



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20180184

GAP1 基因缺失对上面发酵酵母高级醇代谢能力的影响

孙中贯, 王孟祺, 王亚平, 肖冬光

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

摘要: 以亲本上面发酵酵母工业菌株 S17 为对照, 研究了 *GAP1* 一个等位基因敲除重组菌株 S17G 和 *GAP1* 两个等位基因敲除重组菌株 S17G2 的发酵性能. 实验结果表明: 与亲本菌株相比, 重组菌株 S17G 的总高级醇生成量降低 17.47%, α -氨基氮利用能力降低 13.67%, 麦芽糖利用能力降低 31.08%; 重组菌株 S17G2 的总高级醇生成量得到进一步降低, 达到 210.58 mg/L, 较亲本菌株降低了 21.98%, α -氨基氮利用能力降低了 18.47%, 麦芽糖利用能力降低了 35.14%. 重组菌株 S17G、S17G2 的其他发酵性能与亲本菌株 S17 相比没有发生显著的变化.

关键词: 上面发酵酵母; *GAP1*; 高级醇; 氨基酸通透酶

中图分类号: Q939.97

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2020)01-0010-08

Effect of *GAP1* Gene Deletion on Higher Alcohols Production in Top-fermenting Yeast

SUN Zhongguan, WANG Mengqi, WANG Yaping, XIAO Dongguang

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

Abstract: The fermentation performances of the mutant strain S17G with one *GAP1* allele deletion and the mutant strain S17G2 with two *GAP1* allele deletion were investigated. The results showed that the mutants have the following advantages over the parental strain S17. The production of higher alcohols by S17G was 17.47% lower than that of the parental strain S17. The utilizations of α -amino nitrogen and maltose in the mutant strain S17G decreased by 13.67% and 31.08%, respectively, compared with the parental strain. The concentration of higher alcohols decreased to 210.58 mg/L in the mutant S17G2, reduced by 21.98% compared with the strain S17; α -amino nitrogen and maltose utilization in the mutant strain S17G2 were 18.47% and 35.14% lower than that of S17, respectively. Other fermentation performances of the mutants S17G and S17G2 were consistent with the parental strain S17.

Key words: top-fermenting yeast; *GAP1*; higher alcohol; amino acid permease

小麦啤酒是以小麦芽作为主要原料, 有时也使用未发芽的小麦作为原料生产的一类啤酒^[1]. 根据我国 2008 年颁布的 GB/T 4927—2008^[2]规定: 小麦芽应占麦芽使用总量的 40% 以上, 而德国啤酒《纯净法》规定小麦芽用量占总原料的 50% 以上^[3]; 目前在国际上并未形成统一的规定. 小麦啤酒采用上面发酵法酿制, 发酵温度一般为 20~24 °C^[4], 成品小麦啤酒具有泡沫洁白细腻、口味醇厚、苦味较轻、热量高、营养

丰富等特点^[5-6].

20 世纪 80 年代, 我国啤酒企业就已经开始引进小麦啤酒, 但多年来小麦啤酒在消费者中的认知度并不高. 近年来, 随着消费者的需求日趋多元化、细分化、个性化, 同时由于全球大麦资源的短缺、价格的上涨; 各地啤酒企业积极调整产品结构, 开发高品质、多元化、个性化的产品^[7]. 其中, 小麦芽以其优良的酿造特性而受到酿造者们的青睐^[8-9]. 但小麦啤酒

收稿日期: 2018-06-14; 修回日期: 2018-12-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31471724); 天津市高等学校创新团队培养计划资助(TD13-5013)

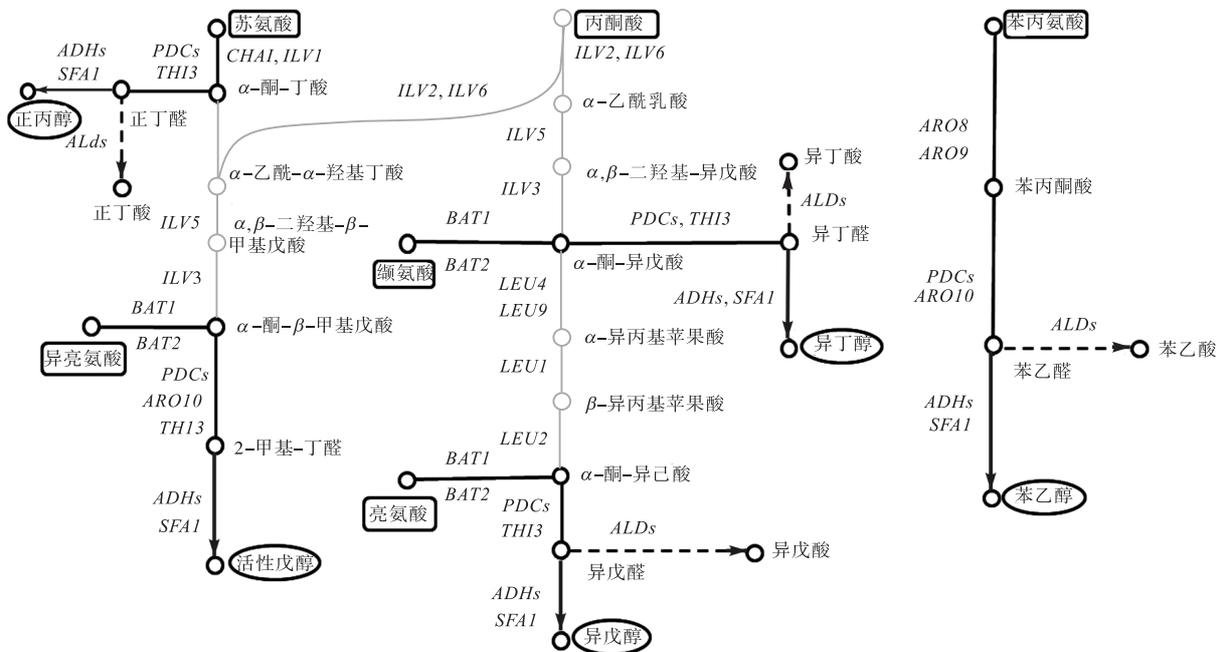
作者简介: 孙中贯(1984—), 男, 山东薛城人, 博士研究生; 通信作者: 肖冬光, 教授, xdg@tust.edu.cn

由于其较高的发酵温度以及原料中丰富的蛋白质含量, 导致成品中高级醇含量高达 300 mg/L 以上, 而大麦啤酒的高级醇含量一般在 100 mg/L 以下, 优质啤酒则需控制在 50 mg/L 左右^[10-11]. 高级醇含量过高, 将导致饮用后产生口渴、头痛等症状, 不利于饮用者的身体健康, 严重影响小麦啤酒的发展^[12].

高级醇是在啤酒酿造过程中, 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 产生的主要风味代谢产物之一; 其合成过程主要有两条途径: 一种是以丙酮酸为代谢起始物的糖酵解合成代谢途径; 另一种是以氨基酸为代谢起始物的氨基酸分解代谢途径, 如图 1 所示^[10-13]. 目前, 有关高级醇的代谢研究主要集中在这两条途径上^[11], 而有关酵母菌株碳、氮源代谢调控对高级醇代谢影响的研究还鲜有报道.

在酿酒酵母中, *GAP1* 基因编码的氨基酸转运蛋白是一种通用型的氨基酸运输载体, 能够将培养物中所有的在蛋白质中常见的 *D* 型和 *L* 型氨基酸转运到酵母细胞内, 供酵母生长代谢所用^[14-15]. Chiva 等^[16] 研究发现, *GAP1* 基因的缺失不仅会影响酿酒酵母对氮源的利用, 还对其他氨基酸转运蛋白的表达产生了影响. *GAP1* 基因对酿酒酵母氨基酸的利用具有十分重要的作用, 这有可能影响酿酒酵母合成高级醇的代谢能力, 但目前还没有研究报道 *GAP1* 基因与高级醇代谢之间的关系.

本研究以上面发酵酵母 S17 为出发菌株, 通过构建 *GAP1* 一个等位基因敲除菌株和 *GAP1* 两个等位基因敲除菌株, 考察 *GAP1* 基因缺失对酿酒酵母高级醇代谢能力及发酵性能的影响.



注: 黑色实线表示氨基酸分解代谢途径; 灰色实线表示糖酵解合成代谢途径; 黑色虚线表示相应酸的合成

图 1 酿酒酵母高级醇代谢网络图

Fig. 1 Biosynthetic pathways of higher alcohols formation in *Saccharomyces cerevisiae*

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒及引物

本研究中所用菌株见表 1, 引物见表 2. 质粒 pUG6(Kan^r, 包含 *loxP-KanMX-loxP*) 为本实验室保存. 其中, 上面发酵酵母 S17 购于中国工业微生物菌种保藏中心(保藏号为 CICC1929).

表 1 菌株

Tab. 1 Strains

名称	特性
S17	亲本上面发酵酵母工业菌株, 酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
S17G	S17 <i>GAP1</i> (<i>n-1</i>)/ Δ <i>gap1</i> : : <i>loxP-KanMX-loxP</i>
S17G-K	S17 <i>GAP1</i> (<i>n-1</i>)/ Δ <i>gap1</i> : : <i>loxP</i> : : <i>loxP</i>
S17G2	S17 <i>GAP1</i> (<i>n-2</i>)/ Δ <i>gap1</i> : : <i>loxP-KanMX-loxP</i>
S17G2-K	S17 <i>GAP1</i> (<i>n-2</i>)/ Δ <i>gap1</i> : : <i>loxP</i> : : <i>loxP</i>

表2 引物
Tab.2 Primers

名称	序列
GA-F	GGCAGCCTCACTAATCT
GA-R	CCTGCAGCGTACGAAGCTTCAGCTGTGTCC TTGGTCTGTTCT
GK-F	AGAACAGACCAAGGACAAGCTGAAGCTTC GTACGCTGCAGG
GK-R	CAAATACAGATACACCCGCATAGGCCACTA GTGGATCTGATA
GB-F	TATCAGATCCACTAGTGGCCTATGCGGGTG GTATCTGTATTG
GB-R	TTCATCTCGCTGTCTACT
G1-F	GATCCGGTGAATCTATG
G1-R	TTGATGGTCGGAAGAGGC
G2-F	CGTATGTGAATGCTGGTC
G2-R	TTTAGTTATCGGAGTGCC
DGA-F	TTCTAACTCAGGAGCCAATA
DGA-R	CCTGCAGCGTACGAAGCTTCAGCTGCAGC CAACTCACCCAGAG
DGK-F	CTCTGGGTGAGTTGGCTGCAGCTGAAGCT TCGTACGCTGCAGG
DGK-R	GCTCTACGGATTACTGGGCATAGGCCAC TAGTGGATCTGATA
DGB-F	TATCAGATCCACTAGTGGCCTATGCCAGT GAATCCGTAGAGC
DGB-R	ATGACAACCCAGACAAGG
DG1-F	GGGGAAGTTGATTTGGTA
DG1-R	CGATAGATTGTCGCACCT
DG2-F	ATGCGTCAATCGTATGTG
DG2-R	TACCATCTTGCTTTGTG
K-U	CAGCTGAAGCTTCGTACGC
K-D	GCATAGGCCACTAGTGGATCTG
GAP1-F	GTCCAACAGGTGGTTACAT
GAP1-R	AGCGGTGACGAAGACAGA
UBC6-F	GGACCTGCGGATACTCCTTAC
UBC6-R	TAATCGTGTGTGGGCTTGA

1.1.2 主要仪器

MS204S 电子天平,梅特勒-托利多仪器有限公司;PCR仪、核酸分析仪,美国Bio-Rad公司;全自动生长曲线分析仪,芬兰Bioscreen公司;1100系列高效液相色谱仪、7890A型气相色谱仪,美国安捷伦科技有限公司;实时荧光定量PCR仪,美国AB公司.

1.1.3 培养基

酵母培养基(YEPD, g/L):葡萄糖 20,蛋白胨 20,酵母浸粉 10,自然 pH.

细菌培养基(LB, g/L):胰蛋白胨 10,氯化钠 10,酵母浸粉 5,自然 pH.

半乳糖诱导培养基(YEPG, g/L):半乳糖 20,蛋白胨 20,酵母浸粉 10,自然 pH.

麦芽汁培养基:称量粉碎后的小麦芽,按 1:4 的料水比,30℃投料并保持 30 min,65℃保持 90 min,78℃保持 10 min,经过滤、煮沸、冷却至室温

后,调整表观糖度至 12°P.

以上培养基的固体培养基需加 20 g/L 琼脂粉.

1.2 实验方法

1.2.1 目的片段的扩增

以上面发酵酵母 S17 菌株的基因组 DNA 为模板,利用引物对 GA-F/GA-R、DGA-F/DGA-R、GB-F/GB-R、DGB-F/DGB-R 扩增 GAP1 基因的两条上游同源序列 GA 和 DGA、两条下游同源序列 GB 和 DGB. 以质粒 pUG6 为模板,GK-F/GK-R、DGK-F/DGK-R 为引物扩增 *KanMX*、*KanMX-D* 片段.

1.2.2 酵母的转化和重组子的筛选

酿酒酵母的转化采用 LiAc/SSDNA/PEG 法^[17]. 利用 G418 筛选转化子,提取转化子基因组进行 PCR 定点验证.

1.2.3 啤酒发酵实验

将甘油管中保存菌种转接至 YEPD 试管斜面 30℃活化培养 2 d. 取活化后的斜面菌种 1 环,接种于装有 50 mL 12°P 麦芽汁培养基的 250 mL 三角瓶内,24℃静置培养 36 h. 种子液经离心无菌水洗涤 2 次后得到酵母泥,按 0.5% 的接种量接入盛有 150 mL 麦芽汁培养基的 250 mL 三角瓶内,20℃静置发酵.

1.2.4 *KanMX* 抗性基因的去除

采用 Cre/*loxP* 报告基因挽救系统^[18],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 G418 抗性阴性转化子,以 K-U/K-D 为引物对进行 PCR 验证.

1.2.5 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR)

酵母 RNA 的提取使用 Yeast RNAiso Kit 酵母总 RNA 提取试剂盒(TaKaRa 公司),采用 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒(TaKaRa 公司)进行基因组 DNA 的去除和 cDNA 的合成. 使用 SYBR[®]Premix *Ex Taq*TM II 试剂盒(TaKaRa 公司)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 *UBC6* 进行基因表达量的分析.

1.2.6 指标测定

生长曲线的测定:以 YEPD 液体培养基为空白对照,采用全自动生长曲线测定仪测定菌液在波长为 600 nm 处的吸光度. 以时间为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制生长曲线.

CO₂ 排放量的测定:发酵前预先称量发酵体系总质量,发酵过程中每隔 12 h 称量 1 次,称量前应先摇晃三角瓶,以去除发酵液中的 CO₂,当质量减少小于 0.1 g 时,表示发酵已经结束^[19].

糖类物质的测定:葡萄糖、麦芽糖和麦芽三糖含量测定采用高效液相色谱法^[19]. 高效液相色谱条件为: Bio-Rad 公司的 Aminex HPX-87H 色谱柱(300 mm × 7.8 mm, 9 μm), 流动相为 5 mmol/L 的稀硫酸, 流量 0.6 mL/min, 柱温 65 °C, 检测器为示差折光检测器, 检测器温度 45 °C. 样品稀释到合适的质量浓度(低于 1 000 mg/L)并用 0.22 μm 的滤膜过滤, 进样量 20 μL.

α -氨基氮含量的测定: 采用茚三酮比色法测定. 2 mL 样品稀释液中加入 1 mL 显色剂, 沸水浴中加热 16 min, 立即在 20 °C 水浴中冷却 20 min, 于 570 nm 测定吸光度.

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测定. 色谱条件: LAP-930 色谱柱(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 50 °C, 保持 8 min, 以 5 °C/min 的升温速率升至 200 °C, 保持 5 min; 进样量 1.0 μL; 分流比 10 : 1.

其他发酵参数的测定: 利用手持糖度折光仪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; 酒精度及发酵度的测定依据啤酒分析方法进行^[20].

2 结果与讨论

2.1 *GAP1* 一个等位基因敲除重组菌株的构建

将 *GAP1* 基因上游同源序列 GA 片段、下游同源序列 GB 片段和 *KanMX* 片段转化上面发酵酵母 S17, 同源重组过程如图 2 所示. 对在 G418 质量浓度为 50 mg/L 的 YEPD 平板上生长的转化子进行 PCR 验证, 获得的阳性转化子命名为 S17G.

重组菌株 S17G 的 PCR 验证结果如图 3 所示. 以重组菌株 S17G 基因组为模板, 以 G1-F/G1-R 为引物能够扩增得到长度为 1 304 bp 的片段, 以 G2-F/G2-R 为引物能够扩增得到长度为 1 012 bp 的片段, 两条片段均与设计片段长度一致; 而以出发菌株 S17 基因组为模板无法获得与目的片段长度一致的条带, 同时也没有扩增得到其他长度的片段. PCR 验证结果证实, *KanMX* 片段已整合到出发菌株 S17 的基因组上, 且整合位点正确.

构建 *GAP1* 两个等位基因敲除的重组菌株, 需要以重组菌株 S17G 为模板, 并再次利用 *KanMX* 抗性基因作为筛选标记, 因而必须剔除存在于重组菌株 S17G 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.

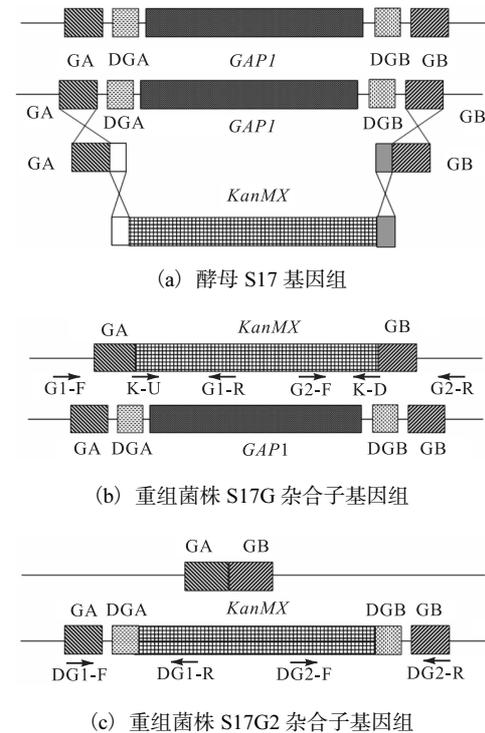
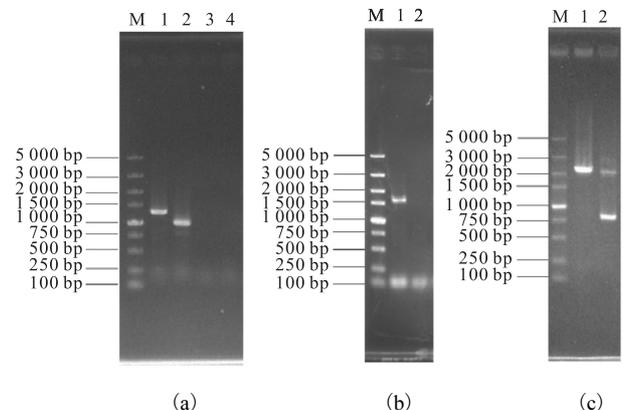


图 2 同源重组过程

Fig. 2 Homologous recombining process



(a) 重组菌株 S17G 的 PCR 验证. M. 5 kbp DNA marker; 1. 以 S17G 基因组为模板, G1-F 与 G1-R 为引物扩增所得片段(1 304 bp); 2. 以 S17G 基因组为模板, G2-F 与 G2-R 为引物扩增所得片段(1 012 bp); 3. 以 S17 基因组为模板, G1-F 与 G1-R 为引物扩增结果; 4. 以 S17 基因组为模板, G2-F 与 G2-R 为引物扩增结果.

(b) 剔除 *KanMX* 抗性基因重组菌株的验证. M. 5 kbp DNA marker; 引物为 K-U 与 K-D; 1. 以 S17G 基因组为模板, 扩增所得片段(1 613 bp); 2. 以 S17G-K 基因组为模板, 扩增结果.

(c) 重组菌株 S17G-K 敲除 *GAP1* 一个等位基因的 PCR 验证. M. 5 kbp DNA marker; 1. 以 S17 基因组为模板, DG1-F 与 DG2-R 为引物扩增所得片段(2 148 bp); 2. 以 S17G-K 基因组为模板, DG1-F 与 DG2-R 为引物扩增所得片段(2 148 bp, 755 bp).

图 3 重组菌株 S17G 的 PCR 验证

Fig. 3 PCR verification of the mutant strain S17G

重组菌株 S17G 基因组中的 *KanMX* 抗性基因剔除的 PCR 验证结果如图 3(b) 所示, 将获得的阳性转化子命名为 S17G-K. 以 K-U 与 K-D 为引物, 以重组菌株 S17G 为模板, 能够扩增出长度为 1 613 bp 的 *KanMX* 抗性基因片段; 以重组菌株 S17G-K 为模板, 无法扩增出与 *KanMX* 抗性基因长度一致的目的片段; 结果证实重组菌株 S17G 基因组中的 *KanMX* 抗性基因已被剔除.

重组菌株 S17G-K 敲除 *GAP1* 一个等位基因的 PCR 验证如图 3(c) 所示. 以出发菌株 S17 的基因组为模板, 利用引物 DG1-F/DG2-R 能够扩增得到 1 条长度为 2 148 bp 的片段, 片段长度与设计片段长度大小一致. 以重组菌株 S17G-K 的基因组为模板, 能够扩增得到 2 条长度分别为 2 148 bp 和 755 bp 的片段, 且片段长度与设计片段长度大小一致. PCR 验证结果表明重组菌株 S17G-K 为 *GAP1* 一个等位基因敲除的重组菌株.

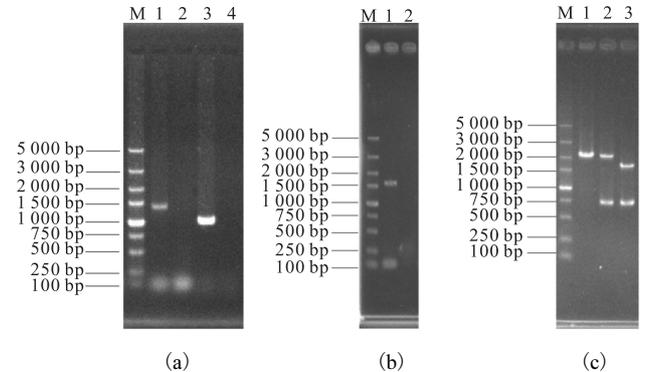
2.2 *GAP1* 两个等位基因敲除重组菌株的构建

采用缩进式基因整合的方式, 即同源序列 DGA 位于同源序列 GA 的下游区域, 同源序列 DGB 位于同源序列 GB 的上游区域, 且同源序列彼此之间均无重复区域, 将上游同源序列 DGA 片段、下游同源序列 DGB 片段和 *KanMX*-D 片段转化重组菌株 S17G-K, 同源重组过程参照图 2. 获得的 G418 抗性转化子经 PCR 验证, 结果如图 4 所示.

以重组菌株 S17G-K 为出发菌株, 再次进行 *GAP1* 基因的敲除, 将得到的阳性重组菌株命名为 S17G2. 以重组菌株 S17G2 基因组为模板, 利用两对引物 DG1-F/DG1-R、DG2-F/DG2-R 能够扩增获得长度分别为 1 394 bp 和 1 033 bp 的片段, 且片段长度与设计片段长度一致. 而以出发菌株 S17G-K 的基因组为对照, 无法扩增获得与目的片段长度一致的片段, 同时也没有扩增得到其他长度的片段. PCR 验证结果证实, 重组片段已整合到出发菌株 S17G-K 的基因组上, 且整合位点正确. 重组菌株 S17G2 剔除 *KanMX* 抗性基因的重组菌株 S17G2-K 的 PCR 验证如图 4(b) 所示. 以 K-U 与 K-D 为引物, 以重组菌株 S17G2 为模板, 能够扩增获得长度为 1 613 bp 的 *KanMX* 抗性基因片段; 以重组菌株 S17G2-K 为模板, 无法扩增得到与 *KanMX* 抗性基因长度一致的目的片段; 结果证实重组菌株 S17G2 基因组中的 *KanMX* 抗性基因已被剔除.

以重组菌株 S17G2-K 的基因组为模板, 利用引物 DG1-F/DG2-R 能够扩增得到长度分别为 1 705 bp

和 755 bp 的片段, 所得片段长度与设计片段长度大小一致, PCR 验证结果表明获得的重组菌株 S17G2-K 为 *GAP1* 两个等位基因敲除的突变株.



(a) 重组菌株 S17G2 的 PCR 验证. M. 5 kbp DNA marker; 1. 以 S17G2 基因组为模板, DG1-F 与 DG1-R 为引物扩增所得片段 (1 394 bp); 2. 以 S17G-K 基因组为模板, DG1-F 与 DG1-R 为引物扩增结果; 3. 以 S17G2 基因组为模板, DG2-F 与 DG2-R 为引物扩增所得片段 (1 033 bp); 4. 以 S17G-K 基因组为模板, DG2-F 与 DG2-R 为引物扩增结果.
 (b) 剔除 *KanMX* 抗性基因重组菌株的验证. M. 5 kbp DNA marker; 引物: K-U 与 K-D; 1. 以 S17G2 基因组为模板, 扩增所得片段 (1 613 bp); 2. 以 S17G2-K 基因组为模板的扩增结果.
 (c) 重组菌株 S17G2 敲除 *GAP1* 两个等位基因的 PCR 验证. M. 5 kbp DNA marker; 1. 以 S17 基因组为模板, DG1-F 与 DG2-R 为引物扩增所得片段 (2 148 bp); 2. 以 S17G-K 基因组为模板, DG1-F 与 DG2-R 为引物扩增所得片段 (2 148 bp、755 bp); 3. 以 S17G2-K 基因组为模板, DG1-F 与 DG2-R 为引物扩增所得片段 (1 705 bp、755 bp).

图 4 重组菌株 S17G2 的 PCR 验证

Fig. 4 PCR verification of the mutant strain S17G2

2.3 *GAP1* 基因转录水平

为了检测 *GAP1* 基因在重组菌株中的表达量, 利用实时荧光定量 PCR 技术, 以 *GAP1*-F 与 *GAP1*-R 为引物, 对重组菌 S17G、S17G2 及亲本菌株 S17 的 *GAP1* 基因转录水平进行测定, 结果如图 5 所示.

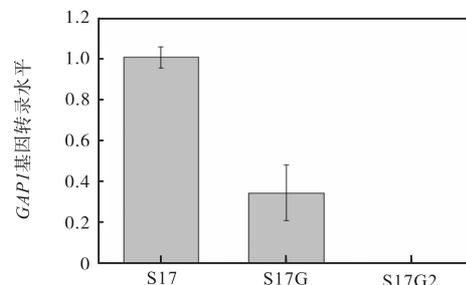


图 5 *GAP1* 基因转录水平

Fig. 5 Transcription of *GAP1* gene

GAP1 一个等位基因敲除后, 其转录水平约降低了 65%, *GAP1* 两个等位基因敲除后, 其转录水平为 0; 实验结果表明, *GAP1* 基因的敲除降低了其在酿酒

酵母菌株 S17 中的表达水平。

2.4 重组菌株生长性能分析

以原始菌株 S17 为对照,对敲除 *GAP1* 一个等位基因的重组菌株 S17G 和敲除 *GAP1* 两个等位基因的重组菌株 S17G2 进行生长曲线的测定,结果如图 6 所示。重组菌株的生长速率均受到了一定程度的影响。与原始菌株相比,重组菌株 S17G 的生物量没有发现显著的变化;而重组菌株 S17G2 的生物量受到了一定程度的影响,较原始菌株稍有下降。这可能是由于 *GAP1* 基因部分或完全敲除后菌株对氨基酸的吸收能力受到了影响,从而阻碍了菌体的生长。

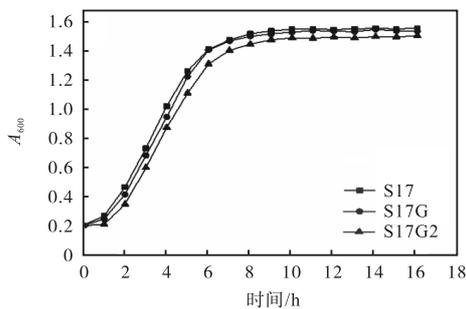


图 6 重组菌株 S17G、S17G2 及亲本 S17 的生长曲线
Fig. 6 Growth curves of mutants S17G, S17G2 and parental strain S17

2.5 重组菌株发酵性能分析

对重组菌株及亲本菌株进行全小麦麦芽汁发酵,每隔 12 h 称量 1 次,测定发酵液的 CO₂ 释放量,结果如图 7 所示。重组菌株 S17G、S17G2 与亲本菌株 S17 相比,在整个发酵过程中重组菌株 S17G 的 CO₂ 释放量较亲本菌株 S17 略低,重组菌株 S17G2 的 CO₂ 释放量最低;但重组菌株 S17G 及 S17G2 的整体发酵趋势与亲本菌株 S17 一致,说明 *GAP1* 基因的敲除没有显著影响菌株的发酵速率。

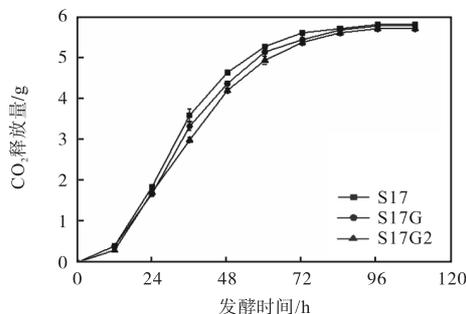


图 7 重组菌株 S17G、S17G2 及亲本 S17 的 CO₂ 释放量
Fig. 7 CO₂ emission amount of mutants S17G, S17G2 and parental strain S17

发酵结束后,测定各菌株发酵液中还原糖含量、酒精度及发酵度,进一步探究重组菌株的基本发酵性

能,结果见表 3。对表中数据进行 *t* 检验,结果表明重组菌与亲本菌株 S17 发酵液的酒精度、还原糖含量以及发酵度均无明显差异,说明 *GAP1* 基因的敲除没有影响啤酒发酵的基础指标。

表 3 重组菌株 S17G、S17G2 及亲本菌株 S17 的发酵性能比较

Tab. 3 Comparison of fermentation properties of mutant S17G, S17G2 and parental strain S17

菌株	还原糖/(g·L ⁻¹)	酒精度/%	发酵度/%
S17	5.83 ± 0.058	4.06 ± 0.021	69.37 ± 0.11
S17G	5.90 ± 0.000	3.99 ± 0.050	69.25 ± 0.19
S17G2	5.90 ± 0.000	3.98 ± 0.071	69.22 ± 0.38

2.6 不同菌株风味物质的代谢能力

重组菌株与亲本菌株代谢产生高级醇和酯类物质的差异,见表 4。与出发菌株 S17 相比,重组菌株 S17G 发酵产生的总高级醇含量降低了 17.47%,其中异丁醇的生成量下降最为显著,降低了 46.01%,另外,在酯类物质中乙酸异戊酯的生成量降低了 52.61%;重组菌株 S17G2 发酵产生的总高级醇含量进一步降低,降低了 21.98%,其中除异丁醇的生成量下降最为显著外,活性戊醇、正丙醇、异戊醇也有不同程度的降低,在酯类物质中,乙酸异戊酯的生成量降低了约 45.76%。这表明 *GAP1* 基因对酿酒酵母高级醇代谢具有极为显著的影响。

表 4 不同菌株风味物质代谢能力的比较

Tab. 4 Comparison of flavor substance produced by different strains

风味物质	质量浓度/(mg·L ⁻¹)		
	菌株 S17	菌株 S17G	菌株 S17G2
正丙醇	17.40 ± 0.32	16.39 ± 0.42*	15.57 ± 0.31**
异丁醇	91.88 ± 1.09	49.61 ± 1.97**	48.21 ± 1.34**
异戊醇	106.49 ± 1.18	103.54 ± 0.63	97.92 ± 0.49**
活性戊醇	26.48 ± 0.71	23.60 ± 1.20*	22.26 ± 1.02**
苯乙醇	27.64 ± 2.08	29.61 ± 0.64	26.62 ± 1.19
总高级醇	269.89 ± 2.40	222.74 ± 3.30**	210.58 ± 2.38**
乙酸乙酯	16.75 ± 1.13	14.45 ± 0.26	14.68 ± 0.54*
乙酸异戊酯	6.28 ± 0.97	2.98 ± 0.02*	3.41 ± 0.23**

注: *表示重组菌株与出发菌株代谢产风味物质的量差异显著 ($P \leq 0.05$), **表示差异极显著 ($P \leq 0.01$)。

2.7 α -氨基氮及糖类物质的代谢能力

利用茚三酮比色法测定发酵过程中重组菌株与亲本菌株发酵液中 α -氨基氮的含量,其变化趋势如图 8 所示。与亲本菌株 S17 相比,重组菌株 S17G 和 S17G2 对 α -氨基氮的利用能力明显减弱,不仅利用速率出现不同程度的减缓,发酵结束后发酵液中 α -氨基氮的含量也显著增加。结果证明, *GAP1* 基因的部分或完全缺失都会对上面发酵酵母 S17 利用 α -氨

基氮的能力产生影响,但影响程度并没有随基因功能的减弱呈叠加效应。

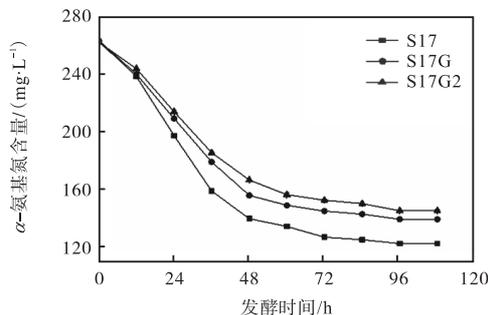


图8 不同菌株发酵过程中 α -氨基氮的含量

Fig. 8 Concentration of α -amino acid of different strains during fermentation

通过 HPLC 测定了发酵结束后,各菌株发酵液中麦芽糖、葡萄糖、麦芽三糖的含量,结果见表 5。

表5 不同菌株糖类物质代谢能力的比较

Tab. 5 Comparison of metabolic capacity of carbohydrates different strains

糖类物质	质量浓度/(g·L ⁻¹)		
	菌株 S17	菌株 S17G	菌株 S17G2
麦芽糖	0.74 ± 0.00	0.97 ± 0.02**	1.00 ± 0.11*
葡萄糖	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
麦芽三糖	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

注: *表示重组菌株与出发菌株代谢产糖类物质的量差异显著($P \leq 0.05$), **表示差异极显著($P \leq 0.01$)。

重组菌株 S17G、S17G2 和亲本菌株 S17 均能够充分利用全小麦麦芽汁中的葡萄糖和麦芽三糖;但对麦芽糖的利用,重组菌株与亲本菌株相比存在显著差异。发酵结束后,重组菌株 S17G 的麦芽糖利用能力降低 31.08%,重组菌株 S17G2 的麦芽糖利用能力降低 35.14%。这些实验结果表明,GAP1 基因的部分或完全缺失对上面发酵酵母 S17 利用麦芽糖的能力产生了一定影响。

重组菌株 S17G 与 S17G2 对 α -氨基氮和麦芽糖的利用能力均呈现下降的趋势,对重组菌株的发酵性能和生长性能产生了一定的影响,同时影响了重组菌株合成高级醇及酯类物质等次级代谢产物的能力。这可能是因为重组菌株对碳源和氮源利用能力的下降不足以对菌株的初级产物合成能力产生显著的影响,而只是显著影响了次级代谢产物的合成能力。

3 结论

本实验利用基因同源重组的原理及 Cre/loxP 报告基因挽救系统,在上面发酵酵母菌株中实现了

GAP1 基因的单敲除和双敲除。重组菌株 S17G 及 S17G2 的高级醇合成能力得到不同程度的减弱。通用型氨基酸通透酶编码基因 GAP1 的部分或完全缺失能够减弱酿酒酵母对 α -氨基氮的利用能力,同时对麦芽糖的利用能力产生一定程度的影响。发酵性能的测定结果表明,重组菌株符合啤酒发酵的基本要求,具有一定的实际应用潜力。

参考文献:

- [1] Langos D, Granvogel M, Schieberle P. Characterization of the key aroma compounds in two bavarian wheat beers by means of the sensomics approach[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(47): 11303-11311.
- [2] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. GB/T 4927—2008 啤酒[S]. 北京:中国标准出版社,2008.
- [3] Faltermaier A, Waters D, Becker T, et al. Common wheat (*Triticum aestivum* L.) and its use as a brewing cereal: A review[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2014, 120(1): 1-15.
- [4] Vanderhaegen B, Neven H, Coghe S, et al. Evolution of chemical and sensory properties during aging of top-fermented beer[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(23): 6782-6790.
- [5] Cui Y Q, Cao X H, Li S S, et al. Enhancing the concentration of 4-vinylguaiacol in top-fermented beers: A review[J]. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 2010, 68(2): 77-82.
- [6] Liguori L, Francesco G D, Russo P, et al. Quality attributes of low-alcohol top-fermented beers produced by membrane contactor[J]. Food and Bioprocess Technology, 2016, 9(1): 191-200.
- [7] 陈芳. 啤酒遇冷三大巨头争推白啤酒[N]. 中国商报, 2015-06-23(P06).
- [8] Delvaux F, Gys W, Michiels J, et al. Contribution of wheat and wheat protein fractions to the colloidal haze of wheat beers[J]. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 2001, 59(3): 135-140.
- [9] Phiarais B P N, Mauch A, Schehl B D, et al. Processing of a top fermented beer brewed from 100% buckwheat malt with sensory and analytical characterisation[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2012, 116(3): 265-274.
- [10] Procopio S, Qian F, Becker T. Function and regulation of

- yeast genes involved in higher alcohol and ester metabolism during beverage fermentation[J]. *European Food Research and Technology*, 2011, 233(5): 721–729.
- [11] Pires E J, Teixeira J A, 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[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(5): 1937–1949.
- [12] 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[J]. *食品科学*, 2011, 32(9): 188–192.
- [13] Eden A, Nederveelde L V, Drukker M, et al. Involvement of branched-chain amino acid aminotransferases in the production of fusel alcohols during fermentation in yeast[J]. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2001, 55(3): 296–300.
- [14] Donaton M C, Holsbeeks I, Lagatie O, et al. The *Gap1* general amino acid permease acts as an amino acid sensor for activation of protein kinase A targets in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Molecular Microbiology*, 2010, 50(3): 911–929.
- [15] Omura F, Fujita A, Miyajima K, et al. Engineering of yeast Put4 permease and its application to lager yeast for efficient proline assimilation[J]. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 2005, 69(6): 1162–1171.
- [16] Chiva R, Baiges I, Mas A, et al. The role of *GAP1* gene in the nitrogen metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 107(1): 235–244.
- [17] Gietz R D, Schiestl R H. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method[J]. *Nature Protocols*, 2007, 2(1): 38–41.
- [18] 张翠英, 林雪, 孙溪, 等. 敲除 *MIG1* 同时过表达 *MAL62* 面包酵母的发酵性能[J]. *天津科技大学学报*, 2014, 29(3): 1–5.
- [19] 张艳英, 肖冬光, 张翠英, 等. *BAT2* 缺失酿酒酵母基因工程安全菌株的构建及其杂交育种[J]. *食品与发酵工业*, 2012, 38(1): 36–40.
- [20] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 4928—2008 啤酒分析方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.

责任编辑: 郎婧

(上接第9页)

- New York: IEEE, 2017: 8122453.
- [62] Boulkenafet Z, Komulainen J, Li L, et al. OULU-NPU: A mobile face presentation attack database with real-world variations[C]//IEEE. 2017 12th IEEE International Conference on Automatic Face & Gesture Recognition (FG 2017). New York: IEEE, 2017: 7961798.
- [63] Liu Y, Jourabloo A, Liu X. Learning deep models for face anti-spoofing: Binary or auxiliary supervision[C]//IEEE. 2018 IEEE/CVF Conference on Computer Vision and Pattern Recognition. New York: IEEE, 2018: 8578146.
- [64] Zhang S, Wang X, Liu A, et al. A dataset and benchmark for large-scale multi-modal face anti-spoofing [EB/OL]. (2018–12–02) [2019–08–30]. <https://arxiv.org/abs/1812.00408>.
- [65] de Freitas Pereira T, Anjos A, De Martino J M, et al. Can face anti-spoofing countermeasures work in a real world scenario[C]//IEEE. 2013 International Conference on Biometrics (ICB). New York: IEEE, 2013: 6612981.
- [66] Pratt H, Williams B, Coenen F, et al. FCNN: Fourier convolutional neural networks[C]//Springer. Joint European Conference on Machine Learning and Knowledge Discovery in Databases. Berlin: Springer, 2017: 786–798.
- [67] Nikisins O, George A, Marcel S. Domain adaptation in multi-channel autoencoder based features for robust face anti-spoofing[EB/OL]. (2019–07–09) [2019–08–30]. <https://arxiv.org/abs/1907.04048>.
- [68] Laurensi R I A, Menon L T, Penna N, M C O, et al. Style transfer applied to face liveness detection with user-centered models[EB/OL]. (2019–07–16) [2019–08–30]. <https://arxiv.org/abs/1907.07270>.
- [69] Liu Y, Stehouwer J, Jourabloo A, et al. Deep tree learning for zero-shot face anti-spoofing[EB/OL]. (2019–04–05) [2019–08–30]. <https://arxiv.org/abs/1904.02860>.
- [70] Zhang P, Zou F, Wu Z, et al. FeatherNets: Convolutional neural networks as light as feather for face anti-spoofing[EB/OL]. (2019–04–22) [2019–08–30]. <https://arxiv.org/abs/1904.09290>.

责任编辑: 郎婧