

具有 α -淀粉酶分泌活性以及低双乙酰产量的啤酒酵母工程菌的构建

张峰^{1,2}, 王肇悦¹, 刘楠¹, 何秀萍¹, 张博润¹

1 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

2 中国科学院研究生院, 北京 100039

摘要: 扣囊复膜酵母(*Saccharomycopsis fibuligera*)因具有较强的 α -淀粉酶以及葡聚糖酶活性, 使其在以淀粉为唯一碳源的培养基上能够良好的生长。从其基因组中克隆了 α -淀粉酶的编码区, 构建了由酵母磷酸甘油酸激酶基因(*PGK1*)启动子、酿酒酵母 α -因子信号序列以及扣囊复膜酵母 α -淀粉酶基因编码序列组成的基因表达盒。将该表达盒插入到质粒 pPLZ-2 的 *ILV2* 基因序列内部, 使其两翼具有 *ILV2* 基因的同源区。将该表达盒通过同源重组的方式整合到啤酒酵母工业菌株 YSF-5 的 α -乙酰乳酸合成酶(AHAS)基因 *ILV2* 内部。在以淀粉为唯一碳源的培养基上进行转化子的筛选。通过多对引物 PCR、 α -淀粉酶活性以及 AHAS 活性分析对转化子进行鉴定, 得到一株具有 α -淀粉酶分泌表达活性、较低 AHAS 活性, 并且发酵液中双乙酰产量也相对较低的啤酒酵母工程菌。该菌株在非选择压力条件下连续培养 50 代后仍然保持其遗传稳定性。还对 pH、温度以及金属离子对该转化菌株的 α -淀粉酶活性的影响进行了研究。由于所构建的菌株不含有非酵母来源的 DNA, 所以生物安全性相对较高, 对酵母育种以及啤酒生产工业都具有较为重要的意义。

关键词: 啤酒酵母工程菌, α -淀粉酶, 双乙酰, α 信号肽

Construction of a New Brewing Yeast Strain with Secretive α -amylase Activity and Reduced Diacetyl Production

Feng Zhang^{1,2}, Zhaoyue Wang¹, Nan Liu¹, Xiuping He¹, and Borun Zhang¹

1 The Laboratory of Molecular Genetics and Breeding of Yeast, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

Abstract: *Saccharomycopsis fibuligera* possesses high α -amylase and glucoamylase activities that enable it to utilize raw starch as a carbon source. A expression cassette containing the promoter sequence of 3-phosphoglycerate kinase gene (*PGK1p*), the α factor signal sequence from *Saccharomyces cerevisiae* and the α -amylase coding sequence of *S. fibuligera* was constructed. The α -amylase expression cassette was inserted in the *ILV2* locus of industrial brewer's yeast strain YSF-5 encoding α -acetolactate synthase (AHAS) by homologous recombination. The transformed yeast strain was selected on the media with starch as the sole carbon source and verified by PCR. The transformant exhibited secretive α -amylase activity, low AHAS activity and reduced diacetyl production. Effects of temperature, pH, and metal ions on the activity of the α -amylase expressed by the transformant were examined. The fermentation performance of host strain YSF-5 and the transformant was also examined.

Keywords: industrial brewer's yeast, α -amylase, diacetyl, α factor

Received: September 26, 2007; **Accepted:** December 7, 2007

Corresponding author: Borun Zhang. Tel: +86-010-64807427; E-mail: zhangbr@sun.im.ac.cn

Xiuping He. Tel: +86-010-64807356; E-mail: hexp@sun.im.ac.cn

α -淀粉酶, 又称 α -1, 4-葡聚糖-4-葡聚糖水解酶(α -1, 4-glucan-4-glucanohydrolase EC 3.2.1.1), 广泛存在于动物、植物和微生物中。淀粉价格低廉, 是自然界中最广泛存在的碳水化合物之一, 是一种很有潜力的生物资源。酿酒酵母因其高发酵能力、高酒精生产能力以及高酒精耐受力而著称^[1], 但是大部分的酿酒酵母都不具有直接利用淀粉的能力^[2]。目前虽然已发现大约有 100 种酵母具有淀粉同化能力, 但是它们都不适合啤酒酿造工业的使用。啤酒酿造工业所使用的工业菌株也因缺乏淀粉水解酶类而不能直接利用淀粉, 需将淀粉进行蒸煮, 然后经 α -淀粉酶液化, 再经酸解或糖化酶处理转变成可发酵性糖后才能被利用。目前, 已知的酵母种类中, 以扣囊复膜酵母(*Saccharomycopsis fibuligera*)以及桔林油脂酵母(*Lipomyces kononenkoae*)表现的淀粉酶活性最为突出。已有很多研究者将多种不同来源的 α -淀粉酶基因在啤酒酵母实验室菌株以及少量工业菌株中以游离质粒载体或整合载体的方式进行了表达^[3-7]。

酵母 *ILV2* 基因编码的 α -乙酰乳酸合成酶催化酵母异亮氨酸-缬氨酸生物合成途径中由丙酮酸盐生成 α -乙酰乳酸的反应。双乙酰是由 α -乙酰乳酸渗透到胞外经非酶促氧化脱羧反应生成的, 它是成品酒的主要异味物质^[8], 在啤酒中的阈值很低, 并且一般在啤酒发酵后期还原双乙酰所需的时间较长, 是啤酒酿造中主发酵和成熟期延长的主要原因。*ILV2* 基因在卡尔型酵母体内有两个不同的等位基因, 一个与 *S. cerevisiae* 同源, 另一个与 *Saccharomyces calshbergensis* 同源。因此该基因的一个等位基因被破坏不会对酵母本身的代谢产生影响, 但是可以降低啤酒中的双乙酰含量^[9], 缩短啤酒发酵周期, 在啤酒发酵工业中具有重要的应用价值。

本研究以同源重组的方式, 将由 *PGK1* 启动子、酵母 α -因子信号序列, 以及扣囊复膜酵母的 α -淀粉酶基因编码区组成的基因表达盒整合到啤酒酵母工业菌株基因组的 *ILV2* 位点, 使得该啤酒酵母工业菌株在获得分泌表达 α -淀粉酶活性的同时, 具有较低 AHAS 活性的特征, 并且该菌株发酵液中双乙酰含量也有所降低。同时, 与已有的关于 α -淀粉酶基因在酿酒酵母工业菌株中表达的研究不同, 本研究中所涉及的基因都来源于酵母菌, 不含有任何细菌等

酵母菌以外的 DNA 序列, 因此生物安全性相对较高。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

啤酒工业酵母 YSF-5 由青岛啤酒科研中心提供。大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α (*supE44*, *Alac*, *U169*, *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*)、扣囊复膜酵母(*Saccharomycopsis fibuligera* AS 2.1145)、质粒 YEp352(*amp*, *URA3*, Yeast/*E. coli* 穿梭载体)^[10]、pBluescript M13-^[11]、含有 *ILV2* 基因的质粒 pPLZ-2^[12]均由本实验室保存。

1.2 培养基

大肠杆菌 DH5 α 的保存和培养用 LB 培养基(每 L 含 5 g 酵母抽提物, 10 g 胰蛋白胨, 10 g 氯化钠), 筛选平板用含有 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C 静置或振荡培养; 酿酒酵母 YSF-5 用 YEPD 培养基(每 L 含 10 g 酵母抽提物, 20 g 蛋白胨, 20 g 葡萄糖) 28 $^{\circ}$ C 静置或振荡培养; 酵母转化子用 YNBS(每 L 含有 6.7 g YNB, 10 g 可溶性淀粉)、YEPD 或 YNBG(每 L 含有 6.7 g YNB, 20 g 葡萄糖)培养基培养。所有固体培养基均含有 1.5%琼脂糖。

1.3 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; 氨苄青霉素购自北京鼎国生物技术发展中心; 其他分子生物学试剂购自北京化学试剂公司。

1.4 PCR 引物合成

见表 1。

表 1 本研究所使用的引物
Table 1 Primers used in this research

Primers	Sequences 5' to 3'
AMY1 5'	CCGAATTCAATATGCAAATTTCAAAAGC
AMY1 3'	CTGAATTCTCATGAACAAATCTCAGAAGC
S 5'	AGCCGTCGACATGAGATTTCTTCAATT
S 3'	CGCTCTAGATCAACGCCAGCCATCATGA
ILV2 5'	GCAGGATCCTGGCTTCAGTTGCTGATCT
ILV2 3'	CAGGTCGACGGCCACTGTTCTTATGCTT

1.5 重组质粒的构建以及酵母转化

大肠杆菌转化与质粒提取参照文献[13]进行; 质粒的酶切与 DNA 片段的回收和连接参照产品说

明进行; 啤酒酵母总 DNA 的提取按文献[14]的方法进行, 以扣囊复膜酵母总 DNA 为模板, 以 AMY1 5'/AMY1 3' 为引物进行扩增。用 *EcoR* I 酶切该 PCR 产物以及 pPIC9 质粒, 将二者用 T₄ DNA 连接酶连接获得重组质粒 pSA-1; 用 *Bam*H I 和 *EcoR* I 酶切质粒 pPVC727-6 和 pBluescriptM13, 回收质粒 pPVC727-6 酶切产物中 1.5 kb 左右的 DNA 片段以及 pBluescriptM13 的酶切产物, 连接后通过酶切验证获得质粒 pMP-3; 以质粒 pSA-1 为模板, 以 S 5'/S 3' 为引物, PCR 扩增含有 α 因子以及 α -淀粉酶基因的片段, 用 *Sal* I 酶切 PCR 片段以及 pMP-3 质粒, 将二者用 T₄ DNA 连接酶连接构建质粒 pPSA-2, 酶切验证插入方向; 用 *Spe* I 以及 *Xba* I 酶切 pPSA-2 以及 pPLZ-2, 将 3.3 kb 左右的片段与酶切的 pPLZ-2 用 T₄ DNA 连接酶连接构建质粒 pPZSA-4。将质粒 pPZSA-4 用 *Sma* I 和 *Sph* I 酶切, 回收两端为 ILV2 序列的 α -淀粉酶表达盒, 用此片段转化啤酒酵母工业菌株 YSF-5。转化方法见文献[15]。

1.6 转化子 PCR 鉴定

提取酵母转化子的总 DNA, 以其为模板并以不同的引物对进行 PCR。PCR 引物: AMY1 5'/AMY1 3', S 5'/A MY1 3', AMY1 5'/ILV2 3' 以及 ILV2 5'/S 3'。

1.7 α -淀粉酶活力测定

将酵母转化子以及 YSF-5 在 YEPD 或 10° P 麦芽汁中培养后, 收集发酵产物离心获得上清液备用。取上清液进行 α -淀粉酶活性测定。具体方法见文献[14], 稍作改动, 以 37°C 下, 每分钟水解淀粉产生 1 nmol 麦芽糖所需的 α -淀粉酶的量 1 u。

1.8 AHAS 活性测定

将酵母转化子以及 YSF-5 在 YEPD 或 10° P 麦芽汁中培养后, 收集菌体, 超声波破碎, 采用细胞通透测定法^[16,17], 以 55°C 下, 每分钟催化产生 10^{-8} mol 乙偶姻所需 AHAS 的量 1 u。

1.9 双乙酰含量测定

测定麦芽汁发酵液中双乙酰含量, 测定方法见文献[18], 蛋白质浓度测定方法见文献[19]。

1.10 转化子遗传稳定性测定

将转化子在无选择压力的培养基 YNBG 中连续培养 50 代以上, 然后将转化子无菌水稀释, 室温静置 2~4 h, 涂布于 YNBG 以及 YNBS 平板上。对平板上出现的菌落数进行统计比较。

1.11 转化子与受体菌发酵力比较

将受体菌与转化子在 10° P 的麦芽汁中, 10°C 条件下连续培养 12 d, 每天对发酵体系进行称量, 记录发酵体系减轻的重量即 CO₂ 减重。以 CO₂ 减重来反应转化子与受体菌的发酵能力。

1.12 pH 对转化子 α -淀粉酶活性的影响

将酵母转化子用 YEPD 培养后离心, 取上清液在 pH1~9 的 PBS 缓冲液中按照文献[14]的方法在 37°C 条件下进行酶促反应, 测定 α -淀粉酶活性。

1.13 温度对转化子 α -淀粉酶活性的影响

将酵母转化子用 YEPD 培养后离心, 以上清液为粗酶液按照文献^[14]方法在 4°C~75°C 温度范围内进行 α -淀粉酶活性测定。

1.14 金属离子以及离子浓度差异对 α -淀粉酶活性的影响

将酵母转化子用 YEPD 培养后离心, 以上清液为粗酶液在 pH 7.0 的 Tris-HCl 缓冲液中 4°C 透析过夜。以此为粗酶液与淀粉溶液在不同浓度梯度的金属离子存在下, 37°C 下进行酶促反应, 以文献[14]方法进行 α -淀粉酶活性测定。

2 结果

2.1 目的基因的 PCR 扩增以及重组质粒的构建

以扣囊复膜酵母总 DNA 为模板, 以 AMY1 5'/AMY1 3' 为引物, PCR 扩增出 1.5 kb 的 DNA 片段(图 1)。序列分析结果表明 PCR 产物与 GenBank 中报道序列完全相同。重组质粒 pPZSA-4 简图见图 2, 限制酶 *Bam*H I、*EcoR* I 以及 *Sal* I 酶切验证图如图 3。

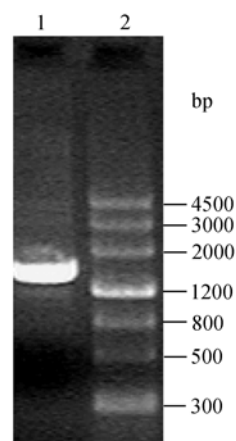


图 1 扣囊复膜酵母 α -淀粉酶基因编码区的 PCR 产物

Fig. 1 PCR product of α -amylase coding sequence of *Saccharomycopsis fibuligera*

1: PCR product; 2: marker

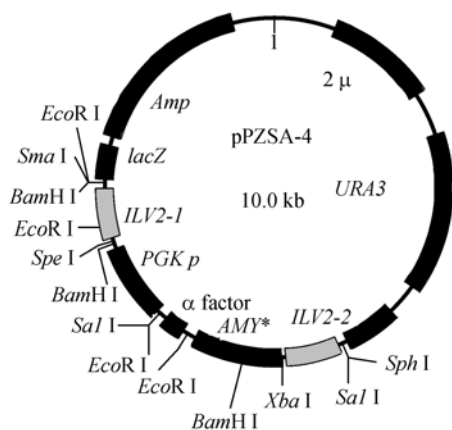


图2 重组质粒示意图

Fig. 2 The schematic representation of recombinant plasmid pPZSA-4

Here the "AMY" stands for the α -amylase gene from *Saccharomycopsis fibuligera*

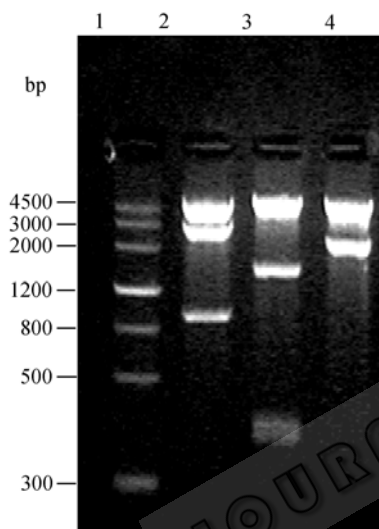


图3 重组质粒 pPZSA-4 的酶切验证

Fig. 3 Verification of pPZSA-4 by restriction enzymes' digestion

1: marker; 2~4: the enzyme digest results by BamHI, EcoRI, SalI

2.2 同源重组及酵母转化子的鉴定

回收质粒 pPZSA-4 经限制性内切酶 *Sph* I 及 *Sma* I 酶切后小于 5 kb 的片段, 用该片段转化 YSF-5, 使其与 YSF-5 的 *ILV2* 基因发生同源重组(图 4), 在选择性培养基 YNBS 上进行转化子的筛选。挑选 YNBS 平板上较大的菌落 N14, 扩大培养后提取其总 DNA, 以其为模板, 以受体菌 YSF-5 为对照, 用多对引物对其进行 PCR 验证。如图 5 所示, 以引物 AMY1 5'/AMY1 3', S 5'/AMY1 3', AMY1 5'/ILV2 3' 以及 ILV2 5'/S 3' 进行 PCR 扩增, 分别得到 1.5 kb, 1.8 kb, 2 kb 和 2.9 kb 的 DNA 片段, 说明所构建的 α -淀粉酶基因的表达式已经整合到受体菌 YSF-5 基因组的 *ILV2* 位点。而对照菌没有扩增出任何 DNA 片段。

分别以 N14 的发酵上清液以及细胞破碎液离心后的上清液为粗酶液进行 α -淀粉酶以及 AHAS 的活力测定, 进一步对 N14 进行验证, 如图 6 所示, 重组菌株能够产生 α -淀粉酶, 同时 AHAS 活性降低。

2.3 转化子遗传稳定性分析

如图 7 所示, 对经 50 代连续培养过的转化子 N14 在 10 对 YNBG 以及 YNBS 平板上的菌落数进行统计, 发现转化子 N14 在两种培养基上的菌落数没有显著差异, 证明 α -淀粉酶基因的表达式在转化子 N14 的基因组上能稳定遗传。

2.4 温度、pH 以及金属离子对转化子 α -淀粉酶活性的影响

如图 8 所示, 在 45°C 时, 转化子表现出最高的 α -淀粉酶活性。当温度高于 45°C 时, 转化子的 α -淀粉酶活性呈现急剧下降的趋势, 当温度达到 75°C

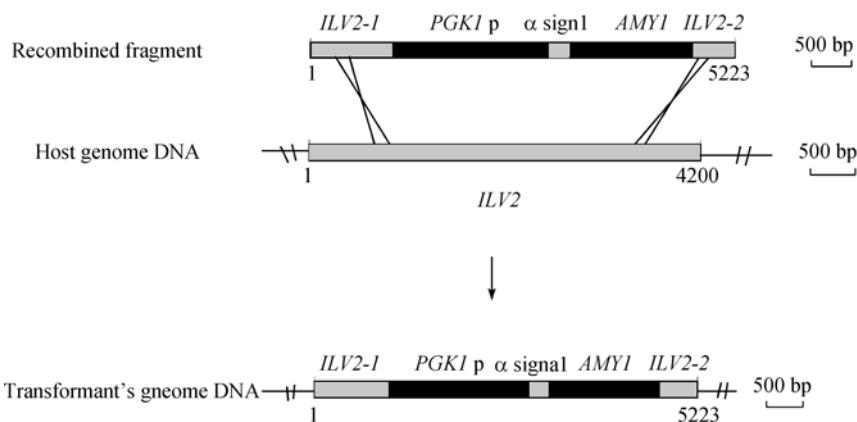


图4 同源重组示意图

Fig. 4 Homologous recombination

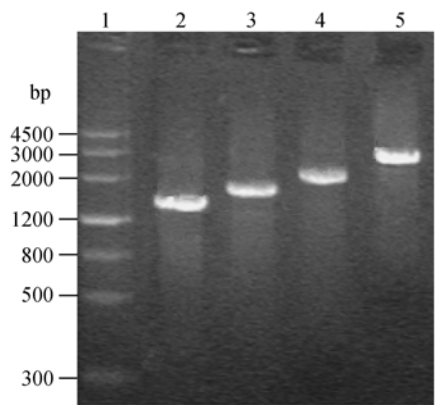


图 5 转化子 PCR 验证电泳图

Fig. 5 PCR analysis of the transformant N14

1: marker; 2~5: PCR products from the genome DNA of N14 using primers of AMY1 5'/AMY1 3', S 5'/AMY1 3', AMY1 5'/ILV2 3' and ILV2 5'/S 3'

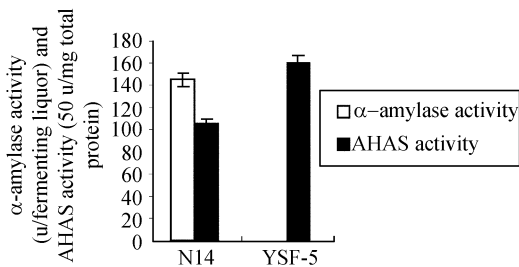


图 6 转化子与受体菌α-淀粉酶活性以及 AHAS 活性测定

Fig. 6 α-Amylase and AHAS activities of YSF-5 and the transformant N14

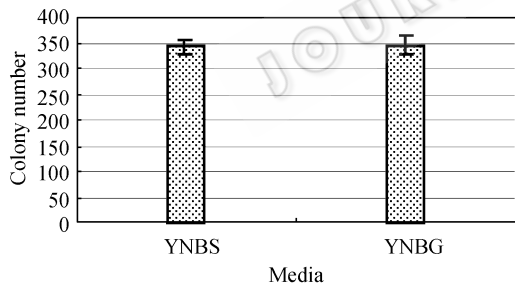


图 7 转化子遗传稳定性测定

Fig. 7 Test of genetic stability of the transformant N14

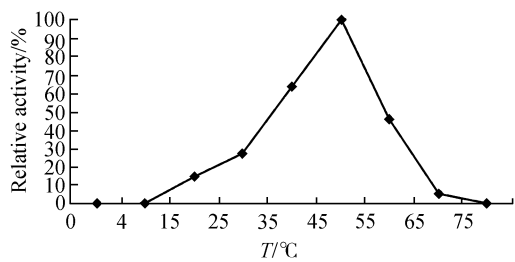


图 8 温度对转化子α-淀粉酶活性的影响

Fig. 8 Effect of temperature on the activity of α-amylase on the transformant N14

时, 转化子分泌表达的α-淀粉酶完全失活。

如图 9 所示, 转化子的α-淀粉酶活性在 pH 1 的时候表现为零, 随 pH 的增高, 其活性逐渐提高, 当达到 pH 5~6 时, 转化子表现出最高的α-淀粉酶活性, 此后, 随着 pH 的增高, 转化子的α-淀粉酶活性逐渐减弱, pH 10 时, 转化子的α-淀粉酶活性为 0。

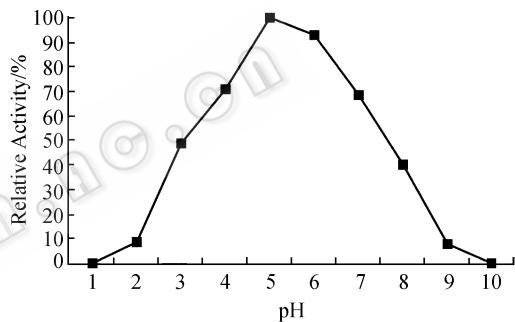


图 9 pH 对转化子α-淀粉酶活性的影响

Fig. 9 Effect of pH on the activity of α-amylase on the transformant N14

如表 2 所示, 以未添加金属离子的条件下测得的α-淀粉酶活性为 100%, 其它条件下的酶活为其相对比值。在 pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液中, Mn^{2+} , Mg^{2+} 以及 Fe^{2+} 在浓度梯度为 1 mmol/L, 5 mmol/L 以及 10 mmol/L 时, 都表现出对转化子α-淀粉酶活力的较大的促进作用, 其他的离子在不同浓度条件下对转化子的α-淀粉酶活性表现出促进或抑制或没有作用。

表 2 不同浓度的金属离子对转化子 N14 α-淀粉酶活性的影响

Table 2 Effects of different metal ions on the activity of α-amylase on the transformed brewer's yeast strain N14

Ion concentration/(mol/L)	Metal ion									
	Fe^{2+}	Fe^{3+}	K^{+}	Cu^{2+}	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Hg^{2+}	Pb^{2+}	Zn^{2+}	Mn^{2+}
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1×10^{-3}	116	122	134	66	118	131	82	95	125	207
5×10^{-3}	123	97	128	58	132	127	76	79	110	185
10×10^{-3}	138	84	130	54	106	128	11	38	94	173

2.5 发酵实验

将啤酒酵母工业菌株 YSF-5 以及转化子在 10°C 条件下, 在 10° P 的麦汁中连续培养 12 d, 每天对发酵体系进行称量, 每天重量的减少作为当日 CO₂ 的产生量。如图 10 所示, 酵母转化子以及受体菌的 CO₂ 产生能力并没有明显的差异, 这说明, 基因改良对啤酒酵母工业菌株 YSF-5 的发酵能力没有明显的影响。

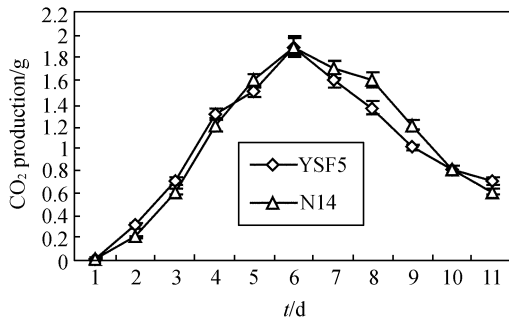


图 10 转化子以及受体菌发酵力比较即 CO₂ 产量实验
Fig. 10 Comparison of fermentability between YSF-5 and the transformant N14

对 YSF-5 以及转化子 N14 的 α -淀粉酶活力、AHAS 活力以及发酵液中双乙酰含量测定结果表明, N14 与 YSF-5 在该发酵条件下生物量没有明显差异, N14 表现出胞外 α -淀粉酶活力, 而 YSF-5 没有表现出任何 α -淀粉酶活性(图 11); 同时, N14 相对于 YSF-5, AHAS 活力有所下降(图 12), 发酵液中双乙酰含量为 YSF-5 的 70%(图 13)。

3 讨论

淀粉是一种非常廉价的碳水化合物, 淀粉以及淀粉质辅料已经广泛的应用于啤酒生产工业。但是利用淀粉以及淀粉质辅料进行发酵时必须经过糖化、糊化过程的处理使淀粉转化成可发酵性糖才能被啤酒酵母利用。目前, 利用淀粉进行啤酒发酵的成本仍然较高, 造成这种现状的原因之一即是淀粉酶类的添加。另外, 啤酒中的重要风味物质之一双乙酰在啤酒中的口味阈值较低, 在啤酒发酵后期对其进行还原所需的时间较长, 是啤酒生产耗时较长的步骤。本研究从青岛啤酒酵母菌株 YSF-5 出发, 将构建的含有 *PGK1* 启动子、酿酒酵母 α 因子信号序列以及扣囊复膜酵母 α -淀粉酶基因编码区的表达盒整合到 YSF-5 的 *ILV2* 基因内部, 获得具有遗传稳定

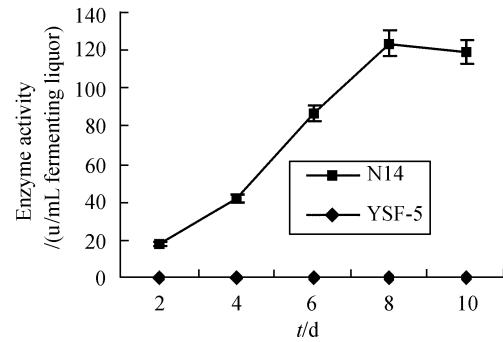


图 11 转化子以及受体菌 α -淀粉酶活力测定
Fig. 11 α -Amylase activity of YSF-5 and the transformant N14

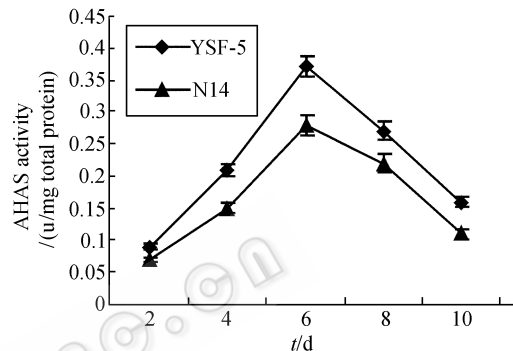


图 12 转化子以及受体菌 AHAS 活力测定
Fig. 12 AHAS activity of YSF-5 and the transformant N14

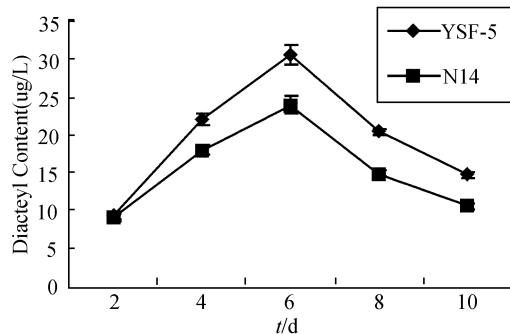


图 13 转化子以及受体菌发酵液中双乙酰含量测定
Fig. 13 Diacetyl content in the fermenting liquor of YSF-5 and the transformant N14

性的啤酒酵母工程菌。该工程菌在获得 α -淀粉酶活力的同时, AHAS 活力明显低于宿主菌 YSF-5, 并且在其发酵液中双乙酰含量也明显减少, 大约为原来的 70%。虽然转化子的 α -淀粉酶活性仍然较低, 不能直接利用淀粉进行发酵生产啤酒, 但是由于其为组成型表达, 所以仍旧能够通过持续不断的分泌表达对发酵底物中残留的淀粉进行降解, 从而降低啤酒碘值和啤酒中的糖含量, 并且以此工程菌酿制的

啤酒的风味可能会有所改善而且发酵周期也可能缩短。发酵温度是啤酒风味的重要影响因素之一, 是一个非常重要的必须考虑的因素, 但在目前对于具有 α -淀粉酶活性的啤酒酵母工程菌的研究中尚无与此相关的报道, 本研究针对此项空白, 就温度这个影响因素对所构建的酵母转化子的 α -淀粉酶活性进行了分析; 另外, pH 也是影响酶活力的重要因素之一, 本研究就其对转化子的 α -淀粉酶活性的影响也进行了分析, 研究发现本研究所构建的啤酒酵母工程菌表达的 α -淀粉酶在正常的发酵液中(pH 4~6)能够表现出几乎最高的活力, 并且还发现一些金属离子如 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 以及 Fe^{2+} 在一定的浓度范围能够大幅度的提高转化子的 α -淀粉酶活性。

对于遗传改良的工业酵母菌株的使用, 总有生物安全性的问题存在。由于啤酒酵母本身不含有 α -淀粉酶基因, 本研究从与酿酒酵母亲缘关系较近的无毒的扣囊复膜酵母中克隆了该基因, 同时利用来自酿酒酵母的启动子以及 α 信号序列对该基因在啤酒酵母工业菌株中进行分泌表达, 整个基因操作过程中没有涉及任何非酵母 DNA, 所构建的工程菌生物安全性相对较高, 具有较高的理论意义和实际应用价值。

REFERENCES

- [1] Ibragimova SI, Kozlov DG, Kartasheva NN, *et al.* A strategy for construction of industrial strains of distiller's yeast. *Biotechnology and Bioengineering*, 1995, **46**(3): 285–290.
- [2] Tubb RS. Amylolytic yeasts for commercial applications. *TIBTECH*, 1986, **4**: 98–104.
- [3] Moses SBG, Otero RRC, La Grange DC, *et al.* Different genetic backgrounds influence the secretory expression of the LKA1-encoded *Lipomyces kononenkoeae* α -amylase in industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 2002, **24**(8): 651–656.
- [4] Eksteen JM, Steyn AJC, Van Rensburg P, *et al.* Cloning and characterisation of a second α -amylase gene (*LKA2*) from *Lipomyces kononenkoeae* IGC4052B and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 2003, **20**(1): 69–78.
- [5] Eksteen JM, Van Rensburg P, Cordero Otero RR, *et al.* Starch fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing the β -amylase and glucoamylase genes from *Lipomyces kononenkoeae* and *Saccharomycopsis fibuligera*. *Biotechnology Bioengineering*, 2003, **84**(6): 639–646.
- [6] Kang NY, Park JN, Chin JE, *et al.* Construction of an amylolytic industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* containing the *Schwanniomyces occidentalis* α -amylase gene. *Biotechnology Letters*, 2003, **25**(21): 1847–1851.
- [7] Ghang DM, YuL, Lim MH, *et al.* Efficient one-step starch utilization by industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* expressing the glucoamylase and alpha-amylase genes from *Debaromyces occidentalis*. *Biotechnology Letters*, 2007, **29**(8): 1203–1208.
- [8] Su H. Production and affection of diacetyl in beer. *Guangzhou Food Science and Technology*, 1998, **2**: 49–53. 苏华. 双乙酰在啤酒中的生成及对啤酒的影响. 广州食品工业科技, 1998, **2**: 49–53.
- [9] Dequin S. The potential of genetic engineering for improving brewing. Wine-making and baking yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, **56**(5–6): 577–588.
- [10] Hill J E, Meyers AM, Koerner TJ, *et al.* Yeast/*E.coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast*, 1986, **2**(3): 163–167.
- [11] Short JM, Fernandez JM, Sorge JA, *et al.* A bacteriophage λ expression vector with *in vivo* excision properties. *Nucleic Acids Res*, 1988, **16**: 7583–7600.
- [12] Li Y, Tie CJ, Wang ZX, *et al.* Construction of diacetyl-low brewer's yeast. *Liquor Making*, 2002, **29**: 77–79. 李艳, 铁翠娟, 王正祥, 等. 低双乙酰啤酒酵母工程菌的构建. 酿酒, 2002, **29**: 77–79.
- [13] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [14] Miller JL, Glennon WE, Burton AL. Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Anal Biochem*. 1960, **1**(2): 127–132.
- [15] Alison A, Daniel EG, Chris AK. Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor laboratory Course Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.
- [16] Magee PT, Robichon-Szulmajster DH. The regulation of isoleucine-valine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. 2. Identification and characterization of mutants lacking acetohydroxyacid synthase. *Eur J Biochem*, 1968, **3**(4): 502–506.
- [17] Pang SS, Duggleby RG. Regulation of yeast acetohydroxyacid synthase by valine and ATP. *Biochem J*, 2001, **357**(3): 749–757.
- [18] Singh BK, Stidham MA, Shaner DL. Assay of acetohydroxyacid synthase. *Anal Biochem*, 1988, **171**: 173–179.
- [19] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248–254.