

SSU1 多拷贝表达对酿酒酵母二氧化硫生成量的影响

陈叶福, 沈世超, 王艳, 肖冬光*

(天津市工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要:【目的】在不影响酵母正常代谢前提下, 构建亚硫酸盐分泌量提高的基因工程菌株, 增加二氧化硫生成量, 有效地解决啤酒老化问题。【方法】以适量高产二氧化硫工业啤酒酵母突变株 M8 总 DNA 为模板, PCR 方法得到带有不同长度 5'端非编码区的基因片段 *SSU1-1*、*SSU1-2*, 以大肠杆菌-酿酒酵母穿梭质粒 YEp352 构建表达载体 pSU1 和 pSU2, 转化实验室酵母 YS58, 验证 *SSU1* 多克隆表达对其二氧化硫生成量的影响。进而将 pSU2 转化工业啤酒酵母 M8, 利用亚硫酸盐抗性筛选转化子, 并对其二氧化硫和硫化氢生成量及其啤酒抗老化性能进行测定和分析。【结果】实验室酵母转化子 pSU1-4 和 pSU2-3 二氧化硫生成量较原株明显提高而硫化氢生成量基本不变, 工业啤酒酵母转化子 Y2 二氧化硫生成量比原株 M8 提高 74.4%, TBA 值下降 14.9%, DPPH 自由基清除率提高 38.2%, 硫化氢生成量基本不变。【结论】*SSU1* 基因的多拷贝表达有效提高了亚硫酸盐转运蛋白 Ssu1p 表达量, 增加了亚硫酸盐分泌量, 啤酒抗氧化能力得到明显增强, 而对酵母硫代谢途径中亚硫酸盐还原为硫化物代谢过程没有影响。

关键词: 酿酒酵母; 硫代谢; *SSU1*; 二氧化硫

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2008) 12-1609-07

在啤酒生产中, 二氧化硫是一种常用的抗氧化剂, 对维持啤酒风味的稳定性起到关键作用。在啤酒酿造过程中, 二氧化硫的生成量一般在 10~15 mg/L 之间, 其量不能很好的起到抗氧化作用^[1], 因此在啤酒包装前需要人为的添加部分亚硫酸盐, 以解决啤酒老化问题。采用代谢控制方法, 改变细胞内部硫代谢分布, 可以在不影响啤酒酵母正常生长代谢的情况下达到适量提高二氧化硫产量的目的, 较好的解决啤酒老化问题。

二氧化硫是啤酒酵母同化还原硫酸盐生成含硫氨基酸代谢过程的中间产物, 在啤酒中以亚硫酸盐的形式存在。近年来, 对于 SO₂ 生成相关基因, 如: *MET14*、*MET2*、*MET10* 等均有一些研究。过量表达 *MET14*^[2]或敲除 *MET2*、*MET10*^[3]可以有效增加二氧化硫产量, 但同时可能会破坏酵母硫代谢中多种含硫

氨基酸的正常代谢。Park 和 Bakalinsky^[4]研究证实, 当细胞中的亚硫酸盐积累过多时, 过量的亚硫酸盐可以通过亚硫酸盐转运蛋白 Ssu1p 运输到细胞外, 从而减少亚硫酸盐对细胞产生毒害作用。

本实验采用基因工程手段, 以物理诱变获得的一株低产硫化氢、适量高产二氧化硫工业啤酒酵母突变株 M8 为出发菌株, 通过多拷贝表达 *SSU1* 基因, 在不影响啤酒酵母正常生长代谢的情况下, 增加工业啤酒酵母 M8 亚硫酸盐分泌量, 从而提高发酵液中二氧化硫含量, 改善啤酒的抗氧化性能。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒: 啤酒酵母 (*Saccharomyces cer-*

基金项目: 天津市自然科学基金 (05YFJMJC03000)

*通讯作者: Tel: +86-22-60601067; Fax: +86-22-60602298; E-mail: xdg@tust.edu.cn

作者简介: 陈叶福(1973-), 男, 吉林通化人, 博士, 副教授, 主要从事酵母遗传改良和生物质生物转化方面的研究。

E-mail: yfchen@tust.edu.cn

收稿日期: 2008-04-16; 修回日期: 2008-08-28

evisiae) M8, 为经物理诱变得到的—株低产硫化氢、适量高产二氧化硫工业啤酒酵母突变株, 本实验室保藏。酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) YS58 (*MATa*, *ura3*, *trp1*, *leu2*, *his4*), 中国科学院微生物研究所的张博润教授惠赠。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109, 本实验室保藏。质粒 YEp352(*Amp^R*, *URA3*, *Yeast-E. coli* 穿梭质粒), 本实验室保藏。

1.1.2 主要试剂: 限制性内切酶 *Bam*H 和 *Sal* I, T4 DNA 连接酶, *Taq* DNA 聚合酶, Agarose Gel DNA Purification Kit, 购自 TaKaRa 公司; 低分子量蛋白质 Marker (14.2~66.0 kDa), 购自北京博大泰克生物基因技术有限公司; 氨苄青霉素, 购自美国

Amresco 公司。

1.1.3 培养基和培养条件: 大肠杆菌 JM109 保存和培养采用 LB 培养基, 转化子筛选用含有 Amp、IPTG、X-gal 的 LA 平板, 37 °C 静置培养; 酿酒酵母 YS58 用 YEPD 培养基保存和培养, 转化子用含有色氨酸、亮氨酸、组氨酸 YNB 选择培养基进行筛选鉴定, 28 °C 静置培养。

1.1.4 引物: 根据 GenBank 报道的 *SSU1* 基因序列 (Gene ID: 856013) 设计 PCR 反应引物 (表 1, 引物 1-1、1-2 和引物 2-1、2-2 分别扩增带有不同长度 5 端非编码区的基因片段 *SSU1-1*、*SSU1-2*, 下划线部分为酶切位点)。

表 1 PCR 反应引物
Table 1 PCR Primers

Primer	Sequence(5'→3')	Size/bp	Restriction site
1-1	GCAGGATCCTTTGGGCTGGTAGGATTAC	28	<i>Bam</i> H I
1-2	CAGGTCGACATTGACAAGGGTCGTGCTT	28	<i>Sal</i> I
2-1	GCAGGATCCCGTCAAGATGACACTTCTAC	29	<i>Bam</i> H I
2-2	CAGGTCGACTGCTTGCCAATTATGTACGT	29	<i>Sal</i> I

1.2 亚硫酸钠抗性平板筛选

YEPD 培养基中加入 75 mmol/L 的酒石酸缓冲溶液 (pH3.5), 2% 琼脂, 分别 0.1 MPa 灭菌 20 min 后, 混匀, 制得 YEPD+TA 平板。取 0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 mol/L 的亚硫酸钠母液分别涂布于 YEPD+TA 平板, 制成不同亚硫酸盐浓度的梯度平板。将酵母菌株划线接种于梯度平板上, 28 °C 培养 3~4 d, 观察菌落生长情况。

1.3 啤酒发酵

采用新鲜制备的 10 Brix 麦芽汁, 酵母泥接种量为 0.5%, 12 °C 恒温发酵 8 d。

1.4 DNA 操作技术

1.4.1 基因组 DNA 的提取: 参考文献[5]进行操作。

1.4.2 目的基因的 PCR 扩增: 反应条件: 94 °C 5min; 94 °C 40s, 54 °C 2min, 72 °C 3min, 30 个循环; 72 °C 15min。0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。

1.4.3 DNA 酶切与连接: 酶切和连接参照产品说明进行。

1.4.4 大肠杆菌转化与质粒提取: 参考文献[5]进行操作。

1.4.5 表达载体 pSU1 和 pSU2 的构建: 将纯化的 *SSU1-1*、*SSU1-2* 分别用 *Bam*H I - *Sal* I 双酶切, 与同经 *Bam*H I - *Sal* I 双酶切的穿梭质粒 YEp352 连接, 构建表达载体 pSU1 和 pSU2 (图 1)。

1.5 酵母转化

按照文献[5]进行电转化法。

1.6 分析方法

1.6.1 硫化氢含量分析方法: 亚甲基兰分光光度法[6]。

1.6.2 酵母培养液中总二氧化硫分析方法: 碘量法[7]。

1.6.3 TBA 值测定: 参考文献[8]。

1.6.4 DPPH 自由基清除率测定: 参考文献[9]。

2 结果

2.1 基因克隆

2.1.1 *SSU1* 基因的 PCR 扩增: 以提取的啤酒酵母 M8 的总 DNA 为模板, 分别用引物 1 和引物 2 进行 PCR 扩增, 经 0.8 % 的琼脂糖凝胶电泳显示分别在 2.3 kb 和 1.9 kb 附近出现特异的单一 DNA 条带 (图略), 即 *SSU1-1* 和 *SSU1-2*, 与预计的目的基因片段大小一致。

2.1.2 重组表达载体的鉴定: 将重组表达载体 pSU1、pSU2 分别进行 *Bam*H I - *Sal* I 双酶切和 *Sac* I 单酶切。双酶切后分别释放出 2.3 kb 和 1.9 kb 大小的片段, 单酶切后分别释放出 756 bp 和 515 bp 的特征性片段, 与预期特征性片段大小一致, 证明重组表达载体构建正确。

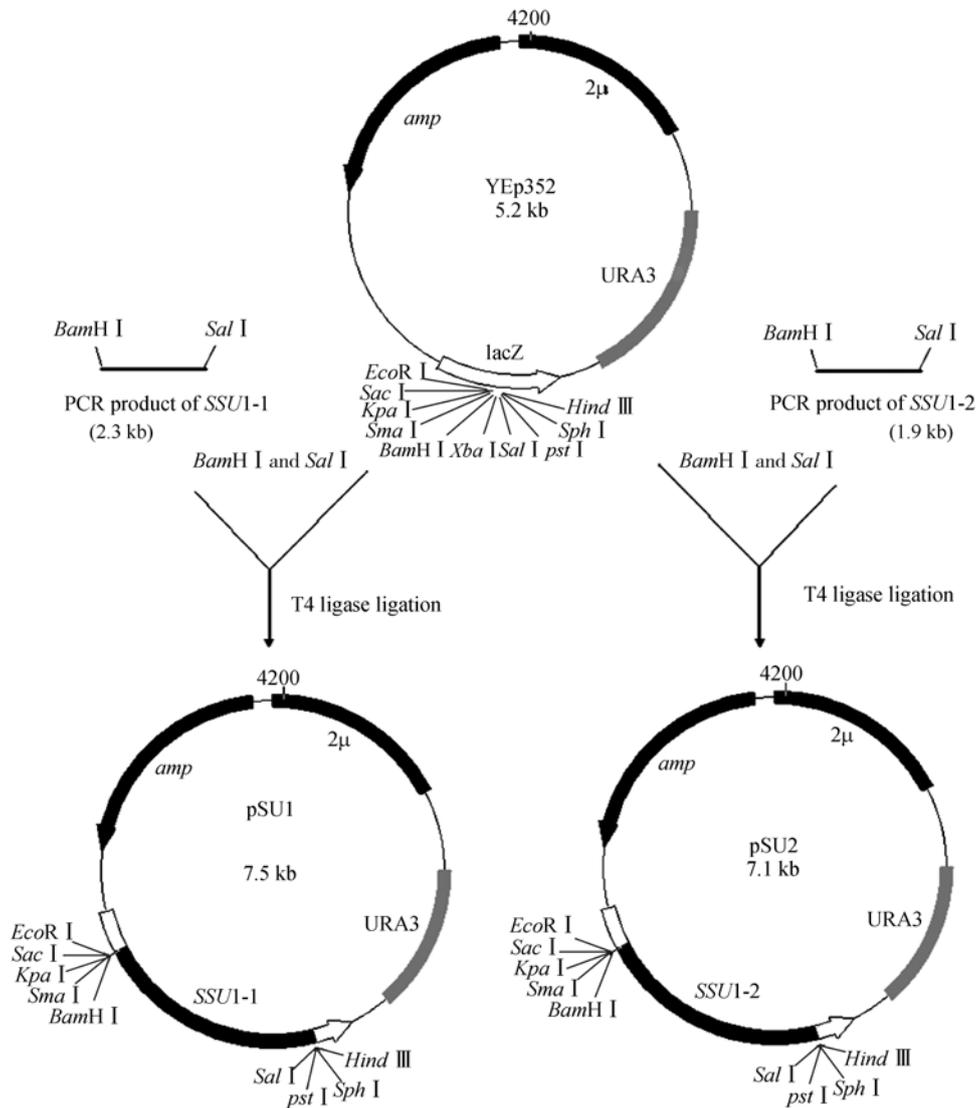


图 1 表达载体 pSU1 和 pSU2 的构建示意图
Fig.1 Construction of the expression vector pSU1 and pSU2.

2.2 *SSU1* 基因在实验室酵母 YS58 中的表达

采用电转化法将表达载体 pSU1 和 pSU2 分别转化实验室酵母 YS58, 筛选获得阳性酵母转化子, 即 pSU1-YS58、pSU2-YS58。

2.2.1 实验室酵母转化子全细胞蛋白 SDS-PAGE :随机挑取转化子 pSU1-YS58 和 pSU2-YS58 各一株, 培养收集菌体, 做全细胞蛋白 SDS-PAGE, 检测 *SSU1* 基因表达情况。与对照相比, 转化子在 Ssu1p 分子量大小(约 52 kDa)位置上的蛋白条带占总蛋白的比例有较明显增加(图 2), 表明 pSU1 和 pSU2 上的 *SSU1* 基因可能在 YS58 中得到了表达。

2.2.2 实验室酵母转化子二氧化硫生成量测定 :挑选 pSU1-YS58 和 pSU2-YS58 各 5 株, 与原株实验室酵

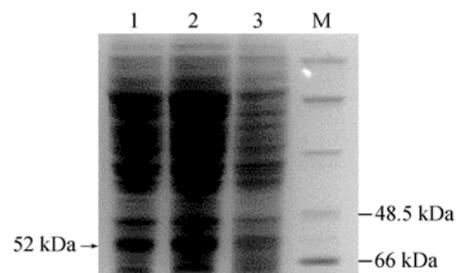


图 2 实验室酵母转化子全细胞蛋白 SDS-PAGE
Fig. 2 SDS-PAGE of laboratory yeast transformants 1. YS58 (pSU1); 2. YS58(pSU2); 3. *Saccharomyces cerevisiae* YS58; M. Low molecular weight protein marker.

母 YS58 同时进行发酵实验, 28 静置培养 5 d, 测定发酵液中的二氧化硫生成量。结果显示(表 2), 10 株酵母转化子的二氧化硫生成量较原株 YS58 都有较大的提高。

其中,转化子 pSU1-4 的二氧化硫生成量比原株 YS58 提高了 40.2%; pSU2-3 转化子的二氧化硫生成量比 YS58 提高了 48.3%。说明 pSU1 和 pSU2 上携带的 *SSU1* 基因在实验室酵母 YS58 中均得到活性表达。

2.2.3 实验室酵母转化子硫化氢生成量测定:硫化氢是酵母硫代谢过程中甲硫氨酸、S-腺苷甲硫氨酸和谷

胱甘肽等重要含硫物质生物合成所必需的中间代谢产物,在酵母生理代谢过程中具有重要作用。将 2.2.2 中所挑选的转化子与原株 YS58 同时进行发酵实验,28 ℃ 静置培养 5 d,测定硫化氢生成量(表 3)。从表 3 结果可以看出,10 株转化子与原株 YS58 的硫化氢生成量水平相差不大。

表 2 实验室酵母转化子二氧化硫生成量
Table2 SO₂ production of laboratory yeast transformants

Strains	SO ₂ production/(mg/L)	Increasing amount of SO ₂ /(mg/L)	Strains	SO ₂ production/(mg/L)	Increasing amount of SO ₂ /(mg/L)
YS58	21.32	0	YS58	21.32	0
pSU1-1	25.16	3.84	pSU2-1	30.63	9.31
pSU1-2	29.82	8.50	pSU2-2	26.80	5.48
pSU1-3	25.34	4.02	pSU2-3	31.62	10.30
pSU1-4	29.91	8.59	pSU2-4	31.31	9.99
pSU1-5	29.67	8.35	pSU2-5	26.52	5.20

表 3 实验室酵母转化子硫化氢生成量
Table3 H₂S production of laboratory yeast transformants

Strains	H ₂ S production/(μg/L)	Decreasing amount of H ₂ S/(μg/L)	Strains	H ₂ S production/(μg/L)	Decreasing amount of H ₂ S/(μg/L)
YS58	15.72	0	YS58	15.72	0
pSU1-1	15.12	0.60	pSU2-1	15.26	0.54
pSU1-2	14.79	0.93	pSU2-2	15.65	0.07
pSU1-3	15.19	0.53	pSU2-3	15.45	0.27
pSU1-4	15.52	0.20	pSU2-4	15.32	0.40
pSU1-5	15.39	0.33	pSU2-5	15.26	0.46

综合 2.2.1、2.2.2 和 2.2.3 实验结果表明, pSU1 和 pSU2 上的 *SSU1* 基因在实验室酵母 YS58 中均得到活性表达,且二者表达水平相当,说明 *SSU1-1* 5 端非编码区较 *SSU1-2* 长出的 240 bp DNA 序列对 *SSU1* 基因的表达并无明显促进作用。选择相对较小的表达载体 pSU2 转化工业啤酒酵母突变株 M8,进一步研究 *SSU1* 基因在工业啤酒酵母中多克隆表达对于二氧化硫生成量的影响。

2.3 *SSU1* 基因在工业啤酒酵母突变株 M8 中的表达

2.3.1 啤酒酵母 M8 亚硫酸盐抗性显性筛选标记的确定:啤酒酵母多为异源多倍体,一般不产孢,很难利用单倍体营养缺陷型进行啤酒酵母转化子筛选。再者,啤酒生产中采用营养缺陷型酵母菌株可能会影响到酵母的发酵性能和啤酒风味^[10]。此外, G418 等药物抗性标记由于是酵母外源基因,在食品安全性方面存在争议。啤酒酵母亚硫酸盐抗性是一种源于啤酒酵母自身的由 *FZF1-4* 和 *SSU1* 基因调控的显性筛选标记,在食品安全性和消除高密度转化子中假阳性出现等方面优势明显^[11]。因此,本实验采用啤酒酵母亚硫

酸盐抗性作为啤酒酵母转化子显性筛选标记。

将啤酒酵母 M8 划线接种于浓度分别为 1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0 mmol/L 的亚硫酸钠抗性平板上,28 ℃ 培养 3~4 d,观察生长情况:在 1.8 mmol/L 亚硫酸钠抗性平板上啤酒酵母 M8 有较弱的生长,而在 2.0 mmol/L 亚硫酸钠抗性平板上不能生长。故选择含 2.0 mmol/L 亚硫酸钠的 YEPD+TA 平板用于转化子的筛选。

2.3.2 啤酒酵母 M8 转化子初筛:将表达载体 pSU2 电转化到工业啤酒酵母 M8 中,将电转液涂布于含 2.0 mmol/L 亚硫酸钠的 YEPD+TA 平板上,28 ℃ 培养 3~4 d,筛选获得 51 株转化子。随机挑选 7 株转化子,与原株 M8 分别划线于 2.0 mmol/L 亚硫酸钠的 YEPD+TA 平板上,观察生长情况。转化子均能在含 2.0 mmol/L 亚硫酸钠的 YEPD+TA 平板上生长,而啤酒酵母 M8 不能生长,初步证明重组表达载体 pSU2 成功转入到啤酒酵母 M8 中(图 3)。

2.3.3 啤酒酵母转化子发酵液中二氧化硫生成量测定:从啤酒酵母转化子中随机挑选 14 株转化子与啤

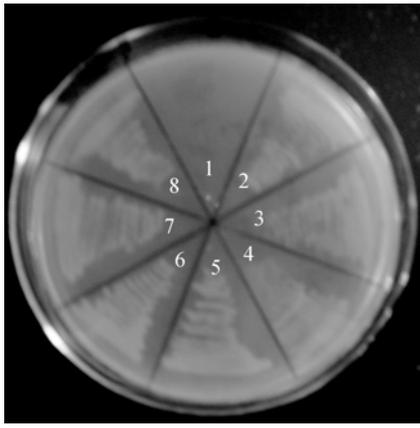


图3 转化子和原株 M8 亚硫酸盐抗性比较
Fig. 3 Comparison of Na_2SO_3 resistance between *S. cerevisiae* M8 and its transformants. 1. *S. cerevisiae* M8; 2-8. transformants.

酒酵母 M8 同时进行啤酒发酵实验, 12 发酵 8 d, 按照方法 1.6, 测定二氧化硫生成量。结果显示(表 4),

表 4 工业啤酒酵母 M8 转化子二氧化硫生成量
Table 4 SO_2 production of industrial *S. cerevisiae* M8 transformants

Strains	SO_2 production/(mg/L)	Increasing amount of SO_2 /(mg/L)	Strains	SO_2 production/(mg/L)	Increasing amount of SO_2 /(mg/L)
M8	21.48	0	M8	21.48	0
Y1	33.32	11.84	Y8	36.63	15.15
Y2	38.84	17.36	Y9	38.46	16.98
Y3	32.76	11.28	Y10	38.15	16.67
Y4	33.36	11.88	Y11	38.08	16.60
Y5	37.62	16.14	Y12	34.02	12.54
Y6	35.39	13.91	Y13	37.77	16.29
Y7	32.22	10.74	Y14	32.71	11.23

表 5 工业啤酒酵母 M8 转化子硫化氢生成量
Table 5 H_2S production of industrial *S. cerevisiae* M8 transformants

Strains	H_2S production/($\mu\text{g/L}$)	Decreasing amount of H_2S /($\mu\text{g/L}$)	Strains	H_2S production/($\mu\text{g/L}$)	Decreasing amount of H_2S /($\mu\text{g/L}$)
M8	14.19	0	M8	14.19	0
Y1	14.26	-0.07	Y8	14.12	0.07
Y2	13.86	0.33	Y9	13.92	0.27
Y3	14.26	-0.07	Y10	13.86	0.33
Y4	14.12	0.07	Y11	14.39	-0.20
Y5	13.79	0.40	Y12	14.52	-0.33
Y6	13.99	0.20	Y13	13.86	0.33
Y7	14.39	-0.20	Y14	13.99	0.20

综合 2.3.3 和 2.3.4 实验结果表明, 通过多拷贝表达 *SSU1* 基因提高啤酒酵母亚硫酸盐分泌量不会对酵母细胞内亚硫酸盐代谢产生影响, 即在啤酒酵母 M8 中多拷贝表达 *SSU1* 基因, 只是提高了亚硫酸盐的分泌量, 对硫化氢的生成及进一步硫代谢没有影响。

2.4 转化子 Y2 与原株 M8 啤酒抗老化性能比较

TBA 值和 DPPH 自由基清除率是评价啤酒老化程度的重要指标。TBA 值越高, 表明啤酒中所含羰基化合物越多, 啤酒风味稳定性越差; DPPH 自由基清

14 株啤酒酵母转化子的二氧化硫生成量比原株啤酒酵母 M8 提高了 1.5 至 1.8 倍左右。其中, 啤酒酵母转化子 Y2 的二氧化硫生成量最高, 即 38.84 mg/L, 比原株 M8 提高了 80.8%。表明 *SSU1* 基因编码的亚硫酸盐转运蛋白 Ssu1p 在啤酒酵母中得到有效表达, 菌体的亚硫酸盐分泌量明显提高。

2.3.4 啤酒酵母转化子发酵液中硫化氢生成量测定: 硫化氢对啤酒风味具有双重作用, 微量存在时, 是构成啤酒风味某些特点的的必要条件; 含量超过其风味阈值后, 就会呈明显的“酵母臭味”^[12]。

对 2.3.3 中所选的 14 株转化子与啤酒酵母 M8 同时进行啤酒发酵实验, 12 发酵 8 d, 按照方法 1.5, 测定硫化氢生成量。结果显示(表 5), 表达载体 pSU2 的啤酒酵母转化子的硫化氢生成量与原株 M8 相比, 相差不大。

除率越大, 啤酒抗氧化能力越强。

取转化子菌株 Y2 和原株 M8 分别进行啤酒发酵实验, 12 发酵 8 d, 0 后酵 7 d 后, 按照方法 1.2.7 和 1.2.8 测定发酵液的 TBA 值和 DPPH 自由基清除率, 同时测定各发酵液中二氧化硫生成量。结果显示(表 6), 转化子菌株 Y2 的 SO_2 生成量比原株 M8 提高 74.4%, TBA 值下降 14.9%, DPPH 自由基清除率提高 38.2%, 表明菌株 Y2 啤酒抗氧化能力比原株 M8 有明显增强。

表 6 转化子 Y2 与原株 M8 抗氧化性能比较
Table 6 Comparison of antioxidant abilities between transformants Y2 and M8

Strains	SO ₂ production/(mg/L)	TBA value	DPPH radical scavenging ratio/%
M8	18.39	39.6	58.1
Y2	32.07	33.73	80.27

3 讨论

在酵母硫代谢过程中,亚硫酸盐转运蛋白编码基因 *SSU1* 调节酵母体内亚硫酸盐的分泌,当酵母细胞内亚硫酸盐积累量增大时,过量的亚硫酸盐可以通过 Ssu1p 运输到胞外,减少其对酵母细胞的毒害作用^[4]。因此,多拷贝表达 *SSU1* 基因,可增加胞内二氧化硫的输出量,提高培养液中二氧化硫含量,从而达到提高啤酒抗氧化能力的目的。

本研究中,通过 PCR 扩增得到分别带有 782 bp 和 542 bp 不同长度 5 端非编码区的 *SSU1-1*、*SSU1-2* 基因片段,构建表达载体 pSU1 和 pSU2,转化实验室酵母 YS58,筛选所得转化子中 pSU1-4、pSU2-3 的 SO₂ 生成量比原株 YS58 分别提高了 40.2%和 48.3%。将 pSU2 转化工业啤酒酵母 M8,采用亚硫酸盐抗性平板筛选转化子,测得转化子 Y2 的 SO₂ 生成量比原株 M8 提高 74.4%,TBA 值下降 14.9%,DPPH 自由基清除率提高 38.2%,而硫化氢生成量相差不大,表明转化子 Y2 啤酒抗氧化能力比原株 M8 有明显增强。

实验表明,多拷贝表达 *SSU1* 基因可有效增加二氧化硫产量,而硫化氢生成量基本不变,不会影响含硫氨基酸的正常代谢。再者 pSU1 和 pSU2 上的 *SSU1* 基因在实验室酵母 YS58 中的表达水平相当,表明 *SSU1-1* 中 5 端非编码区较 *SSU1-2* 长出的 240 bp DNA 序列对 *SSU1* 基因的表达没有明显的促进作用。已有报道称 *SSU1* 基因的转录是通过转录激活因子 Fzf1p 与其启动子区域相结合而被激活,距离 *SSU1* 结构基因上游约 540 bp 处的特定转录元件可以有效结合 Fzf1p,从而促进 *SSU1* 转录^[13]。此外,采用啤酒酵母自身的亚硫酸盐抗性作为显性筛选标记筛选工业啤酒酵母转化子,在有效避免转化子筛选中假阳性出现的同时,也保证了食品安全性^[11]。

为了更好的满足啤酒发酵工业需要,将 *SSU1* 基因整合于啤酒酵母染色体上,构建亚硫酸盐分泌量提

高的啤酒酵母工程菌株,以解决转化子的遗传稳定性问题。相关研究正在进行中。

参 考 文 献

- [1] Robbins TL, Boillat B. Control of odors in the brewing and food processing industries. *Master Brewers Association of the Americas*, 2002(39): 29–31.
- [2] 曲娜, 何秀萍, 郭雪娜, 等. 高 SO₂ 产量啤酒酵母工业菌株的构建. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 2006, 46(1): 38–42.
- [3] 刘波. 工业酿酒酵母菌株 *MET10* 基因敲除及其用于工业生产可行性的研究. 山东大学硕士论文, 2005.
- [4] Park H, Bakalinsky. *SSU1* mediates sulphite efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 2000 (16): 881–888.
- [5] Sambrook J, Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.
- [6] 丁书美, 陈叶福, 肖冬光. 啤酒中硫化氢测定方法的研究. *酿酒(Liquor-Making)*, 2006, 33(6): 94–95.
- [7] 丁书美. 啤酒发酵过程中 H₂S 的测定与低产 H₂S 菌株的选育. 天津科技大学硕士论文, 2007.
- [8] 付兆辉, 李崎, 顾国贤. 啤酒老化的预测——TBA 值测定方法的探讨. *食品与发酵工业(Food and Fermentation Industries)*, 2004(03): 97–101.
- [9] 严敏, 李崎, 顾国贤. 利用 DPPH 自由基清除率评价啤酒内源性抗氧化能力. *食品工业科技(Science and Technology of Food Industry)*, 2005(8): 82–83.
- [10] Gjermansen C, Sigsgaard P. Construction of a hybrid brewing strain of *Saccharomyces carlsbergensis* by mating of meiotic segregants. *Carlsberg Res Commun*, 1981(46): 1–11.
- [11] Park H, Lopez NI, Bakalinsky. Use of sulfite resistance in *Saccharomyces cerevisiae* as a dominant selectable marker. *Curr Genet*, 1999(36): 339–344.
- [12] 陈叶福, 王艳, 丁书美, 等. 低产硫化氢啤酒酵母菌株的选育. *酿酒科技(Liquor-Making Science & Technology)*, 2007, 7: 23–25.
- [13] Breitwieser W, Price C, Schuster T. Identification of a gene encoding a novel zinc finger protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 1993(9): 551–556.

Effect of *SSU1* multi-copy expression on *Saccharomyces cerevisiae* sulphite production

Yefu Chen, Shichao Shen, Yan Wang, Dongguang Xiao*

(Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: [Objective] Sulfite, an intermediate metabolite in yeast sulfur-containing amino acid biosynthesis pathway, plays an important role in beer flavor stabilizing because of its antioxidant activity. In *Saccharomyces cerevisiae*, excretion of sulfite is regulated by sulfite transporter protein Ssu1p which is encoded by *SSU1*. We constructed a high sulfite excreting brewing yeast strain to solve the beer staling problem by *SSU1* gene over-expressing. [Methods] Sulfite transporter gene *SSU1-1* and *SSU1-2* that contain different length of 5 untranslated region were cloned by PCR, with the genomic DNA of an industrial mutant strain M8 as template. The amplified DNA was digested with *Bam*H^I and *Sal*I, and then inserted into plasmid YEp352 digested by *Bam*H^I-*Sal*I and constructed the expression vector pSU1 and pSU2. pSU1 and pSU2 were transformed into laboratory strain YS58 and tested the effect of *SSU1* multi-copy expression on *Saccharomyces cerevisiae* sulfite production. Furthermore, pSU2 was transformed into industrial brewing yeast mutant strain M8, and SO₂, H₂S production and beer antioxidant abilities of transformant Y2, screened out by sulfite resistance plate, were tested. [Result] The SO₂ production of laboratory yeast transformants pSU1-4 and pSU2-3 enhanced remarkably, but H₂S production remained unchanged. Compared with the *S. cerevisiae* M8, SO₂ production of transformant Y2 increased by 74.4%, TBA value decreased by 14.9%, DPPH radical scavenging ratio enhanced by 38.2%, but H₂S production had little change. [Conclusion] Over-expression of *SSU1* in both laboratory *S. cerevisiae* strain and industrial brewing yeast strain increased their sulphite excretion, enhanced beer antioxidant abilities and had no negative effect on sulfur-containing amino acids biosynthesis.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*; sulfur metabolism; *SSU1*; sulphite

Supported by the Tianjin Natural Science Foundation (05YFJMJC03000)

*Corresponding author. Tel: +86-22-60601067; Fax: +86-22-60602298; E-mail: xdg@tust.edu.cn

Received: 16 April 2008/ Revised: 28 August 2008

《微生物学报》真诚欢迎刊登广告

《微生物学报》(月刊)创刊于 1953 年,由中国微生物学会和中国科学院微生物研究所主办,是我国微生物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。曾多次被评为优秀科技期刊。

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,免疫学以及与微生物学有关的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。

本刊提供广告服务,分为彩色图版、黑白图版及彩样装订 3 种形式,刊登与微生物学相关的试剂、仪器、设备及生物技术等方面的产品信息,为您开拓在微生物学领域新的发展空间。本刊态度严谨,信守协议,已与众多生物技术公司建立了长期的合作关系。

需刊登广告的客户,可以能过电话、E-mail 与我们联系获取具体版位及报价,双方经协商确定版位后将签署正式的广告刊登合同。欲了解更多信息,欢迎登录本刊网站 <http://journals.im.ac.cn>, 进入《微生物学报》查看广告服务专区。

联系人: 武文、王闵; 电话: 010-64807336, 010-64807521; 传真: 010-64807327; E-mail: gg@im.ac.cn