使 SO₂ 产量降低;另一原因是 SO₂ 浓度越高,其散失的速度就会越快,结果导致转化子发酵上清液中 SO₂ 含量降低。为了进一步完善该研究,在下面的工作中,将采用整合型表达载体进行宿主菌基因组修饰,以解决转化子遗传稳定性问题。 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶基因 *GSH-I* 在工业啤酒酵母中高表达可以明显提高细胞合成谷胱甘肽的能力^[11]。而谷胱甘肽的含量与啤酒酵母的抗氧化密切相关。由于硫化氢(H₂S)、谷胱甘肽(GSH)、二氧化硫(SO₂)在酵母体内属于同一代谢途径,因此,通过 *GSH-I* 和 *MET14* 基因共表达,

来构建生成少量硫化氢(H₂S)、大量谷胱甘肽(GSH)、适量二氧化硫(SO₂)的抗氧化啤酒工业用酵母工程菌是可行的,也具有相当的理论和实践意义。相关研究正在进行中。

参 考 文 献

- [1] Donalies UEB, Stahl U. Increasing sulphite formation in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of *MET14* and *SSUI*. *Yeast* 2002, **19**: 475–484.
- [2] Hansen J, Kielland-Brandt MC. Inactivation of *MET10* in brewer's yeast specifically increases SO₂ formation during beer production. *Nature Biotechnol* 1996, **14**: 1587–1591.
- [3] Korch C, Mountain HA, Gyllang H, et al. A mechanism for sulphite production in beer and how to increase sulphite levels by recombinant genetics. In: European Brewery Convention, Proceedings of the 23rd Congress, Lisbon. Oxford: Oxford University Press, 1991: 201–208.
- [4] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd eds. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [5] 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.
- [6] Alison A, Daniel EG, Chris AK. Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998.
- [7] Korch C, Mountain HA, Bystrom AS. Cloning, nucleotide sequence, and regulation of *MET14*, the gene encoding the APS kinase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*, 1991, **229**: 96–108.
- [8] Adams A, Gottschling DE, Kaiser CA, et al. Methods in Yeast Genetics, A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997, 99–102.
- [9] 张晓磊,蔡心尧.比色法测定啤酒中二氧化硫的含量.食品与发酵工业,2000, **26**(5): 37–40.
- [10] He X, Huai W, Tie C, et al. Breeding of high ergosterol-producing yeast strains. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2000, **25**: 39–44.
- [11] 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.

Construction of high sulphite-producing industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae*

QU Na, HE Xiu-ping, GUO Xue-na, LIU Nan, ZHANG Bo-run*

(¹ Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

(² Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: In the process of beer storage and transportation, off-flavor can be produced for oxidation of beer. Sulphite is important for stabilizing the beer flavor because of its antioxidant activity. However, the low level of sulphite synthesized

by the brewing yeast is not enough to stabilize beer flavor. Three enzymes involve sulphite biosynthesis in yeast. One of them, APS kinase (encoded by *MET14*) plays important role in the process of sulphite formation. In order to construct high sulphite-producing brewing yeast strain for beer production, *MET14* gene was cloned and overexpressed in industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae*.

Primer 1 (5'-TGTGAATTCCTGTACACCAATGGCTACT-3', *EcoR* I) and primer 2 (5'-TATAAGCTTGATGA GGTGGATGAAGACG-3', *Hind* III) were designed according to the *MET14* sequence in GenBank. A 1.1kb DNA fragment containing the open reading frame and terminator of *MET14* gene was amplified from *Saccharomyces cerevisiae* YSF-5 by PCR, and inserted into YEpl352 to generate recombinant plasmid p*MET14*. To express *MET14* gene properly in *S. cerevisiae*, the recombinant expression plasmids pPM with *URA3* gene as the selection marker and pCPM with *URA3* gene and copper resistance gene as the selection marker for yeast transformation were constructed. In plasmid pPM, the *PGK1* promoter from plasmid pVC727 was fused with the *MET14* gene from p*MET14*, and the expression cassette was inserted into the plasmid YEpl352. The dominant selection marker, copper-resistance gene expression cassette *CUP1-MTI* was inserted in plasmid pPM to result in pCPM. Restriction enzyme analysis showed that plasmids pPM and pCPM were constructed correctly.

The laboratory strain of *S. cerevisiae* YS58 with *ura3*, *trp1*, *leu2*, *his4* auxotroph was transformed with plasmid pPM. Yeast transformants were screened on synthetic minimal medium (SD) containing leucine, histidine and tryptophan. The sulphite production of the transformants carrying pPM was 2 fold of that in the control strain YS58, which showed that the *MET14* gene on plasmid pPM was expressed functionally in YS58. The industrial brewing yeast strain YSF-38 was transformed with the plasmid pCPM and yeast transformants were selected on YEPD medium containing 4mmol/L copper sulphate. The recombinant strain carrying pCPM showed a 3.2-fold increase in sulphite production when compared to the host strain YSF-38 under laboratory culture conditions. Flask fermentation under brewing-like conditions was performed in Tsingtao Beer Brewery. The sulphite production of the recombinant strain began to be higher than that of the host strain YSF-38 at the fourth day and reached the maximum at the eighth day. At the end of fermentation, the sulphite produced by recombinant strain is 1.4 fold of that in the host strain.

The overexpression of *MET14* gene in both laboratory and industrial strains of *S. cerevisiae* increases the sulphite formation. It is the first time to construct high sulphite-producing industrial strain by functional expression of *MET14* in *S. cerevisiae*. Such study provides the foundation for construction of an excellent brewing yeast strain that can produce proper sulphite and can be used in commercial beer production.

Keywords: Sulphite formation; *MET14* gene; Cloning and expression; *Saccharomyces cerevisiae*

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

Received: 26 May 2005/Accepted: 6 June 2005/Revised: 11 July 2005

《微生物学报》真诚欢迎刊登广告

《微生物学报》(双月刊)创刊于1953年,由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办,是我国微生物学领域唯一的综合性学报级期刊和国家自然科学基金核心期刊,被国内外多家重要的文摘刊物和数据库收录。

本刊历史悠久,发行量大,内容涵盖面广,主要报道普通微生物学、工业、农业、医学和兽医微生物学、病毒学、免疫学以及生物工程等方面的研究成果和科研进展。一直受到国内外科研工作者、高等院校师生和相关企业界的欢迎。

本刊可以为您定期发布与微生物学相关的试剂、药品、仪器、设备及生物技术等方面的产品信息,可为您开拓在微生物学领域新的发展空间。另外,与生命科学有关的各类服务信息也在本刊发布之列。

本刊态度严谨,信守协议,由中国科学院科学出版社广告部代理广告业务(广告经营许可证:京东工商广字第0034号),编辑部备有最新的期刊简介和报价单,欢迎与我们联系。

电话: (010) 62630422 传真: (010) 62554303 电子信箱: actamicro@sun.im.ac.cn