

黄酒酵母 β -苯乙醇合成途径醇脱氢酶 I 的异源表达及酶学特性

杨琪琳^{1,4,5}, 刘双平^{1,2,3,4,5}, 赵禹宗^{1,4,5}, 孙海龙^{1,4,5}, 毛健^{1,2,3,4,5*}

¹ 江南大学食品学院粮食发酵与食品生物制造国家工程研究中心 江苏无锡 214122

² 江南大学(绍兴)产业技术研究院 浙江绍兴 312000

³ 国家黄酒工程技术研究中心 浙江古越龙山绍兴酒股份有限公司 浙江绍兴 312000

⁴ 江南大学江苏省生物活性制品加工工程技术研究中心 江苏无锡 214122

⁵ 江南大学江苏省食品安全与质量控制协同创新中心 江苏无锡 214122

摘要 醇脱氢酶 I (Adh1p) 是黄酒酵母艾利希途径最后合成 β -苯乙醇的一个关键酶。为探究黄酒酵母 Adh1p 的差异及酶学特性,以工业生产菌株黄酒酵母 HJ 和模式菌株酿酒酵母 S288C 的基因组为模板,设计引物 PCR 扩增醇脱氢酶编码区基因 *ADH1*, 构建 pET-28a(+) 表达质粒,转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 中, IPTG 诱导表达获得 Adh1p。通过超声破碎菌体后获取粗酶液,亲和层析纯化后获取纯酶,进而探究酶学特性。以苯乙醛为底物,酶活性测定表明:来自黄酒酵母的 Adh1p^{HJ} 纯酶的酶活 (231.51 U/g) 比来自酿酒酵母的 Adh1p^{S288C} (203.48 U/g) 高 13.79%,且 Adh1p^{HJ} 的 K_m 值 (0.524 $\mu\text{mol/L}$) 小于 Adh1p^{S288C} 的 K_m 值 (0.759 $\mu\text{mol/L}$), 表现为 Adh1p^{HJ} 与底物的亲和力更大。从 k_{cat}/K_m 值发现 Adh1p^{HJ} (0.406 L/($\mu\text{mol}\cdot\text{min}$)) 的催化效率更高。Adh1p^{HJ} 耐受 β -苯乙醇和乙醇的能力较高于 Adh1p^{S288C}。本研究结果为 Adh1p 的结构以及酶学性质分析提供方法和理论依据,同时也对 β -苯乙醇工业生产开发提供借鉴。

关键词 醇脱氢酶 I; 异源表达; 酶学性质; 黄酒; 黄酒酵母

文章编号 1009-7848(2022)06-0083-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.06.009

黄酒,作为中华民族特有的酒种,是经加曲和部分酶制剂、酵母等糖化发酵剂酿制成的发酵酒^[1]。醇、醛、酯、酸等物质丰富了黄酒酒体的醇厚性和典型性。 β -苯乙醇,作为芳香醇的一种,是黄酒酿造过程中酿酒酵母代谢产生的主要副产物之一,在黄酒中含量为 40~180 mg/L^[2-3],可赋予黄酒特有的醇香风味,其含量较高时会产生致醉性^[4]。在以黄酒为主要原料的料酒等调味品中, β -苯乙醇具有提升食物香味的作用^[5],说明 β -苯乙醇在食品工业中具有十分重要的作用。

酿酒酵母合成 β -苯乙醇是通过莽草酸途径和艾利希途径的一系列酶催化^[6]。艾利希途径中,酿酒酵母可将底物 *L*-苯丙氨酸,通过转氨酶的作用将其氨基转移形成苯丙酮酸,然后通过脱羧酶的脱羧作用形成苯乙醛,最后再由脱氢酶催化还

原成 β -苯乙醇^[7],而另一条莽草酸代谢途径中,由于反应途径复杂,存在多种抑制作用,导致 β -苯乙醇产量很低^[8]。近几年来关于 β -苯乙醇合成途径中关键基因的作用研究较多^[9-11]。福田等^[12-14]比较了清酒酵母突变菌株和亲本在 β -苯乙醇合成途径中的一系列酶的酶活变化,确定了突变菌株中引起 β -苯乙醇产量提高的关键酶,进一步研究了关键酶的相关基因,其中包括能够引起 β -苯乙醇高产的突变基因。也有研究^[15]发现黄酒酵母 HJ01 预苯酸脱水酶 PDT 的 3 个碱基突变使其表现出较高的底物亲和力、催化效率等。醇脱氢酶作为两条途径中关键酶,在同型酒精发酵过程中催化产乙醇^[16],在艾利希途径中的最后催化杂醇醛(苯乙醛)脱羧形成 β -苯乙醇^[17-18],在 β -苯乙醇合成调控过程中起到至关重要的作用^[19]。目前对于黄酒中 β -苯乙醇的合成调控机理以及合成途径中关键基因的研究较少^[20]。

醇脱氢酶是黄酒酵母的 β -苯乙醇合成调控的关键酶,探究黄酒酵母与酿酒酵母模式菌产的醇脱氢酶的差异性是必要的。本研究以工业生产

收稿日期: 2021-06-11

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目
(32072205, 31701593)

作者简介: 杨琪琳(1997—),女,博士生

通信作者: 毛健 E-mail: maojian@jiangnan.edu.cn

菌株黄酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)HJ和模式菌株酿酒酵母(*S. cerevisiae*)S288C的醇脱氢酶I(Alcohol dehydrogenase I, Adh1p)为研究对象,基于同源建模分析其三维结构的差异,通过分子生物学手段对比研究其酶学性质,以期为黄酒酵母关键酶的结构以及酶学性质分析提供方法和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株与质粒 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)S288C、黄酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)HJ、大肠杆菌(*Escherichia coli*)BL21(DE3)、质粒 pESI-T 和 pET-28a(+),均为本实验室保存。已获得不含外源抗性基因且不能发生接合型转变的黄酒酵母 HJ 单倍体菌株^[21]。

1.1.2 试剂 T4 DNA 连接酶、DNA 聚合酶、*Nde*I 内切酶、*Bam*H I 内切酶,美国 ThermoFisher Scientific 公司;DNA 凝胶电泳回收试剂盒(纯化回收 DNA 片段)、质粒小量提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;酵母膏、蛋白胨、酸洗玻璃珠,西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;氯化钠,国药集团化学试剂有限公司;苯乙醛、焦磷酸硫酸素、 β -NADH、乙醇脱氢酶、咪唑、IPTG,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;其它试剂均为分析纯生化试剂。

1.2 仪器与设备

AKTA pure 蛋白纯化系统、His Trap™ HP(1 mL)色谱柱,美国 GE 公司;三头梯度 PCR 仪,江苏舜天国际集团机械进口股份有限公司;Amicon-Ultra-15 超滤管(15 mL, 30 ku),美国 Milipore 公司;超声波破碎仪,美国 SONICS&MATERIALS 公司;凝胶成像仪,美国 Bio-Rad 公司。

1.3 方法

1.3.1 酵母基因组提取 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)S288C 和黄酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)HJ 菌株在活化后,接种至酵母浸出粉胨葡萄糖(yeast extract peptone dextrose, YPD)培养基中 28℃、180 r/min 条件下培养过夜。在 OD_{600nm} 达到 2.0~3.0 时,离心收集菌体,参照赵宏宇等^[22]用珠磨法提取酵母基因组。

1.3.2 醇脱氢酶 Adh1p 氨基酸序列与三维结构分析 使用蛋白质同源建模在线服务器 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 构建醇脱氢酶 Adh1p 的三维结构模型,获取同源建模数据。使用 DNAMAN 工具进行氨基酸序列比对分析和引物设计。使用 PyMOL 软件进行蛋白结构分析,使用 SnapGene 工具进行质粒图谱分析。

1.3.3 重组质粒构建 根据酿酒酵母 S288C 基因序列(NCBI Gene ID: 854068)和黄酒酵母 HJ 的相应醇脱氢酶基因 ADH1 编码区序列设计引物,该序列全长为 1 047 bp。上游引物序列:5'-GGGAATTCCATATGATGTCTATCCCAGAAACTCA-3';下游引物序列:5'-GGATCCTTATTAGAAAGTGTCAACAA-3'。下划线序列分别为 *Nde*I 和 *Bam*HI 的酶切位点,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

利用 *Nde*I 和 *Bam*HI 限制性内切酶对 pESI-T-S288C-ADH1 和 pESI-T-HJ-ADH1 质粒进行双酶切并回收目的基因产物。T4 连接酶将目的基因产物与 pET-28a(+)空质粒连接构建 pET-28a(+)-S288C-ADH1 和 pET-28a(+)-HJ-ADH1 重组质粒,质粒提取后做双酶切验证。将重组质粒转入大肠杆菌 BL21 (DE3)感受态细胞^[23]。选取阳性单克隆菌,在含有 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中过夜培养,将菌液送去苏州金唯智生物科技有限公司测序鉴定,扩培,于-80℃甘油管冷藏。

1.3.4 重组工程菌的诱导表达和粗酶液的获取 将保藏的阳性克隆菌,分别接种到含终质量浓度为 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中(接种量 1%),37℃ 170 r/min 振荡培养 12 h。将活化好的种子液取出,转接于 50 mL 含终质量浓度为 50 μ g/mL 卡那霉素的 TB 液体培养基中(接种量 5%),37℃ 170 r/min 振荡培养 3 h,加入诱导剂 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L,降温至 25℃诱导 12 h。

取菌液至无菌离心管中,4℃ 12 000 r/min 离心 10 min 去上清,收集沉淀菌体,用 0.2 mol/L 磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)(pH 7.5)洗涤 2 次,吹打重悬菌体,冰浴条件下超声波破碎(超声条件:400 W,工作 1 s,间隔 2 s,总破碎时间 30 min),破碎至菌液澄清透光。4℃ 12 000

r/min 离心 20 min 收集上清,即粗酶液,留样进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分析^[24]。

1.3.5 蛋白亲和层析纯化 采用 AKTA pure 仪器分离纯化目的蛋白,流速为 1 mL/min。结合缓冲液对镍柱进行平衡,上样 5 mL 的过膜粗酶液,10 倍柱体积的洗脱缓冲液进行线性洗脱,最后用结合缓冲液对镍柱再次平衡。分别收集出峰处的蛋白,用 SDS-PAGE 检测洗脱蛋白的分子质量大小和纯度。将收集的洗脱液置于超滤管中 4 ℃,4 000 r/min 离心 30 min 脱盐浓缩。蛋白含量检测采用 Bradford 法^[25]。

1.4 醇脱氢酶 Adh1p 的酶学性质分析

1.4.1 醇脱氢酶 Adh1p 酶活测定与计算 用分光光度计测定辅酶 NADH 在 340 nm 处的吸光值变化值 OD_{340nm} ^[26]。反应体系包括终浓度为 20 mmol/L $Na_2HPO_4-NaH_2PO_4$ 缓冲液(pH 7.5),0.35 mmol/L NADH,2 mmol/L 的底物和纯酶。将无酶反应体系在 37 ℃ 孵育 5 min,然后置于分光光度计中,读数稳定后立即加入纯酶,开始计数,反应 15 min,得到 OD_{340nm} ,计算公式如下:

$$U(\mu\text{mol}/\text{min}) = \frac{V \times OD_{340nm}}{t \times \epsilon \times b} \times 100$$

式中:V——反应体系体积(mL); OD_{340nm} ——吸光度差值;t——反应时间(min); ϵ ——NADH 的摩尔消光系数 $[6.22 \times 10^3 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{min})]$;b——光程(cm)。

1 个酶活力单位(U)定义为 1 min 减少 1 μmol 的辅酶 NADH 所需的酶量。比酶活(U/g)定义为每克酶所具有的酶活力单位。

1.4.2 pH 值对醇脱氢酶 Adh1p 酶活的影响及其稳定性 配制不同 pH 值的缓冲液:20 mmol/L $Na_2CO_3-NaHCO_3$ 缓冲液(pH 9.0~10.0)、20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0~9.0)、20 mmol/L Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液(pH 3.0~8.0)。为研究 pH 值对醇脱氢酶 Adh1p 酶活的影响,将底物苯乙醛置于不同 pH 值的缓冲液反应体系中,孵育 5 min 后立即加入 40 μL (蛋白浓度调整至 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的纯酶。Adh1p^{S288C} 最高的酶活力定义为 100%,其对应的 pH 值为最适反应 pH 值。为研究醇脱氢酶

Adh1p 的 pH 值稳定性,将纯酶液孵育在不同 pH 值的缓冲液中 1 h,测定相对酶活。Adh1p^{S288C} 最高的酶活力定义为 100%,其对应的 pH 值为最稳定 pH 值。绘制重组醇脱氢酶 Adh1p 的 pH-相对酶活图。

1.4.3 温度对醇脱氢酶 Adh1p 酶活的影响及其稳定性 将含有底物苯乙醛的反应体系在最适 pH 值下孵育 5 min 后,在不同温度(15,20,25,30,35,40,50,60,70 ℃)条件下测定醇脱氢酶 Adh1p 的酶活。Adh1p^{S288C} 最高的酶活力定义为 100%,其对应的温度为最适反应温度。将重组醇脱氢酶 Adh1p 酶液分别在不同的温度(20,30,35,40,50,60,70 ℃)中孵育 1 h,在最适反应 pH 值和温度条件下测定残余的相对酶活。Adh1p^{S288C} 最高的酶活力定义为 100%,其对应的温度为最稳定温度。绘制重组醇脱氢酶 Adh1p 的温度-相对酶活图^[27]。

1.4.4 醇脱氢酶 Adh1p 的动力学参数 以 0~5 mmol 的苯乙醛和乙醛为底物进行酶学动力学研究。使用 Origin 软件对所获数据进行非线性拟合回归^[28],利用双倒数作图法(Lineweaver-Burk)计算得 K_m , V_{max} 和 k_{cat}/K_m 。

1.4.5 外源添加末端产物对酶活的影响 以苯乙醛和乙醛为底物,分别在酶测体系中加入不同体积分数的乙醇(0~20%)和苯乙醇(0~300 mg/L),测定酶活。未添加末端产物乙醇和苯乙醇的 Adh1p^{S288C} 的酶活分别定义为 100%。绘制重组醇脱氢酶 Adh1p 的外源物质-相对酶活图。

1.5 数据分析处理

采用凝胶成像仪对电泳图进行分析。使用 Origin 2019 软件对数据进行统计分析,GraphPad Prism 8.0.2 进行显著性差异分析。

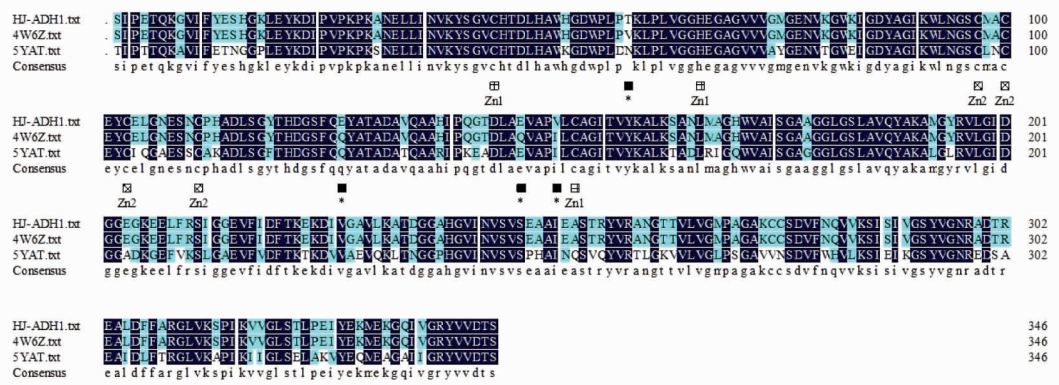
2 结果与分析

2.1 醇脱氢酶 Adh1p 的氨基酸序列与同源建模结构分析

将 *ADH1^{II}* 的氨基酸序列导入 SWISS-MODEL 在线服务器,同源建模结果发现,*ADH1^{II}* 与酿酒酵母醇脱氢酶 I (PDB:4W6Z) 的相似度达 98.85%,与巴斯德毕赤酵母(*Komagataella phaffii*) GS115 的线粒体醇脱氢酶同工酶 III(PDB:5YAT) 的相似度达 72.91%。Raj 等^[29]研究显示酵母醇脱

氢酶 I(PDB:4W6Z)是由 347 个氨基酸残基组成的具有 4 个背靠背亚基的同源四聚体。不对称单位包含 4 个不同的亚基,排列成相似的二聚体。如图 2a 所示,晶胞中含有两种由“背靠背”二聚体组成的四聚体,四聚体二聚体亚基的不对称性提供 2 个似乎与催化机制相关的结构。结构中包括 8 个锌离子,如图 1 所示,即催化锌结合残基结合的活性位点残基 (Cys-43、Cys-153、His-66 和 Glu-67),结构锌结合残基(Cys-97、Cys-100、Cys-103 和 Cys-111)。2,2,2-三氟乙醇的氧以经典的四面体与 Cys-43、Cys-153 和 His-66 配位连接到催化锌上。相反,具有开放的构象的亚基,没有结合辅酶,催化锌与 Cys-43、Cys-153、His-66 和 Glu-67 的羧酸盐具有交替的反向配位。通过调节 Glu-67 与锌的相互作用将会促进水、醇和醛的配体交

换。如图 2b 所示,棍状结构表示的 Gly-177~Gly-183 和 Val-268~Gly-Met-270 为辅酶 NAD,Asn-31~Ala-136 为酵母醇脱氢酶 I 结构 N 端,Gly-181~Ala-309 为酵母醇脱氢酶 I 结构 C 端。底物结合位点如图 2c 所示。几个大的疏水残基 Trp-55、Trp-93、Met-271 和 Tyr-295 产生 1 个空腔可容纳底物,预测可能为黄酒酵母醇脱氢酶 Adh1p^{II}的底物的结合区域。将氨基酸序列输入 DNAMAN 中进行同源序列对比发现,ADHI^{II}和 4W6Z (ADHI^{S288C})氨基酸序列在位点 58(V-T),127(Q-E),147(Q-E),151(I-V)处共有 4 个氨基酸有差异。醇脱氢酶的每个亚基都由两个结构域组成,辅酶结合结构域(又称生物有机催化结构域)和催化活性结构域(又称生物无机催化结构域),辅酶结合结构域具有 Rossmann 折叠,能通过氨基酸残基



注:*:差异氨基酸位点;Zn1:催化锌结合残基结合的活性位点残基;Zn2:结构锌结合残基结合的活性位点残基。

图 1 氨基酸序列对比图

Fig.1 Comparison of amino acid sequences

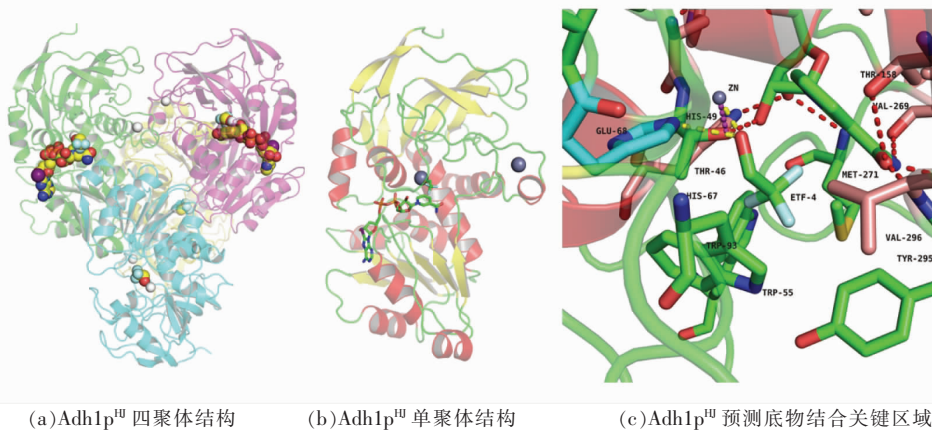


图 2 三维结构模拟图

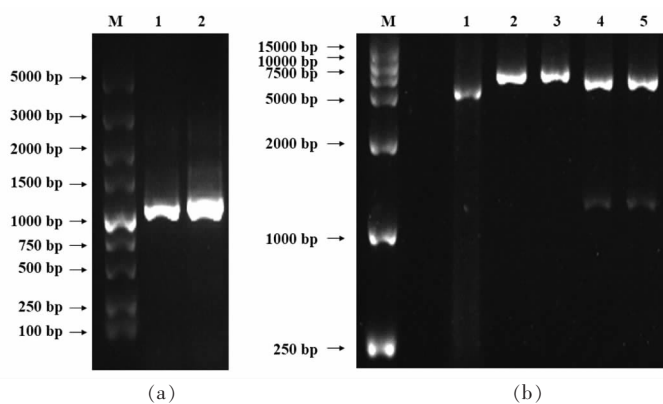
Fig.2 3D structure simulation

上的官能团与辅酶相互作用而使辅酶 (NAD⁺/NADH) 结合在醇脱氢酶上。催化活性结构域结合的催化活性 Zn²⁺能与许多底物相结合, 这两个结构域大小不等, 催化活性结构域的氨基酸数占整个肽链的 60%, 辅酶结合结构域占 40%^[30]。Mlejnek 等^[31]发现氨基酸残基序列的 143~283 为辅酶结合区域, 氨基酸残基序列的 1~142 和 284~336 为催化活性区域。结合 Zhang 等^[32]对巴斯德毕赤酵母 GS115 的线粒体醇脱氢酶同工酶 III KpADH3 (PDB:5YAT) 研究, 预测差异氨基酸可能位于催化活性区域, 这可能会导致醇脱氢酶 Adh1p 的酶学性质发生改变。

2.2 重组质粒载体的构建

以黄酒酵母 HJ 和酿酒酵母 S288C 的 cDNA 为模板, 设置引物后扩增目的基因片段, 并在该基因的 5' 端和 3' 端分别引入酶切位点 *Bam*H I 和

Nde I。经 TA 克隆后, 命名为 pESI-*ADH1*^{HJ} 和 pESI-*ADH1*^{S288C}。经菌落 PCR 筛选出阳性转化子, 电泳结果见图 3a。通过对 pESI-*ADH1*^{HJ} 和 pESI-*ADH1*^{S288C} 与 pET28a 空载质粒酶切和胶回收, 连接和转化等步骤获得重组质粒, 将其导入大肠杆菌 BL21 (DE3) 后, 此基因工程菌命名为 pET-28a (+)-*ADH1*^{HJ} 和 pET-28a (+)-*ADH1*^{S288C}。构建过程中酶切验证的电泳鉴定结果如图 3b 所示, 重组表达载体经双酶切后在 5 000 bp 和 1 000 bp 附近均出现单一条带, 其中 5 000 bp 附近为载体 pET-28a 条带, 1 000 bp 附近为目的基因条带, 经苏州金唯智生物科技有限公司测序鉴定为目的基因, 表明该重组表达载体构建成功, 符合预期。pET-28a (+)-*ADH1*^{HJ} 质粒图谱见图 4, 目的基因 *ADH1* 两段为酶切位点 *Bam*H I 和 *Nde* I, pET-28a (+)-*ADH1*^{HJ} 全长为 6 383 bp。



注: (a): M: DNA Marker; 泳道 1, 2: pESI-*ADH1*^{HJ} 和 pESI-*ADH1*^{S288C} PCR 扩增产物电泳图。(b): M: DNA Marker; 泳道 1: 空质粒 pET-28a 单酶切; 2: pET-28a-*ADH1*^{HJ} 单酶切; 3: pET-28a-*ADH1*^{S288C} 单酶切; 4: pET-28a-*ADH1*^{HJ} *Bam*H I + *Nde* I 双酶切验证; 5: pET-28a-*ADH1*^{S288C} *Bam*H I + *Nde* I 双酶切验证。

图 3 重组质粒电泳验证图

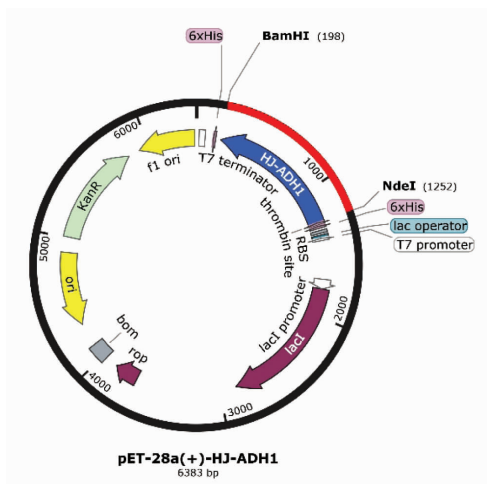
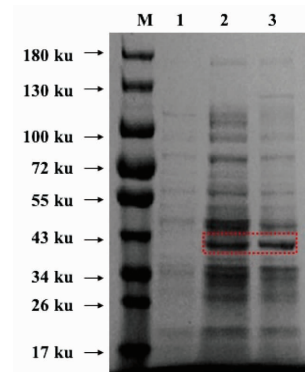
Fig.3 Electrophoretic verification map of recombinant plasmid

2.3 重组菌的诱导表达与分离纯化

重组菌株的 *ADH1* 基因编码 341 个氨基酸, 醇脱氢酶 Adh1p 的分子质量约 36.8 ku, 重组表达载体实际表达为 42.6 ku。粗酶液 SDS-PAGE 结果如图 5 所示, 在 43 ku 处有特征条带出现, 与预期设计蛋白分子质量一致, 而对照无此条带, 说明重组工程菌表达醇脱氢酶 Adh1p 成功。

预处理后通过亲和层析镍柱分离纯化目的蛋

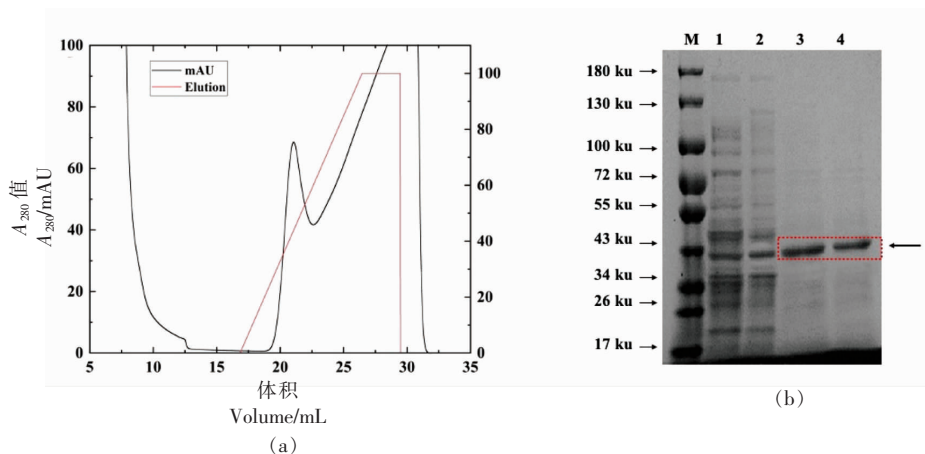
白, 得到纯化色谱峰图 6a, 记录 AKTA Pure 仪器上出峰位置所在的收集管, 结果显示线性洗脱在约 20% 处, 即 100 mmol/L 咪唑的磷酸盐缓冲液开始出现单一色谱峰, 进一步对纯化后的酶液进行超滤, 离心浓缩溶于水中, 调整蛋白浓度后 SDS-PAGE 结果显示 Adh1p^{S288C} 和 Adh1p^{HJ} 纯酶液在 42.6 ku 处有单一条带, 确认为目的条带。

图4 pET-28a(+)-ADH1^{HJ}质粒图谱Fig.4 Plasmid map of pET-28a(+)-ADH1^{HJ}

注:M:Protein Marker;泳道1:空质粒 pET-28a;泳道2: Adh1p^{HJ}粗酶液;泳道3:Adh1p^{S288C}粗酶液。

图5 粗酶液蛋白电泳图

Fig.5 Protein electrophoresis of crude enzyme solution



注:(a)纯化色谱峰图;(b)M. Protein Marker;泳道1:Adh1p^{S288C}粗酶液;泳道2:Adh1p^{HJ}粗酶液;泳道3:Adh1p^{S288C}纯酶液;泳道4:Adh1p^{HJ}纯酶液。

图6 酶液纯化过程图

Fig.6 Purification process of enzyme solution

2.4 醇脱氢酶 Adh1p 酶学性质

2.4.1 醇脱氢酶 Adh1p 的最适反应 pH 值和稳定性 试验结果表明,Adh1p 的最适反应 pH 值为 7.5,结果如图 7a 所示,在 pH 3.0~7.5 范围,酶活随着 pH 值的升高而提高,当 pH 值大于 7.5,酶活逐渐减弱。Adh1p 的最稳定 pH 值为 7.5。图 7b 表明醇脱氢酶 Adh1p 在 pH 7.5~8.0 范围孵育 1 h 后,仍剩余 80%以上的酶活,且 Adh1p^{HJ} 酶活相对略高于 Adh1p^{S288C};在 pH 3.0~5.0 的缓冲液中孵育 2 h 后,剩余酶活不足 40%,说明醇脱氢酶 Adh1p 在中性 pH 值的条件下比较稳定。

2.4.2 醇脱氢酶 Adh1p 的最适反应温度和稳定性

试验结果表明,Adh1p 的最适反应温度为 40 ℃, Adh1p^{HJ} 的酶活 (231.51 U/g) 比 Adh1p^{S288C} (203.48 U/g) 高 13.79%。结果如图 8a 所示,15~40 ℃范围,酶活随温度的升高而提高,当温度高于 40 ℃,酶活下降较快。Adh1p 的最稳定温度为 30 ℃。图 8b 表明醇脱氢酶 Adh1p 在 20~35 ℃条件下孵育 1 h 后,仍剩余 80%以上的酶活,当温度高于 35 ℃时,酶活下降迅速;当温度高于 60 ℃时,剩余酶活不足 30%。

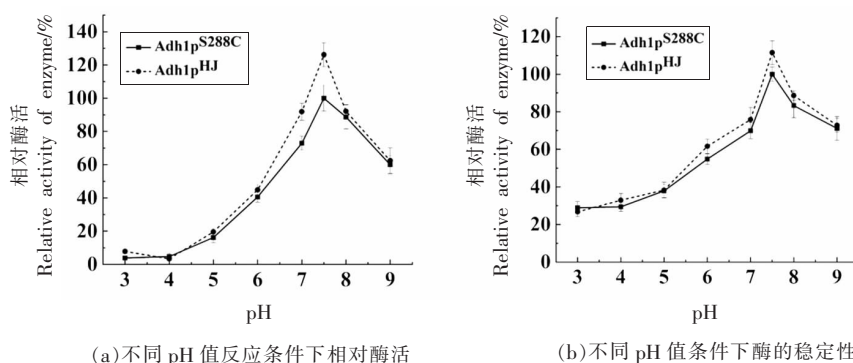


图7 醇脱氢酶的最适 pH 值和 pH 值稳定性

Fig.7 Optimum pH and pH stability of alcohol dehydrogenase

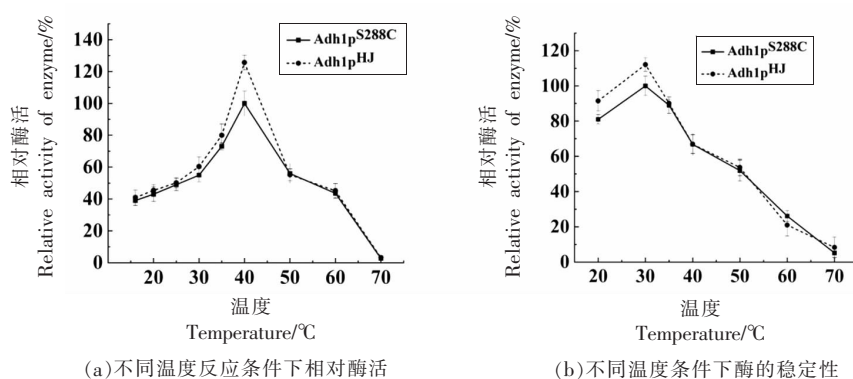


图8 不同温度下 Adh1p 酶活以及稳定性分析图

Fig.8 Activity and stability of Adh1p at different temperatures

2.5 醇脱氢酶 Adh1p 的酶学动力学分析

分别以 0~5 mmol/L 的苯乙醛和乙醛为底物,测定酶反应的初速度,以底物浓度[S]为 X 轴,速度 v 为 Y 轴进行曲线拟合,结果如图 9 所示。随着底物浓度的增加,醇脱氢酶 Adh1p 被饱和。进而对 Adh1p^{HJ} 和 Adh1p^{S288C} 的酶促动力学结果进行分析,结果如图 10 所示。根据试验数据获得米氏方程,最终获得 K_m 、 V_{max} 和 k_{cat}/K_m 值。如表 1 所示:以苯乙醛为底物时,Adh1p^{S288C} 的特征性常数 K_m 值 (0.759 $\mu\text{mol/L}$) 比 Adh1p^{HJ} 的 K_m 值 (0.524 $\mu\text{mol/L}$) 大,说明 Adh1p^{HJ} 与底物苯乙醛的亲合力相对于 Adh1p^{S288C} 较大。Adh1p^{HJ} 的 V_{max} 值 [299.40 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{g})$] 比 Adh1p^{S288C} 的 V_{max} 值 [289.86 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{g})$] 略高,且 Adh1p^{HJ} 的 k_{cat}/K_m 值 [0.406 $\text{L}/(\mu\text{mol}\cdot\text{min})$] 表现为较大,说明在同一底物苯乙醛的条件下,Adh1p^{HJ} 的催化效率比 Adh1p^{S288C} 高。而以乙醛为底物时,Adh1p^{S288C} 的 K_m 值 (0.741

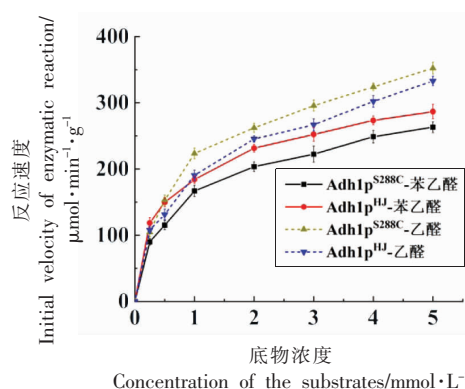


图9 底物与醇脱氢酶 Adh1p 反应速度的非线性拟合回归图

Fig.9 Non-linear regression of substrate and reaction rate of Adh1p

$\mu\text{mol/L}$), 比 Adh1p^{HJ} 的 K_m 值 (0.895 $\mu\text{mol/L}$) 小,说明 Adh1p^{S288C} 与底物乙醛的亲合力比 Adh1p^{HJ} 大。Adh1p^{HJ} 的 V_{max} 值 [363.64 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{g})$] 和 k_{cat}/K_m 值 [0.289 $\text{L}/(\mu\text{mol}\cdot\text{min})$] 略比 Adh1p^{S288C} 的 V_{max} 值低,说明在同一底物乙醛的条件下,Adh1p^{HJ}

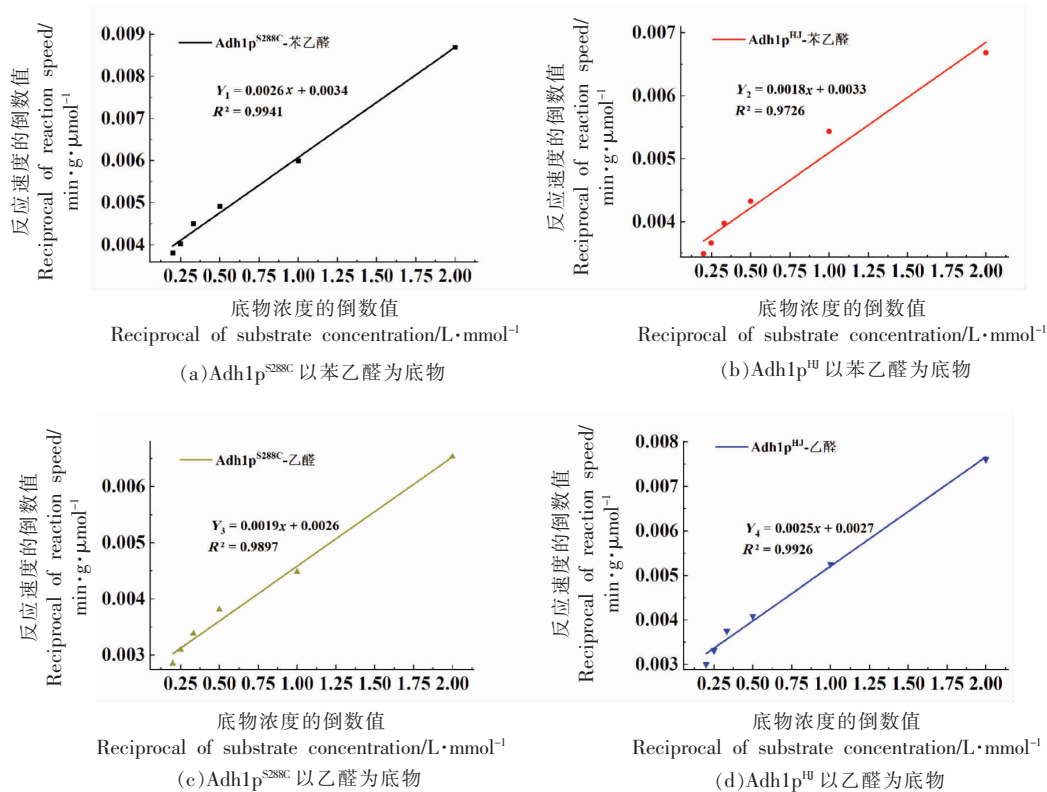
图 10 酵母模式菌株和黄酒酵母菌株中 Adh1p $1/[S]-1/v$ 关系图Fig.10 Relationship between Adh1p $1/[S]-1/v$

表 1 Adh1p 酶学参数分析

Table 1 Analysis of Adh1p enzymatic parameters

	Adh1p ^{S288C} -苯乙醛	Adh1p ^{HJ} -苯乙醛	Adh1p ^{S288C} -乙醛	Adh1p ^{HJ} -乙醛
$V_{max}/\mu\text{mol}\cdot(\text{min}\cdot\text{g})^{-1}$	289.86 ± 3.51	299.40 ± 5.82	380.23 ± 8.34	363.64 ± 9.33
$K_m/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.76 ± 0.15	0.52 ± 0.19	0.74 ± 0.13	0.90 ± 0.11
$k_{cat}/K_m/\text{L}\cdot(\mu\text{mol}\cdot\text{min})^{-1}$	0.27 ± 0.06	0.41 ± 0.08	0.36 ± 0.05	0.29 ± 0.06

的催化效率低于 Adh1p^{S288C}。

2.6 外源添加末端产物乙醇和 β -苯乙醇对醇脱氢酶 Adh1p 的酶活的影响

试验结果如图 11a 所示, 通过外源添加 0~300 mg/L β -苯乙醇, 醇脱氢酶 Adh1p 对底物乙醛的脱羧反应仍保持高催化活性, 且其在 0~200 mg/L 质量浓度范围随 β -苯乙醇的添加量而增加, Adh1p^{HJ} 的相对酶活比 Adh1p^{S288C} 的相对酶活显著高, 相比之下, 黄酒酵母菌株的 Adh1p^{HJ} 耐受 β -苯乙醇的能力相对来说高于酵母模式 Adh1p^{S288C}。而外源添加体积分数 0~20% 的乙醇, 随体积分数的上升, 醇脱氢酶对底物苯乙醛的脱羧反应的催化

活性下降, 在添加 20% 乙醇条件下, Adh1p^{S288C} 的相对酶活剩余 57.99%, Adh1p^{HJ} 的相对酶活虽有所下降, 但仍剩余 82.21%。相比之下, 黄酒酵母菌株的 Adh1p^{HJ} 耐受乙醇的能力相对高于酿酒酵母 Adh1p^{S288C}。

3 结论

醇脱氢酶 Adh1p 作为酵母合成 β -苯乙醇的艾利希途径的最后一步的酶, 催化杂醇醛还原成杂醇, 是生物体内不可缺少的关键酶^[33]。本研究发现工业菌株黄酒酵母 HJ 和酿酒酵母 S288C 的醇脱氢酶 Adh1p 在催化活性区域具有 4 位氨基酸差

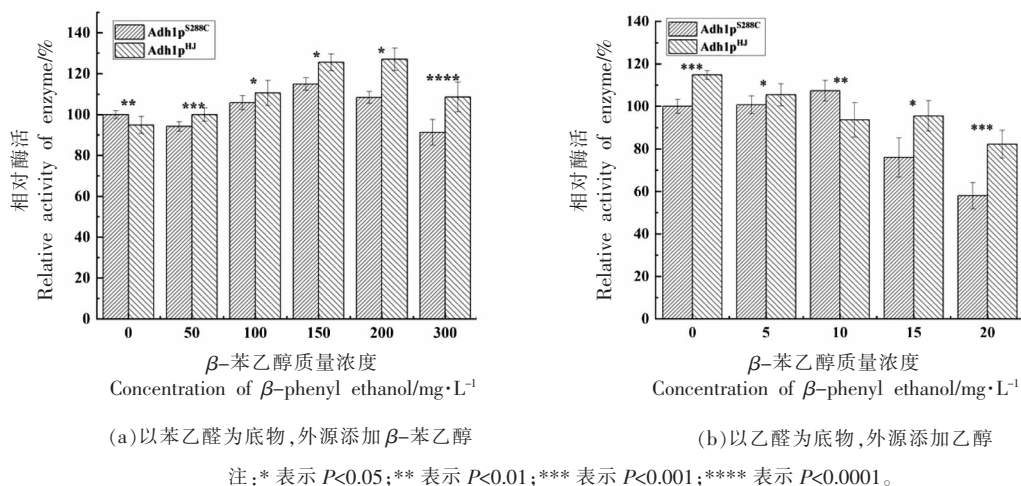


图 11 外源添加末端产物对醇脱氢酶 Adh1p 酶活的影响

Fig.11 Effect of exogenous end products on enzyme activity of Adh1p

异,因此研究其酶学性质是必要的。通过构建重组表达载体,利用 IPTG 诱导,大量表达目的蛋白^[34-35]。通过亲和柱层析手段对目的蛋白进行分离纯化,得到高纯度的 Adh1p。对纯化后的酿酒酵母模式菌株 S288C 的 Adh1p^{S288C} 和黄酒酵母菌株 HJ 的 Adh1p^{HJ} 的稳定性、动力学参数以及末端代谢产物对酶活的影响进行分析,结果表明:醇脱氢酶 Adh1p 的最适反应 pH 7.5, 最适反应温度 40 ℃。在最适条件下,Adh1p^{HJ} 的酶活 (231.51 U/g) 比 Adh1p^{S288C} (203.48 U/g) 高约 13.79%。动力学分析结果表明,以苯乙醛为底物时,Adh1p^{HJ} 与底物苯乙醛的亲合力大于 Adh1p^{S288C}, 且 Adh1p^{HJ} 的催化效率也较大。而以乙醛为底物时,Adh1p^{S288C} 与底物乙醛的亲合力和催化效率较小。外源添加 0~300 mg/L β -苯乙醇的情况下,醇脱氢酶对底物乙醛的脱羧反应仍保持高催化活性,且黄酒酵母菌株的 Adh1p^{HJ} 耐受 β -苯乙醇的能力相对来说高于酵母模式 Adh1p^{S288C}, 而对底物苯乙醛的脱羧反应,乙醇抑制一定的酶活,其中黄酒酵母菌株 Adh1p^{HJ} 耐受乙醇的能力相对高于酵母模式 Adh1p^{S288C}。这些差异很可能是黄酒酵母醇脱氢酶 Adh1p^{HJ} 的氨基酸差异导致酶催化能力的改变,进而影响黄酒酵母中 β -苯乙醇的合成。酵母细胞内的 Ehrlich 途径的前两步 L-苯丙氨酸通过脱氨基作用形成苯丙酮酸,进而脱羧生成相应苯乙醛,然后经还原反应形成 β -苯乙醇。该途径的前两步反

应的机制已基本清楚^[8,36]。本文研究醇脱氢酶 Adh1p 相关酶学性质,为探究黄酒酵母的 β -苯乙醇的合成途径关键酶和编码基因以及合成调控机制提供靶点。

参 考 文 献

- [1] JIAO A, XU X, JIN Z. Research progress on the brewing techniques of new-type rice wine[J]. Food Chem, 2017, 215: 508-515.
- [2] 荣绍丰, 伍进, 管世敏, 等. 生物合成天然 2-苯乙醇细菌的筛选及合成途径分析[J]. 食品科学, 2021, 42(16): 69-75.
RONG S F, WU J, GUAN S M, et al. Isolation of 2-phenylethanol-synthesizing bacteria and synthetic pathway analysis[J]. Food Science, 2021, 42(16): 69-75.
- [3] 陈双, 罗涛, 徐岩, 等. 我国黄酒酵母和酿酒原料对黄酒中 β -苯乙醇含量的影响[J]. 中国酿造, 2009(4): 23-26.
CHEN S, LUO T, XU Y, et al. Effects of yeast strains and raw materials on β -phenylethanol production in Chinese rice wines[J]. China Brewing, 2009(4): 23-26.
- [4] 周佳冰, 张雅卿, 刘双平, 等. 黄酒酵母在黄酒发酵过程中产芳香醇差异分析[J]. 酿酒科技, 2020(10): 30-37.
ZHOU J B, ZHANG Y Q, LIU S P, et al. Differ-

- ential analysis of aromatic alcohol production performance of Huangjiuyeasts during fermentation[J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2020(10): 30–37.
- [5] 李茜云. 新型食用菌料酒的制备及功能性成分的研究[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2018.
- LI Q Y. Preparation of new edible fungus wine and study on functional components[D]. Hangzhou: Zhejiang A&F University, 2018.
- [6] ETSCHMANN M M, BLUEMKE W, SELL D, et al. Biotechnological production of 2-phenylethanol[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 59(1): 1–8.
- [7] LI S, YUYA N, FUMIO M, et al. Overexpressing enzymes of the Ehrlich pathway and deleting genes of the competing pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for increasing 2-phenylethanol production from glucose[J]. *J Biosci Bioeng*, 2016, 122(1): 34–39.
- [8] 杨霄, 崔志峰. 酵母生物转化生产 2-苯乙醇的研究进展[J]. *应用与环境生物学报*, 2006, 12(1): 140–144.
- YANG X, CUI Z F. Progress in 2-phenylethanol production by biotransformation with yeast[J]. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2006, 12(1): 140–144.
- [9] WANG Y, ZHANG Z, LU X, et al. Genetic engineering of an industrial yeast *Candida glycerinogenes* for efficient production of 2-phenylethanol[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104(24): 10481–10491.
- [10] MARTÍNEZ-AVILA O, SÁNCHEZ A, FONT X, et al. 2-phenylethanol (rose aroma) production potential of an isolated *pichiakudriawzevii* through solid-state fermentation[J]. *Process Biochemistry*, 2020, 93: 94–103.
- [11] GUO D, ZHANG L, KONG S, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of 2-phenylethanol and 2-phenylethyl acetate from glucose[J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(23): 5886–5891.
- [12] FUKUDA K, WATANABE M, ASANO K. Altered regulation of aromatic amino acid biosynthesis in β -phenylethyl-alcohol-overproducing mutants of sake yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1990, 54(12): 3151–3156.
- [13] FUKUDA K, WATANABE M, ASANO K, et al. A mutated *ARO4* gene for feedback-resistant DAHP synthase which causes both o-fluoro-DL-phenylalanine resistance and beta-phenethyl-alcohol overproduction in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Curr Genet*, 1991, 20(6): 453–456.
- [14] FUKUDAK, WATANABE M, ASANOK, et al. Molecular breeding of a sake yeast with a mutated *ARO4* gene which causes both resistance to o-fluoro-DL-phenylalanine and increased production of β -phenethyl alcohol[J]. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1992, 73(5): 366–369.
- [15] LIU S, YANG Q, MAO J, et al. Feedback inhibition of the prephenate dehydratase from *Saccharomyces cerevisiae* and its mutation in huangjiu (Chinese rice wine) yeast[J]. *LWT*, 2020, 133: 110040.
- [16] 徐国强, 吴满珍, 吴瑶, 等. 利用功能基因组学方法研究酿酒酵母乙醇生物合成的调控机理[J]. *微生物学杂志*, 2013, 33(6): 19–25.
- XU G Q, WU M Z, WU Y, et al. Study on the regulation mechanism of ethanol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by functional genomics[J]. *Journal of Microbiology*, 2013, 33(6): 19–25.
- [17] HAZELWOOD L A, DARAN J M, VAN MARIS A J, et al. The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(8): 2259–2266.
- [18] PAQUIN C E, WILLIAMSON V M. Ty insertions at two loci account for most of the spontaneous antimycin A resistance mutations during growth at 15 degrees C of *Saccharomyces cerevisiae* strains lacking *ADHI*[J]. *Mol Cell Biol*, 1986, 6(1): 70–79.
- [19] GU Y, MA J, ZHU Y, et al. Refactoring ehrlich pathway for high-yield 2-phenylethanol production in *Yarrowialipolytica*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(3): 623–633.
- [20] 王成涛, 梁婧如, 尹胜, 等. 溶氧量对酿酒酵母及其工程菌的 β -苯乙醇合成代谢的影响及调控效应[J]. *中国食品学报*, 2016, 16(8): 78–86.
- WANG C T, LIANG J R, YIN S, et al. Effects and biosynthetic metabolism regulation of dissolved oxygen on β -phenethylalcohol in *Saccharomyces cerevisiae* and its engineering strains[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2016, 16(8): 78–86.
- [21] 白梅, 刘双平, 毛健, 等. 黄酒酵母 HO 基因的敲除及其对黄酒发酵的影响[J]. *食品科学*, 2018, 39(18): 61–66.

- BAI M, LIU S P, MAO J, et al. Influence of knocking out the HO gene of *Saccharomyces cerevisiae* on Chinese rice wine fermentation[J]. Food Science, 2018, 39(18): 61–66.
- [22] 赵宏宇, 李珺, 赵玥, 等. 4种酵母基因组提取方法的比较[J]. 食品科学, 2011, 32(9): 170–173.
- ZHAO H Y, LI J, ZHAO Y, et al. Comparison of four methods for genomic DNA extraction from yeasts[J]. Food Science, 2011, 32(9): 170–173.
- [23] 罗艳. *Gluconobacter thailandicus* D-阿拉伯糖醇脱氢酶和木糖醇脱氢酶基因的克隆及协同表达[D]. 镇江: 江苏大学, 2016.
- LUO Y. Cloning and co-expression of D-arabitoldehydrogenase and xylitol dehydrogenase genes from *Gluconobacterthailandicus*[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2016.
- [24] LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227(5259): 680–685.
- [25] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248–254.
- [26] 于凤川. 奇异变形杆菌醇脱氢酶的克隆表达及酶学性质研究[D]. 无锡: 江南大学, 2019.
- YU F C. Gene cloning, expression and biochemical characteristics of alcoholdehydrogenase from *Proteus mirabilis* JN458[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2019.
- [27] PENNACCHIO A, PUCCI B, SECUNDO F, et al. Purification and characterization of a novel recombinant highly enantioselective short-chain NAD (H)-dependent alcohol dehydrogenase from *Thermus thermophilus*[J]. Appl Environ Microbiol, 2008, 74(13): 3949–3958.
- [28] 舒梅. 酿酒酵母乙醇脱氢酶2和乙醛脱氢酶以及两种水生动物抗菌肽的表达和酶活分析[D]. 南昌: 南昌大学, 2011.
- SHU M. Expression and characterization *ADH2* and *ALDH* of *Saccharomyces cerevisiae* and expression and activity analysis of two anti-microbial peptides[D]. Nanchang: Nanchang University, 2011.
- [29] RAJ S B, RAMASWAMY S, PLAPP B V. Yeast alcohol dehydrogenase structure and catalysis[J]. Biochemistry, 2014, 53(36): 5791–5803.
- [30] 许松伟, 姜忠义, 吴洪. 醇脱氢酶结构和作用机理研究进展[J]. 有机化学, 2005, 25(6): 629–633, 607.
- XU S W, JIANG Z Y, WU H. Progress in structure and kinetic mechanism of alcohol dehydrogenase[J]. Organic Chemistry, 2005, 25(6): 629–633, 607.
- [31] MLEJNEK K, SEIFFERT B, DEMBERG T, et al. Temperature optima of enzyme-catalysed reactions in microemulsion systems[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2004, 64(4): 473–480.
- [32] ZHANG H, LI Q, WANG L, et al. Investigation of structure and function of mitochondrial alcohol dehydrogenase isozyme III from *Komagataellaphaffii* GS115[J]. Biochim Biophys Acta Gen Subj, 2018, 1862(5): 1199–1208.
- [33] DICKINSON J R, SALGADO L E, HEWLINS M J. The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. J Biol Chem, 2003, 278(10): 8028–8034.
- [34] 祁浩, 刘新利. 大肠杆菌表达系统和酵母表达系统的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(17): 4–6, 52.
- QI H, LIU X L. Research progress of expression systems of *Escherichia coli* and yeast[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2016, 44(17): 4–6, 52.
- [35] 李赤霞, 陈滢, 张萌, 等. 白假丝酵母环核苷酸磷酸二酯酶2的异源表达、纯化与酶学特性分析[J]. 食品科学, 2020, 41(22): 82–87.
- LI C X, CHEN Y, ZHANG M, et al. Heterologous expression, purification and enzymatic analysis of *Candida albicans* cyclic nucleotide phosphodiesterase 2[J]. Food Science, 2020, 41(22): 82–87.
- [36] 张晓瑜. 黄酒酿酒酵母芳香醇脱氢酶的定点突变与催化位点鉴定[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2017.
- ZHANG X Y. Site-specific mutagenesis and catalytic site identification of yeast aryl alcohol dehydrogenase in Chinese rice wine[D]. Hangzhou: Zhejiang A&F University, 2017.

Heterologous Expression and Enzymatic Analysis of Alcohol Dehydrogenase I in β -Phenylethanol Biosynthesis Pathway from Huangjiu Yeast

Yang Qilin^{1,4,5}, Liu Shuangping^{1,2,3,4,5}, Zhao Yuzong^{1,4,5}, Sun Hailong^{1,4,5}, Mao Jian^{1,2,3,4,5*}

(¹School of Food Science and Technology, National Engineering Research Center of Cereal Fermentation and Food Biomanufacturing, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu

²Jiangnan University (Shaoxing) Industrial Technology Research Institute, Shaoxing 312000, Zhejiang

³National Engineering Research Center of Huangjiu, Zhejiang Guyuelongshan Shaoxing Wine Co., Ltd., Shaoxing 312000, Zhejiang

⁴Jiangsu Provincial Engineering Research Center for Bioactive Product Processing, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu

⁵Collaborative Innovation Center of Food Safety and Quality Control in Jiangsu Province, Wuxi 214122, Jiangsu)

Abstract Alcohol dehydrogenase is a key enzyme in the final synthesis of β -phenylethanol in Huangjiu yeast, which comes from the Ehrlich pathway. To explore the differences and enzymatic analysis of Adh1p^{HJ}, the *ADHI* of *Saccharomyces cerevisiae* HJ and *Saccharomyces cerevisiae* S288C were used as templates respectively to amplify the target gene by PCR. The expression plasmid pET-28a(+)-*ADHI* were constructed, and transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3) cells to obtain high expression induced by IPTG. The crude enzymes were obtained after ultrasonic fragmentation, and then purified by affinity chromatography with AKTA pure. Finally the enzymatic analysis were explored. Using phenylacetaldehyde as substrate, it was found that the enzyme activity (231.51 U/g) of Adh1p^{HJ} was 13.79% higher than that of Adh1p^{S288C} (203.48 U/g), and the K_m value of Adh1p^{HJ} (0.524 $\mu\text{mol/L}$) was less than that of Adh1p^{S288C} (0.759 $\mu\text{mol/L}$), which indicated that the affinity between Adh1p^{HJ} and substrate was higher. From the k_{cat}/K_m value, it is found that the catalytic efficiency of Adh1p^{HJ} [0.406 L/($\mu\text{mol}\cdot\text{min}$)] is higher. The tolerance of Adh1p^{HJ} to β -phenylethanol and ethanol was higher than that of Adh1p^{S288C}. This study provides a method and theoretical basis for the analysis of the structure and properties of Adh1p, and also provides a reference for the industrial production and development of β -phenylethanol.

Keywords alcohol dehydrogenase I; heterologous expression; enzymatic properties; Huangjiu; *Saccharomyces cerevisiae*