



## 过量表达鲁氏酵母耐盐基因 *GPD1* 对酿酒酵母的影响

侯丽华, 于雁飞, 王川, 王春玲

(食品营养与安全教育部重点实验室, 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

**摘要:** *GPD1* 是 3-磷酸甘油脱氢酶的编码基因, 在酵母的耐盐通路中发挥着重要的作用. 为了探讨耐盐酵母家族成员鲁氏酵母的 *GPD1* 对酿酒酵母的影响, 本文利用分子生物学方法构建了质粒 YEplac195-*GPD1*, 并将其转入到酿酒酵母菌株 W303 中, 得到工程菌株 WYS. 研究发现在菌株 WYS 中过量表达鲁氏酵母的 *GPD1*, 其耐盐性、抗性及其甘油产量均明显高于对照菌株 WY, 特别是在含盐量为 18% 的情况下菌株 WYS 甘油产量提高了 14.35%. 说明 *GPD1* 的过量表达是菌株耐盐性提高的重要原因.

**关键词:** 鲁氏酵母; *GPD1*; 耐盐性; 酿酒酵母

中图分类号: Q344.13

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2012)06-0007-04

### Effect of Overexpression of Salt-tolerant Gene *GPD1* on *Saccharomyces cerevisiae*

HOU Lihua, YU Yanfei, WANG Chuan, WANG Chunling

(Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education, College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** *GPD1* encoded glycerol-3-phosphate dehydrogenase plays an important role in the salt-tolerant pathway of yeast. *Zygosaccharomyces rouxii* belongs to the salt-tolerant family. In order to analyze the effect of *ZrGPD1* (*GPD1* gene of *Zygosaccharomyces rouxii*) on the salt-tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*, plasmid YEplac195-*GPD1* was constructed and then transformed into *Saccharomyces cerevisiae* W303, forming the engineered strain WYS. The results showed the the salt tolerance, resistance and the production of glycerol in the strain WYS were improved by overexpression of *GPD1* compared with that of the control strain WY. Noticeably, the production of glycerol in the strain WYS was raised by 14.35% under the condition of 18% salt. The data suggested that overexpression of *GPD1* was the important reason for the improvement of salt tolerance.

**Key words:** *Zygosaccharomyces rouxii*; *GPD1*; salt tolerance; *Saccharomyces cerevisiae*

鲁氏酵母 (*Zygosaccharomyces rouxii*) 又称 S 酵母, 主要应用于酱油的高盐稀态发酵过程中, 用以改善酱油的风味<sup>[1-2]</sup>. S 酵母是与模式生物酿酒酵母相近的半子囊菌酵母. 鲁氏酵母可在高盐的环境中生长, 比如, 在酱油高盐稀态发酵工艺的后期盐水发酵中含盐量高达 17%, 鲁氏酵母依然能够生长及发酵<sup>[3]</sup>. 但是在此环境中包括酿酒酵母在内的大多数酵母都不能生长.

目前, 一些关于鲁氏酵母的耐盐、耐渗的基因, 如 *ZrPMA1*、*ZrSOD2*、*ZrSOD22*、*ZrGPD1*、*ZrHOG1*

和 *ZrHOG2* 等已经被克隆和测序<sup>[4-6]</sup>. 其中, *GPD1* 即 3-磷酸甘油脱氢酶 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase) 的编码基因, 其编码的酶可使磷酸二羟丙酮生成 3-磷酸甘油, 从而增加甘油含量, 在酵母耐盐的渗透调节中发挥举足轻重的作用<sup>[7]</sup>. 因此, 本文对鲁氏酵母的耐盐基因 *GPD1* 进行研究, 使其在模式酵母即酿酒酵母实验室菌株 W303 中过量表达, 研究其对酿酒酵母耐盐性、甘油产量等的影响, 为构建耐盐菌株奠定理论基础, 为阐述酵母菌株的耐盐机制提供更多的理论依据.

收稿日期: 2012-02-29; 修回日期: 2012-07-11

基金项目: 天津科技大学科学研究基金资助项目 (20110103)

作者简介: 侯丽华 (1974—), 女, 黑龙江哈尔滨人, 副教授, lhhou@tust.edu.cn.

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株、质粒和培养基

鲁氏酵母 (*Zygosaccharomyces rouxii*)、酿酒酵母 W303 (*Saccharomyces cerevisiae* W303, *MATa*, *leu2-3/112*, *ura3-1*, *trp1-1*, *his3-11/15*, *ade2-1*, *can1-100*, *GAL*, *SUC2*, *mal 0*)、多拷贝酵母 (*S. cerevisiae*) 与大肠杆菌 (*E. coli*) 的穿梭质粒 YEplac195 ( $Amp^r$ , *URA3*), 为本实验室保存。

YPD 培养基 (g/L): 酵母浸粉 10, 葡萄糖 20, 蛋白胨 20, 121 °C 灭菌 20 min. 其中, 40% 葡萄糖溶液 115 °C 灭菌 20 min 后, 加入培养基中使含量达到 2%。

CM-ura 培养基 (g/L): 无氨基酸的酵母氮源 (YNB) 6.7, 腺嘌呤 0.05, 组氨酸 0.1, 色氨酸 0.1, 亮氨酸 0.1, 精氨酸 0.02, 天冬氨酸 0.1, 谷氨酸 0.1, 异亮氨酸 0.03, 赖氨酸 0.03, 甲硫氨酸 0.02, 苯丙氨酸 0.05, 丝氨酸 0.15, 苏氨酸 0.15, 酪氨酸 0.03, 缬氨酸 0.15, 调节 pH 为 6.5, 加入 1.5% 的琼脂, 121 °C 灭菌 15 min。

#### 1.1.2 试剂与仪器

十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB), 北京鼎国生物技术有限公司; 琼脂糖, Gene Tech (上海) 有限公司; Easy *Pfu* DNA Polymerase、Easy *Pfu* 10 × buffer、Ligase 10 × Buffer、T4 DNA Ligase, 加拿大 Fermentas 生物技术公司; 2.5 mmol/L dNTPs, 北京全式金生物技术公司; *Hind* III 内切酶、10 × M Buffer、*Sph*I 内切酶、10 × H Buffer, 日本东洋坊公司; 腺嘌呤、组氨酸、色氨酸、亮氨酸等 15 种氨基酸、无氨基酸的酵母氮源 (YNB), BBI 公司。

电热恒温水浴锅, 北京市永光明医疗仪器厂; 飞鸽牌微量离心机, 上海安亭科学仪器厂; My Cycler™ PCR 仪、DYY-6C 型水平电泳仪、凝胶成像仪, 美国 Bio-Rad 公司; 紫外分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 引物设计

根据鲁氏酵母基因数据 (<http://www.genolevures.org/zyro.html>, 序号为 ZYRO0A055390g) 设计引物, *GDPI*-up: 5'-GCGCATGCGTTGTTGTTGTCATCACTC-3' (*Sph*I); *GDPI*-dn: 5'-GCAAGCTTTTGTCTTTCTAATACAC-3' (*Hind* III)。 *GPD1* 目的片段上游引物 5'端引入 *Sph*I 酶切位点 (GCATGC), 下游引物 5'端引入 *Hind* III 酶切位点 (AAGCTT)。引物由

上海生工公司合成。

#### 1.2.2 构建质粒

提取鲁氏酵母基因组, 并以其为模板, 以 *GDPI*-up 和 *GDPI*-dn 为引物作 PCR 扩增 (95 °C 模板预变性 3 min; 95 °C 模板变性, 55、58、60 °C 引物退火 1.5 min, 72 °C 引物延伸 2 min, 共 30 个循环; 最后 72 °C 再延伸 10 min)。纯化 PCR 产物, 并用 *Sph*I 和 *Hind* III 双酶切, 将酶切产物连入到同样双酶切的 YEplac195 中, 得到重组质粒 YEplac195-*GPD1*。

#### 1.2.3 耐盐性变化实验

分别取 200 mL 灭菌后含盐量为 0、9%、18% 的 YPD 培养基各 3 瓶, 其中分别接种  $10^6$  mL<sup>-1</sup> 的菌种 2 mL。将上述样品置于摇床中 180 r/min、30 °C 培养, 每隔 4 h 取样测  $A_{600}$  的值。

#### 1.2.4 抗性实验

将待测菌株接种到 YPD 液体培养基中培养 (30 °C, 12 h, 转速 < 200 r/min); 测  $A_{600}$  值, 计算细胞浓度, 取出约含  $5 \times 10^6$  个细胞的菌液加入到 1 mL 新鲜培养液中活化 2 h; 测  $A_{600}$  值, 计算细胞浓度, 取出约含  $2 \times 10^6$  个细胞的菌液, 10 000 r/min 离心 1 min, 弃上清液; 加入 20 μL 无菌水混匀, 终浓度为  $1 \times 10^6$  μL<sup>-1</sup>。取 2 μL 加入到 18 μL 无菌水中稀释 10 倍。同样方法按浓度递增顺序分别得到  $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^2$  μL<sup>-1</sup> 的菌液。每个稀释度取 3 μL 菌液滴在所需平板上, 超净台晾干后, 30 °C 倒置培养。

#### 1.2.5 甘油产量的测定

$Cu(OH)_2$  悬浊液的配制: 取 5 支试管。各注入 1 mL 0.05 g/mL 的  $CuSO_4$  溶液和 3.5 mL 0.05 g/mL 的 NaOH 溶液, 振荡, 生成  $Cu(OH)_2$  悬浊液。

甘油铜溶液的配制: 向上述  $Cu(OH)_2$  悬浊液的试管中分别注入 6‰、7‰、8‰、9‰、10‰ 的甘油标准品溶液 0.5 mL, 充分振荡, 即生成甘油铜溶液, 离心分离, 取上清液备用; 以超纯水为空白, 630 nm 为测定波长。以  $Cu(OH)_2$  为横坐标, 630 nm 下的吸光度为纵坐标绘制标准曲线。样品如上操作, 将测得的值代入公式计算即可得出甘油产量<sup>[8]</sup>。

## 2 结果与amp;讨论

### 2.1 工程菌株的构建

将构建的质粒 YEplac195-*GPD1* (见图 1) 转入大肠杆菌感受态细胞 (TOP10) 中, 提取质粒后, 用 *Sph*I 与 *Hind* III 双酶切验证, 琼脂糖凝胶电泳检测 (见图

2). 然后将质粒 YEplac195-*GPD1* 和空质粒 YEplac195 分别转入酿酒酵母实验室菌株 W303 中<sup>[9]</sup>, 得到工程菌株 WYS 和对照菌株 WY.

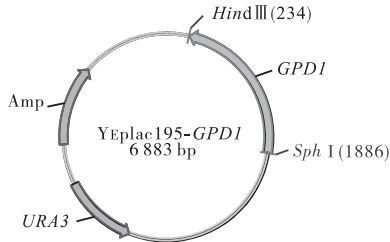


图1 质粒 YEplac195-*GPD1* 结构示意图

Fig. 1 Schematic view of the plasmid YEplac195-*GPD1*

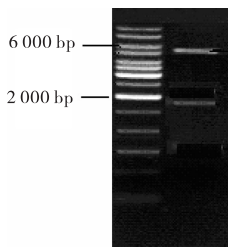


图2 重组表达质粒的 *Sph I* 和 *Hind III* 双酶切鉴定

Fig. 2 Analysis of recombinant plasmid digested by *Sph I* and *Hind III*

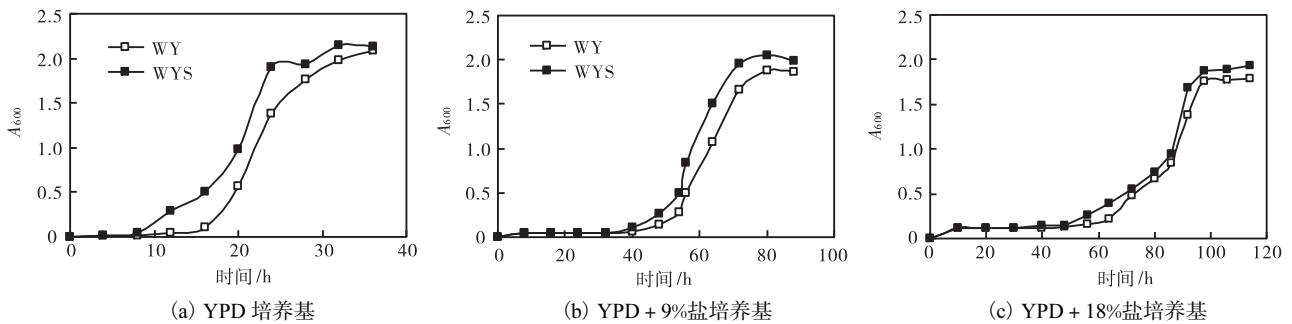


图3 菌株在不同含盐量 YPD 培养基中的生长情况

Fig. 3 Growth of engineered strains in YPD culture media with different salt concentration

### 2.3 抗性变化

分别研究菌株 WYS 和 WY 对 LiCl、盐、山梨醇、乙醇和高温的抗性, 结果如图 4 所示, 从左到右菌体的浓度依此为  $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^2 \mu\text{L}^{-1}$ .

由图 4 可见, 在 LiCl、NaCl、乙醇不同程度刺激而产生的渗透压力下<sup>[2]</sup>, WYS 生长趋势明显优于 WY, 表现出了较好的耐性; 对比图 4(a) 和图 4(e) 发现, (a) 组菌落比 (e) 组菌落大而圆, 这说明随着盐的加入, 导致了细胞内水分的外流, 细胞发生了质壁分离现象. 而 1 mol/L 的山梨醇浓度对于该系列菌株来说并无太大影响. 42 °C 培养对两株菌株的影响基本相同, 只有最高浓度才能生长, 但是 WYS 的生长优

### 2.2 耐盐性变化

对工程菌株 WYS 和对照菌株 WY 在含盐量为 0、9%、18% 的 YPD 培养基中的生长情况进行研究, 实验结果如图 3 所示.

因为在一定浓度下, 酵母细胞在 600 nm 下的吸光度与细胞个数有对应关系, 所以本文中通过测定不同菌株在 600 nm 波长下的吸光度来反映菌株的生长状况. 由图 3 可知, 随着盐的加入, 菌株 WYS 和对照菌株 WY 到达对数期的时间变长. 这说明盐的加入, 使得细胞内外渗透压发生变化, 从而影响细胞增殖, 导致到达对数期的时间延长且延缓对数期细胞的增殖. 但是, 在每个含盐量下, WYS 与对照菌株 WY 相比, 对细胞的抗渗透压耐盐作用仍旧可以明显表现出来.

由上述分析可知, 重组后的质粒 YEplac195-*GPD1* 明显比空质粒 YEplac195 促进了酵母细胞的生长, 不仅表现在对数生长期的提前, 而且平稳期的细胞数量也有所增加, 这说明基因 *GPD1* 对于酵母细胞耐盐性的重要作用.

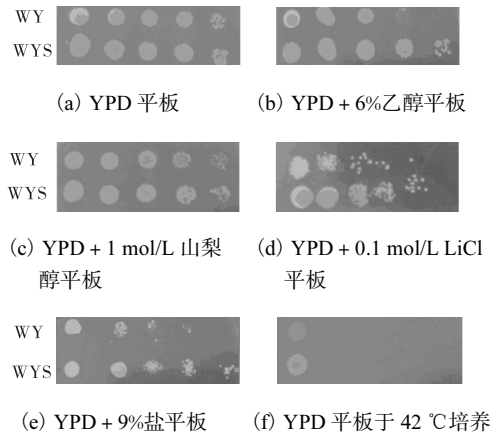


图4 工程菌株的抗性比较

Fig. 4 Tolerance comparison of engineered strains

于 WY, 表明过量表达 *GPD1* 对细胞耐受热具有明显的作用。

## 2.4 甘油产量变化

按照 1.2.5 方法得到标准曲线  $y = 0.0443x + 0.0013$ ,  $R^2 = 0.9996$ . 将工程菌株 WYS 和 WY 分别培养在含盐量为 0、9%、18% 的 YPD 培养基中, 30 °C 培养. 当培养至对数后期, 测定细胞内外甘油产量, 如图 5 所示。

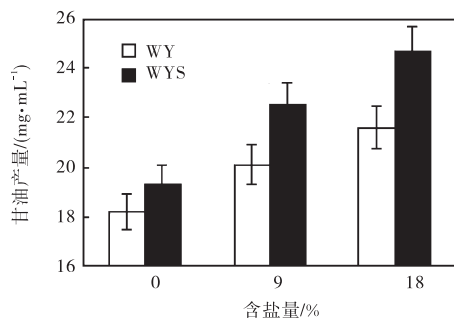


图 5 甘油产量变化

Fig. 5 Changes of glycerol content

由图 5 可知, 随着含盐量的增加, WYS 和 WY 菌株的甘油产量都依次增加, 但增加的程度并不一致, 这表明它们对环境的应答并不完全一样. 对于同一菌株, 随着含盐量的增加, 其甘油产量也随之增加; 对于同一个含盐量, WYS 菌株的甘油产量高于 WY, 结合图 4(e) 结果, 这说明 WYS 中过量表达 *GPD1* 使其更能适应外界渗透压的变化。

## 3 结 语

基因 *GPD1* 只是耐盐通路中的一个小分支, 要进一步阐明酵母菌株的耐盐机制, 将需要研究此通路中的其他关键基因, 如 *FPS1* (编码甘油由胞内向胞外渗透的通道蛋白)、*PMAI* (编码质膜  $H^+$ -ATPase)、*PDC1* (编码丙酮酸脱羧酶)、*ALD6* (编码胞质乙醛脱氢酶) 等. 还需建立起一个立足点较多的基因功能网络, 结合酵母的代谢网络, 对酱油添加酵母的耐盐机制进行研究. 此外, 在本研究中只是对过量表达鲁氏酵母耐盐基因 *GPD1* 对酿酒酵母 W303 的影响进行了分析, 并没有研究自身过表达 *GPD1* 对耐盐家族成员鲁氏酵母的影响. 因此在后续的研究中可以利用质粒 pZEU<sup>[10]</sup> 在鲁氏酵母  $\Delta ura3$  缺陷型菌株中过量表达耐盐基因 *GPD1*.

## 参考文献:

- [1] Murooka Y, Yamshita M. Traditional healthful fermented products of Japan[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2008, 35(8): 791-798.
- [2] Pribylova L, Montigny J, Sychrova H. Osmoresistant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*: The two most studied wild-type strains (ATCC 2623 and ATCC 42981) differ in osmotolerance and glycerol metabolism[J]. Yeast, 2007, 24(3): 171-180.
- [3] Sluis C, Tramper J, Wijffels R H. Enhancing and accelerating flavour formation by salt-tolerant yeasts in Japanese soy-sauce processes[J]. Trends in Food Science & Technology, 2001, 12(9): 322-327.
- [4] Pribylova L, Papouskova K, Sychrova H. The salt tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* possesses two plasma-membrane  $Na^+/H^+$ -antiporters (*ZrNha1p* and *ZrSod2-22p*) playing different roles in cation homeostasis and cell physiology[J]. Fungal Genetics and Biology, 2008, 45(10): 1439-1447.
- [5] Iwaki T, Higashida Y, Tsuji H, et al. Characterization of a second gene (ZSOD22) of  $Na^+/H^+$  antiporter from salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* and functional expression of ZSOD2 and ZSOD22 in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Yeast, 1998, 14(13): 1167-1174.
- [6] Iwaki T, Kurono S, Yokose Y, et al. Cloning of glycerol-3-phosphate dehydrogenase genes (*ZrGPD1* and *ZrGPD2*) and glycerol dehydrogenase genes (*ZrGCY1* and *ZrGCY2*) from the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*[J]. Yeast, 2001, 18(8): 737-744.
- [7] Hohmann S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2002, 66(2): 300-372.
- [8] André L, Nilsson A, Adler L. The role of glycerol in osmotolerance of the yeast *Debaryomyces hansenii*[J]. Journal of General Microbiology, 1988, 134: 669-677.
- [9] Schiestl R H, Gietz R D. High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as carrier[J]. Current Genetics, 1989, 16(5/6): 339-346.
- [10] Pribylova L, Straub M L, Sychrova H, et al. Characterisation of *Zygosaccharomyces rouxii* centromeres and construction of first *Z. rouxii* centromeric vectors[J]. Chromosome Research, 2007, 15(4): 439-445.

责任编辑: 郎婧