

文章编号:1009-038X(2003)03-0053-04

羧酸还原异构酶基因在啤酒工业酵母中的整合表达

李艳¹, 张博润², 王正祥¹, 诸葛健¹

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214036; 2. 中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘要:采用 PCR 技术扩增啤酒工业酵母 QY 中的羧酸还原异构酶基因 ILV5, 构建了整合载体 YIp-5C, 整合转化 QY, 通过铜抗性筛选转化子, 所得的转化子的羧酸还原异构酶的活力明显高于对照菌株 QY, 转化子产生的双乙酰的量比原始菌株降低了 40%。

关键词:啤酒工业酵母; ILV5 基因; 羧酸还原异构酶; 双乙酰

中图分类号: Q 78

文献标识码: A

Study on the Integrative Expression of ILV5 Gene in Brewer's Yeast

LI Yan¹, ZHANG Bo-run², WANG Zheng-xiang¹, ZHUGE Jian¹

(1. School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: The ILV5 gene encoded reductoisomerase was amplified by Polymerase Chain Reaction from brewer's yeast QY. The 2.6 kb amplified product, 0.43 kb CUP1 fragment and 0.9 kb MTI fragment were inserted into YIp5 to form recombinant plasmid YIp-5C. Stable brewer's yeast transformants were obtained by integration of YIp-5C into chromosome. In beer fermentation, the transformant showed a 40% reduction in diacetyl formation compared to that of the control yeast QY.

Key words: brewer's yeast; ILV5 gene; reductoisomerase; diacetyl

α -乙酰乳酸是啤酒发酵中酵母细胞体内缬氨酸生物合成的中间产物,也是使啤酒产生异味(馊酸味)的双乙酰的前体物。酵母在形成缬氨酸的过程中会产生过量的 α -乙酰乳酸,这是由于催化 α -乙酰乳酸的一个碳原子转移到邻位碳原子还原成二羟基异戊酸的乙酰羧酸还原异构酶(RI)的效率非常低,使得双乙酰前体物质积累,而双乙酰是影响啤酒口味及熟化期长短的关键(阈值 ≤ 0.1 mg/L)。Villanueva等报道了ILV5在啤酒工业酵母中的表达,转化子中双乙酰的产生比亲株降低70%左右^[1,2]国内尚未见到这方面研究的报道。作者报道

了ILV5在啤酒工业酵母中整合表达的研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种和质粒 实验用菌株和质粒见表1。

1.1.2 培养基和工具酶 LB培养基按常规配制^[3]使用前根据需要加入100 μ g/mL Amp或50 μ g/mL Tet。酵母菌及酵母转化子用YEPD培养基^[4]配制。实验所用的限制性内切酶、T₄ DNA连接酶、Pfu、Alkaline Phosphatase均购自上海华美公司。Southern杂交试剂盒DIG DNA Labeling and Detection

收稿日期:2002-08-12; 修回日期:2002-12-06。

作者简介:李艳(1973-),女,江苏徐州人,发酵工程博士研究生。

万方数据

Kit 购自 BM 公司。

表 1 菌种与质粒

Tab.1 Strains and plasmids

菌种和质粒	基因型	来源
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44 ΔlacU169 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	作者所在实验室提供
QY	野生型	作者所在实验室提供
YIp5	<i>Amp^RTet^RURA3</i>	作者所在实验室提供
pCM1-1	<i>Amp^RLEU2CUP1-MT1</i>	Winge 教授提供
pMTI	<i>Amp^RURA3</i>	作者所在实验室提供
YIp-5C	<i>Amp^RTet^RURA3 CUP1-MT1 ILV5</i>	来自本研究

1.2 方法

1.2.1 转化 *E. coli* 和啤酒工业酵母方法 转化 *E. coli* DH5 α 用 CaCl₂ 法,转化啤酒工业酵母采用醋酸锂完整细胞转化法^[4]。

1.2.2 啤酒工业酵母 QY 总 DNA 的提取方法 见文献[4]。

1.2.3 引物合成与 PCR 扩增 根据文献[5]报道的 ILV5 DNA 的序列设计 PCR 反应的引物。

5'端引物:

5'-GCAGGATCC TGGCTAAGAACGTTGTAAG-3'

↑

*Bam*HI

3'端引物:

5'-CAGGTCGACCTCAATATGGCTCAGTCAG-3'

↑

*Sal*I

PCR 扩增以啤酒工业酵母总 DNA 为模板,50 μ L PCR 反应混合液中含 10 倍缓冲液 5 μ L,dNTP(2 mmol/L)20 μ L,12.5 μ mol/L 引物各 2 μ L,模板 2 μ L,pfu 酶 2 μ L,用无菌水调整至 50 μ L,94 $^{\circ}$ C 变性 5 min,加入 pfu 酶,循环参数 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s,52 $^{\circ}$ C 退火 2 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min,共 30 个循环,72 $^{\circ}$ C 保温 15 min 使产物延伸完全。

1.2.4 羟酸还原异构酶(RI)的测定 收获对数生长期的酵母细胞,用 0.05 mol/L Tris-HCl(pH 7.5)缓冲液洗涤 2 次,冰浴 10 min 后超声波破碎,离心收集上清液为粗酶液。酶活的测定方法见文献[6]。蛋

白质含量用考马斯蓝染色法测定,以牛血清白蛋白作为测定参照标准^[7]。酶活定义为:一个羟酸还原异构酶单位相当于在规定条件下每小时氧化 1 μ mol 的 NADPH 时所需的酶量。底物的制备:用 9.62 mL 0.3 mol/L NaOH 水解 0.38 mL α -acetolactate ethyl ester(Aldrich),水解过程中持续震荡 5 min。

1.2.5 Southern blotting 操作方法 按 DIG DNA Labeling and Detection Kit 中的有关说明进行。

1.2.6 双乙酰含量测定 见文献[8]。

2 实验结果

2.1 重组质粒 YIp-5C 的构建

在酵母转化实验中,最常用的选择标记是某种特定的营养缺陷型,但大多数生产用啤酒酵母的染色体具有多倍性,很难获得营养缺陷型突变株,并且在啤酒生产中采用营养缺陷型酵母菌株很可能会影响酵母的发酵性能和啤酒风味,因而依靠营养缺陷型互补来筛选生产用啤酒酵母转化子是不可行的。这就需要导入的 DNA 带有可选择的显性遗传标记。可用于酵母转化实验的显性遗传标记很多,其中最为常见的是来源于细菌的 G418 抗性基因,但 G418 价格昂贵。酵母对铜产生抗性是由 CUP1-MTI 基因调控的,此基因来源于酵母,在野生和实验室酵母中都存在。一般而言,所有的酿造用酵母都对铜敏感,所以作者以铜抗性为显性选择标记构建整合型质粒,尽量避免引入其它非酵母基因,且筛选所用试剂 CuSO₄ 较便宜。

整合型穿梭质粒 YIp5 经 *Bam*HI 酶切和碱性磷酸酶处理后,用 T₄DNA 连接酶将 PCR 扩增产物 2.6 kb 大小的 ILV5 基因片段以及来源于质粒 pCM1-1 的 0.43 kb CUP1 启动子片段和来源于质粒 pMTI 的 0.9 kb MTI 片段一起连接到 YIp5 的 *Bam*HI 酶切位点上(见图 1),转化 DH5 α ,将转化子分别转移至含有四环素和氨苄青霉素的平板上培养,挑取 Amp^r、Tet^s 菌落提取质粒,进行酶切分析可知 3 条 DNA 片段以两种方向插入到 YIp5 质粒中。ILV5 基因和铜抗性基因使用的均是自身的启动子,因而无论以那个方向插入到 YIp5 质粒中,两个基因都能正确表达。选用如图 1 所示的插入方向做进一步研究,命名为 YIp-5C,酶切分析见图 2,与预期结果一致。此质粒的构建解决了转化生产用啤酒酵母后的筛选问题,它带有来源于 pCM1-1 和 pMTI 的铜抗性基因(CUP1-MT1),因此可以依据酵母对铜抗性的提高有效地筛选酵母转化子。

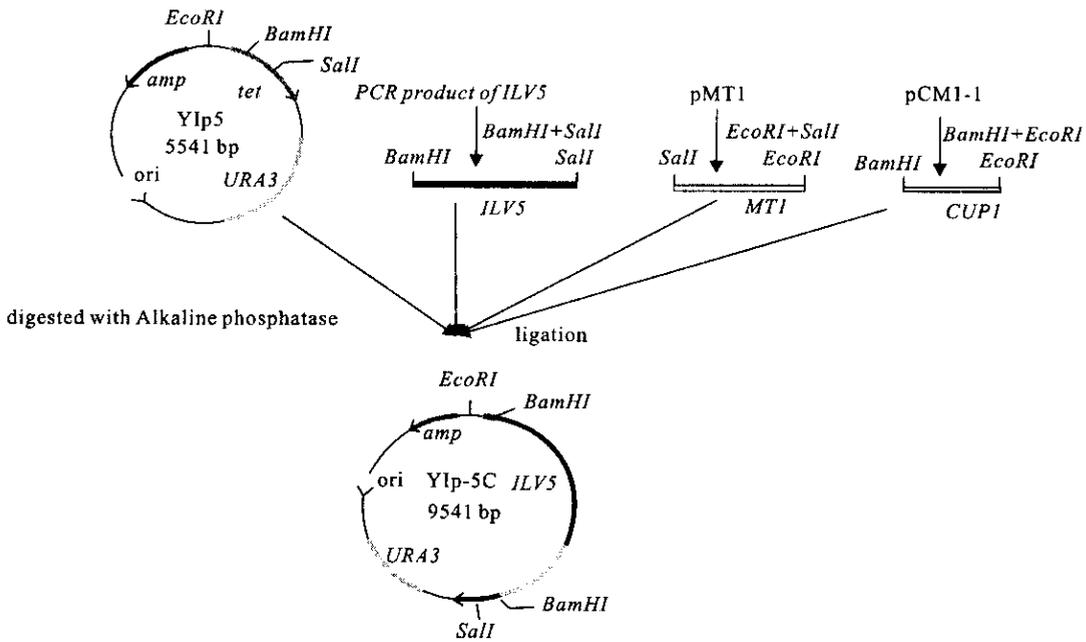
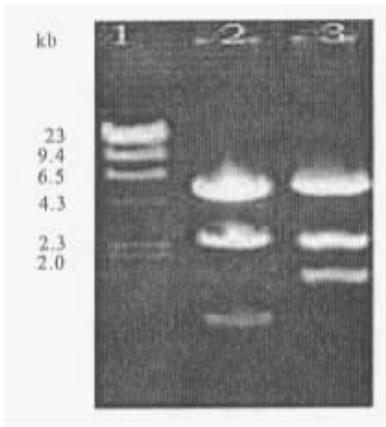


图 1 重组质粒 YIp-5C 的构建

Fig.1 The construction of the recombinant plasmid YIp-5C



1. λ DNA/*Hind* III 相对分子质量标准; 2. YIp-5C/*Bam*HI; 3. YIp-5C/*Eco*RI

图 2 重组质粒 YIp-5C 酶切分析

Fig.2 Restriction endonuclease digestion of the recombinant plasmid YIp-5C

2.2 啤酒工业酵母转化子 RI 酶活的测定

用 *Nco*I 酶切重组质粒 YIp-5C, 使其在 URA3 基因内部线性化, 然后转化 QY, 由于 QY 最高能在含有 4 mmol/L CuSO_4 的 YEPD 固体培养基平板上生长, 因此选用含有 5 mmol/L CuSO_4 的 YEPD 固体培养基筛选转化子。从所得转化子中挑选 3 个转化子测定 RI 酶活力, 从表 2 可知, 转化子的 RI 酶活明显高于受体菌 QY, 选 YI-51 做进一步的研究。

2.3 啤酒工业酵母转化子 Southern Blotting 分析

用 *Eco*RI/*Bam*HI 酶切 YIp5 质粒, 低熔点胶回收

2.3 kb 的片段制备成探针。提取转化子和受体菌的总 DNA 染色体, 经 *Nco*I 酶切后, 分别与探针进行 Southern 杂交。该探针的 DNA 片段均来源于细菌, 与酵母染色体没有同源性, 只有当 YIp-5C 整合到酵母染色体上才会有杂交信号, 实验结果见图 3。探针与转化子的经 *Nco*I 酶切的染色体杂交后有阳性杂交带, 位置在 9.4 kb 左右, 而与受体菌 QY 染色体杂交没有出现阳性杂交带, 与预期结果一样, 说明在转化子中 YIp-5C 成功地整合在酵母染色体的 URA3 基因位点上。

表 2 啤酒工业酵母转化子 RI 酶活性

Tab.2 RI activity of transformants

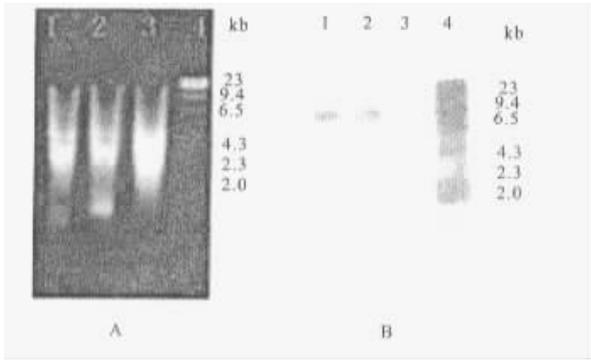
酵母菌	RI 酶活/($\mu\text{mol}/(\text{h} \cdot \text{mg})$)
QY	1.01
YI-51	2.13
YI-52	2.05
YI-53	1.77

2.4 啤酒工业酵母转化子的稳定性测试

由于工业化生产中不易建立选择压力, 因而啤酒工业酵母转化子在非选择培养条件下的保持情况, 对其在工业生产中的进一步应用是十分必要的。将啤酒工业酵母转化子在无选择压力的完全培养基 (YEPD) 中连续培养 10 d, 每隔 1 d 取样检测转化子的铜抗性表型, 结果见图 4。

从图中可以发现, 转接 10 d 后转化子的铜抗性

的表型几乎 100% 存在 ,这说明质粒整合在酵母的染色体上能够较为稳定地存在 ,为酵母基因工程菌在啤酒工业中的运用提供了基础.



A. 总 DNA 被 *Nco*I 酶切后的琼脂糖凝胶电泳 ;B :Southern blot 杂交

1. 转化子 YI-51 ;2. 转化子 YI-52 ;3. 啤酒酵母 ;
4. λ DNA/*Hind*III 标记

图 3 ILV5 基因整合的 Southern blot 杂交验证

Fig.3 The Southern blotting hybridization of *ILV5* gene integration

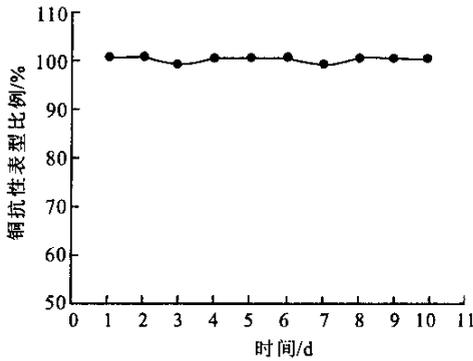


图 4 啤酒工业酵母转化子的稳定性

Fig.4 Stability of integrative transformant of brewer's yeast QY in absence of selective pressure

2.5 啤酒发酵液中双乙酰质量浓度的变化曲线

选用 YI-51 进行啤酒发酵 ,测定发酵液中双乙酰含量的变化 ,结果见图 5.可以看到在整个发酵过程中 ,YI-51 产生双乙酰的量比较低 ,其双乙酰峰值

比原始菌株 QY 降低了 50% ,嫩啤酒的双乙酰含量比 QY 降低了 40% .

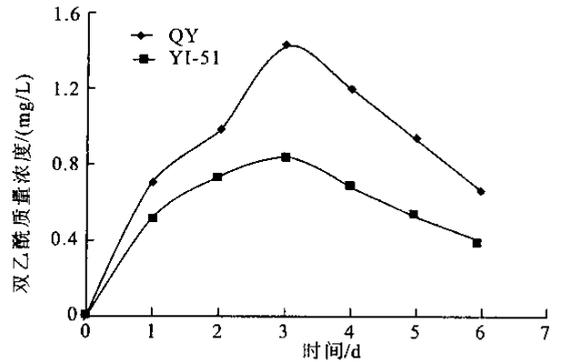


图 5 啤酒发酵过程中双乙酰含量变化曲线

Fig.5 Fig.5 Diacetyl production of integrative transformant YI-51 and control strain QY during fermentation

3 讨论

从上述结果可以看出 ,通过基因重组手段将 *ILV5* 基因整合在啤酒工业酵母的染色体上 ,增加 *ILV5* 基因的拷贝数 ,能有效地降低啤酒发酵过程中双乙酰的产生 ,但可能是整合到酵母染色体上的拷贝数太少 ,没能达到 Villanueba 等报道的效果^[1] ,以后的研究应考虑 *ILV5* 基因多拷贝串联整合表达或将 *ILV5* 基因置于强组成型启动子后加强表达 .近年来国内外已有研究者将来源于细菌的 α -乙酰乳酸脱羧酶 ALDC 的基因引入啤酒酵母中 ,构建得到 ALDC 酶活高、能快速将 α -乙酰乳酸转化成乙偶姻 ,从而降低双乙酰产生的啤酒酵母工程菌 ,在发酵实验中双乙酰产生量可以比亲株降低 50% ~ 66%^[9~11] .但啤酒是一种广泛饮用的饮料 ,用带有来源于细菌的 ALDC 基因的工程菌生产的啤酒是否安全 ,是否适于饮用 ,是否能被消费者接受还需要很长时间的实践证明 .作者尝试利用来源于酵母自身的 DNA 对啤酒酵母进行基因修饰改良 ,从食用安全性的角度出发 ,希望能促进啤酒酵母工程菌在工业化生产中早日得到应用 .

参考文献 :

[1] Villanueba K D , Goossens E , Masschelein C A . Subthreshold vicinal diketone levels in lager brewing yeast fermentations by means of *ILV5* gene amplification[J] . *J Am Soc Brew Chem* , 1990 , 48 : 111 - 114 .
 [2] Suzanne M Mithieux , Anthony S Weiss . Tandem integration of multiple *ILV5* copies and elevated transcription in polyploid yeasts[J] . *Yeast* , 1995 , 11 : 311 - 316 .
 [3] Smveook J , Fritsch E F , Maniatis T . *Molecular Cloning : A Laboratory Manual* [M] . New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989 .

FEMS Microbiol Reviews , 1999 , 23 :411 – 459.

- [9] Rober H , Thomas A L , Helmut K , *et al.* *Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up 90 °C [J]. **Arch Microbiol** , 1986 , 144 :324 – 333.
- [10] Christoph W , Wolfgang L . Two extremely thermostable xylanases of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* MSB [J]. **Appl Environ Microbiol** , 1995 , 61 :1810 – 1815.
- [11] Lever M . A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates [J]. **Anal Biochem** , 1972 , 47 :273.
- [12] Sambrook J , Frisch E F , Maniatis T . *Molecular Cloning : A Laboratory Manual* [M]. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989.

(责任编辑 : 李春丽)

(上接第 56 页)

- [4] Alison Adams , Daniel E Gottschling , Chris A Kaiser , *et al.* *Methods in yeast Genetics : A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual* [M]. London : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1998.
- [5] Jens G Litske Petersen , Steen Holmberg . The *ILV5* gene of *Saccharomyces cerevisiae* is highly expressed [J]. **Nucleic Acids Research** , 1985 , 13 :4011 – 4027.
- [6] Villa K D , Lee S . Control of vicinal diketone production by brewer 's yeast . I . Effects of *ILV5* and *ILV3* gene amplification on vicinal diketone production and *ILV* enzyme activity [J]. **J AM Soc Brew Chem** , 1995 , 53 (2) :49 – 53.
- [7] 李建武 , 余瑞元 . *生物化学实验原理和方法* [M]. 北京 : 北京大学出版社 , 1996.
- [8] 张学群 , 张柏青 . *啤酒工业控制指标及检测手册* [M]. 北京 : 中国轻工业出版社 , 1994.
- [9] Yamano S , Tanaka J , Inoue T , *et al.* Cloning and expression of the gene encoding alpha-acetolactate decarboxylase from *Acetobacter aceti* sp. *xylinum* in brewer 's yeast [J]. **J Biotechnol** , 1994 , 33 (2) :165 – 171.
- [10] Yamano S , Kondo K , Tanaka J , *et al.* Construction of a brewer 's yeast having alpha-acetolactate decarboxylase gene from *Acetobacter aceti* sp. *xylinum* integrated in the genome [J]. **J Biotechnol** , 1994 , 33 (2) :173 – 178.
- [11] 郭文洁 , 何秀萍 , 铁翠娟 , 等 . 枯草芽孢杆菌 α -乙酰乳酸脱羧酶基因在啤酒酵母工业菌株中的表达 [J]. *微生物学报* , 2001 , 41 (1) :105 – 108.

(责任编辑 : 李春丽)