

THI3/BAT2 基因缺失酿酒酵母菌构建及其在黄酒酿造中的应用

陈文颖¹, 周世水^{1*}, 闫统帅¹, 梁思宇²

(1. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

(2. 广东石湾酒厂集团股份有限公司, 广东佛山 528031)

摘要: 为探究酿酒酵母支链氨基酸转氨酶编码基因 (*BAT2* 基因) 和类丙酮酸脱羧酶编码基因 (*THI3* 基因) 的缺失对黄酒中高级醇的影响, 以酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 菌 XF1 的单倍体 XF1a7/XF1a6 和 *THI3* 基因缺失菌 XF1-T 的单倍体 XF1a7-T/XF1a6-T 为原始菌, 采用 Cre/loxP 重组系统构建了 *BAT2* 单基因缺失和 *THI3/BAT2* 双基因缺失的双倍体酵母重组菌 XF1-B 和 XF1-TB。将 XF1、XF1-B 和 XF1-TB 进行黄酒发酵, 实验结果表明, 重组菌 XF1-B、XF1-TB 与原始菌 XF1 的生长性能相似、发酵性能无差异, 重组菌 XF1-B、XF1-TB 酿造黄酒的异戊醇分别降低了 18.12%、26.06%, 异丁醇分别降低了 35.21%、18.83%, 正丙醇分别提高了 15.42%、32.75%, 总高级醇分别为 269.59 mg/L、270.77 mg/L, 分别降低了 15.65%、15.28%。XF1-B 和 XF1-TB 酿造黄酒中异戊醇/异丁醇比值分别为 3.24 和 2.34, 降低了 27.78%。综上, 重组菌 XF1-B 和 XF1-TB 都有效降低了黄酒中总高级醇含量, 而且 XF1-TB 与 XF1-B 相比异戊醇/异丁醇比值显著降低, 这能够降低黄酒“上头”的醉度, 有效提高黄酒品质。

关键词: *THI3*; *BAT2*; 酿酒酵母; 黄酒; 高级醇; 异戊醇/异丁醇

文章编号: 1673-9078(2022)11-55-62

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.11.0031

Construction of *THI3/BAT2* Gene-deleted *Saccharomyces cerevisiae* and Its Application in Preparing Chinese Rice Wine

CHEN Wenying¹, ZHOU Shishui^{1*}, YAN Tongshuai¹, LIANG Siyu²

(1. School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

(2. Guangdong Shiwang Winery Group Co. Ltd., Foshan 528031, China)

Abstract: To investigate the effect of deleting the genes encoding branched-chain amino acid transaminase (*BAT2* gene) and pyruvate decarboxylase-like enzyme (*THI3* gene) in *Saccharomyces cerevisiae* on the high alcohol content in Chinese rice wine, the diploid yeasts XF1-B (*BAT2* gene deletion) and XF1-TB (*THI3* and *BAT2* gene deletion) were constructed using the Cre/loxP recombination system with the haploid XF1a7/XF1a6 of XF1 and haploid XF1a7-T/XF1a6-T of XF1-T (*THI3* gene deletion) as the original strains. Chinese rice wine was fermented using XF1, XF1-B, and XF1-TB under the same conditions. The growth capability of XF1-B and XF1-TB was similar to that of XF1, and the basic fermentation capability was not significantly different. The isoamyl alcohol content decreased by 18.12% and 26.06%, the isobutanol content decreased by 35.21% and 18.83%, the *n*-propanol content increased by 15.42% and 32.75%, and the high alcohol content decreased by 15.65% and 15.28% to 269.59 and 270.77 mg/L in the Chinese rice wine brewed using XF1-B and XF1-TB, respectively, compared with those of wine brewed using XF1. The ratio of isoamyl alcohol/isobutanol was 3.24 and 2.34 in Chinese rice wine brewed using XF1-B and XF1-TB, respectively, representing a decrease of 27.78% compared with that of wine brewed using XF1. In summary, both XF1-B and XF1-TB

引文格式:

陈文颖,周世水,闫统帅,等. *THI3/BAT2* 基因缺失酿酒酵母菌构建及其在黄酒酿造中的应用[J].现代食品科技,2022,38(11):55-62

CHEN Wenying, ZHOU Shishui, YAN Tongshuai, et al. Construction of *THI3/BAT2* gene-deleted *Saccharomyces cerevisiae* and its application in preparing chinese rice wine [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(11): 55-62

收稿日期: 2022-01-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (51878291)

作者简介: 陈文颖 (1995-), 女, 硕士, 研究方向: 发酵工程与微生物学, E-mail: 1260132988@qq.com

通讯作者: 周世水 (1971-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 发酵工程与酿酒工程, E-mail: hgzhous@scut.edu.cn

effectively reduced the total higher alcohol content, and XF1-TB effectively reduced the ratio of isoamyl alcohol/isobutanol in Chinese rice wine. Hence, they can weaken the intoxication degree and improve the quality of Chinese rice wine.

Key words: *THI3*; *BAT2*; *Saccharomyces cerevisiae*; Chinese rice wine; higher alcohols; isoamyl alcohol/isobutanol

黄酒是我国的民族特产之一, 风味独特, 富含矿物质、维生素、有机酸、肽、氨基酸、 γ -氨基丁酸、多酚等营养物质和生物活性成分^[1]。但我国传统黄酒中高级醇含量较高, 消费者普遍反映有易上头、易醉等现象^[2]。高级醇, 也称为杂醇, 是酒精饮料中的一类风味化合物, 对酒精饮料的感官品质和特性有显著的影响。适量的高级醇会使得酒体口感醇厚、柔软、丰满, 酒香协调。当高级醇含量过高时, 酒不仅会有杂醇油的味道, 而且容易有“上头”的强烈醉感^[3]。黄酒中高级醇对人体有潜在的危害, 它比乙醇具有更高的毒副作用^[4,5]; 其次不同高级醇比例导致毒副作用不同, 特别是异戊醇/异丁醇比例越高, 酒的醉度越高^[6]。采取有效发酵控制来调控黄酒中高级醇的含量及不同高级醇比例, 降低黄酒“上头”的醉度和改善黄酒品质, 对提高黄酒的地位和扩大市场消费量具有重要意义。

酵母发酵产生的高级醇主要来源于糖代谢生物合成途径或支链氨基酸 Ehrlich 降解途径^[7,8], 在 Ehrlich 途径中, *BAT2* 基因编码的支链氨基酸转氨酶催化支链氨基酸转化为 α -酮酸, 随后进一步转化为高级醇^[9]。*THI3* 基因编码一个与丙酮酸脱羧酶 (PDCs) 十分相

似的蛋白质类酮酸脱羧酶, 被鉴定为亮氨酸代谢的主要脱羧酶, 催化 2-酮异己酸形成异戊醇^[7]。目前 *BAT2* 基因^[9-11]和 *THI3* 基因^[12-14]单独缺失对不同酒类影响均有较多研究, 但还对 *THI3* 和 *BAT2* 基因同时缺失对黄酒影响的研究还较少。

本文以酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 菌株 XF1 的单倍体 XF1a7/XF1a6 和 *THI3* 基因缺失 XF1-T 的单倍体 XF1a7-T/XF1a6-T 为原始菌采用 Cre/loxP 同源重组系统^[15]构建 *BAT2* 基因缺失重组菌 XF1-B 和 *THI3/BAT2* 双基因缺失重组菌 XF1-TB, 然后进行黄酒发酵研究 *BAT2* 基因缺失和 *THI3/BAT2* 双基因缺失对高级醇生成的影响。以期控制黄酒中高级醇含量和优化高级醇比例来降低黄酒“上头”的醉度, 为提高黄酒品质提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株与质粒

本研究中使用的所有菌株和质粒载体列于表 1。

表 1 本实验的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study.

项目	特征	来源
XF1	diploid yeast strain	本实验室
XF1a7	MATa, haploid yeast strain	本实验室
XF1a6	MAT α , haploid yeast strain	本实验室
XF1a7-BK	MATa Δ BAT2::loxP-kanMX-loxP, haploid yeast strain	本研究
XF1a6-BK	MAT α Δ BAT2::loxP-kanMX-loxP, haploid yeast strain	本研究
XF1a7-B	MATa Δ BAT2::loxP, haploid yeast strain	本研究
XF1a6-B	MAT α Δ BAT2::loxP, haploid yeast strain	本研究
菌株 XF1-B	Δ BAT2::loxP, diploid yeast strain	本研究
XF1a7-T	MATa Δ THI3::loxP, haploid yeast strain	本实验室
XF1a6-T	MAT α Δ THI3::loxP, haploid yeast strain	本实验室
XF1a7-TBK	MATa Δ THI3::loxP Δ BAT2::loxP-kanMX-loxP, haploid yeast strain	本研究
XF1a6-TBK	MAT α Δ THI3::loxP Δ BAT2::loxP-kanMX-loxP, haploid yeast strain	本研究
XF1a7-TB	MATa Δ THI3::loxP Δ BAT2::loxP, haploid yeast strain	本研究
XF1a6-TB	MAT α Δ THI3::loxP Δ BAT2::loxP, haploid yeast strain	本研究
XF1-TB	Δ THI3::loxP Δ BAT2::loxP, diploid yeast strain	本研究
质粒 pUG6	Kan ^r , Amp ^r /loxP-kanMX-loxP	本实验室
pSH65	Zeof, Cre recombinant enzyme expression vector	本实验室

表2 本实验使用的引物

Table 2 Primers used in this study

引物	序列 (5'→3') ^a	
<i>BAT2</i> -F1	CCCTCTCTGACACCTCTTG	
<i>BAT2</i> -R1	AAACTCGTGGAGATGCT	
敲除组件构建引物	<i>BAT2</i> -F2	TACTGCTGCGATTGTTT
	<i>BAT2</i> -R2	GGATAATTGCAGGTTTCGAC
	loxP-F	<u>TAAGGGAAAGCATCTCCACGAGTTTTTCGTACGCTGCAGGTC</u>
	loxP-R	<u>ATGGGAGAAACAATCGCAGCAGTAGCGTTGGCCGATTTCAT</u>
<i>BAT2</i> -A	CTGTGACCGCACTACAC	
<i>BAT2</i> -D	CGACATTACGGAAACGTCT	
B-M	TTCCGTCAGTTTAGTC	
验证引物	M-B	GATGAGATGGTCAGACTAAACTG
	MAT-a	ACTCCACTTCAAGTAAGAGTTTG
	MAT- α	GCACGGAATATGGGACTACTTCG
	MAT-F	AGTCACATCAAGATCGTTTATGG

注：下划线部分为融合 PCR 的重叠序列。

1.1.2 引物设计

本研究中使用的引物列于表 2 中。酿酒酵母 (*S288c*) *BAT2* 基因组序列从 NCBI (序列号: NC-001144.5) 获得。采用 Snapgene 软件设计引物, 上海生物工程技术有限公司合成。

1.1.3 主要试剂

中性蛋白酶、风味蛋白酶, 河南万邦化工科技有限公司; *ApexHF* HS 脱氧核糖核酸聚合酶、DNA 回收纯化试剂盒、质粒小量提取试剂盒, 湖南艾科瑞生物科技有限公司; 遗传霉素 (G418) 和博来霉素 (Zeocin), 北京普博欣生物科技有限责任公司; 氨基酸标准品、乙酸丁酯、丙酮、正丙醇、异丁醇、异戊醇、 β -苯乙醇 (均为色谱纯), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 半乳糖、无水乙酸钠、氯化钾、氯化钠、氢氧化钠 (均为分析纯), 天津市科密欧化学试剂有限公司; 异硫氰酸苯酯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 酵母提取粉、蛋白胨、琼脂 (生化试剂): 广东环凯微生物科技有限公司。

1.1.4 主要培养基

LB 培养基: 氯化钠 10 g/L、蛋白胨 10 g/L、酵母提取粉 5 g/L。

YPD 培养基: 葡萄糖 20 g/L、蛋白胨 20 g/L、酵母提取粉 10 g/L。

YPG 培养基: 半乳糖 20 g/L、蛋白胨 20 g/L、酵母提取粉 10 g/L。

McClary 麦氏产孢培养基^[16]: 葡萄糖 1 g/L, 氯化钾 1.8 g/L, 无水乙酸钠 8.2 g/L, 酵母提取粉 2.5 g/L, 琼脂 20 g/L。

所有固体培养基在液体培养基的基础上添加 20 g/L 琼脂, 并均经 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min, 备用。

1.2 仪器与设备

TC1000-S PCR 扩增仪、PowerPac 3000 电泳仪、GelDoc 2000 凝胶成像分析系统, 美国 Bio-Rad 公司; CanNeed-MB-800 自动糖化器, 肇庆市嘉仪仪器有限公司; 5804R 高速台式冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; GC8100 气相色谱仪, 滕州中科普仪器有限公司; 高效液相色谱仪, LC-10A 双泵岛津液相色谱; 安捷伦 TC-C18 色谱柱, 安捷伦科技(中国)有限公司。

1.3 方法

1.3.1 敲除组件构建

以 pUG6 质粒为模板, 用引物 loxP-F/loxP-R 进行 PCR 扩增, 获得两端与酵母基因组同源的 *KanMX* 抗性基因片段 (1 736 bp); 以提取的酵母基因组 DNA 为模板, 用引物 *BAT2*-F1/*BAT2*-R1 和 *BAT2*-F2/*BAT2*-R2 分别 PCR 扩增出同源臂 BU (290 bp) 和 BD (361 bp)。利用 *KanMX* 基因两端与两同源臂的重叠碱基进行融合 PCR 连接成 *BAT2* 基因敲除组件 BU-loxp-*KanMX*-loxp-BD (2 338 bp)。

1.3.2 酿酒酵母电转化和阳性转化子筛选

电转化法^[17]将敲除组件导入单倍体酿酒酵母细胞 XF1a7/XF1a6 和 XF1a7-T/ XF1a6-T, 加 0.1~0.2 μ g 纯化敲除组件 DNA 到感受态细胞, 电转化 (1.5 kV、200 Ω 、25 mF 的电容电击 5 ms) 后, 温育的转化子涂布含 100 μ g/mL G418 抗生素的 YPD 平板上培养。挑

取阳性菌落用引物 *BAT2*-A、*BAT2*-D 进行 PCR 验证。

1.3.3 筛选标记去除与质粒丢失

利用电转化法将带有 Cre 重组酶基因的 pSH65 质粒导入 *BAT2* 基因缺失的单倍体酵母细胞 XFa7-BK/XFa6-BK 和 XFa7-TBK/XFa6-TBK, 涂布于含 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ zeocin 抗生素平板上培养 3 d, 挑取阳性菌在 YPG 液体培养基中连续培养 10 h 以上, 以期有足够的时间使半乳糖诱导质粒 pSH65 产生 Cre 重组酶, 通过 Cre 重组酶切除 *loxP* 位点间的抗性基因, 然后涂布于含 G418 平板和不含 G418 平板上, 筛选不能在 G418 抗生素平板生长而能在不含 G418 抗生素平板上生长的酵母菌进行 PCR 验证, 并传代培养 15 次以上, 再次用 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ zeocin 抗生素平板挑选 pSH65 质粒丢失、无抗性标记的重组酵母菌 XFa7-B/XFa6-B 和 XFa7-TB/XFa6-TB。基因敲除过程如图 1 所示。

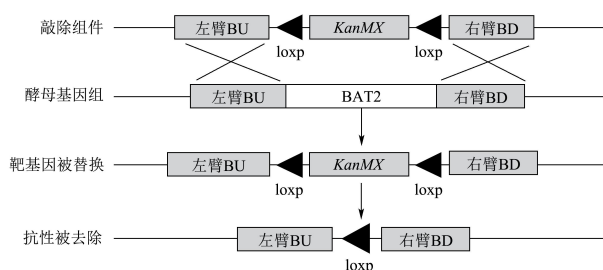


图 1 *BAT2* 基因敲除过程

Fig.1 *BAT2* gene knockout process

1.3.4 双倍体融合

将去掉抗性标记的单倍体酵母菌株 XFa7-B/XFa6-B 和 XFa7-TB/XFa6-TB 各取 100 μL 接种于含有 3 mL YPD 的试管中摇床震荡培养 8 h, 取 10 μL 菌液在显微镜下观察细胞融合形态, 将有哑铃型的酵母融合菌液稀释涂布于 YPD 平板 30 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 2 d, 挑取单菌落显微镜观察, 并分散椭圆菌落进行产孢培养验证双倍体 XFa1-B 和 XFa1-TB, 用引物 MAT-F/MAT- α /MAT-a^[18]进行菌落 PCR 验证。

1.3.5 黄酒发酵

为减少干扰, 本实验采用液态发酵黄酒。将浸泡后的糯米加 1.6 倍体积的水煮熟, 打浆后加 0.1%~0.3% 耐高温淀粉酶 95 $^{\circ}\text{C}$ 酶解 20 min 进行液化, 再加入糯米质量的 5wt% 麦芽、5wt% 花生饼粉、250wt% 水、0.25wt% 中性蛋白酶、0.25% 风味蛋白酶和 0.1%~0.3% (*V/V*) 糖化酶进行糖化, 条件为: 50 $^{\circ}\text{C}$ 糖化 4 h、65 $^{\circ}\text{C}$ 1 h 和 72 $^{\circ}\text{C}$ 20 min。过滤灭菌冷却后备用。将酵母菌接种到 10 mL 上述制备的黄酒发酵液中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养 24 h 后, 取 1 mL 菌液接种到含 50 mL 黄酒发酵液中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养 16 h, 得到种子液。取 100 mL

黄酒发酵液接种 3% (*V/V*) 酵母菌种子液 30 $^{\circ}\text{C}$ 发酵 7 d。

1.3.6 生长曲线

生长曲线参照徐佳等^[10]的方法, 取斜面菌种 1 环, 接到 10 mL YPD 液体培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$, 180 r/min 培养 12 h。再以 1% 接种量转接至 50 mL YPD 液体培养基继续培养, 每隔 2 h 测定 600 nm 处的吸光值。

1.3.7 理化性质测定

CO_2 释放量采用称重法测量^[18], 总酸、总糖、氨基态氮的测定参照国标 GB/T 13662-2018^[19], 酒精度的测定参照孟庆顺等^[20]的方法。

1.3.8 高级醇和氨基酸的测定

高级醇的测定参照 Wu 等^[21]的方法通过气相色谱内标法测定。氨基酸的测定参照芮鸿飞等^[22]的方法采用液相色谱测定。

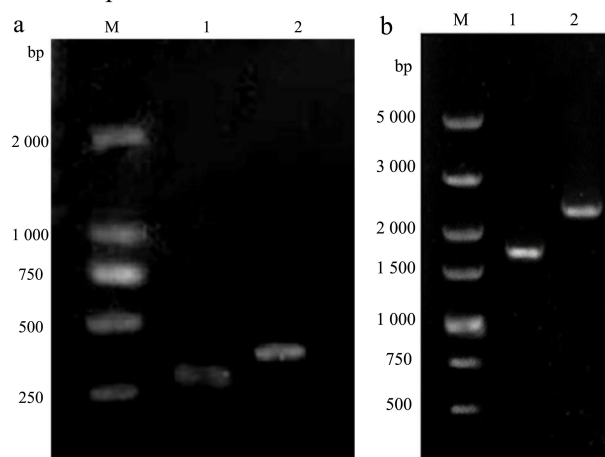
1.4 数据处理

所有实验均至少重复 3 次, 结果以平均数士标准差表示, 并通过 SPSS 25.0 软件采用单因素方差分析法 (ANOVA) 进行显著性分析。其中, 柱状图、生长曲线使用 Graph Pad Prism 8.0 软件进行分析作图。

2 结果与讨论

2.1 敲除组件和重组酵母菌的构建与验证

根据 1.3.1 的方法构建敲除组件, 以提取的酵母基因组 DNA 为模板, 用引物 *BAT2*-F1/*BAT2*-R1 和 *BAT2*-F2/*BAT2*-R2 分别 PCR 扩增出同源臂 BU 和 BD; 以 pUG6 质粒为模板, 用引物 *loxP*-F/*loxP*-R 扩增出 *loxP*-*KanMX*-*loxP*, 结果如图 2a、2b 所示, 左同源臂 BU (290 bp) 的和右同源臂 BD (361 bp) 和抗性标记 *loxP*-*KanMX*-*loxP* (1 736 bp) 通过融和 PCR 连接, 得到 *BAT2* 基因敲除组件 BU-*loxP*-*KanMX*-*loxP*-BD (2 338 bp)。



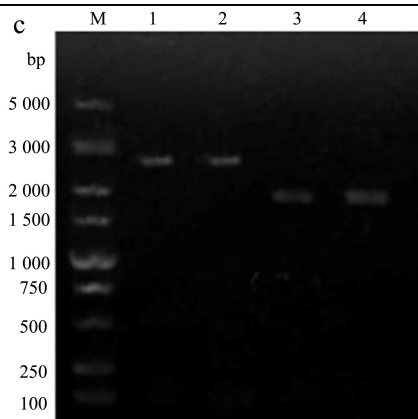


图2 敲除组件和重组菌株的PCR验证

Fig.2 PCR verification of disruption cassette

注: a: M-2 000 bp DNA Marker, 1-左同源臂 BU (290 bp), 2-右同源臂 BD (361 bp); b: M-5 000 bp DNA Marker, 1-*loxP-KanMX-loxP* (1 736 bp), 2-*BAT2* 基因敲除组件 (2 338 bp); c: M-5 000 bp DNA Marker, 1-重组菌株 XF1a7-TBK (2 600 bp), 2-重组菌株 XF1a6-TBK (2 600 bp), 3-原始菌株 XF1a7 (1 692 bp), 4-原始菌株 XF1a6 (1 692 bp)。

根据 1.3.2 的方法通过同源重组转化酵母 XF1a7/XF1a6 和 XF1a7-T/XF1a6-T, 然后挑选阳性菌落进行 PCR 验证, 结果如图 2c 所示(以 XF1a7-TBK、XF1a6-TBK 为例), 重组菌株 2 600 bp, 原始菌株为 1 692 bp, PCR 验证条带和理论值一致, 成功获得 *BAT2* 和 *THI3/BAT2* 基因缺失重组酵母菌。

2.2 *KanMX* 抗性筛选标记与 pSH65 质粒丢失验证

根据 1.3.3 的方法对重组菌诱导培养, 然后对去除抗性的重组菌的进行 PCR 验证, 验证结果如图 3a 所示(以 XF1a7-TB 为例)。以 *BAT2-A* 和 *BAT2-D* 作为引物, 未去除抗性的 XF1a7-TBK 的 PCR 产物大小为 2 600 bp、去除抗性的 XF1a7-TB 的 PCR 产物大小为 1 093 bp。以 *BAT2-A* 和 B-M 以及 M-B 和 *BAT2-D* 为引物的 XF1a7-TB 的 PCR 结果为无条带。结果表明重组菌的 *KanMX* 抗性基因成功去除。

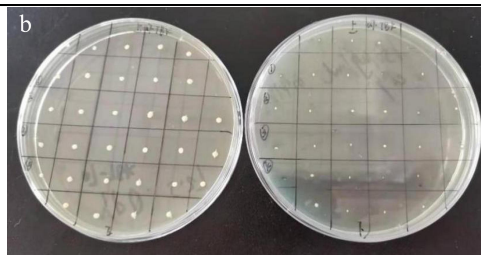
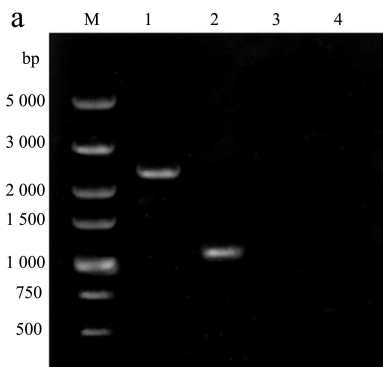


图3 重组菌株 XF1a7-TB 的抗性去除验证与质粒丢失验证

Fig.3 Resistant removal verification and plasmid loss verification of strains XF1a7-TB

注: a: M-5 000 bp DNA Marker, 1-XF1a7-TBK (引物 *BAT2-A/BAT2-D*), 2-XF1a7-TB (引物 *BAT2-A/BAT2-D*), 3-XF1a7-TB (引物 *BAT2-A/B-M*), 4-XF1a7-TB (引物 *M-B/BAT2-D*); b: 左图为不含 zeocin 抗生素 YPD 平板, 右图为含 zeocin 抗生素 YPD 平板。

根据 1.3.3 的方法将传代去除 pSH65 质粒的重组菌进行影印平板法筛选去除质粒的菌株。质粒丢失的菌株只能在不含抗生素平板上生长, 不能在含 zeocin 抗生素的平板上生长。结果如图 3b 所示(以 XF1a7-TB 为例), 不含 zeocin 抗生素的平板上重组菌生长, 含 zeocin 抗生素的平板上重组菌未生长。结果表明 pSH65 质粒成功丢失。

2.3 基因缺失双倍体融合的重组酵母菌

根据 1.3.4 的方法将不同配型单倍体 XF1a7-B/XF1a6-B 和 XF1a7-TB/XF1a6-TB 融合后, 以引物 MAT-F/MAT- α /MAT-a 进行菌落 PCR 验证, 结果如图 4 所示, 泳道 1 和泳道 3 中的 XF1a7-B 和 XF1a7-TB 均为 544 bp, 泳道 2 和泳道 4 中的 XF1a6-B 和 XF1a6-TB 均为 404 bp, 泳道 5 和泳道 6 均有 544 bp 和 404 bp 两条条带, 表明双倍体 XF1-B 和 XF1-TB 融合成功。



图4 融合双倍体菌株验证

Fig.4 PCR verification of Diploid strains

注: M-2 000 bp DNA Marker; 1-XF1a7-B, 2-XF1a6-B, 3-XF1a7-TB, 4-XF1a6-TB, 5-XF1-B, 6-XF1-TB (引物均为 MAT-F/MAT- α /MAT-a)。

2.4 基因敲除对重组菌生长性能的影响

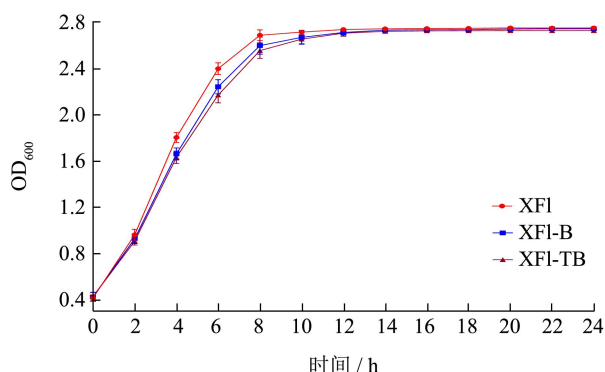


图5 原始菌XF1、重组菌XF1-B和XF1-TB生长曲线

Fig.5 The growth curves of XF1, XF1-B and XF1-TB

根据 1.3.6 的方法绘制原始菌 XF1、重组菌 XF1-B 和 XF1-TB 生长曲线, 结果如图 5 所示, 双基因缺失

酵母 XF1-B 和 XF1-TB 的前期的生长速率略低于 XF1, 但是最终生物量都没有明显差异。THI3 和 BAT2 基因缺失影响酵母对营养物质的吸收, 使其生长速率变慢, 但对酵母菌体生长性能影响不大。

2.5 基因敲除对重组菌发酵性能的影响

根据 1.3.7 的方法测定原始菌 XF1、重组菌 XF1-B 和 XF1-TB 基本发酵性能如表 3 所示。从表 3 可知, 重组菌 XF1-B 和 XF1-TB 的 CO₂ 产生量、总糖、总酸和酒精度与原始菌 XF1 相比都无差异, 说明 THI3 和 BAT2 基因缺失不影响酵母的基本发酵性能。而 XF1-B 和 XF1-TB 的氨基态氮分别为 0.66 g/L 和 0.65 g/L, 提高了 11.86%和 10.17%, 说明敲除 BAT2 能明显抑制支链氨基酸分解合成高级醇途径, 从而使得氨基态氮积累。

表 3 原始菌 XF1、重组菌 XF1-B 和 XF1-TB 基本发酵性能

Table 3 Basic fermentation performance of XF1, XF1-B and XF1-TB

菌株	CO ₂ 产生量/g	总糖质量浓度/(g/L)	总酸质量浓度/(g/L)	酒精度/%vol	氨基态氮质量浓度/(g/L)
XF1	7.74±0.12 ^a	18.89±0.17 ^a	6.41±0.23 ^a	11.62±0.15 ^a	0.59±0.02 ^b
XF1-B	7.77±0.07 ^a	18.74±0.35 ^a	6.38±0.12 ^a	11.74±0.08 ^a	0.66±0.02 ^a
XF1-TB	7.75±0.09 ^a	18.61±0.23 ^a	6.31±0.09 ^a	11.82±0.02 ^a	0.65±0.02 ^a

注: 同列右肩不同的小写字母表示具有显著差异 ($p < 0.05$)。

2.6 基因敲除对重组菌生成高级醇的影响

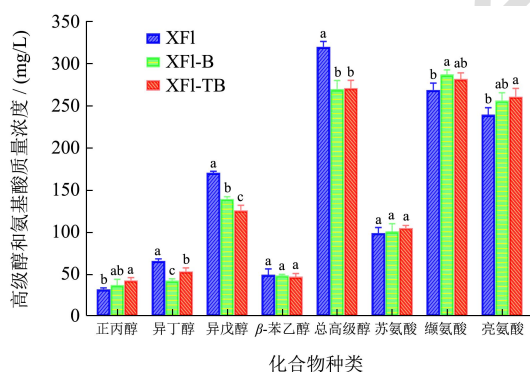


图6 原始菌XF1、重组菌XF1-B和XF1-TB发酵黄酒后的高级醇和氨基酸含量

Fig.6 The higher alcohol and amino acid content in fermented Huangjiu of strains XF1, XF1-B and XF1-TB

注: 不同的小写字母表示具有显著差异 ($p < 0.05$)。

根据 1.3.7 的方法测定原始菌 XF1、重组菌 XF1-B 和 XF1-TB 发酵黄酒后的高级醇和氨基酸质量浓度如图 6 所示。从图 6 可知, 重组菌 XF1-B、XF1-TB 发酵黄酒生成的异戊醇分别为 139.60、126.06 mg/L, 与原始菌 XF1 相比分别降低了 18.12%、26.06%; 异丁醇分别为 43.02、53.90 mg/L, 降低了 35.21%、18.83%; 正丙醇分别为 37.70、43.36 mg/L, 提高了 15.42%和

32.75%; 总高级醇分别为 269.59、270.77 mg/L, 降低了 15.65%和 15.28%; 缬氨酸分别为 286.89、281.63 mg/L, 提高了 6.75%、4.80%; 苏氨酸分别为 112.24、107.49 mg/L, 提高了 2.28%、6.14%; 亮氨酸分别为 255.98、260.71 mg/L, 提高了 6.97%、8.95%; 异戊醇/异丁醇分别为 3.24 和 2.34。可见, 重组菌 XF1-B、XF1-TB 酿造黄酒中总高级醇降低效果明显, 但是异戊醇/异丁醇比值相差大。

2.7 讨论

本研究构建重组菌 XF1-B 使发酵黄酒中异戊醇、异丁醇分别降低了 18.12%、35.21%, 与 Zhang 等^[23]敲除酿酒酵母 BAT2 基因分别降低了黄酒中异戊醇与异丁醇 14.20%、33.00%的结果相似, 与葛峻伶等^[24]敲除啤酒酵母 BAT2 基因分别降低了啤酒中异戊醇与异丁醇 9.55%、10.63%的结果相差较大, 可能是因为发酵原料以及酵母种类不同。对应酿造黄酒中缬氨酸和亮氨酸提高了 6.75%、6.97%, 根据高级醇代谢途径图 7 分析, 证实 BAT2 基因编码的支链氨基酸转移酶对支链氨基酸转化为高级醇途径起主要作用。

本研究构建重组菌 XF1-TB 使发酵黄酒中异戊醇、异丁醇分别降低了 26.06%、18.83%。Dickinson 等^[25]敲除酿酒酵母 THI3 基因接种以亮氨酸为唯一氮

源的培养基进行发酵,异戊醇降低 94%,接种以缬氨酸为唯一氮源的培养基进行发酵,异丁醇由 3 020 mg/L 上升为 3 080 mg/L^[26]。而郝欣等^[27]敲除 *THI3* 基因后接种玉米汁发酵,异戊醇并无明显变化,并猜测该合成途径受到破坏,异戊醇的合成会转向氨基酸转氨途径,本研究证实在 *THI3* 和 *BAT2* 同时缺失会导致异戊醇进一步减少,并与 Styger 等^[28]敲除酿酒酵母 *THI3* 与 *BAT2* 双基因异戊醇与异丁醇都有降低结论一致。重组菌 *BAT2/THI3* 基因缺失时,因 *THI3* 编码的类酮酸脱羧酶是亮氨酸分解代谢途径中 α -酮异己酸脱羧生成异戊醇的关键酶^[12],该途径受阻导致异戊醇生成量显著降低。重组菌 XF1-TB 与 XF1-B 相比异丁醇提高了 25.29%,目前还未见 *BAT2/THI3* 双基因缺失较 *BAT2* 单基因缺失异丁醇会提高的报道,对于 α -

酮异戊酸生成异丁醇的途径,因 3 种同工酶 (*Pdc1p*、*Pdc5p* 或 *Pdc6p*)中任何一种酶都能使 α -酮异戊酸脱羧^[27]而受影响小,异戊醇合成途径受阻导致 α -酮酸积累,而氨基酸的增加抑制了 α -酮酸合成氨基酸,使积累的 α -酮异戊酸在同工酶的作用下向异丁醇途径合成,异丁醇生成量显著提高,则重组菌 XF1-TB 酿造黄酒中异戊醇/异丁醇比值降低。黄酒中高级醇含量并不是越低越好,它是黄酒醇厚感的重要成分,黄酒中高级醇含量在 80~540 mg/L 之间比较合适^[7],异戊醇/异丁醇比值在 0.5~2.5 之间醉度较低^[29],适当的高级醇含量和不同高级醇比例是影响黄酒品质的重要因素。通过构建重组菌 XF1-TB 酿造黄酒的总高级醇、异戊醇/异丁醇比值都显著降低,有助于降低黄酒的“上头”醉度,提升黄酒品质。

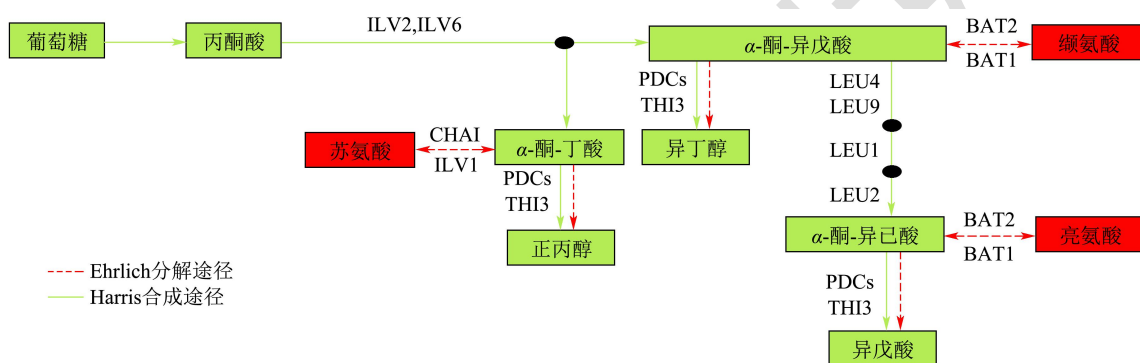


图 7 高级醇代谢途径

Fig.7 Higher alcohol metabolic pathway

3 结论

本研究成功构建 *BAT2* 基因缺失重组酵母菌 XF1-B 和 *BAT2/THI3* 双基因缺失重组酵母菌 XF1-TB。结果表明,重组菌 XF1-B、XF1-TB 都能有效降低发酵黄酒中总高级醇含量,分别降低了 15.65%、15.28%,同时对应提高黄酒中氨基氮含量约 11.86%、10.17%。这表明降低发酵黄酒中高级醇含量和提高黄酒中氨基酸等营养物质含量在技术上是可行的。重组菌 XF1-TB 比重组菌 XF1-B 优化了不同高级醇含量,即异戊醇/异丁醇比值由 3.24 降低为 2.34,这进一步降低了黄酒“上头”的醉度,为提高黄酒品质提供了新的技术思路。因此,可通过构建多基因缺失的重组酵母菌来降低酿造黄酒中高级醇含量和优化不同高级醇比例,从而有效降低黄酒醉度和提高黄酒品质。

参考文献

[1] 胡超凡,阮晖,金建江,等.黄酒健康功效及相关生物活性物质研究进展[J].中国酿造,2021,40(7):7-11
 [2] 闫春明.降低新酿黄酒中高级醇含量研究[D].合肥:合肥工

业大学,2017

[3] Li W, Wang J H, Zhang C Y, et al. Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* genetic engineering on the production of acetate esters and higher alcohols during Chinese Baijiu fermentation [J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2017, 44(6): 949-960
 [4] Lu Z, Xie G, Wu D, et al. Isolation and identification of the bitter compound from Huangjiu [J]. Food Chem, 2021, 349: 129133
 [5] Sun H, Liu S, Mao J, et al. New insights into the impacts of Huangjiu components on intoxication [J]. Food Chem, 2020, 317: 126420
 [6] Xie J, Tian X F, He S G, et al. Evaluating the intoxicating degree of liquor products with combinations of fusel alcohols, acids, and esters [J]. Molecules, 2018, 23(6): 1239
 [7] 孙中贯,刘琳,王亚平,等.酿酒酵母高级醇代谢研究进展[J].生物工程学报,2021,37(2):429-447
 [8] Wang Y P, Wei X Q, Guo X W, et al. Effect of the deletion of genes related to amino acid metabolism on the production of higher alcohols by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Biomed

- Res Int, 2020, 2020: 6802512
- [9] Colon M, Hernandez F, Lopez K, et al. *Saccharomyces cerevisiae* *Bat1* and *Bat2* aminotransferases have functionally diverged from the ancestral-like *Kluyveromyces lactis* orthologous enzyme [J]. PLoS One, 2011, 6(1): e16099
- [10] 徐佳,黄雪芹,杨建飞,等.酿酒酵母中 *BAT2* 基因敲除对黍基酒中高级醇的影响[J].食品与发酵工业,2021,47(19):133-139
- [11] Zhang C Y, Qi Y N, Ma H X, 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(4): 617-625
- [12] 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
- [13] Hiroshi N, Yuko K, Yoshinobu K K N, et al. A positive regulatory gene, *THI3*, is required for thiamine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Journal of Bacteriology, 1992, 174(14): 4701-4706
- [14] Christian C A, Pierre D, Isabelle S, et al. Deciphering regulatory variation of *THI* genes in alcoholic fermentation indicate an impact of *Thi3p* on *PDC1* expression [J]. BMC Genomics, 2014, 15(1): 1085
- [15] Ulrich G S H, Thomas F, Jens B, et al. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast [J]. Nucleic Acids Research, 1996, 24(13): 2519-2524
- [16] Li W, Wang J H, Zhang C Y, et al. Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* genetic engineering on the production of acetate esters and higher alcohols during Chinese Baijiu fermentation [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2017, 44(6): 949-960
- [17] 朱红,王梦飞,焦宏亮,等.酿酒酵母 *NST1* 基因敲除菌的构建及其对抗氧化的影响[J].生物加工过程,2020,18(5):549-555
- [18] Zheng N, Jiang S, He Y, et al. Production of low-alcohol Huangjiu with improved acidity and reduced levels of higher alcohols by fermentation with scarless *ALD6* overexpression yeast [J]. Food Chem, 2020, 321: 126691
- [19] GB/T 13662-2018,黄酒[S]
- [20] 孟庆顺,马金慧,汤琅琅.气相色谱法快速测量黄酒和调味料酒中酒精度含量[J].中国食品添加剂,2020,31(7):110-114
- [21] Wu L, Wen Y, Chen W, et al. Simultaneously deleting *ADH2* and *THI3* genes of *Saccharomyces cerevisiae* for reducing the yield of acetaldehyde and fusel alcohols [J]. FEMS Microbiol Lett, 2021, 368(15): fnab094
- [22] 芮鸿飞,张晓瑜,刘兴泉,等.PITC 柱前衍生-反相高效液相色谱法测定黄酒中游离氨基酸和生物胺[J].食品科学,2016, 37(8):159-163
- [23] Zhang C Y, Qi Y N, Ma H X, 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(4): 617-625
- [24] 葛峻伶,郭莹,刘小二,等.一次敲除 *BAT2* 同时过表达 *Lg-ATF1* 对啤酒酵母产醇酯的影响[J].现代食品科技,2019, 35(6):171-176
- [25] Dickinson J R, Lanterman M M, Danner D J, et al. A ¹³C nuclear magnetic resonance investigation of the metabolism of leucine to isoamyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. J Biol Chem, 1997, 272(43): 26871-26878
- [26] Dickinson J R, Harrison S J, Hewlins M J. An investigation of the metabolism of valine to isobutyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. J Biol Chem, 1998, 273(40): 25751-25756
- [27] 郝欣,肖冬光,张翠英.酿酒酵母类丙酮酸脱羧酶基因缺失对高级醇生成量的影响[J].微生物学报,2010,50(8):1030-1035
- [28] Styger G, Jacobson D, Prior B A, et al. Genetic analysis of the metabolic pathways responsible for aroma metabolite production by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2013, 97(10): 4429-4442
- [29] 谢佳.杂醇、酸、酯组成及氨基酸对白酒醇度的调节作用[D].广州:华南理工大学,2018