

# BAT 基因改造对酿酒酵母高级醇生成量的影响

刘芳志, 张翠英, 李维, 刘学强, 肖冬光

(天津科技大学生物工程学院, 工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津 300457)

**摘要:** 酿酒酵母 *BAT* 基因编码支链氨基酸转氨酶, 其中 *BAT1* 和 *BAT2* 基因分别编码线粒体和细胞质氨基酸转氨酶, 位于细胞不同的位置导致二者的生理功能有所差异, *BAT1* 基因在线粒体中倾向催化  $\alpha$ -酮酸合成氨基酸, 细胞质中的 *BAT2* 基因将氨基酸转化为  $\alpha$ -酮酸, 通过敲除 *BAT2* 以减少  $\alpha$ -酮酸合成, 过表达 *BAT1* 以增加  $\alpha$ -酮酸消耗达到降低酿酒酵母高级醇的合成的目的。本研究以酿酒酵母 AY15 单倍体  $\alpha 5$  为出发菌株, 结合融合 PCR 技术构建重组质粒 pUC-BABPB1K, 获得 BA-PGK-*BAT1*-BB 重组盒, 并利用醋酸锂转化法和同源重组技术筛选出缺失 *BAT2* 基因同时过表达 *BAT1* 基因的突变株 B-8, 将其和亲本菌株  $\alpha 5$ 、*BAT2* 基因缺失菌株  $\alpha 5\Delta BAT2$  进行酒精发酵实验, 发酵结束后进行发酵性能和高级醇的测定。实验结果表明, 与亲本菌株相比, 异丁醇降低了 25%, 异戊醇降低了 15%, 活性戊醇降低了 30%; 与  $\alpha 5\Delta BAT2$  菌株相比, 异丁醇提高了 0.5 倍, 异戊醇增加了 0.1 倍, 活性戊醇增加了 0.3 倍。

**关键词:** 酿酒酵母; 高级醇; 融合 PCR; *BAT1* 基因; *BAT2* 基因

文章编号: 1673-9078(2016)6-142-147

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.6.023

## Effects of *BAT* Genetic Modification on the Yield of Higher Alcohols from *Saccharomyces cerevisiae*

LIU Fang-zhi, ZHANG Cui-ying, LI Wei, LIU Xue-qiang, XIAO Dong-guang

(College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** Branched-chain amino acid transaminases are encoded by *BAT* genes in *Saccharomyces cerevisiae*, and *BAT1* and *BAT2* encode mitochondrial and cytosolic branched-chain amino acid transaminases, respectively. Owing to their different locations in cells, *BAT1* and *BAT2* have different physiological functions. *BAT1* in the mitochondria has a tendency to carry out the catalytic synthesis of amino acids from  $\alpha$ -keto acids, and *BAT2* in the cytoplasm is responsible for converting amino acids into  $\alpha$ -keto acids. This study attempted to reduce the synthesis of  $\alpha$ -keto acids and increase the consumption of  $\alpha$ -keto acids in *S. cerevisiae* by knocking out *BAT2* and overexpressing *BAT1*, in order to decrease the level of higher alcohols in wine. *Saccharomyces cerevisiae* AY15 haploid  $\alpha 5$  was used as the parental strain in this study, and fusion polymerase chain reaction (PCR) was adopted to construct the recombinant plasmid pUC-BABPB1K, and the recombinant gene cassette BA-PGK-*BAT1*-BB was obtained. Lithium acetate transformation and homologous recombination were employed to screen for a mutant strain B-8 overexpressing *BAT1* and lacking *BAT2*. B-8, parental strain  $\alpha 5$ , and strain  $\alpha 5\Delta BAT2$  lacking *BAT2* were used to conduct ethanol fermentation, and the fermentation performance and yield of higher alcohols were determined at the end of fermentation. The yields of isobutanol, isopentanol, and 2-methyl-1-butanol decreased by 25%, 15%, and 30%, respectively, compared with those of parental haploid  $\alpha 5$ , while the production of these higher alcohols were 0.7, 0.1, and 0.3 fold higher than those from the  $\alpha 5\Delta BAT2$  mutant, respectively.

**Key words:** *Saccharomyces cerevisiae*; higher alcohols; fusion polymerase chain reaction (PCR); *BAT1* gene; *BAT2* gene

白酒是我国特有的蒸馏酒, 历史悠久, 是世界六大蒸馏酒之一。高级醇<sup>[1]</sup>是白酒中一类重要的香气成分, 不但成香、呈味, 能增加白酒的甜感, 还是构成

收稿日期: 2015-08-04

基金项目: 天津市科委自然科学基金重点项目 (14JZDJC32900); 国家自然科学基金项目 (31471724)

作者简介: 刘芳志 (1989-), 男, 硕士研究生, 主要从事酿酒酵母的改造和选育

通讯作者: 张翠英 (1979-), 女, 副教授, 研究方向为现代酿造技术

酯类的前体物质。但是含量过高便会产生异杂味, 易上头, 影响身体健康, 因此控制高级醇在白酒中的含量对改善白酒酒质有很重要意义。

酿酒酵母酒精发酵过程中, 高级醇形成主要有两条途径: 一种是酵母以糖为基质的合成代谢途径, 即 *Harrsi* 途径<sup>[2]</sup>。另一种是以氨基酸为基质的分解代谢途径, 又称为 *Ehrlich* 代谢途径<sup>[3]</sup>。酵母在正常发酵时, 75% 的高级醇代谢来自 *Harrsi* 途径, 只有 25% 的高级醇来自 *Ehrlich* 途径, 后者对前者具有补充和抑制双重

效果。*BAT1*、*BAT2* 是编码酿酒酵母线粒体和细胞质支链氨基酸转氨酶基因，由于处于不同的细胞环境，导致其所编码的氨基酸转氨酶的功能存在差异，*BAT1* 倾向于催化  $\alpha$ -酮酸合成氨基酸，*BAT2* 正好相反<sup>[4,5]</sup>。酿酒酵母细胞中的丙酮酸在线粒体中由 *ILV* 基因催化合成  $\alpha$ -酮异戊酸、 $\alpha$ -酮-3-甲基戊酸，然后  $\alpha$ -酮异戊酸继续在 *LEU* 基因作用下合成  $\alpha$ -酮异己酸，另一方面缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸在支链氨基酸转氨酶作用下催化合成相应的  $\alpha$ -酮酸，最后通过这两种方式催化生成相应高级醇，即异丁醇，活性戊醇和异戊醇<sup>[5]</sup>。

Seong-Hee<sup>[6]</sup>等人在提高酿酒酵母细胞合成高级醇时敲除了 *BAT1* 基因，在此基础上对高级醇代谢途径上其他调控基因进行过表达，结果高级醇合成得到很大提高，这说明敲除 *BAT1* 基因能够在一定程度上

有助于增加高级醇合成。在酿酒酵母线粒体中 *BAT1* 催化  $\alpha$ -酮异戊酸合成缬氨酸，催化  $\alpha$ -酮-3-甲基戊酸合成异亮氨酸，*BAT2* 基因将缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸分解为  $\alpha$ -酮异戊酸、 $\alpha$ -酮异己酸和  $\alpha$ -酮-3-甲基戊酸。因此一方面通过阻断三种氨基酸转变为  $\alpha$ -酮酸，另一方面通过线粒体氨基酸转氨酶催化  $\alpha$ -酮酸生成氨基酸，降低前体物  $\alpha$ -酮酸含量从而达到降低酿酒酵母高级醇生成量的目的。

本实验以支链氨基酸转氨酶为研究对象，通过同源重组技术敲除了酿酒酵母 *BAT2* 基因，同时过表达 *BAT1* 基因，通过对重组菌株进行发酵实验研究 *BAT1* 基因过表达对高级醇生成量的影响，为研究低产高级醇的酿酒酵母工程菌株奠定一定理论基础。

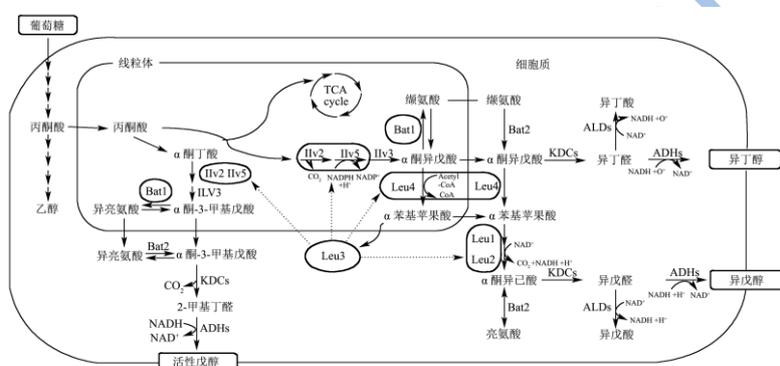


图1 高级醇代谢网络图<sup>[6]</sup>

Fig.1 Metabolic network diagram of higher alcohols

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及仪器

#### 1.1.1 菌种和质粒

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ 、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) AY15 的单倍体  $\alpha$ 5、酿酒酵母 *BAT2* 基因缺失菌株  $\alpha 5\Delta BAT2$  均为天津科技大学天津市工业微生物重点实验室保藏。其中质粒 Yep352-PGK 为本实验室保存，质粒 pUC6 由德国 Hegemann 教授惠赠，pUC19 质粒购自宝生物工程(大连)有限公司。

#### 1.1.2 培养基及培养条件

发酵培养基：玉米糖化醪。

YEPD 培养基 (m/V)：葡萄糖 2%，酵母粉 1%，蛋白胨 2%，自然 pH 值，115 °C 灭菌 20 min。

LB 培养基 (m/V)：葡萄糖 1%，酵母粉 0.5%，蛋白胨 1%，自然 pH 值，固体培养基加 2% 琼脂，121 °C 灭菌 15 min。

#### 1.1.3 试剂和酶

限制性内切酶、DNA 连接酶、rTaq 聚合酶、RNA 提取试剂盒及荧光定量 PCR 试剂盒均购自宝生物工程(大连)有限公司；遗传霉素 (G418) 购自 Merck 公司；酵母基因组 DNA 提取试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司；引物由鼎国生物技术有限公司合成。

#### 1.1.4 仪器

PCT-200 型 PCR 基因扩增仪，台式高速离心机，电热恒温水浴锅电子天平，DYY-4c 型电泳仪，Reference-2 型移液枪，DL102x 型电热鼓风干燥箱，AgilentGC 7890，StepOnePlus™ 实时荧光定量 PCR 仪。

### 1.2 实验方法

本实验采用同源重组基因敲除的方法，同时结合融合 PCR 技术将相应基因融合并连接到载体 pUC19 上，然后敲除酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 编码细胞质支链氨基酸转氨酶基因 *BAT2*，同时过表达线粒体氨基酸转氨酶 *BAT1* 基因，并筛选得到重组菌株。

#### 1.2.1 引物

本实验所用到的 PCR 反应引物见表 1，引物设计

均采用 Primer5.0 软件设计。具体引物说明如下：根据 NCBI 公布酿酒酵母 *S. cerevisiae* S288c 的 *BAT2* 基因序列，设计用于扩增 *BAT2* 上游同源臂序列 BA 的引物 BA-U 和 BA-D，及 *BAT2* 下游同源臂序列 BB 的引

物 BB-U 和 BB-D。根据 pUC6 质粒序列设计用于扩增 *KanMX* 抗性基因序列的引物 K-U 和 K-D。根据 Yep352-PGK 质粒序列设计用于扩增 PGK 序列的引物 PGK-U 和 PGK-D。

表 1 PCR 反应引物

Table 1 PCR primers used in this study

名称	引物序列 (5'→3')	引物位置
质粒构建		
BA-U	TAACGCTCCTTTCCAAACATC	扩增 <i>BAT2</i> 同源臂上游引物
BA-D	GTTTTGGATAGATCAGTTAGAATCGTCTTAAAACTCGTGG	扩增 <i>BAT2</i> 同源臂下游引物
BB-U	GATCCACTAGTGGCCTATGCAGTATCGCTATTGCTACGTAAAGT	扩增 <i>BAT2</i> 同源臂上游引物
BB-D	CTTCTGAAGTCTAAGTGGGAT	扩增 <i>BAT2</i> 同源臂下游引物
PGK-U	CACGAGTTTTAAGAACGATTCTAACTGATCTATCCAAAACCTGA	扩增 PGK 上游引物
PGK-D	GCGTACGAAGCTTCAGCTG TAACGAACGCAGAATTTTC	扩增 PGK 下游引物
K-U	GAAAATTCTGCGTTCGTTACAGCTGAAGCTTCGTACGC	扩增 <i>KanMX</i> 上游引物
K-D	ACGTAGCAATAGCGATACT GCATAGGCCACTAGTGGATCTG	扩增 <i>KanMX</i> 下游引物
PCR 验证		
定点 1-U	TCTTTTCGTCACCGTGTCCG	上游定点验证上游引物
定点 1-D	AATATCTGTGCGTCTTGAGTTG	上游定点验证下游引物
定点 2-U	CGCAATCACGAATGAATAACGGT	下游定点验证上游引物
定点 2-D	TTCGCCAGTTAGCTGTTTG	下游定点验证下游引物
Y-D	TCATTAGGCACCCCAGGCTTT	验证质粒引物
Real-time PCR		
RT-B1-U	TTGAAGGTTTGAAAGCCTACAG	
RT-B1-D	TAATAAGGACCGACTGGAGAAG	

### 1.2.2 重组质粒 pUC-BABPB1K 质粒构建

本实验使用 1.2.1 设计的引物以单倍体  $\alpha 5$  基因组为模板 PCR 扩增得到 *BAT2* 上下同源臂片段 BA、BB，以 Yep352-PGK-*BATI* 质粒为模板得到片段 PGK-*BATI*，以 pUC6 质粒为模板得 *KanMX* 片段，先通过融合 PCR 将上游同源臂 BA、PGK-*BATI*（含酶切位点 *Sma* I）以及下游同源臂 BB、*KanMX*（含酶切位点 *Sph* I）融合成含有酶切位点的长片段 BA-PGK-*BATI* 和 *KanMX*-BB，然后 BA-PGK-*BATI* 和 pUC19 使用 *Sma* I 酶切后进行连接，构建重组质粒 pUC-BAPB1，并进行 *Eco*R I 酶切验证。将 *KanMX*-BB 片段和质粒 pUC-BAPB1 使用 *Sph* I 单酶切进行连接，进行 PCR 验证后得到正确的重组质粒 pUC-BABPB1K 质粒（见图 2）。

### 1.2.3 酵母转化

从质粒 pUC-BABPB1K 上扩增得 BA-PGK-*BATI*-*KanMX*-BB 片段，使用醋酸锂转化法<sup>[7]</sup>转化酿酒酵母  $\alpha 5$ ，涂布含 G418 YEPD 平板，30 ℃，静置培养 48 h，对 YEPD 平板上生长的单菌落进行筛选验证。

### 1.2.4 转化子验证

将转化子点接到新 YEPD 平板上，30 ℃培养，48 h 后做菌落 PCR，将 PCR 样品进行琼脂糖凝胶电泳验证 DNA 片段大小，然后对筛选的菌株精提酵母基因组，进行上下游定点验证。

### 1.2.5 Real-Time PCR

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<sup>®</sup>Premix Ex Taq<sup>™</sup> II（TaKaRa）试剂盒进行实时荧光定量 PCR，通过  $\Delta\Delta C(t)$  值法对目的基因及内参基因 *ACT1* 进行基因表达量的分析。

### 1.2.6 发酵验证

从 YEPD 斜面上挑取 1 环菌种接入含 5 mL 一级种子培养基的试管中，30 ℃静置培养 24 h，进入稳定期后，按照 10% 的接种量将其接种到含 45 mL 二级种子培养基的三角瓶中，30 ℃静置培养 16~17 h 至对数期的后期，然后按照 10% 接种量接种到发酵培养基，30 ℃静置发酵，每隔 12 h 称重 1 次，发酵结束后测定 CO<sub>2</sub> 累计失重、发酵时间、酒精度、发酵液残还原糖及高级醇的含量，每个样品做 3 个平行，取平均值。

### 1.3 分析方法

#### 1.3.1 CO<sub>2</sub>失重的测定

在发酵过程中,按照文献<sup>[8]</sup>描述的方法每隔 12 h 称重 1 次。

#### 1.3.2 还原糖的测定

斐林试剂法<sup>[8]</sup>。

#### 1.3.3 酒精度的测定

酒精计比重法<sup>[8]</sup>。

#### 1.3.4 高级醇测定方法<sup>[9]</sup>

发酵结束后将发酵液进行蒸馏,得到含高级醇的样品进行气相色谱分析。根据 Agilent GC7890 气相色谱说明书及有关白酒样品检测资料设定检测高级醇的最佳条件为:色谱柱:105 m×0.530 mm 毛细管柱;柱温 50 °C 保持 8 min,然后以 5 °C/min 的速度升温至 150 °C,再保持 15 min;进样口温度 200 °C;检测器温度 200 °C;载气流速 20 mL/min;氢气流速 30 mL/min;空气流速 400 mL/min;尾吹速度 25 mL/min;分流比 10:1;进样量 1 μL。

#### 1.3.5 数据分析

每组实验做三个平行,并使用 SPSS11.0 和 EXCEL 2007 软件对实验数据进行差异显著性检验分析 (ANOVA)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 重组菌株的获得

#### 2.1.1 重组质粒 pUC-BABPB1K 构建

重组质粒按照 1.2.2 方法进行构建,其流程及结果见图 2。

#### 2.1.2 重组质粒 pUC-BABPB1K 验证

在构建重组质粒过程中,使用限制性内切酶对重组质粒 pUC-BAPB1 进行 *Eco*R I 单酶切验证,结果得到含 PGK 启动子和 BA 两个片段大小为 1981 bp 条带以及 4626 bp 条带 (见图 3a),使用 *KanMX* 上游引物 K-U 和验证引物 Y-D 对质粒 pUC-BABPB1K 进行 PCR 验证,得到大小为 3453 bp 条带 (见图 3b)。

#### 2.1.3 重组菌株的验证

以醋酸锂转化法筛选出的重组菌株 B-8 基因组总 DNA 为模板,以酿酒酵母单倍体 α5 基因组总 DNA 为阴性对照,使用上游定点验证引物:定 1-U 和定 1-D,下游定点验证引物:定 2-U 和定 2-D 进行 PCR 验证。结果上游定点验证对照菌 α5 无条带, B-8 转化子有 1483 bp;下游定点验证对照菌 α5 无条带, B-8 转化子有 1343 bp,其结果与预期条带大小一致,证明重组

盒 BA-PGK-BAT1-*KanMX*-BB 成功整合到酿酒酵母基因组上, *BAT2* 基因已被敲除 (见图 4)。

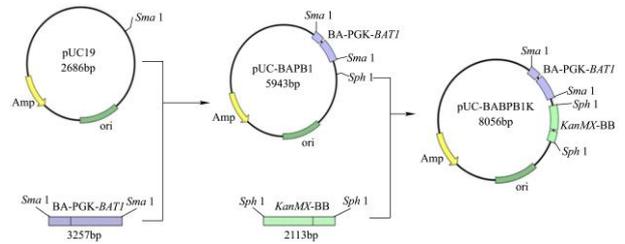


图 2 重组质粒 pUC-BABPB1K 构建流程图

Fig.2 Flow chart of recombinant plasmid pUC-BABPB1K

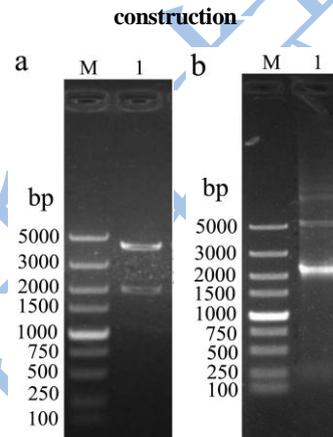


图 3 重组质粒验证

Fig.3 Verification of recombinant plasmid

注: a.酶切验证, b.PCR 验证, M-5000 DNA Ladder Marker,

a1- pUC-BABPB1 酶切条带, b1- pUC-BABPB1K PCR 条带。

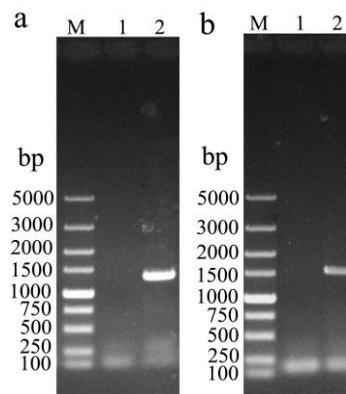


图 4 重组菌株 B-8 验证

Fig 4 Verification of recombinant strain B-8

注: a.上游定点验证, b.下游定点验证, M-5000DNA

Marker, 1-酿酒酵母 α5 为模板 PCR 条带, 2-B-8 为模板 PCR 条带。

### 2.2 RT-PCR 结果

为了进一步验证 *BAT1* 基因过表达成功,提取重组菌 B-8、α5Δ*BAT2* 及亲本菌株 α5 的总 RNA 并反转录成 cDNA,以其为模板进行实时荧光定量 PCR 对 *BAT1* 基因表达量进行分析,从图 5 结果看出 B-8 菌株

*BAT1* 基因的表达量是亲本菌株  $\alpha 5$  的 11.60 倍,  $\alpha 5\Delta BAT2$  与亲本菌株  $\alpha 5$  基本不变, 结果差异显著 ( $p < 0.05$ )。实验结果表明过表达 *BAT1* 基因后, 导致其转录水平的增加, 从而导致酶的表达量的提高, 加速 *BAT1p* 催化速率, RT-qPCR 结果能够在转录水平上解释了过表达 *BAT1* 导致高级醇变化原因, 同时说明敲除 *BAT2* 基因并不会对 *BAT1* 产生影响, *BAT1* 基因过表达成功。

### 2.3 出发菌株与重组菌株的发酵性能比较

将亲本菌株  $\alpha 5$ ,  $\alpha 5\Delta BAT2$  及重组菌株 B-8 同时进行玉米浓醪白酒发酵。发酵结束后测定各菌株的基本发酵性能。由表 2 可知, 过表达 *BAT1* 基因突变株菌株与出发菌株在相同条件下  $CO_2$  失重、残糖含量以

表 2 酿酒酵母  $\alpha 5$ ,  $\alpha 5\Delta BAT2$  及重组菌 B-8 发酵性能的比较

菌株	24 h 失重 /( $CO_2/g$ )	48 h 失重 /( $CO_2/g$ )	72 h 失重 /( $CO_2/g$ )	还原糖含量 /(g/100 mL)	酒精度 /(% Vol)
$\alpha 5$	10.20	19.90	23.10	0.43	15.7 $\pm$ 0.1
$\alpha 5\Delta BAT2$	10.20	20.20	23.20	0.53	15.3 $\pm$ 0.1
B-8	9.80	19.5	23.00	0.49	15.5 $\pm$ 0.1

### 2.4 重组菌株与亲本菌株高级醇生成量的测定

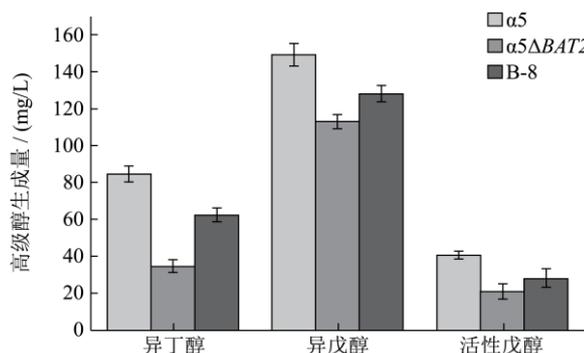


图 6 酿酒酵母  $\alpha 5$ ,  $\alpha 5\Delta BAT2$  及重组菌 B-8 浓醪发酵高级醇生成量的比较

Fig 6 Comparison of high alcohol yields from  $\alpha 5$ ,  $\alpha 5\Delta BAT2$ , and B-8 strains after fermentation

以亲本菌株酿酒酵母  $\alpha 5$ , 重组菌  $\alpha 5\Delta BAT2$  为对照菌, 将对照菌和重组菌 B-8 在玉米糖化醪中进行发酵, 发酵结束后对发酵醪进行蒸馏, 对获得到酒样使用气相色谱法检测分析其中高级醇的含量。

由图 6 可知在玉米糖化醪发酵条件下 (与在其它培养基上发酵结果一致, 数据未列出) 重组菌株 B-8,  $\alpha 5\Delta BAT2$  菌株三种高级醇含量均比亲本菌株  $\alpha 5$  有所

及酒精度等均没有明显变化, 表明 *BAT2* 基因缺失、*BAT1* 基因过表达对酿酒酵母发酵性能没有太大的影响。

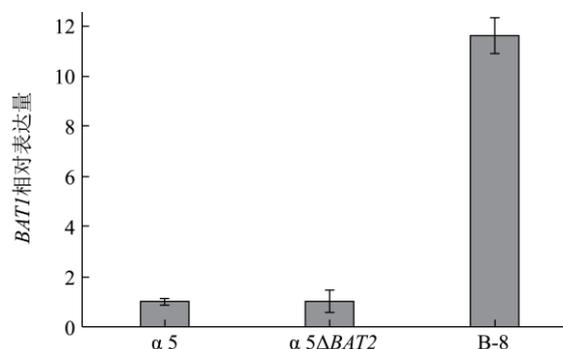


图 5 *BAT1* 基因表达量 RT-qPCR

Fig.5 Expression of *BAT1* gene as measured by RT-qPCR

降低。另一方面重组菌株 B-8 高级醇却比  $\alpha 5\Delta BAT2$  菌株均有不同程度的增加: 其中异丁醇生成量为 62.08 mg/L, 与  $\alpha 5\Delta BAT2$  相比提高了 0.79 倍, 异戊醇的生成量为 127.78 mg/L, 与  $\alpha 5\Delta BAT2$  相比提高了 0.13 倍, 活性戊醇的生成量为 27.65 mg/L, 与  $\alpha 5\Delta BAT2$  相比提高了 0.33 倍, 结果差异显著 ( $p < 0.05$ )。

实验结果表明基因 *BAT2* 的缺失使得酿酒酵母高级醇生成量降低<sup>[10]</sup>, 根据图 1 可以看出 *BAT2* 基因的缺失阻断了酿酒酵母细胞质中的缬氨酸, 亮氨酸, 异亮氨酸转化为  $\alpha$ -酮酸代谢通路, 由于高级醇前体物质  $\alpha$ -酮酸合成受阻导致酿酒酵母合成高级醇降低。由图 6 看出重组菌 B-8 和  $\alpha 5\Delta BAT2$  三种高级醇均比亲本菌株  $\alpha 5$  低, 这与理论结果一致, 张翠英等<sup>[5]</sup>也做过相关报道, 其结论相同。

*BAT2* 基因的缺失能够阻断细胞质中三种氨基酸转化为  $\alpha$ -酮酸生成高级醇, 过表达 *BAT1* 基因能够将三种  $\alpha$ -酮酸转化为氨基酸<sup>[5]</sup>, 通过阻断前体物  $\alpha$ -酮酸来源, 增加前体物  $\alpha$ -酮酸消耗, 这两方面能够使得过表达 *BAT1* 重组菌株比  $\alpha 5\Delta BAT2$  高级醇合成进一步降低, 但是发酵结果与预期结果并不一致, 过表达 *BAT1* 重组菌株的高级醇含量反而升高了。根据高级醇代谢途径, 一方面可能是由于 *BAT2* 基因缺失造成酿酒酵母细胞质中的氨基酸积累, 线粒体中氨基酸合成  $\alpha$ -酮酸反应由于底物增加而转向生成  $\alpha$ -酮酸, 使得高级醇

前体物含量增加,另一方面 *BAT1* 基因在可逆转氨反应中倾向于将  $\alpha$ -酮酸转化为氨基酸,由于氨基酸的积累使得反应倾向生成  $\alpha$ -酮酸,而 *BAT1* 基因过表达能够使得转氨反应速率增加,使得这一反应趋势更加显著,从而在相同条件下将更多的  $\alpha$ -酮酸转化为高级醇。

另外,重组菌 B-8 增加的高级醇并没有达到亲本菌株  $\alpha 5$  生成水平,这可能原因是,虽然 *BAT* 基因催化氨基酸和  $\alpha$ -酮酸之间转化是可逆,*BAT1* 和 *BAT2* 编码的转氨酶活力并不一致,而 Sung A 等<sup>[11]</sup>在研究 *Bat2p* 对酿酒酵母产生杂醇的影响时也提及 *Bat1p* 和 *Bat2p* 在细胞中由于其各自功能差异无法互相替代,因此酿酒酵母并不能将 *BAT2* 缺失积累的氨基酸全部转化为相应的  $\alpha$ -酮酸,合成相应高级醇。

此外重组菌 B-8 与  $\alpha 5\Delta BAT2$  菌株相比,异丁醇、异戊醇、活性戊醇三种高级醇增加的程度不同,异丁醇最大,异戊醇最小。从图 1 高级醇代谢流程图中看出酿酒酵母由  $\alpha$ -酮异戊酸直接合成异丁醇,代谢通路简单,而合成异戊醇需要  $\alpha$ -酮异戊酸经过 *LEU4*、*LEU1*、*LEU2* 催化生成  $\alpha$ -酮异己酸,再脱羧、脱氢反应合成,代

谢通路冗长复杂。这使得累积的  $\alpha$ -酮异戊酸能够转化为异戊醇的能力大大降低,因此异戊醇生成量提高不显著。

### 3 结论

高级醇是白酒重要的香气成分,也是合成酯类的前体物质。本实验构建了 pUC-BABPB1K 质粒,并通过同源重组技术获得了缺失 *BAT2* 基因同时过表达 *BAT1* 基因酿酒酵母重组菌株 B-8, RT-PCR 结果显示重组菌株 *BAT1* 基因转录水平比菌株  $\alpha 5$ 、 $\alpha 5\Delta BAT2$  提高了将近 11.60 倍。通过对菌株进行玉米浓醪发酵实验,研究了 *BAT* 基因对酿酒酵母高级醇生成量的影响,发酵结果显示敲除 *BAT2* 基因的酿酒酵母  $\alpha 5\Delta BAT2$ , B-8 高级醇比亲本菌株  $\alpha 5$  显著降低,但过表达 *BAT1* 基因菌株 B-8 并没有在  $\alpha 5\Delta BAT2$  基础上进一步降低高级醇的含量,这可能与 *BAT2* 基因敲除使得酵母细胞中底物氨基酸积累,使得底物  $\alpha$ -酮酸浓度改变, *BAT1* 的过表达加速了转氨反应,从而影响了生物反应代谢方向有关。

### 参考文献

[1] Swiegers JH, Bartowsky EJ, Henschke PA, et al. Yeast and

bacterial modulation of wine aroma and flavour. [J]. Aust. J. Grape Wine Res., 2005, 11: 145-152

- [2] Dickinson JR, Harrison SJ, Dickinson JA, et al. An investigation of the metabolism of isoLeucine to active amyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. [J]. J. Biol. Chem., 2000, 275: 10937-10942
- [3] Hazelwood LA, Daran JM, van Maris AJ, et al. The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2008, 74: 2259-2266
- [4] Maritrini Colon, Fabiola Hernandez, Karla Lopez. *Saccharomyces cerevisiae* *BAT1* and *BAT2* Aminotransferases have functionally diverged from the Ancestral-Like *Kluyveromyces lactis* Orthologous Enzyme [J]. PLoS ONE. 2011, 6(1): e16099
- [5] 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]. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 2015, 42: 617-625
- [6] Park SH, Kim S, Hahn JS. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of isobutanol and 3-methyl-1-butanol [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2014, 98: 9139-9147
- [7] Gietz RD, Robert H, Schiestl. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method [J]. Nature Protocols, 2007, 2(1): 31-34
- [8] 王福荣.酿酒分析与检测[M].北京:化学工业出版社,2005  
WANG Fu-rong. Analysis and detection of wine [M]. Beijing: Chemical Industry Publisher, 2005
- [9] 沈怡方.白酒生产技术全书[M].北京:中国轻工业出版社,1998  
SHEN Yi-fang. Wine production technology encyclopedia [M]. Beijing: Chinese Light Industry Publisher, 1998
- [10] 刘玉兰等. *ATF1* 过表达和 *BAT2* 敲除酿酒酵母发酵性能的研究. [J]. 中国酿造, 2012, 31(1): 151-153  
LIU Yu-lan et al. Research of fermenting performance of the *Saccharomyces cerevisiae* with delecting *BAT2* gene and expressing *ATF1* gene [J]. China Brewing, 2012, 31(1): 151-153
- [11] Sung A, Schoondermark-Stolk, et al. *Bat2p* is essential in *Saccharomyces cerevisiae* for fusel alcohol production on the non-fermentable carbon source ethanol [J]. FEMS Yeast Research, 2005, 5: 757-766