

## 研究报告

# 啤酒酵母 *ECM25/YJL201W* 基因敲除对啤酒风味稳定性的影响

张一心, 李崎, 沈微, 谢焱, 顾国贤

江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122

**摘要:** 以 pUG6 为模板, 设计含有与 *ECM25* 基因两侧序列同源的长引物, 构建了带有卡那抗性基因(*kanMX*)破坏盒, 转化啤酒酵母 G-03, 获得一株 G-03/a 转化菌, 遗传稳定性良好, 测序结果证实 *ECM25* 基因敲除是成功的。有氧条件下 11°C 和 28°C 培养时转化菌 G-03/a 的胞外谷胱甘肽(GSH)分泌量在对数生长期分别比原菌高 21.4%和 14.7%。在锥形瓶中连续发酵 4 代后, 与原菌株相比, 转化菌 G-03/a 发酵液、成品酒中 GSH 含量分别提高 32.1%和 13.8%, 发酵液和成品啤酒 SI 系数分别提高 7.7%和 5.3%, 成品啤酒 RSV 值提高 45.0%。EBC 管发酵 6 d 后, 与原菌株相比, 转化菌 G-03/a 发酵液中 GSH 含量提高 34.0%。转化菌 G-03/a 与 G-03 所酿制成品啤酒的常规指标没有显著差别。表明 G-03/a 是一株具有抗老化能力的优良啤酒酵母, 能够提高啤酒的风味稳定性。

**关键词:** 啤酒酵母, 基因敲除, *ECM25*, 谷胱甘肽, 分泌, 啤酒风味稳定性

## Effects of Knockout *ECM25/YJL201W* Gene in Brewing Yeast on Beer Flavor Stability

Yixin Zhang, Qi Li, Wei Shen, Yan Xie, and Guoxian Gu

The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University Wuxi 214122, China

**Abstract:** The *ECM25* deletion mutant of industrial brewing yeast, G03/a, was constructed by replacing the *ECM25* gene with the *kanMX* gene. The transformant was verified to be genetically stable. The PCR analysis showed that *ECM25* gene in the G-03/a was deleted. Under aerobic conditions of 11°C and 28°C, compared with the host strain G-03, the excretive glutathione concentration of G-03/a increased by 21.4% and 14.7%, respectively. Strains G-03 and G-03/a were inoculated in flasks and cultivated continuously for 4 generations. Compared with the host strain G-03, the glutathione concentration in the main fermentation broth and final beer of strain G-03/a increased by 32.1% and 13.8%, the stability index (SI) increased by 7.7% and 5.3%, respectively, and the flavor resistance staling value (RSV value) in final beer increased by 45.0%. During EBC fermentation, the glutathione concentration in the main fermentation broth of strain G-03/a increased by 34.0%, compared with the host strain G-03. Furthermore, no significant difference in routine fermentation parameters was found. The strain G-03/a is proved to be an excellent anti-staling brewing yeast to improve beer flavor stability.

**Keywords:** brewing yeast, gene knockout, *ECM25*, glutathione, excretion, beer flavor stability

**Received:** December 18, 2007; **Accepted:** March 4, 2008

**Supported by:** the National Key Technology R&D Program of China (No. 2007BAK36B01).

**Corresponding author:** Qi Li. Tel: +86-510-85918176; Fax: +86-510-85805219; E-mail: liqi@jiangnan.edu.cn

国家“十一五”重大科技支撑专项 (No. 2007BAK36B01)资助。

风味稳定性作为啤酒的重要质量指标之一，从 20 世纪 70 年代开始就受到国外学者的关注<sup>[1,2]</sup>。啤酒酵母是啤酒生产的灵魂，是对啤酒风味和风味稳定性具有决定作用的因素之一。啤酒是非常复杂的体系，其中有些化合物会通过一系列反应，使啤酒风味不断变化，最终导致风味老化。但是啤酒酵母会产生一些具有抗老化功能的还原性物质，如还原型谷胱甘肽(GSH)、亚硫酸盐和还原酮等，它们都能协助消除氧自由基的积累。此外，GSH 也能防止酿造酒色泽改变和香气损失并有抑菌的作用<sup>[3]</sup>。

*ECM25* 基因位于酵母 X 号染色体，可能和细胞壁生物合成、结构及蛋白质运输相关<sup>[4-6]</sup>。Perrone 等已经发现，酵母 *ECM25* 基因的缺失，或液泡蛋白质分选等基因的缺失，会影响 GSH 的运输途径，从而改变 GSH 的内稳态并导致其过量分泌<sup>[7-9]</sup>，但是这些菌株通常只是用于实验室研究的营养缺陷型，而工业啤酒酵母是野生型菌株，且没有关于工业啤酒酵母 *ECM25* 基因缺失和胞外分泌 GSH 的报道。

啤酒生产时酵母合成和分泌的 GSH 可以显著延长啤酒的风味保鲜期<sup>[10-12]</sup>。本次研究主要是对一株工业啤酒酵母(*Saccharomyces carlsbergensis*)G-03 通过同源重组，以卡那抗性基因替换，敲除 *ECM25* 基因，获得了一株 GSH 分泌量增加的抗老化啤酒酵母菌株 G-03/a。摇瓶发酵结果表明，转化菌酿制啤酒的风味基本保持不变，GSH 分泌量增加，成品啤酒的风味稳定性提高。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒

啤酒酵母(*Saccharomyces carlsbergensis*)M<sub>4</sub>，是

前期研究以青岛啤酒酵母青②为出发菌株通过氨基酸连续驯养得到的 GSH 合成能力提高的啤酒酵母<sup>[10]</sup>，啤酒酵母(*S. carlsbergensis*) G-03，大肠杆菌 JM109 和 DH5 $\alpha$ 为本实验室保存。质粒 pMD-18T 购自 TaKaRa 公司。pUG6 为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂

2-苯叔丁基硝酮(PBN 纯度为 98%)，聚乙二醇 3350 (PEG 3350)，单链载体 DNA(来自沙门氏试验中III型脱氧核酸钠盐)均购自 Sigma 公司。二苯代苦味酰肼自由基(DPPH 纯度为 90%)购自东京工业株式会社，PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒和 DNA marker 购自上海生工生物工程技术有限公司，Taq DNA 聚合酶、dNTP 购自上海博彩生物科技有限公司。引物由上海生工合成(表 1)。其他生化试剂均为进口或国产分析纯。

1.1.3 培养基

麦汁培养基：实验室全麦芽自制(11°P)，酒花添加量为 0.4 g/L。YPD 培养基：酵母粉 10 g/L，蛋白胨 20 g/L，葡萄糖 20 g/L；若为筛选培养基，加入 G418，使其在培养基中的终浓度为 200 mg/L。

1.2 方法

1.2.1 破坏盒的构建

以 pUG6 为模板，Pecout01、Pecout02 为引物，PCR 循环参数为：94℃，5 min；30 个循环：94℃，40 s，56℃，90 s，72℃，2 min；72℃，12 min；4℃ 保温。取 3  $\mu$ L PCR 产物用于 1%的琼脂糖凝胶电泳。将得到的破坏盒，40 管合并为 1 管(2000  $\mu$ L)，用酚及酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)抽提后，用 2.5 倍体积的无水乙醇沉淀 DNA，再用 70%乙醇洗涤 2 次，空气中干燥后，将沉淀溶于 50  $\mu$ L 的 1 $\times$ TE buffer。

表 1 PCR 介导基因破坏引物和验证引物

Table 1 Oligo nucleotides used in PCR-mediated gene disruption and verification

Primers	Sequence (5'→3')
<b>For gene knock out</b>	
Pecout01	TCGACTTATTTGCCAGCATCTGATGAAATTGGCGATAGGTCGACAACCCTTAATATAAC
Pecout02	TAGCCTGCTAACCTTGTTGCTTGCTTAAATATCTGGTGGATCTGATATCACCTAATAAC
<b>For PCR verification</b>	
PkanT02	TTCCATAGGATGGCAAGATC
PecmT02	TCTTTGTGGACTAGGGCTTC
Pecm01	ATGATAGATATCAACGTTAATAAC
Pecm02	TTACCACCTTTGTTTCATTTTCATTC

### 1.2.2 啤酒酵母感受态的制备、转化及筛选

啤酒酵母感受态的制备和转化见文献[13]。

在含 G418 终浓度为 200 mg/L 的 YPD 平板上涂布筛选转化子, 培养 5~7 d 后, 将长出的酵母在 G418 平板上再划线一次, 得到单菌落。

### 1.2.3 基因组 DNA 提取及转化菌的鉴定

基因组 DNA 的提取见文献<sup>[13]</sup>, 使用表 1 的引物进行 PCR 验证, PCR 循环参数为: 94°C, 5 min; 30 个循环: 94°C, 40 s, 50°C, 90 s, 72°C, 2 min; 72°C, 12 min; 4°C 保温。取 3  $\mu$ L PCR 产物用于 1% 的琼脂糖凝胶电泳。

### 1.2.4 转化菌的遗传稳定性

将转化菌在 YPD 斜面上连续移接 10 代, 将 10 代转化菌在含 200 mg/L G418 的 YPD 平板上划线。将第 3 代、5 代、7 代、10 代转化菌接种于 YPD 液体培养基, 180 r/min 培养 1 d, 收集细胞, 提取基因组 DNA, 以酵母基因组 DNA 为模板, PCR 验证。

### 1.2.5 低温发酵

(1) 锥形瓶发酵: 斜面菌种经扩培, 接种于含有 300 mL 麦汁的锥形瓶中, 于 11°C 低温培养箱中进行主发酵, 发酵 6 d 后, 主发酵结束, 取部分发酵液过滤测定各项理化指标及老化指标, 其余装瓶 4°C 后发酵 10 d, 进行感官品评并测定 RSV 值。

(2) EBC 发酵: 斜面菌种经扩培, 接种于含有 300 mL 麦汁的锥形瓶中, 充分振荡后加入 2.5 L 麦汁, 倾入 EBC 发酵管。第 1 天 10°C, 2~6 天 11°C 主发酵, 每天取样测定发酵液中 GSH 及酵母胞内 GSH。

### 1.2.6 发酵液中 GSH 浓度

四氧嘧啶法测定发酵液中的 GSH<sup>[14]</sup>。

### 1.2.7 酵母胞内 GSH 含量

先将酵母细胞用蒸馏水洗涤 2 次后置于 -20°C 冷冻后煮沸 15 min, 然后在浓度为 40%(V/V) 的乙醇溶液中 30°C 下振荡抽提 2 h, 测定上清液 GSH 浓度, 除以相应细胞干重得到胞内 GSH 含量。

### 1.2.8 羰基化合物含量(TBA 值)

用以二烯醛类为代表的羰基化合物浓度来表征啤酒或麦汁中老化物质的含量<sup>[15]</sup>。取 5 mL 经 10 000 r/min 离心的麦汁或啤酒样品, 加入 2 mL 含 0.33% 硫代巴比妥酸的 50% 乙酸溶液, 充分混合, 于 60°C 水浴中加热 60 min, 冰浴速冷。以 5 mL 离心后麦汁或啤酒样品加 2 mL 蒸馏水为空白, 530 nm 下比

色, 以吸光度表示 TBA 值。

### 1.2.9 分光法测定 DPPH 清除率

DPPH 溶液配制: 准确称取 20 mg DPPH, 用无水乙醇溶解并定容至 250 mL。

测定: 样品稀释 20 倍后取 2 mL 待测液及 2 mL DPPH 溶液置于一具塞试管中, 混匀, 30°C 水浴避光放置 60 min, 以无水乙醇为空白于 517 nm 测其吸光度  $A_i$ , 并以下式计算清除率<sup>[16]</sup>:

$$\text{清除率} = \left[ 1 - \frac{(A_i - A_j)}{A_c} \right] \times 100\%$$

式中:  $A_c$ : 2 mL 无水乙醇加 2 mL DPPH 溶液的吸光度;  $A_i$ : 2 mL 待测液加 2 mL DPPH 溶液的吸光度;  $A_j$ : 2 mL 待测液加 2 mL 无水乙醇的吸光度。

### 1.2.10 电子自旋共振(ESR)法测定啤酒(发酵液)中的自由基

将 0.5 mL 除气啤酒(发酵液)装入离心管, 外覆铝箔避光, 加入 PBN 溶液 10  $\mu$ L, 使其终浓度达到 2.55 mol/L, 混匀; 置于 60°C 水浴中, 促使自由基产生, 此过程称为培育, 定时取样测定。PBN 溶液配制: 451.98 g PBN/L, 溶剂为 50% 乙醇-水(V/V)。

ESR 测定条件: 中心磁场 3475.00 G; 微波功率 4 mW; 微波频率 9.7 GHz; 调制频率 200 kHz; 调制幅度 2.00 G; 温度室温; 扫描时间 3 min<sup>[17]</sup>。

### 1.2.11 啤酒风味保鲜期的预测

取同一批次的 5 瓶啤酒, 其中 1 瓶对照样品置于冰箱中保存, 另 4 瓶置于 60°C 水浴中陈化, 每 12 h 取出 1 瓶陈化啤酒放于冰箱中保存。待 4 个样品全部陈化好后, 同 1.2.8 操作, 以对照为空白, 530 nm 下测定不同陈化时间下样品的吸光度, 即为  $\Delta TBA_t$  值。风味保鲜程度(Resistance staling value, RSV)以下式表示<sup>[18]</sup>

$$RSV = \frac{1}{4} \times \left[ \frac{12}{\Delta TBA_{12}} + \frac{24}{\Delta TBA_{24}} + \frac{36}{\Delta TBA_{36}} + \frac{48}{\Delta TBA_{48}} \right]$$

不同新鲜啤酒样品的 RSV 值与啤酒的风味保鲜期基本呈线性关系。

1.2.12 细胞大小、死亡温度、生长曲线、絮凝力、麦汁浓度、酒精浓度、发酵度、 $\alpha$ -氨基氮等常规参数参见文献[19]。

## 2 结果与分析

### 2.1 *ECM25* 的克隆和序列分析

提取 G-03 染色体组 DNA, 用 Pecm01 和 Pecm02 扩增出 *ECM25*, 胶回收后连接 pMD-18T, 送上海生工测序, 全长为 1.8 kb (GenBank Accession No. EU328157)。序列分析表明, G-03 *ECM25* 的核苷酸序列与 *S. cerevisiae* Z49476 和 AY692747 (Baker's yeast) 的 *ECM25* 的同源性为 99%。根据序列设计基因破坏引物 Pecout01 和 Pecout02。

### 2.2 基因破坏盒 *ECM25-kanMX-ECM25* 的构建及啤酒酵母的转化

以含有 *kanMX* 的质粒 pUG6 为模板, Pecout01 和 Pecout02 分别在 5' 端带有与 *ECM25* 同源的 36 bp 和 35 bp, 并分别在 3' 端带有与 *kanMX* 同源的 23 bp 和 24 bp。PCR 产物 1649 bp (图 1), 与预计片段大小相符。



图 1 SFH-PCR 构建破坏盒

Fig. 1 PCR-Synthesis of disruption cassettes with small flanking homology (SFH-PCR)

M: marker ( $\lambda$ DNA/*EcoR* I+*Hind* III); 1,2: disruption cassettes

将 40 管破坏盒(2000  $\mu$ L)纯化后, 醋酸锂法转化啤酒酵母 G-03, 在含 200 mg/L G418 的 YPD 平板筛选转化子。使该基因片段的两端与 *ECM25* 发生同源重组, 从而达到破坏 *ECM25* 的目的(图 2)。将在 G418 抗性平板上生长出的菌落划线分离, 获得单菌落命名为 G-03/a。

### 2.3 转化菌的验证及遗传稳定性

转化子 DNA 水平上的鉴定先采用 PCR 来验证。提取转化菌 G-03/a 的染色体 DNA, 以 G-03/a 染色体

DNA 为模板, 引物先使用表 1 中的 Pecm01 和 Pecm02 对其 PCR, 电泳显示获不同分子量的两条扩增条带, 但是以原菌 G-03 染色体 DNA 为模板的 PCR 只出现了一个条带(图 3)。

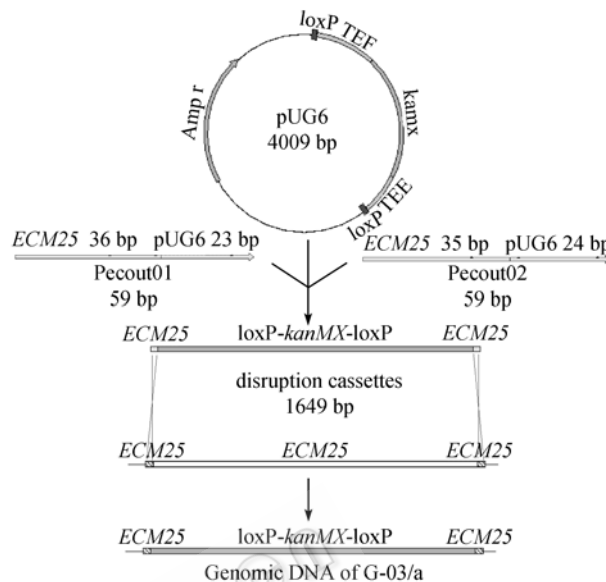


图 2 啤酒酵母工程菌的构建

Fig. 2 Construction of the recombinant industrial brewing yeast

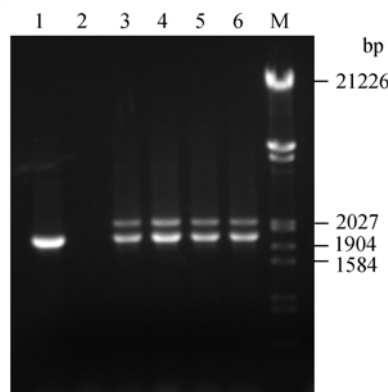


图 3 使用 Pecm01, Pecm02 验证转化菌 G03/a

Fig. 3 Detection of gene deletion events by PCR analysis using Pecm01 and Pecm02

M: marker ( $\lambda$ DNA/*EcoR* I+*Hind* III); 1: PCR product of G-03; 2: the negative control; 3~6: PCR products of G-03/a

由于转化菌 G-03/a 在 G418 抗性平板上生长, 说明至少有一个 *ECM25* 等位基因已经被 *kanMX* 替代, 而原菌 G-03 具有完整的 *ECM25*。根据上述情况, 设计 Pecm01、PecmT02 和 Pecm01、PkanT02 两对引物(表 1)进行再次验证(图 4)。结果表明, 原菌内部没有抗性基因(Lane3), 转化菌内部具有抗性基因(Lane 4), 由于工业啤酒酵母为多倍体, 转化菌可能

只敲除了多倍体酵母中的一个 *ECM25* 等位基因 (Lane 2), 可能至少还有一个完整的 *ECM25* 基因。

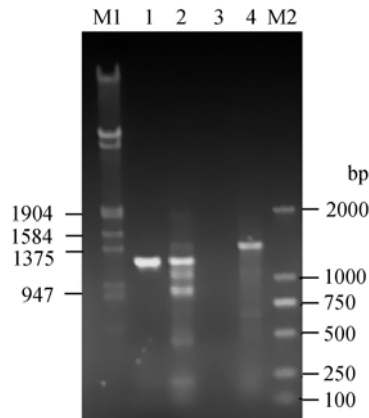


图4 转化菌基因敲除的验证

**Fig. 4 Detection of gene deletion events by PCR analysis**  
1, 3 and 2, 4 were the results of G-03 and G-03/a, respectively. The primer for 1 and 2; 3 and 4 were Pecm01-PecmT02; Pecm01-PkanT02, respectively. M1: marker ( $\lambda$ DNA/*Eco*R I+*Hind* III), M2: marker D

为进一步确认上述推测, 将图3中PCR后电泳显示的2条带胶回收, 连接 pMD-18T 后转化大肠杆菌 JM109, 送上海生工测序, 测序结果表明转化菌中一个 *ECM25* 等位基因已被 *kanMX* 替代(结果未显示), 可见转化子已经成功敲除了一个 *ECM25* 基因。

将移接10次的转化菌在含200 mg/L G418的YPD平板上划线(图5), 表明其遗传稳定性良好。

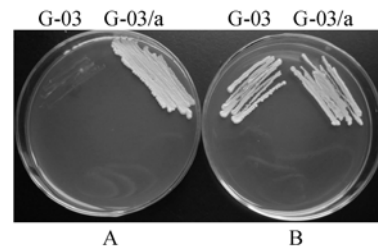


图5 转化菌的遗传稳定性

**Fig. 5 Genetic stability assay**

G-03/a: after 10th generations of culture transferring. A: YPD plate with G418 (200 mg/L), B: YPD plate

## 2.4 转化菌 G-03/a、原菌 G-03 和 $M^I_4$ 在 11°C 和 28°C 下有氧生长及胞内外 GSH 含量

由于啤酒酵母的最适生长温度为 28°C, 而主发酵过程的温度为 11°C, 故选取这两个温度点, 在有氧生长条件下, 比较转化菌 G-03/a、原菌 G-03 和  $M^I_4$  胞内外 GSH 含量。摇瓶结果如图6和图7所示。可以看出, 和原菌相比, 在 11°C 下转化菌 G-03/a 在对数生长期中期(13.5 h)的胞外 GSH 含量提高 21.4% ( $P<0.01$ ), 在 28°C 下转化菌在对数生长期中期(7 h)的胞外 GSH 含量比原菌提高 14.7% ( $P<0.01$ )。这是因为啤酒酵母在 28°C 下生长代谢旺盛, 虽然在迟滞期胞外 GSH 含量较高, 但是一些老化物质的前驱物质的产生能力和氧自由基得到加强, 导致对数生长期胞外 GSH 含量较低。通过蛋氨酸连续驯养得到的 GSH 合成能力提高的  $M^I_4$  (图7), 胞外 GSH 含量在对数生长期却没有转化菌 G-03/a 高, 这表明, *ECM25*

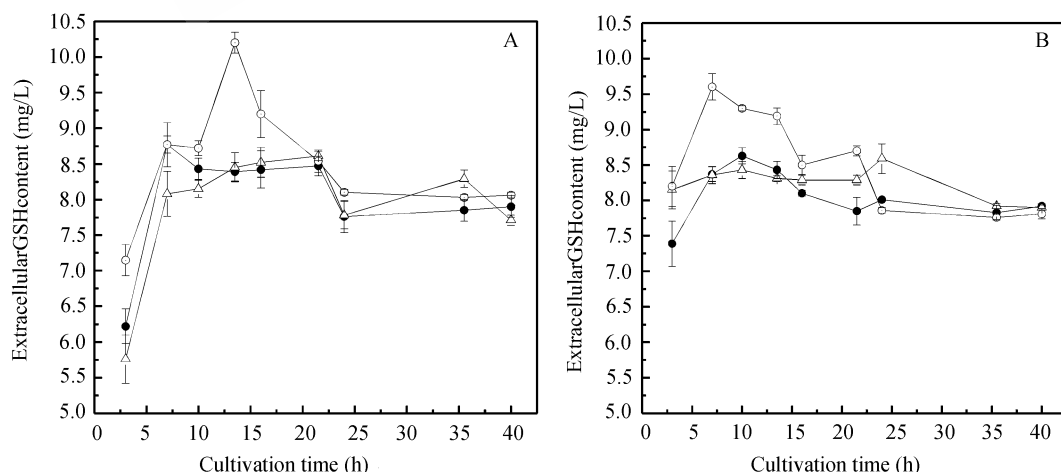


图6 在 11°C 和 28°C 下啤酒酵母有氧生长的胞外 GSH 含量

**Fig. 6 The extracellular GSH content of brewing yeast under different temperatures**

A: propagate temperature 11°C; B: propagate temperature 28°C; ●: G-03; ○: G-03/a; △:  $M^I_4$

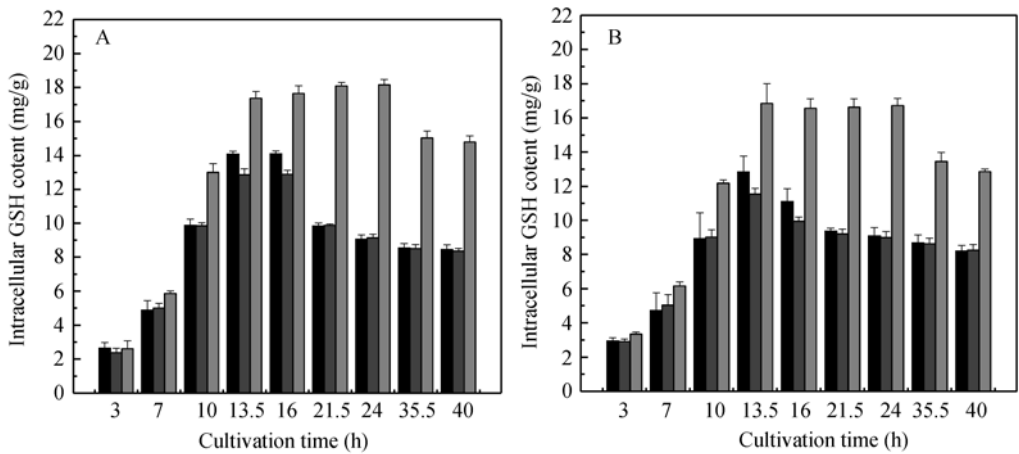


图 7 在 11°C 和 28°C 下啤酒酵母有氧生长胞内 GSH 含量  
Fig. 7 The intracellular GSH content of brewing yeast under different temperatures  
A: propagate temperature 11°C; B: propagate temperature 28°C; ■ G-03; ■ G-03/a; ■ M<sup>1</sup><sub>4</sub>

基因的敲除可以在细胞对数生长期提高 GSH 的分泌量，且在主发酵温度 11°C 下，GSH 的分泌更为有利。但是啤酒发酵过程中，啤酒酵母在大部分时间处于厌氧环境，转化菌是否会提高啤酒的风味稳定性，是否会改变其他的发酵性能？

2.5 转化菌 G-03/a 和 G-03、M<sup>1</sup><sub>4</sub> 的性能比较

2.5.1 转化菌 G-03/a 和 G-03、M<sup>1</sup><sub>4</sub> 的生理性能的比较

啤酒酵母是一个具有精密调控体系的真核生物，所以 *ECM25* 基因的敲除可能会导致其生理性能的改变。从表 2 中可以发现，和原菌 G-03 相比，转化菌 G-03/a 的死灭温度有了变化，絮凝值和α-氨基氮同化率则分别下降了 5.4% ( $P<0.05$ )和 8.3% ( $P<0.01$ )。

Coulon 也报道过在 *Kluyveromyces lactis* 酵母中谷胱甘肽的代谢和絮凝之间存在着潜在的关系，即谷胱甘肽含量高者，酵母的絮凝值会降低<sup>[20]</sup>。但是他没有给出确切的理由，只是推测谷胱甘肽的含量可能和凝集素的表达调控相关。Perrone 等报道支链氨基酸(BCAAs)的限制是影响谷胱甘肽内稳态的又一个关键因素<sup>[9]</sup>。而 BCAAs 在酿造过程中是转化成高级醇的关键。Kodama 等人发现，α-氨基氮同化率和缬氨酸、异亮氨酸和亮氨酸有着密切的联系，同时，异亮氨酸、蛋氨酸和苯丙氨酸和细胞膜流动性或稳定性相关<sup>[21]</sup>。所以，氨基酸代谢和谷胱甘肽的胞外积累有着千丝万缕的关系。对 G-03/a 和 G-03 的主酵液通过氨基酸液相分析(数据未显示)，发现下列氨基酸变化较大，天冬氨酸、谷氨酸、异亮氨酸、亮氨酸和赖氨酸含量分别上升了 25.9%、18.3%、

6.3%、6.8%和 96.6%，苯丙氨酸下降了 6.7%。  
2.5.2 转化菌 G-03/a 和 G-03、M<sup>1</sup><sub>4</sub> 的发酵性能及主要老化指标的比较

将转化菌 G-03/a 和 G-03、M<sup>1</sup><sub>4</sub> 扩培，接种于含有 300 mL 麦汁的锥形瓶中发酵，为 0 代。主发酵结束后，称取酵母泥进行下一次发酵，为 1 代。连续发酵 3 代。测试各项发酵性能指标(表 3)，常规指标没有显著变化( $P>0.05$ )。

表 2 啤酒酵母 G-03、M<sup>1</sup><sub>4</sub> 和 G-03/a 生理性能比较  
Table 2 Comparison of the physiological performance of strains G-03, M<sup>1</sup><sub>4</sub> and G-03/a (mean ± SD, n=3)

Strain	G-03	M <sup>1</sup> <sub>4</sub>	G-03/a
Lethality temperature (°C)	53	52	52
Flocculation value (%)	70.7±1.08	68.2±1.14	66.9±1.85
Alfa amino nitrogen Assimilation value (%)	48.4±0.56	43.9±0.76	44.4±0.61

表 3 低温发酵常规指标<sup>1</sup>  
Table 3 Fermentation routine parameters of the different strains<sup>1</sup> (mean ± SD, n=3)

Strain	G-03	M <sup>1</sup> <sub>4</sub>	G-03/a
Original extract (W/W, %)	11.27±0.70	11.71±0.49	10.54±0.31
Ethanol (W/W, %)	4.48±0.18	4.71±0.17	4.51±0.14
Apparent fermentation degree (%)	76.2±1.73	76.0±1.73	74.0±0.89
Fermentation degree (%)	60.3±1.32	59.8±1.59	57.3±1.56

<sup>1</sup> Data represents mean value of three samples after main fermentation, which are 1st generation, 2nd generation and 3rd generation respectively

SI (Stability index)系数能很好反应啤酒的风味稳定性，它不仅适用于同一品牌啤酒，也适用于不

同的啤酒酵母所酿制的啤酒风味稳定性评价, 具有很强的实用价值<sup>[22]</sup>。

$$SI = \frac{\text{DPPH清除率}}{\text{TBA值}} \times 100$$

转化菌 G-03/a 所酿主酵液的 SI 系数分别比 G-03 和 M<sup>1</sup><sub>4</sub> 高 7.7% ( $P < 0.05$ ) 和 1.7% (表 4)。主酵后, 转化菌 G-03/a 胞外 GSH 含量分别比 G-03 和 M<sup>1</sup><sub>4</sub> 高 32.1% ( $P < 0.05$ ) 和 6.9%。主酵液的 ESR 曲线如图 8 所示。与原菌 G-03 曲线相比, G-03/a 的曲线上升趋势先慢后快, 表明主酵液中存在快速的还原剂, 这可能是由于 GSH 与自由基发生反应, 使得在培育初期的自由基清除, 而 M<sup>1</sup><sub>4</sub> 所酿制的主酵液中存在作用缓慢的抗氧化剂, 可能是由于其胞内 GSH 在培育后期释放而使得曲线后期近零增长。

成品啤酒中 M<sup>1</sup><sub>4</sub> 的 SI 系数比 G-03 高 8.0% ( $P < 0.05$ ), 比 G-03/a 高 2.6%, G-03/a 的 SI 系数比原菌 G-03 高 5.3% ( $P < 0.05$ ) (表 4)。成品啤酒中 G-03/a 胞外 GSH 含量比 G-03 高 13.8% ( $P < 0.05$ ), 但是却比 M<sup>1</sup><sub>4</sub> 低 7.9% ( $P < 0.05$ )。成品啤酒的 RSV 值 M<sup>1</sup><sub>4</sub> 比 G-03 提高 98.3% ( $P < 0.01$ ), 比 G-03/a 提高 36.8% ( $P < 0.01$ ), G-03/a 的 RSV 值比原菌 G-03 提高 45.0% ( $P < 0.01$ )。由于 M<sup>1</sup><sub>4</sub> 是胞内合成 GSH 能力得到加强的啤酒酵母, 虽然在主酵后其胞外 GSH 含量比 G-03/a 少, 但在 10 d 的后酵过程中, 可能由于酵母自溶或其他一些原因, 其胞内的 GSH 缓慢的分泌出来, 从而使得在成品啤酒中 M<sup>1</sup><sub>4</sub> 胞外 GSH 含量和 SI 系数及 RSV 值均高于 G-03/a。这也表明, 胞内合成 GSH 能力强的啤酒酵母可能比分泌型啤酒酵母对啤酒风味稳定性有更高的贡献。而和原菌 G-03 相比, 转化菌 G-03/a 主酵后 SI 系数、胞外 GSH 含量, 成品啤酒 SI 系数、胞外 GSH 含量和 RSV 值都得到提高。经品尝, 转化菌 G-03/a 与啤酒酵母 G-03 酿制的啤酒风味基本一致。

按照 1.2.5 (B) 的方法进行 EBC 发酵, 主酵期间每天取样, 测定啤酒酵母细胞内和发酵液中 GSH 的含量。图 9 显示, 随着发酵过程的进行, 胞内 GSH 含量逐步增加并恒定, 发酵液中 GSH 含量逐步减少。这可能是因为随着发酵过程的进行, GSH 延缓了自由基反应和一些老化物质的前驱物质的产生而自身消耗了一部分。第 6 天主酵结束时 EBC 管中发酵液的 GSH 含量 G-03/a 比 G-03 高 34.0% ( $P < 0.01$ )。

表 4 低温发酵主要老化指标<sup>1</sup>

Table 4 Fermentation major staling parameters of the different strains<sup>1</sup> (mean  $\pm$  SD,  $n=3$ )

Strain	G-03	M <sup>1</sup> <sub>4</sub>	G-03/a
SI of fresh beer <sup>2</sup>	185.91 $\pm$ 5.87	196.81 $\pm$ 5.84	200.2 $\pm$ 5.80
Extracellular GSH of fresh beer <sup>2</sup>	16.5 $\pm$ 1.31	20.4 $\pm$ 1.31	21.8 $\pm$ 1.54
SI of final beer <sup>3</sup>	213.96 $\pm$ 5.43	231.13 $\pm$ 4.59	225.21 $\pm$ 3.41
Extracellular GSH of final beer <sup>3</sup>	26.8 $\pm$ 1.30	33.1 $\pm$ 1.10	30.5 $\pm$ 1.19
RSV of final beer <sup>3</sup>	100.3 $\pm$ 9.0	198.9 $\pm$ 10.2	145.4 $\pm$ 9.0

<sup>1</sup> Data represents mean value of three samples, which are 1st generation, 2nd generation and 3rd generation respectively

<sup>2</sup> Dates were analyzed after main fermentation

<sup>3</sup> Dates were analyzed after secondary fermentation

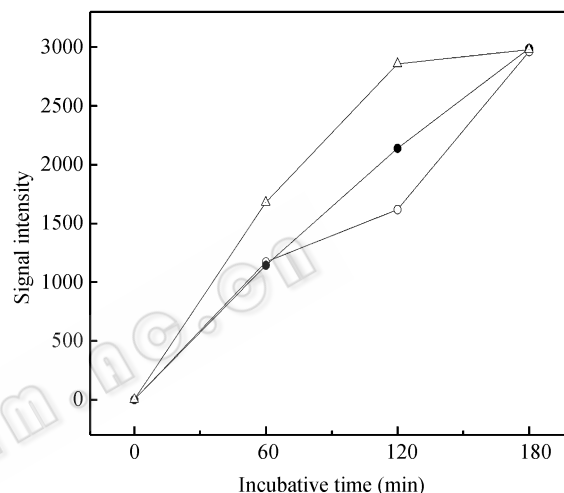


图 8 主酵液的 ESR 自由基生成曲线

Fig. 8 Free radical generation course after main fermentation

○: G-03/a; △: M<sup>1</sup><sub>4</sub>; ●: G-03

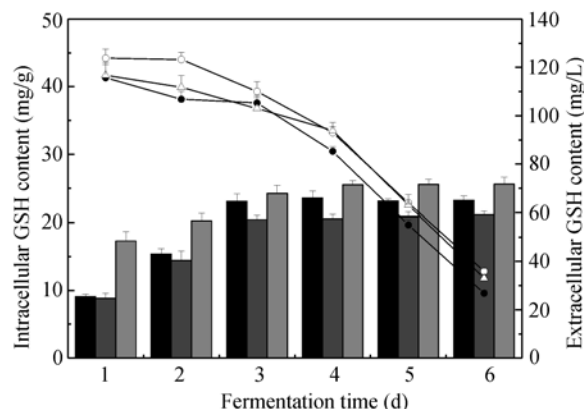


图 9 EBC 发酵过程中啤酒酵母胞内及胞外 GSH 含量  
Fig. 9 The intracellular and extracellular GSH content during EBC fermentation

■: Intracellular GSH content of G-03; ▒: Intracellular GSH content of G-03/a; ■: Intracellular GSH content of M<sup>1</sup><sub>4</sub>; ●: Extracellular GSH content of G-03; ○: Extracellular GSH content of G-03/a; △: Extracellular GSH content of M<sup>1</sup><sub>4</sub>

### 3 讨论

啤酒酵母工业菌株一般为多倍体菌株, 本实验由 G-03 敲除了一个 *ECM25* 等位基因的转化菌 G-03/a 是一株遗传性状稳定的优良啤酒酵母。和原菌相比, 转化菌能分泌较多的 GSH, 可以降低啤酒中老化前驱物质和老化物质的浓度, 因此提高了啤酒的抗老化能力, 使成品啤酒的风味稳定性得到显著改善。但是用于基因破坏的 *kanMX* 对于啤酒酵母是一个外源基因, 因此转化菌还需要对其进行敲除才可以用于实际生产。

啤酒酵母是一个具有精密调控体系的真核生物, 谷胱甘肽的分泌可能还和酵母的絮凝、膜流动性和透性、氨基酸、脂肪酸、酒精胁迫、pH 胁迫、氧胁迫等存在更为复杂的调控机制, 该设想还有待进一步证实。

### REFERENCES

- [1] Hashimoto N. Brewing science. Bristol: Stonebridge Press, 1981.
- [2] Kaneda H. Reducing activity and flavor stability of beer. *Master Brew Assoc Am*, 2000, **37**: 165–171.
- [3] Gijs L, Perpete P, Timmermans A, *et al.* Assessment of added glutathione in yeast propagations, wort fermentations, and beer storage. *Am Soc Brew Chem*, 2004, **62**(3): 97–102.
- [4] *Saccharomyces* Genome Database (SGD). [DB/OL]. <http://db.yeastgenome.org/cgi-bin/locus.pl?locus=ecm25>
- [5] Kang CM, Jiang YW. Genome-wide survey of non-essential genes required for slowed DNA synthesis-induced filamentous growth in yeast. *Yeast*, 2005, **22**: 79–90.
- [6] Gavin AC, Bösch M, Krause R, *et al.* Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature*, 2002, **415**: 141–147.
- [7] Sarry JE, Chen S, Collum RP, *et al.* Analysis of the vacuolar luminal proteome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS J*, 2007, **274**: 4287–4305.
- [8] Perrone GG, Dawes IW, Grant CM. Glutathione Production. US patent, US 20050239164A1. 2005-10-27.
- [9] Perrone GG, Grant CM, Dawes IW. Genetic and environmental factors influencing glutathione homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 2005, **16**: 218–230.
- [10] Li Q, Pan XQ, Gu GX. Improvement of beer flavor stability by screening anti-staling brewers' yeast. *Chin J Biotech*, 2004, **20**(6): 912–917.  
李崎, 潘学启, 顾国贤. 选育抗老化啤酒酵母提高啤酒风味稳定性的研究. *生物工程学报*, 2004, **20**(6): 912–991.
- [11] Zhang JN, He XP, Guo XN, *et al.* Genetically modified industrial brewing yeast with high-glutathione and low-diacetyl production. *Chin J Biotech*, 2005, **21**(6): 942–946.  
张吉娜, 何秀萍, 郭雪娜, 等. 低双乙酰抗老化啤酒酵母工程菌的构建. *生物工程学报*, 2005, **21**(6): 942–946.
- [12] Jiang K, Li Q, Gu GX. Improvement of beer anti-staling capability by genetically modifying industrial brewing yeast with high glutathione content. *Chin J Biotech*, 2007, **23**(6): 1071–1076.  
蒋凯, 李崎, 顾国贤. 构建高产谷胱甘肽啤酒酵母基因工程菌提高啤酒抗老化能力的研究. *生物工程学报*, 2007, **23**(6): 1071–1076.
- [13] Burke D, Dawson D, Stearns T. *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000.
- [14] Liu J, Wang YQ, Liu G, *et al.* Comparison of three methods for determination of glutathione. *J Beijing Univ Chem Technol*, 2004, **31**(3): 35–38.  
刘娟, 王雅琴, 刘刚, 等. 发酵液中还原型谷胱甘肽三种测定方法的改进及其比较. *北京化工大学学报*, 2004, **31**(3): 35–38.
- [15] Kaneda H. Chemical evaluation of beer flavor stability. *Master Brew Assoc Am*, 1995, **32**: 90–94.
- [16] Yan M, Li Q, Gu GX. The estimation of endogenesis antioxidative activity of beer by DPPH radical scavenging capacity. *Sci Technol Food Ind*, 2005, **26**(8): 82–83, 87.  
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*, 2005, **26**(8): 82–83, 87.
- [17] Li Q, Yan M, Li YX, *et al.* Studies on the free radicals of materials of beer and its impact on the wort by ESR method. *Chin J Anal Lab*, 2007, **26**(5): 84–88.  
李崎, 严敏, 李永仙, 等. 利用电子自旋共振(ESR)技术研究啤酒原辅料自由基及其对麦汁自由基的影响. *分析实验室*, 2007, **26**(5): 84–88.
- [18] Parsons R, Cope R. The Assessment and Prediction of Beer Flavor Stability. *Proceedings of the Congress of the European Brewery Convention*, Oxford: Information Press, 1983.
- [19] Guan DY. *Beer Industry Handbook*. Beijing: China Light Industry Press, 1982.  
管敦仪. *啤酒工业手册*. 北京: 中国轻工业出版社, 1982.
- [20] Coulon J, Matoub L, Dossot M, *et al.* Potential relationship between glutathione metabolism and flocculation in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Res*, 2007, **7**(1): 93–101.
- [21] Kodama Y, Omura F, Miyajima K *et al.* Control of higher alcohol production by manipulation of the *BAP2* gene in brewing yeast. *Am Soc Brew Chem*, 2001, **59**(4): 157–162.
- [22] Yan M. *Studies on Free Radicals and Antioxidative Activity of Beer*. Wuxi: Jiangnan University, 2005.  
严敏. *啤酒中自由基与抗氧化力初步研究*. 无锡: 江南大学, 2005.