

• 生物育种与工艺优化 •

高温高浓发酵工业啤酒酵母菌种的构建

孙中贯^{1,2}, 周波^{1,2}, 王孟祺^{1,2}, 王亚平^{1,2}, 邢爽^{1,2}, 郭学武^{1,2}, 肖冬光^{1,2}

1 天津科技大学 生物工程学院, 天津 300457

2 天津科技大学 工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津 300457

孙中贯, 周波, 王孟祺, 等. 高温高浓发酵工业啤酒酵母菌种的构建. 生物工程学报, 2019, 35(3): 522-534.

Sun ZG, Zhou B, Wang MQ, et al. Construction of industrial brewing yeast for fermentation under high temperature and high gravity condition. Chin J Biotech, 2019, 35(3): 522-534.

摘要: 高温高浓发酵技术作为一项新兴的啤酒生产技术, 它为啤酒生产带来诸多利益的同时, 也存在着发酵结束后酵母絮凝性下降、高级醇生成量过高等系列问题。为提高高温高浓发酵条件下酿酒酵母的絮凝性同时降低高级醇的合成能力, 首先构建了以酿酒酵母 *BAT2* 基因为整合位点过表达 *FLO5* 基因的菌株, 重组菌株 S6-BF 的絮凝性达到 67.67%, 比出发菌株 S6 提高了 29%, 而高级醇生成量仅降低 5.9%; 进一步构建以 *BAT2* 基因为整合位点再次过表达 *FLO5* 基因的菌株, 与出发菌株 S6 相比, 重组菌株 S6-BF2 的絮凝性提高了 63%, 达到 85.44%, 高级醇生成量下降至 159.58 mg/L, 降低了 9.0%; 通过弱化线粒体支链氨基酸转氨酶 (*BATI*) 的表达, 高级醇的生成量得到进一步的降低, 达到 142.13 mg/L, 比原始菌株 S6 降低了 18.4%, 同时重组菌株 S6-BF2B1 的絮凝性没有受到影响; 风味物质的测定结果表明啤酒中醇酯比例较为合理。研究结果对工业啤酒酵母发酵后的沉降分离和提高啤酒风味品质有着重要的意义。

关键词: 高浓发酵, 高温发酵, 工业啤酒酵母, 絮凝性, 高级醇

Construction of industrial brewing yeast for fermentation under high temperature and high gravity condition

Zhongguan Sun^{1,2}, Bo Zhou^{1,2}, Mengqi Wang^{1,2}, Yaping Wang^{1,2}, Shuang Xing^{1,2},
Xuewu Guo^{1,2}, and Dongguang Xiao^{1,2}

1 College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

2 Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

Abstract: As a new beer fermentation technology, high temperature and high gravity fermentation has brought many benefits to brewery industry, but there are also a series of problems such as the decrease of yeast flocculation ability at the end

Received: July 29, 2018; **Accepted:** October 8, 2018

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31771969), the Innovative Research Team of Tianjin Municipal Education Commission (No. TD13-5013).

Corresponding author: Dongguang Xiao. Tel/Fax: +86-22-60600019; E-mail: xdg@tust.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31771969), 天津市高等学校创新团队培养计划 (No. TD13-5013) 资助。

网络出版时间: 2019-02-22

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20190221.1541.002.html>

of fermentation and the high concentration of higher alcohols. To increase yeast flocculation ability and reduce the production of higher alcohols in high temperature and high gravity fermentation of beer, *BAT2* was replaced by the *FLO5* expression cassette to obtain the mutant strain S6-BF2. Real-time quantitative PCR showed that the relative transcriptional level of *FLO5* in S6-BF2 improved 17.8 times compared with that in S6. The flocculation ability of mutant S6-BF2 heightened by 63% compared to that of the original strain S6, and the concentration of higher alcohols decreased from 175.58 mg/L to 159.58 mg/L in high temperature and high gravity fermentation of beer. Moreover, the activity of mitochondrial branched-chain amino acid transferase was repressed, resulting in the production of higher alcohols of 142.13 mg/L, reduced by 18.4% compared to that of the original strain S6, meanwhile, the flocculation ability of mutant S6-BF2B1 kept unchanged compared to the mutant S6-BF2. The determination result of flavor compounds showed that the higher alcohols/ester ratio in beer was reasonable. This research has suggested an effective strategy for enhancing yeast flocculation ability and decreasing production of higher alcohols in high-temperature and high-gravity brewing.

Keywords: high gravity fermentation, high temperature fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*, flocculation ability, higher alcohols

啤酒高浓高温发酵是指采用较高浓度 (14 °P 以上) 的麦芽汁在较高的温度条件下进行发酵, 在啤酒成熟后过滤前, 用经处理的含饱和 CO₂ 的脱氧水将啤酒稀释成常规浓度 (10–12 °P) 的技术^[1-2]。高浓高温发酵技术在不增加糖化、发酵等生产设备的基础上, 能够大幅提高企业的生产效率, 减少能源消耗, 降低生产成本, 获得更高的经济效益。但是, 高温高浓发酵技术也会给啤酒发酵带来一系列的问题, 如啤酒风味不协调、泡沫稳定性差、发酵结束后酵母絮凝性下降等^[3-4]。

酵母菌絮凝是指酵母细胞之间相互聚集形成絮状或颗粒状细胞团, 并迅速沉降到发酵液底部的一种生理特性, 絮凝的发生是一种无性的、钙依赖的、可逆的过程^[5]。絮凝的发生依赖于絮凝蛋白与邻近细胞表面寡聚甘露糖链间的结合^[6], 而工业酵母菌株絮凝特性的差异主要是由絮凝蛋白的浓度所决定的^[7]。高浓度麦芽汁发酵结束后, 发酵液中过量存在的甘露糖等糖类物质可抑制酵母菌株的絮凝性^[8]。发酵温度较低时, 对酵母菌株絮凝性的影响较小, 酵母细胞均具有较好的絮凝性^[9-10]。有关学者认为较低的发醇温度下, 酵母的新陈代谢速度减缓, 进而缓解了 CO₂ 对酵母菌株的扰动作用, 故温度较低时酵母细胞趋于絮凝^[11]; 本课题组前期研究结果表明, 麦芽汁浓度

对工业啤酒酵母 S6 的絮凝性影响较显著, 而高温发酵对 S6 菌株的絮凝性影响较小^[12]。

Dietvorst 等研究发现在高浓度麦芽糖或葡萄糖的发酵条件下, 与甲基转移酶相关的复合蛋白 (COMPASS) 能够使 *FLO1*、*FLO5* 以及 *FLO9* 基因表达沉默, 从而导致酵母菌株的絮凝能力下降^[13]。酵母菌细胞壁上的絮凝蛋白表现出丰富的遗传多样性, 其中 *FLO5* 基因编码的絮凝蛋白与糖链的结合能力最强^[14]。

啤酒中的高级醇是酵母在发酵过程中的主要副产物之一, 是构成啤酒风味的重要物质, 适宜的高级醇含量能够增加啤酒的醇厚感, 但含量过高反而会造成酒体风味物质失衡, 饮用后产生头痛、口渴等症状^[15-16]。研究表明较高的发酵温度和麦芽汁浓度均有助于高级醇的生成^[16-17]。酵母细胞内高级醇的合成分为氨基酸分解代谢途径 (Ehrlich pathway) 和糖酵解合成代谢途径 (Harris pathway)^[18], 如图 1 所示。酿酒酵母菌株的 *BAT* 基因编码的支链氨基酸转氨酶催化支链氨基酸转氨生成高级醇的前体物 α -酮酸, 因而 *BAT* 基因的缺失将有助于抑制高级醇的合成^[19-20]。

目前有关利用代谢工程提高高浓高温发酵条件下工业啤酒酵母絮凝性同时降低高级醇合成能

力的研究还未有报道。本研究将在敲除 *BAT* 基因的基础上, 实现 *FLO5* 基因的过量表达, 以构建高温高浓发酵条件下高絮凝性、低高级醇合成能力的工业啤酒酵母优质菌株。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒

本研究所有菌株和质粒均为作者所在实验室保存, 详见表 1。重组菌株的构建均采用单片段基因重组法^[21]。

1.1.2 引物

实验中所用的引物列于表 2。

1.1.3 培养基与试剂

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10, 氯化钠 10, 酵母浸粉 5, pH 7.0, 115 °C 灭菌 20 min。需要时使用前加入氨苄青霉素至 100 μg/mL, 固体培养

基添加 20 g 琼脂, 用于大肠杆菌培养。

YEPD 培养基(g/L): 葡萄糖 20, 蛋白胨 20, 酵母浸粉 10, 自然 pH, 115 °C 灭菌 20 min。制备平板时添加 20 g 琼脂, 用于酵母培养。筛选转化子时需添加 G418 至 500 μg/mL。

YPG 半乳糖诱导培养基(g/L): 半乳糖 20, 蛋白胨 20, 酵母浸粉 10, 自然 pH, 115 °C 灭菌 20 min。

麦芽汁培养基: 采用二段式浸出糖化法。粉碎后的大麦芽, 按 1:4 的料水比于 62 °C 糖化 30 min, 随后升温至 70 °C 糖化至碘检完毕, 过滤煮沸后冷却至室温, 离心去沉淀后, 用自来水调整外观糖度至 18 °P, 115 °C 灭菌 20 min。

引物委托北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司合成。高保真性 DNA 扩增酶采用 *TransTaq* HiFi, 购自北京全式金生物技术有限公司。限制性内切酶、DNA 连接酶、去磷酸化酶购自大连宝

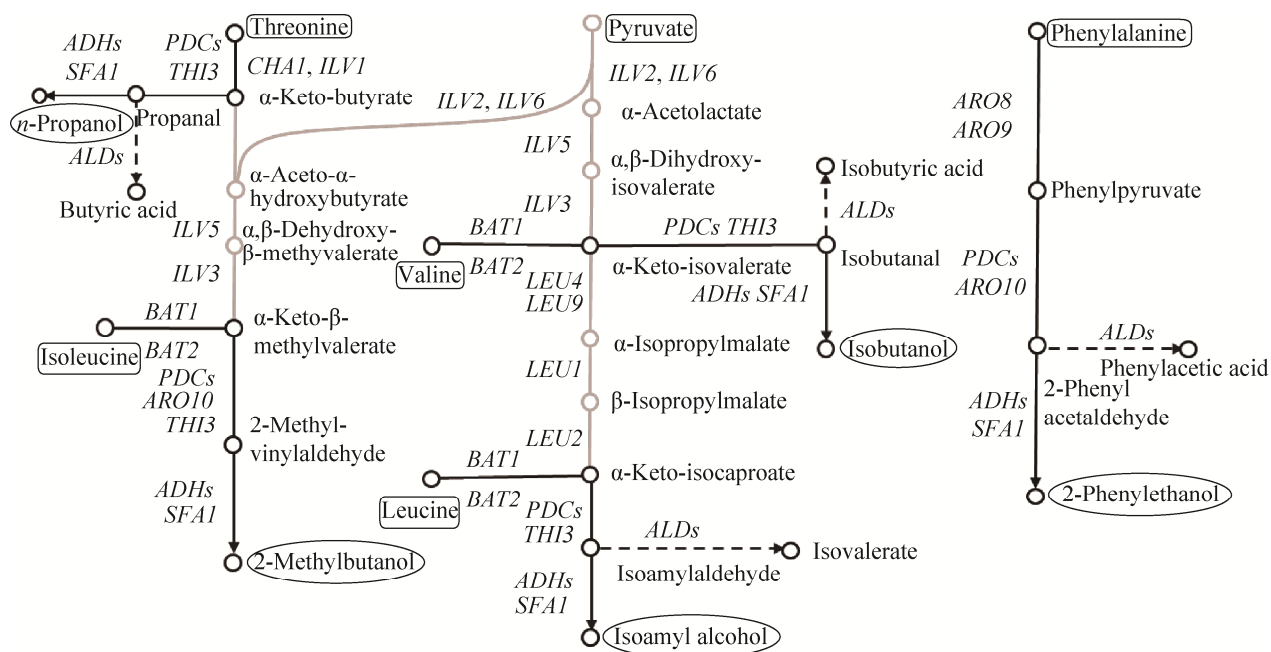


图 1 酿酒酵母高级醇合成代谢网络图

Fig. 1 Biosynthetic pathways for higher alcohols formation in *Saccharomyces cerevisiae*. Black solid lines represent that the higher alcohols are derived from the Ehrlich pathway. Gray solid lines represent that the higher alcohols are derived from the Harris pathway. Black dotted lines represent the synthesis of corresponding carboxylic acids.

表 1 本研究所用菌株及质粒

Table 1 Strains and plasmids in this study

Name	Description	Source
Strains		
<i>E. coli</i> DH5 α	Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 <i>lacU</i> 169 <i>recA</i> 1 <i>endA</i> 1 <i>hsdR</i> 17 <i>supE</i> 44 <i>thi</i> -1 <i>gyrA</i> <i>relA</i> 1	Lab collection
S6	Industrial diploid brewer's yeast; <i>Saccharomyces pastorianus</i>	Lab collection
S6-BF	S6 <i>BAT2</i> / Δ <i>bat2</i> :: <i>PGK1</i> _p - <i>FLO5</i> - <i>PGK1</i> _T - <i>loxP</i> - <i>KanMX</i> - <i>loxP</i>	This study
S6-BFK	S6 <i>BAT2</i> / Δ <i>bat2</i> :: <i>PGK1</i> _p - <i>FLO5</i> - <i>PGK1</i> _T - <i>loxP</i>	This study
S6-BF2	S6 Δ <i>bat2</i> :: <i>PGK1</i> _p - <i>FLO5</i> - <i>PGK1</i> _T - <i>loxP</i> / Δ <i>bat2</i> :: <i>PGK1</i> _p - <i>FLO5</i> - <i>PGK1</i> _T - <i>loxP</i> - <i>KanMX</i> - <i>loxP</i>	This study
S6-BF2K	S6 Δ <i>bat2</i> :: <i>PGK1</i> _p - <i>FLO5</i> - <i>PGK1</i> _T - <i>loxP</i> / Δ <i>bat2</i> :: <i>PGK1</i> _p - <i>FLO5</i> - <i>PGK1</i> _T - <i>loxP</i>	This study
S6-BF2B1	S6 Δ <i>bat2</i> :: <i>PGK1</i> _p - <i>FLO5</i> - <i>PGK1</i> _T - <i>loxP</i> / Δ <i>bat2</i> :: <i>PGK1</i> _p - <i>FLO5</i> - <i>PGK1</i> _T - <i>loxP</i> / <i>BAT1</i> / Δ <i>bat1</i> :: <i>loxP</i> - <i>KanMX</i> - <i>loxP</i>	This study
Plasmids		
pUG6	Kan ^r , containing <i>loxP</i> - <i>KanMX</i> - <i>loxP</i> disruption cassette	Lab collection
pSH-Zeocin	Zeo ^r , Cre recombinant enzyme expression vector	Lab collection
pUC19	Ap ^r , cloning vector	Invitrogen
Yep-PGK	Ap ^r , containing <i>PGK1</i> _p - <i>PGK1</i> _T expression cassette	Lab collection
Yep352	URA3 ^r , Ampr ori control vector	Invitrogen
Yp-AFKB	Ap ^r , Kan ^r , containing the BA- <i>PGK1</i> _p - <i>FLO5</i> - <i>PGK1</i> _T - <i>loxP</i> - <i>KanMX</i> - <i>loxP</i> -BB gene expression cassette	This study
Yp-A2FKB2	Ap ^r , Kan ^r , containing the BA2- <i>PGK1</i> _p - <i>FLO5</i> - <i>PGK1</i> _T - <i>loxP</i> - <i>KanMX</i> - <i>loxP</i> -BB2 gene expression cassette	This study
pUC-A1KB1	Ap ^r , Kan ^r , containing the A1- <i>loxP</i> - <i>KanMX</i> - <i>loxP</i> -B1 gene expression cassette	This study

生物工程有限公司。质粒提取试剂盒和酵母菌总 DNA 提取试剂盒购自大连宝生物公司。硫酸盐遗传霉素 (G418)、氨基青霉素、卡那霉素、博来霉素 (Zeocin) 购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。鲑鱼精 DNA 购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 啤酒发酵实验

1.2.1 菌种活化

将甘油管中保存菌种转接至 YEPD 斜面试管 30 °C 活化培养 2 d。

1.2.2 一级种子培养

取活化后的斜面菌种一环, 接种于装有 5 mL 12 °P 麦芽汁培养基的试管中, 在 28 °C、180 r/min 条件下培养 24 h。

1.2.3 二级种子培养

一级种子液按 10% (V/V) 的接种量接入装有 50 mL 12 °P 麦芽汁培养基的 150 mL 三角瓶内,

16 °C 静置培养 72 h。

1.2.4 啤酒发酵

二级种子液经离心无菌水洗涤 2 次后得到的酵母泥, 按 0.5% (W/V) 的接种量接入盛有 150 mL 18 °P 麦芽汁培养基的 250 mL 三角瓶内, 16 °C 下静置发酵。

1.3 方法

1.3.1 目的片段的扩增与质粒构建

以酿酒酵母 S6 菌株的基因组 DNA 为模板, 利用引物对 FLO5-U/FLO5-D、BA-U/BA-D、BB-U/BB-D、BA2-U/BA2-D、BB2-U/BB2-D、A1-U/A1-D、B1-U/B1-D 扩增 FLO5 基因、BAT2 基因的 2 条上游同源序列 BA 和 BA2、2 条下游同源序列 BB 和 BB2 以及 BAT1 基因的上下游同源序列 A1 和 B1。以质粒 pUG6 为模板, K-U 和 K-D 为引物对扩增 KanMX 片段。

将目的基因 FLO5 经 Xho I 酶切处理并去磷

酸化后, 用 In-fusion 酶连接至相应切口的质粒 Yep-PGK 中, 转化验证后依次将经 *Bam*H I 酶切并磷酸化后的 *KanMX* 片段, 经 *Sma* I 酶切并磷酸

化后的 BA 片段, 经 *Sph* I 酶切并磷酸化后的 BB 片段, 连接到表达载体 Yep-PGK 相应的位点上并进行转化验证, 得到质粒 Yp-AFKB。

表 2 用于基因扩增的引物

Table 2 Primers used for PCR

Primer name	Primer sequence (5'-3')
For plasmid construction	
FLO5-U	TCCAGATCT <u>CCTCGAG</u> ATGACAATTGCACACCACTGCATATT
FLO5-D	TCGCAGATCC <u>CCTCGAG</u> TAAATAATTGCCAGCAATAAGGACG
BA-U	TCCCCCGGGAAAGAGACTGAGAAACCTACTCCCAA
BA-D	TCCCCCGGGAAACTCGTGGAGATGCTTTCCTTA
BB-U	CATGCATGCAGTATCGCTATTGCTACGTAAAG
BB-D	CATGCATGCAGTTAGCTGTTTGAAGATCGGTC
BA2-U	TCCCCCGGGTAAGAACGATATGACCTTGG
BA2-D	TCCCCCGGGTCTGTAAAGCCTTCATCC
BB2-U	CATGCATGCTGGACCATTAGTGAACGC
BB2-D	CATGCATGCCAGTAACAACCCTTGACCA
A1-U	CGGAATTCACGGCAAGGAAAGGGTTT
A1-D	CGGGATCCATTACGCTTTACAGTTCA
B1-U	CGGGATCCATCATCGTGGCATAACAGG
B1-D	AACTGCAGCAATCGAAAGCATAGCAG
K-U	CGGGATCCAGCTGAAGCTTCGTACGCT
K-D	CGGGATCCGCATAGGCCACTAGTGGATCTG
For PCR verification	
B-U	ATGTCGCCCGCGTCAATA
K-X	CAAGACTGTCAAGGAGGGTA
K-D1	ACTAACGCCGCCATCCAG
P-U	GTTTCGGGTTTCAGCGTATT
B-D	TGACAAAGGGAGTAGCAT
A1-S	ATGCTGAATCGTAGCGTCTT
A1-X	ATCGCGTATTTTCGTCTCG
B1-S	TCAGTGGCAAATCCTAAC
B1-X	CTCTAGCCCAAGAAGTGT
For real-time qPCR	
ACT1-F	GGTAACGAAAGATTCAGAGC
ACT1-R	AGGTAGTCAAAGAAGCCAAG
FLO5-F	TCAATCACGCTGAAACAC
FLO5-R	AGGACGCAATGAAGACAC
BAT2-F	GTCATTTGCTGCCCTGTG
BAT2-R	GTTCTTCTTGCCCGTTT
BAT1-F	GCCGCTAGAATTTGTTTG
BAT1-R	AAGGACCGACTGGAGAAG

The underlined characters indicated restriction sites for plasmid construction.

将经 *Sma* I 酶切并磷酸化后的 BA2 片段, 经 *Sph* I 酶切并磷酸化后的 BB2 片段, 依次连接到含有 *KanMX* 片段的表达载体 *Yep-PGK* 相应的位点上, 转化验证后得到质粒 *Yp-A2FKB2*。

将 *BAT1* 基因的上游同源序列 A1 片段用 *EcoR* I 和 *BamH* I 进行双酶切, 连接到相应切口的质粒 *pUC19* 中, 转化验证后再将质粒用 *BamH* I 和 *Pst* I 进行双酶切, 与经同样酶切后的 *BAT1* 基因的下游同源序列 B1 片段连接, 转化验证后将 *KanMX* 基因片段用 *BamH* I 进行单酶切, 连接到重组质粒 *pUC19* 相应的位点上, 转化验证后得到质粒 *pUC-A1KB1*。

以质粒 *YP-AFKB* 为模板, BA-U 和 BB-D 为引物对, PCR 扩增目的片段, 经纯化回收、测序后, 得到敲除 *BAT2* 基因一个等位基因同时过表达 *FLO5* 基因的重组片段 BA+*KanMX*+*PGKp*+*FLO5*+*PGKt*+BB; 以质粒 *YP-A2FKB2* 为模板, BA2-U 和 BB2-D 为引物对, PCR 扩增目的片段, 经纯化回收、测序后, 得到敲除 *BAT2* 基因的另一个等位基因同时过表达 *FLO5* 基因的重组片段 BA2+*KanMX*+*PGKp*+*FLO5*+*PGKt*+BB2; 以质粒 *pUC-A1KB1* 为模板, A1-U 和 B1-D 为引物对, PCR 扩增目的片段, 经纯化回收、测序后, 得到敲除 *BAT1* 基因一个等位基因的重组片段 A1+*KanMX*+B1。

1.3.2 酵母的转化和重组子的筛选

酵母的转化采用 *LiAc/SS carrier DNA/PEG* 法^[22]。利用 G418 筛选转化子, 提取转化子基因组进行 PCR 定点验证。

1.3.3 *KanMX* 抗性基因的去除

采用 *Cre/loxP* 报告基因挽救系统^[23], 剔除阳性转化子中的筛选标记基因 *KanMX*。利用影印平板法筛选转化子, 以 K-U/K-D 为引物对进行 PCR 验证。

1.3.4 Real-Time qPCR 测定基因转录水平

酵母 RNA 的提取及 RNA 的反转录均按照产品说明书进行操作, 使用 *SYBR®Premix Ex Taq™ II*

(*TaKaRa*) 试剂盒进行实时荧光定量 PCR, 通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值法对目的基因及内参基因 *ACT1* 进行基因表达量的分析。

1.3.5 CO₂ 排放量的测定

发酵前预先称量发酵体系总重, 发酵过程中每隔 12 h 称重一次, 称重前应先摇晃三角瓶, 以去除发酵液中的 CO₂, 当失重小于 0.1 g 时, 表示发酵已经结束。

1.3.6 酵母菌絮凝能力的测定

采用光密度改良法对酵母菌絮凝能力进行测定^[24]。

1.3.7 啤酒中高级醇含量的测定

啤酒发酵液经蒸馏后得到的样品使用气相色谱法 (*Agilent*, USA) 测定。色谱条件为: 色谱柱 *LAP-930*, 50 m×0.32 mm×1.0 μm; 检测器为氢火焰离子化检测器。初始柱温为 50 °C, 保持 8 min, 以 5 °C/min 的升温速度升至 200 °C, 保持 5 min, 进样量为 1.0 μL, 分流比为 10:1。

1.3.8 其他发酵参数的测定

利用手持糖度计测定原麦汁的表观糖度; 利用斐林试剂法测定发酵液中还原糖的含量; 酒精度、发酵度及双乙酰的测定依据啤酒分析方法进行测定。

2 结果与分析

2.1 重组菌株 S6-BF 的构建与性能分析

为了提高高温高浓发酵条件下工业啤酒酵母 S6 的絮凝能力, 同时降低高级醇的生成量; 选择 *BAT2* 基因为重组片段的整合位点, 将重组片段 BA+*KanMX*+*PGKp*+*FLO5*+*PGKt*+BB 整合到出发菌株 S6 的基因组中。对在 G418 浓度为 500 mg/L 的 *YEPD* 平板上生长的转化子进行 PCR 验证。转化子的 PCR 验证结果表明, 重组片段成功整合到酵母 S6 基因组中相应的位点, 将得到的阳性转化子命名为 S6-BF (图 2)。

以出发菌株 S6 为对照菌株, 分析重组菌株

S6-BF、*BAT2* 基因单敲除重组菌株 S6-SB2 及 *FLO5* 基因单过表达重组菌株 S6-SF5 的 *BAT2* 基因与 *FLO5* 基因转录水平、絮凝能力、高级醇合成能力以及发酵性能。基因转录水平分析结果表明, *FLO5* 基因在重组菌株 S6-BF 中的转录水平较出发菌株得到了非常显著的提高, 约为出发菌株的 12 倍; 与重组菌株 S6-SF5 相比, *FLO5* 基因在重组菌株 S6-BF 中的转录水平无显著变化, 表明 *BAT2* 基因的单敲除对 *FLO5* 基因的转录水平没有明显的影响 (图 3A); 同时, 絮凝能力分析结果显示, 重组菌株 S6-SF5 与 S6-BF 的絮凝能力均得到非常显著的提升, 是出发菌株 S6 絮凝能力的 1.3 倍 (图 3B)。与出发菌株相比, 重组菌株 S6-BF 的 *BAT2* 基因转录水平显著降低, 约为出发菌株的 0.6 倍, 且 *FLO5* 基因的过量表达没有对 *BAT2* 基因的转录水平产生影响 (图 3A); 在高级醇类物质中, 仅有异戊醇的合成量得到非常显著的降低, 但降低量仅有 7.3%, 其他高级醇的合成水平均没有显著的变化, 同时重组菌株 S6-BF 絮凝能力的提高对高级醇的合成没有产生影响 (图 3C)。由表 3 可知, *BAT2* 基因的单敲除、*FLO5* 基因的

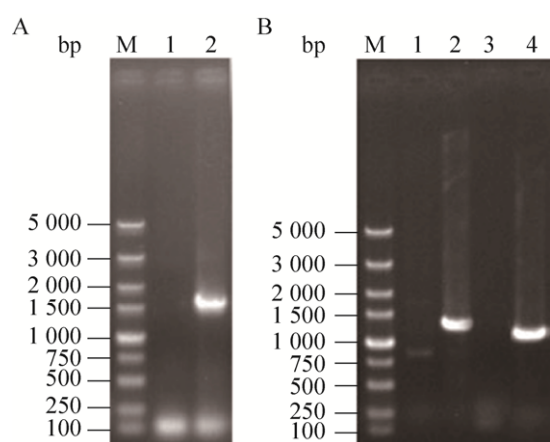


图 2 重组菌株 S6-BF 的 PCR 验证

Fig. 2 The PCR verification of the mutant strain S6-BF. M: DL5000 DNA marker. (A) Primers: K-U and K-D. 1: S6; 2: S6-BF. (B) 1-2: primers: B-U and K-D1; 1: S6; 2: S6-BF. 3-4: primers: P-U and B-D; 3: S6; 4: S6-BF.

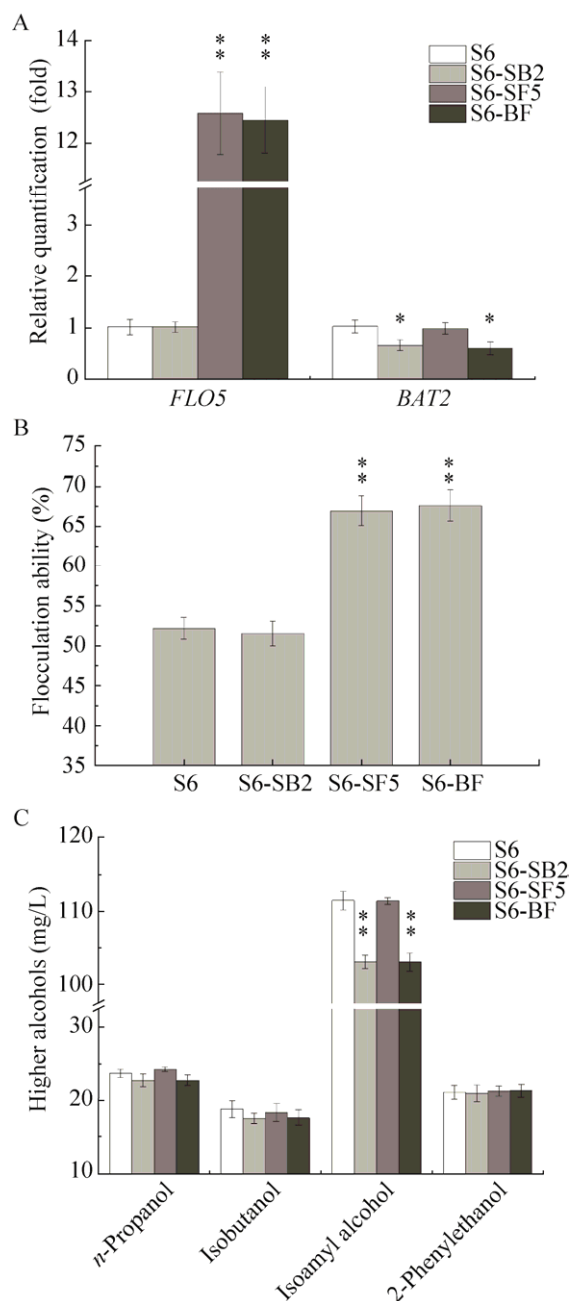


图 3 重组菌株 S6-SB2、S6-SF5 及 S6-BF 基因转录水平及性能分析

Fig. 3 Transcriptional levels and characteristics of S6-SB2, S6-SF5, S6-BF and parent S6. (A) Transcriptional levels of *FLO5*, *BAT2* genes in mutants and the parental strain. (B) Flocculation ability of mutants and the parental strain. The flocculation ability was analyzed using the standard method. (C) The final levels of higher alcohols in mutants and the parental strain. Data are presented as the means of the results of three independent experiments. Error bars indicate standard deviations. Note: ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

单过表达以及 *BAT2* 基因与 *FLO5* 基因的组合敲除过表达对菌株 S6 的发酵能力都没有产生显著的影响, 因而可以通过再次降低 *BAT2* 基因表达量同时过量表达 *FLO5* 基因的方式, 以期提高出发菌株 S6 的絮凝能力同时降低高级醇的合成水平。

2.2 重组菌株 S6-BF2 的构建与性能分析

以重组菌株 S6-BF 为出发菌株, 构建 *FLO5* 基因过量表达的重组菌株, 需要再次利用 *KanMX* 抗性基因作为筛选标记, 因而必须剔除存在于重组菌株 S6-BF 基因组上的 *KanMX* 抗性基因。利

用 *Cre/loxP* 报告基因挽救系统可以实现 *KanMX* 抗性标记的剔除和反复利用。

重组菌株 S6-BF 基因组中 *KanMX* 抗性基因剔除的 PCR 验证结果如图 4A 所示, 将得到的阳性转化子命名为 S6-BFK。选择重组菌株 S6-BFK 的 *BAT2* 基因为整合位点, 采用缩进式基因整合的方式, 即同源序列 BA2 位于同源序列 BA 的下游区域, 同源序列 BB2 位于同源序列 BB 的上游区域, 且同源序列彼此之间均无重复区域, 将重组片段 BA2+*KanMX*+*PGKp*+*FLO5*+*PGKt*+BB2 整合到重组菌株 S6-BFK 的基因组中。对在 G418

表 3 原始菌株 S6 与重组菌株发酵能力分析

Table 3 The fermentation performances of mutants and parent S6

Strains	Fermentation time (d)	CO ₂ release (g)	End extract (g/L)	Ethanol (% , V/V)	Fermentation degree (%)
S6	10	9.43±0.058	9.3±0.08	6.64±0.07	70.42±1.21
S6-SB2	10	9.43±0.110	9.4±0.07	6.72±0.11	70.01±1.01
S6-SF5	10	9.40±0.058	9.3±0.06	6.68±0.10	69.85±0.88
S6-BF	10	9.33±0.058	9.4±0.11	6.50±0.12	69.81±1.54
S6-DB2	10	9.40±0.000	9.4±0.08	6.52±0.07	70.23±1.37
S6-DF5	10	9.43±0.058	9.3±0.07	6.60±0.08	70.65±1.21
S6-BF2	10	9.43±0.000	9.4±0.05	6.57±0.11	70.21±0.91
S6-SB1	10	9.33±0.058	9.3±0.05	6.67±0.07	70.55±1.41
S6-BF2B1	10	9.50±0.100	9.5±0.06	6.71±0.09	69.68±1.58

Data are presented as the means of the results of three independent experiments. ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$.

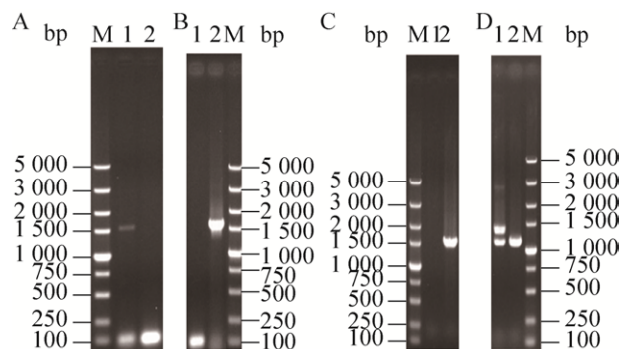


图 4 重组菌株 S6-BF2 的 PCR 验证

Fig. 4 The PCR verification of the mutant strain S6-BF2. M: DL5000 DNA marker. (A) Primers: K-U and K-D. 1: S6-BF; 2: S6-BFK. (B) Primers: K-U and K-D. 1: S6-BFK; 2: S6-BF2. (C) Primers: B-U and K-D1. 1: S6-BFK; 2: S6-BF2. (D) Primers: P-U and B-D. 1: S6-BFK; 2: S6-BF2.

浓度为 500 mg/L 的 YEPD 平板上生长的转化子进行 PCR 验证。转化子的 PCR 验证结果表明, 重组片段成功整合到酵母 S6 基因组中相应的位点, 将得到的阳性转化子命名为 S6-BF2 (图 4B)。

以原始菌株 S6 为对照菌株, 测定 *BAT2* 基因双敲重组菌株 S6-DB2、*FLO5* 基因两次过表达重组菌株 S6-DF5 以及重组菌株 S6-BF2 的 *BAT2* 基因与 *FLO5* 基因转录水平、絮凝能力、高级醇合成能力及发酵性能。*FLO5* 基因在重组菌株 S6-BF2 中的转录水平得到了进一步的提高, 较原始菌株 S6 提高了 17.8 倍, 与重组菌株 S6-DF5 中 *FLO5* 基因转录水平无显著差异 (图 5A); 同时, 重组菌株 S6-BF2 的絮凝能力与重组菌株 S6-DF5

的絮凝能力没有明显的差异,均较原始菌株 S6 提高了 62.8%,絮凝能力达到了 85.44% (图 5B)。同时实验结果也表明 *BAT2* 基因功能的缺失没有对重组菌株的絮凝性产生显著的影响。在重组菌株 S6-DB2 和 S6-BF2 中没有检测到 *BAT2* 基因的转录 (图 5A),表明重组菌株 S6-DB2 和 S6-BF2 基因组上的 *BAT2* 基因已被全部破坏无法正常表达。重组菌株 S6-BF2 合成高级醇的能力也有显著降低,其中异戊醇的合成量下降最为明显;与原始菌株 S6 相比,重组菌株 S6-BF2 合成高级醇的能力降低了 9.15%,与重组菌株 S6-DB2 的高级醇合成能力保持一致,实验结果表明重组菌株絮凝能力的提高没有对高级醇的合成能力产生影响 (图 5C)。由表 3 可知,重组菌株 S6-BF2 的发酵能力与原始菌株 S6 相比没有显著变化,表明 *FLO5* 基因的过量表达及 *BAT2* 基因功能的缺失没有对工业酿酒酵母 S6 的发酵能力产生影响,同时也表明在 *BAT2* 基因和 *FLO5* 基因的改造过程中不存在相互协同或相互干扰的现象,且基因 *BAT2* 是酿酒酵母 S6 的非必需基因。

虽然重组菌株高级醇的合成能力下降较为显著,但将高浓啤酒稀释 50%至常规浓度 (12 °P) 后高级醇的含量仍然高于优质拉格啤酒所要求的高级醇含量的最适浓度^[15]。酿酒酵母基因组中存在着 *BAT2* 基因的同源基因 *BAT1*,而 *BAT1* 基因所编码的蛋白同样具有支链氨基酸转氨酶的作用。以重组菌株 S6-BF2 为出发菌株敲除 *BAT1* 基因,考察 *BAT1* 基因的缺失对重组菌株高级醇合成能力的影响。

2.3 重组菌株 S6-BF2B1 的构建与性能分析

以重组菌株 S6-BF2 为出发菌株实现对 *BAT1* 基因的敲除仍然需要以 *KanMX* 抗性基因为筛选标记,因此在构建菌株之前需要剔除重组菌株 S6-BF2 基因组中的 *KanMX* 抗性基因。试验方法及验证同重组菌株 S6-BFK 的构建过程,将剔除

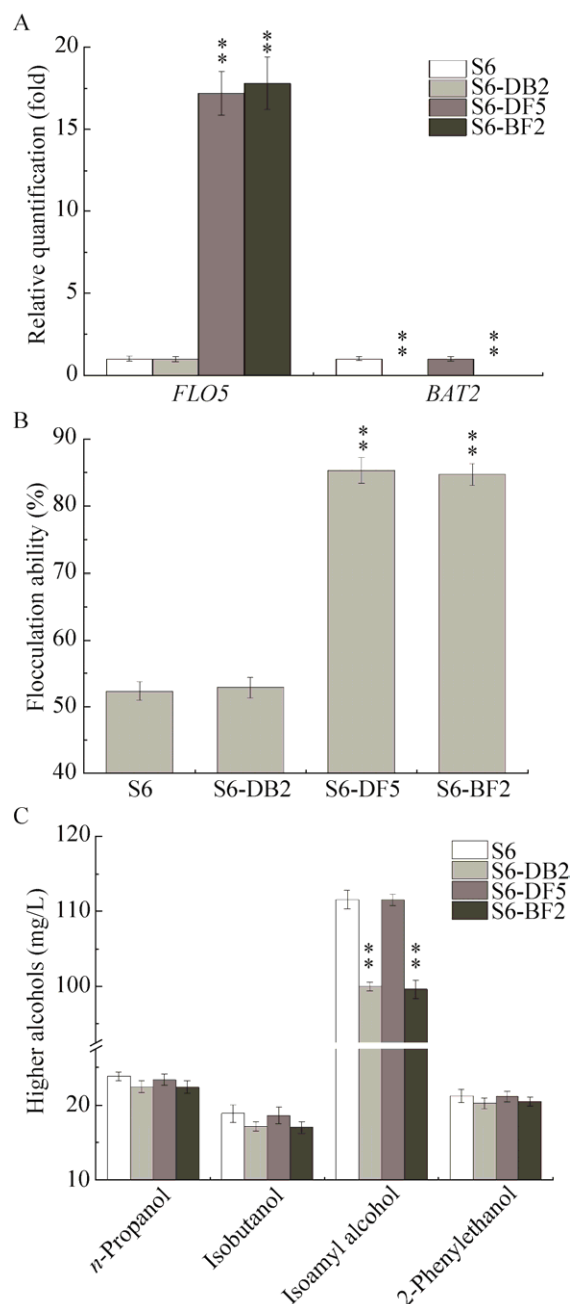


图 5 重组菌株 S6-DB2、S6-DF5 及 S6-BF2 基因转录水平及性能分析

Fig. 5 Transcriptional levels and characteristics of S6-DB2, S6-DF5, S6-BF2 and parent S6. (A) Transcriptional levels of *FLO5*, *BAT2* genes in mutants and the parental strain. (B) Flocculation ability of mutants and the parental strain. The flocculation ability was analyzed using the standard method. (C) The final levels of higher alcohols in mutants and the parental strain. Data are presented as the means of the results of three independent experiments. Error bars indicate standard deviations. Note: ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$.

KanMX 抗性基因的重组菌株命名为 S6-BF2K。PCR 验证结果如图 6A 所示。将重组片段 A1+*KanMX*+B1 转化至重组菌株 S6-BF2K 基因组中并进行 PCR 验证,同时测定 *BAT1* 基因的转录水平、阳性转化子及 *BAT1* 基因单敲除重组菌株 S6-SB1 的发酵性能、絮凝能力及高级醇合成水平。转化子的 PCR 验证结果表明,重组片段 A1+*KanMX*+B1 已整合到重组菌株 S6-BF2K 基因组中相应的位点,将得到的阳性转化子命名为 S6-BF2B1 (图 6B)。

基因转录水平分析结果表明,与原始菌株 S6 相比,重组菌株 S6-BF2B1 的 *BAT1* 基因转录水平下降显著,是原始菌株 *BAT1* 基因转录水平的 56.33%;重组菌株 S6-BF2B1 中 *FLO5*、*BAT2* 基因的转录水平与重组菌株 S6-BF2 相比没有发生明显的变化,且重组菌株 S6-SB1 中 *FLO5*、*BAT2* 基因的转录水平与原始菌株 S6 保持一致,证明 *BAT1* 基因的单次敲除没有对 *FLO5*、*BAT2* 基因的转录水平造成任何影响 (图 7A)。酵母絮凝性分析试验结果显示,重组菌株 S6-BF2B1 的絮凝

性是原始菌株絮凝性的 1.62 倍,这一水平与重组菌株 S6-BF2 的絮凝能力相当,同时 *BAT1* 基因的单敲除没有对菌株 S6 的絮凝能力产生影响,表明 *BAT1* 基因的单敲除没有影响菌株的絮凝能力 (图 7B)。重组菌株 S6-SB1、S6-BF2B1 的高级醇合成水平与原始菌株相比均有显著降低,重组菌株 S6-BF2B1 高级醇的合成量降低了 19.05%,由原始菌株 S6 的 175.58 mg/L 下降至 142.13 mg/L (图 7C)。将重组菌株 S6-BF2B1 高温高浓发酵液稀释 50% 至常规浓度 (12 °P) 时,高级醇含量与原始菌株 S6 在 10 °C 发酵条件下的高级醇生成量基本相当^[12]。试验结果表明,*BAT1* 基因功能的部分缺失有助于降低工业酿酒酵母 S6 的高级醇合成能力,且对出发菌株的发酵性能没有产生显著的影响 (表 3);获得的重组菌株 S6-BF2B1 能够在高温高浓的酿造条件下有效提高酿酒酵母的絮凝性同时显著降低高级醇的生成量。

2.4 重组菌株 S6-BF2B1 风味物质的测定

在高温高浓的发酵条件下进行啤酒发酵实验,待主发酵结束后,对重组菌株 S6-BF2B1 及原始菌株 S6 代谢产生的主要风味物质进行了测定,结果如表 4 所示。

由表 4 可以看出,与原始菌株 S6 相比,重组菌株 S6-BF2B1 的高级醇合成能力及酯类物质的合成水平均有显著的降低,醇酯比例由原始菌株 S6 的 3.42 上升至 4.08,达到拉格啤酒要求的较为适宜的醇酯比例 (1:4-1:5);双乙酰的含量没有发生较为显著的变化。高级醇中异戊醇的含量降低最为明显,从而导致乙酸异戊酯的含量显著降低;此外,重组菌株 S6-BF2B1 合成乙酸乙酯的能力也明显下降,这是否与 *BAT* 基因功能的减弱有关,还有待于进一步的研究。由于本研究中的啤酒发酵是实验室锥形瓶小试发酵,只是完成了啤酒主发酵阶段的实验没有进行后发酵和低温贮藏,因而啤酒中双乙酰的含量未能达到成熟啤酒的要求 (双乙酰阈值范围为 0.10-0.15 mg/L)。

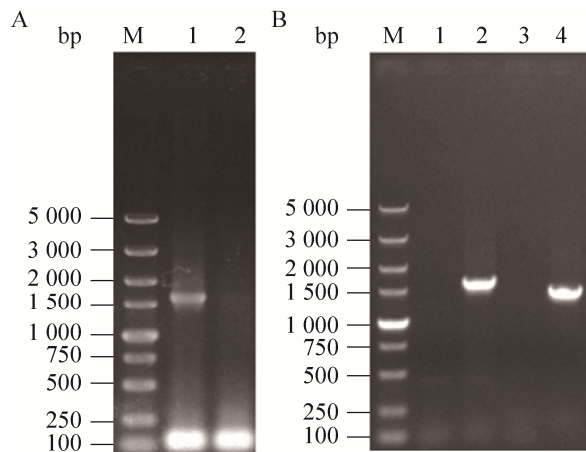


图 6 重组菌株 S6-BF2B1 的 PCR 验证

Fig. 6 The PCR verification of the mutant strain S6-BF2B1. M: DL5000 DNA marker. (A) Primers: K-U and K-D. 1: S6-BF2; 2: S6-BF2K. (B) 1-2: primers: A1-S and A1-X. 1: S6-BF2K; 2: S6-BF2B1. 3-4: primers: B1-S and B1-X. 3: S6-BF2K; 4: S6-BF2B1.

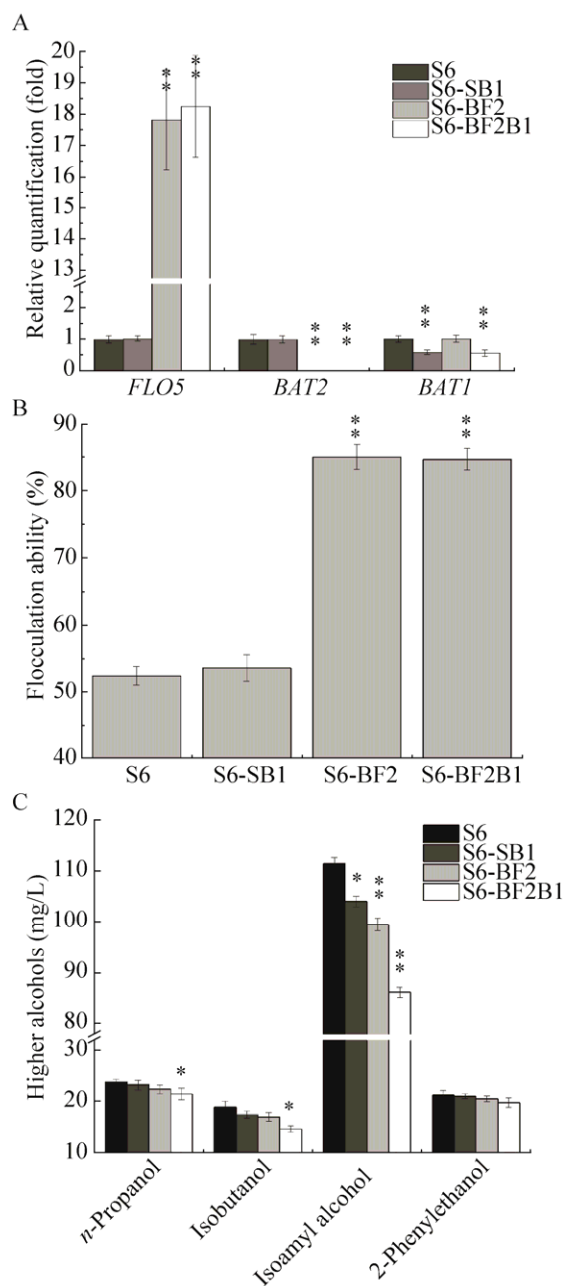


图7 重组菌株 S6-SB1、S6-BF2 及 S6-BF2B1 基因转录水平及性能分析

Fig. 7 Transcriptional levels and characteristics of S6-SB1, S6-BF2, S6-BF2B1 and parent S6. (A) Transcriptional levels of *FLO5*, *BAT2*, *BAT1* genes in mutants and the parental strain. (B) Flocculation ability of mutants and the parental strain. The flocculation ability was analyzed using the standard method. (C) The final levels of higher alcohols in mutants and the parental strain. Data are presented as the means of the results of three independent experiments. Error bars indicate standard deviations. Note: ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$.

表4 重组菌株 S6-BF2B1 风味物质的测定

Table 4 The flavor component profiles of mutant S6-BF2B1 and parent S6

Compound	S6 (mg/L)	S6-BF2B1 (mg/L)
<i>n</i> -Propanol	23.83±0.58	21.45±1.12*
Isobutanol	18.91±1.15	14.70±0.54*
Isoamyl alcohol	111.61±1.24	86.24±1.02**
2-Phenylethanol	21.23±0.90	19.74±0.89
Ethyl acetate	42.55±1.18	30.55±0.96**
Isoamyl acetate	8.71±0.52	4.25±0.29**
Diacetyl	0.53±0.041	0.50±0.055

Data are presented as the means of the results of three independent experiments. ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$.

3 讨论

近年来在啤酒行业中兴起的高温高浓发酵技术为啤酒生产企业降低了生产成本,提高了经济效益,但同时也为生产企业带来了一系列新的问题。高温高浓发酵导致的高渗透压、高乙醇含量等问题对酵母的生长繁殖和发酵造成的影响是不可避免的,进而会对啤酒的口感、风味及酵母的絮凝性等方面带来一些不良的影响。发酵结束时啤酒酵母能够迅速地絮凝沉降,不但可以减少分离酵母所产生的能源消耗,也可以避免酵母长时间悬浮于发酵液中发生自溶现象,而超过5%的酵母发生自溶,将对啤酒质量造成难以挽回的影响^[25]。针对高温高浓发酵技术的研究,国内学者多从啤酒的风味物质出发,而酵母絮凝性方面的研究相对缺乏^[4,16];国外学者的研究多集中在絮凝基因的调控机制方面,有关絮凝基因应用方面的研究较少^[13,26]。因此探索絮凝基因和高级醇代谢基因的协同改造是一条同时解决高温高浓发酵条件下酿酒酵母絮凝性问题和高级醇合成问题的有效途径。

本研究以工业啤酒酵母 S6 为研究对象,运用基因同源重组的方式过量表达酵母絮凝性关键基因 *FLO5* 的同时,敲除参与高级醇合成代谢的 *BAT*

基因, 最终获得絮凝能力较强、高级醇合成水平适宜的工业啤酒酵母重组菌株 S6-BF2B1。研究表明, 重组菌株 S6-BF2B1 在高温高浓的发酵条件下, 不仅极大地增强了发酵结束后酵母菌株的絮凝能力, 而且啤酒风味物质中高级醇的含量也得到了显著的降低, 达到了适宜的醇酯比例。实验结果对发酵结束后酵母菌株的沉降分离以及改善啤酒中的醇酯比例具有积极的意义, 同时也表明 *BAT* 基因和 *FLO5* 基因在改造过程中不存在相互协同或相互干扰的现象。酵母细胞质中编码支链氨基酸转氨酶的 *BAT2* 基因以及线粒体中编码支链氨基酸转氨酶的 *BAT1* 基因能够将支链氨基酸转化为高级醇合成的重要前提物质 α -酮酸, 因而具有促进高级醇合成的作用; 文中对 *BAT* 基因的敲除也达到了降低工业啤酒酵母 S6 高级醇合成水平的效果。

通过对 *FLO5* 基因、*BAT2* 基因以及 *BAT1* 基因的遗传改造增强了酵母细胞在高温高浓发酵条件下的絮凝性同时降低了高级醇的合成水平, 这为研究酿酒酵母的絮凝性和高级醇的代谢提供了一定的理论依据, 同时对指导啤酒的高温高浓发酵技术具有重要的实践价值。

REFERENCES

- [1] Wan CY, Zhao HF, Zhao MM. Effects of very high gravity brewing on the metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. Food Ferment Ind, 2010, 36(12): 55–58 (in Chinese).
万春艳, 赵海锋, 赵谋明. 超高麦汁浓度酿造对啤酒酵母代谢的影响. 食品与发酵工业, 2010, 36(12): 55–58.
- [2] Yu ZM. The metabolic analysis and regulation of brewer's yeast under very high gravity brewing[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2011 (in Chinese).
俞志敏. 啤酒超高浓酿造中酵母代谢的分析与调控[D]. 广州: 华南理工大学, 2011.
- [3] Lei HJ, Zhao HF, Yu ZM, et al. Effects of wort gravity and nitrogen level on fermentation performance of brewer's yeast and the formation of flavor volatiles. Appl Biochem Biotechnol, 2012, 166(6): 1562–1574.
- [4] Liu ML, Chang ZM, Yin H, et al. Research of improving the ratio of alcohol ester of high gravity brewing. Sci Technol Food Ind, 2015, 36(19): 190–194, 279 (in Chinese).
刘明丽, 常宗明, 尹花, 等. 高浓啤酒醇酯调控技术的研究与应用. 食品工业科技, 2015, 36(19): 190–194, 279.
- [5] Du ZL, Cheng YF, Zhu H, et al. Improvement of acetic acid tolerance and fermentation performance of industrial *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of flocculent gene *FLO1* and *FLO1c*. Chin J Biotech, 2015, 31(2): 231–241 (in Chinese).
杜昭励, 程艳飞, 朱卉, 等. 絮凝基因 *FLO1* 及 *FLO1c* 高表达提高工业酿酒酵母乙酸耐受性及发酵性能. 生物工程学报, 2015, 31(2): 231–241.
- [6] Govender P, Domingo JL, Bester MC, et al. Controlled expression of the dominant flocculation genes *FLO1*, *FLO5*, and *FLO11* in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Environ Microbiol, 2008, 74(19): 6041–6052.
- [7] Nayyar A, Walker G, Wardrop F, et al. Flocculation in industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*: role of cell wall polysaccharides and lectin-like receptors. J Inst Brew, 2017, 123(2): 211–218.
- [8] van Holle A, Machado MD, Soares EV. Flocculation in ale brewing strains of *Saccharomyces cerevisiae*: re-evaluation of the role of cell surface charge and hydrophobicity. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 93(3): 1221–1229.
- [9] Soares EV, Teixeira JA, Mota M. Effect of cultural and nutritional conditions on the control of flocculation expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Can J Microbiol, 1994, 40(10): 851–857.
- [10] Jin YL, Speers RA. Effect of environmental conditions on the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. J Am Soc Brew Chem, 2000, 58(3): 108–116.
- [11] Soares EV. Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: a review. J Appl Microbiol, 2011, 110(1): 1–18.

- [12] Zhou B, Zhang CY, Chen YF, et al. Effects of high gravity and high temperature on fermentation performance of beer yeast. *China Brew*, 2016, 35(2): 9–12 (in Chinese).
周波, 张翠英, 陈叶福, 等. 高浓高温对啤酒酵母发酵性能的影响. *中国酿造*, 2016, 35(2): 9–12.
- [13] Dietvorst J, Brandt A. Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae* is repressed by the COMPASS methylation complex during high-gravity fermentation. *Yeast*, 2008, 25(12): 891–901.
- [14] Tofalo R, Perpetuini G, Di Gianvito P, et al. Genetic diversity of *FLO1* and *FLO5* genes in wine flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Int J Food Microbiol*, 2014, 191: 45–52.
- [15] Pires EJ, Teixeira JA, Brányik T, et al. Yeast: the soul of beer's aroma—a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(5): 1937–1949.
- [16] Yang XL, Luo ZM, Hu SP, et al. Reducing total higher alcohol content in high gravity fermentation of beer. *Food Sci*, 2011, 32(9): 188–192 (in Chinese).
杨小兰, 罗正明, 胡仕屏, 等. 降低高浓啤酒发酵中高级醇含量的研究. *食品科学*, 2011, 32(9): 188–192.
- [17] Saerens SMG, Verbelen PJ, Vanbeneden N, et al. Monitoring the influence of high-gravity brewing and fermentation temperature on flavour formation by analysis of gene expression levels in brewing yeast. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 80(6): 1039–1051.
- [18] Eden A, van Nederveelde L, Drukker M, et al. Involvement of branched-chain amino acid aminotransferases in the production of fusel alcohols during fermentation in yeast. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 55(3): 296–300.
- [19] Styger G, Jacobson D, Prior BA, et al. Genetic analysis of the metabolic pathways responsible for aroma metabolite production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(10): 4429–4442.
- [20] Zhang CY, Qi YN, Ma HX, et al. Decreased production of higher alcohols by *Saccharomyces cerevisiae* for Chinese rice wine fermentation by deletion of Bat aminotransferases. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2015, 42(4): 617–625.
- [21] Wu DG, Guo XW, Lu J, et al. A rapid and efficient one-step site-directed deletion, insertion, and substitution mutagenesis protocol. *Anal Biochem*, 2013, 434(2): 254–258.
- [22] Gietz RD, Schiestl RH. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat Protoc*, 2007, 2(1): 31–34.
- [23] Güldener U, Heck S, Fiedler T, et al. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24(13): 2519–2524.
- [24] Zhang YY. Screening of brewer's yeast with low acetaldehyde[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2011 (in Chinese).
张媛媛. 低产乙醛啤酒酵母的选育与研究[D]. 无锡: 江南大学, 2011.
- [25] Li J, Wang JJ, Li Q. Overexpression of *FKS1* by 18S rDNA targeted influence on yeast autolysis. *Chin J Biotech*, 2015, 31(9): 1344–1354 (in Chinese).
李佳, 王金晶, 李崎. 18S rDNA 介导的 *FKS1* 基因过表达对酵母自溶性能的影响. *生物工程学报*, 2015, 31(9): 1344–1354.
- [26] Dietvorst J, Brandt A. Histone modifying proteins Gcn5 and Hda1 affect flocculation in *Saccharomyces cerevisiae* during high-gravity fermentation. *Curr Genet*, 2010, 56(1): 75–85.

(本文责编 郝丽芳)