

FKS 家族基因对酿酒酵母压力耐性的影响

杨歌^{1,2}, 王金晶^{1,2}, 李佳^{1,2}, 郑飞云^{1,2},
刘春风^{1,2}, 李永仙^{1,2}, 钮成拓^{1,2}, 李崎^{*1,2}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 酿酒科学与工程研究室, 江苏 无锡 214122)

摘要: *FKS* 作为 1,3-β-葡聚糖合成酶基因家族, 对维持酿酒酵母细胞壁有重要作用。为探究 *FKS* 家族基因对酿酒酵母细胞抗逆性及其合成乙醇的影响, 通过同源重组的方法分别构建了 *FKS1*、*FKS2* 和 *FKS3* 基因的缺失菌株, 并比较重组菌株和原始菌株的性能差异。结果表明, *FKS1* 缺陷菌株细胞壁的 1,3-β-葡聚糖含量低于原始菌株 60%, 生长性能、抗胁迫性以及合成乙醇能力都较差。*FKS3* 缺陷菌株的生长性能和胁迫性能与原菌株相似, 在发酵环境中抵抗外界环境能力和合成乙醇能力优于原始菌株。因此, *FKS1* 基因对维持酵母细胞活性和抗逆有重要作用, 而 *FKS3* 基因对抗逆有负面作用。

关键词: 细胞壁; 1,3-β-葡聚糖; 压力耐受; 乙醇合成

中图分类号: Q 815 文章编号: 1673-1689(2019)10-0126-09 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.10.018

Effects of *FKS* Family Genes on the Ability of *Saccharomyces cerevisiae* Stress Resistance

YANG Ge^{1,2}, WANG Jinjing^{1,2}, LI Jia^{1,2}, ZHENG Feiyun^{1,2},
LIU Chunfeng^{1,2}, LI Yongxian^{1,2}, NIU Chengtuo^{1,2}, LI Qi^{*1,2}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;
2. Lab of Brewing Science and Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The *FKS* family genes which encoded 1,3-β-glucan synthase are important to maintain the integrity of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. To illustrate the functions of *FKS* family genes on the ability of *S. cerevisiae* to tolerate the environmental stresses and ethanol production, the *FKS1*, *FKS2*, and *FKS3* knocked out strains were constructed by homologous recombination, then the physiological properties of wild-type strain and mutant strains were measured and compared. The results showed that the content of 1,3-β-glucan in cell wall of the *FKS1* knocked out strain was 60% lower compared to the wild type. The knockout of *FKS1* gene also weakened the abilities of growth, stress resistance and ethanol production for *S. cerevisiae*. Furthermore, the growth and stress

收稿日期: 2017-03-21

基金项目: 国家 863 计划项目(2013AA102106-03); 国家自然科学基金项目(31271919, 31571942, 31301539); 江苏省自然科学基金项目(BK20150159); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)。

* 通信作者: 李崎(1971—), 女, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事酿酒微生物与酶技术的研究。E-mail: liqi@jiangnan.edu.cn

引用本文: 杨歌, 王金晶, 李佳, 等. *FKS* 家族基因对酿酒酵母压力耐性的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(10): 126-134.

resistance abilities of *FKS3* gene knocked out strain were similar to those of the wild-type strain, however its abilities to tolerate the fermentation environment and to produce ethanol were better than those of the wild-type strain. Therefore, the *FKS1* gene was important for *S. cerevisiae* to keep the cells activity and to resist the environmental stresses while the *FKS3* gene negatively influenced the ability of *S. cerevisiae* to resist outer stresses.

Keywords: cell wall, 1,3- β -glucan, stress tolerance, ethanol metabolism

酿酒酵母与人类的生活息息相关,并被誉工业上最重要的微生物之一,它在发酵、烘焙、酿造、药物和化工生产中有着重要的作用,尤其在啤酒行业,酿酒酵母对啤酒的质量起决定性的作用^[1-2]。酿酒酵母在发酵过程中受到来自发酵环境和工艺操作的胁迫,酵母细胞需要应对高渗透压、乙醇的积累和营养物质匮乏等压力^[3-4],这些压力可能降低酿酒酵母活性、促进细胞的自溶甚至死亡^[5]。酿酒酵母的自溶对啤酒的质量包括啤酒的风味和品质有严重的负面影响^[6-7]。因此,提高酿酒酵母的压力耐受性对发酵行业、工业等都存在重大意义。

酵母细胞壁作为保护细胞的第一层屏障,主要的作用是维持内部渗透压、保护细胞免受机械压力的破坏以及维持酵母的细胞形态等^[8-9]。酵母细胞壁是双层网状结构,主要由电子透明的内层和电子不透明的外层构成,几丁质和 β -葡聚糖构成内层物质,甘露聚糖构成外层物质^[10-11]。其中 β -葡聚糖由1,3- β -葡聚糖(80%~90%)和1,3- β -葡聚糖(10%~20%)构成,是细胞壁结构重要的基础单元。1,3- β -葡聚糖螺旋结构使细胞壁灵活多变、一定的弹性以及较强的拉伸强度^[12]。催化合成1,3- β -葡聚糖最主

要的酶是1,3- β -葡聚糖合成酶(1,3- β -glucan synthase,GS)^[13]。GS中两个相似度为88%的催化亚基是Fks1p,Fksp2分别由*FKS1*和*FKS2*催化合成,Fks3p与Fks1p有56%的同源性^[14-15]。研究人员通过表达*FKS1*基因,发现突变菌株的耐受性和抗自溶能力均高于原始菌株^[16]。另有研究报道*FKS3*基因敲除菌株所产生的芽孢对温度、乙醇等的抗性发生改变,Fks3p会影响芽孢的生殖,但是其作用机制尚不清楚^[17-18]。*FKS*家族基因对细胞壁的代谢合成及细胞耐受能力有一定协调的作用。

本研究通过同源重组的方法,构建了三株*FKS*家族基因缺陷菌株,对比了重组菌株和原始菌株环境抗逆性、酵母细胞活性、合成乙醇能力等,为研究酿酒酵母耐受性及选育优良耐受性的酿酒酵母提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 本研究所用质粒及菌株 本研究所用的质粒和菌株如表1所示。

表1 本研究所用所用质粒和菌株

Table 1 Strains and plasmids used in this study

质粒与菌株	特性	来源
pUG6	含 <i>KanMX</i> 抗性	本研究室保藏
pMD 19T-simple	TA克隆专用载体,氨苄青霉素(Amp)抗性	TaKaRa
pTK1	由pMD 19T-simple衍生而来,带有 <i>KanMX</i> 基因,Amp抗性	本研究
pTK2	由pMD 19T-simple衍生而来,带有 <i>KanMX</i> 基因,Amp抗性	本研究
pTK3	由pMD 19T-simple衍生而来,带有 <i>KanMX</i> 基因,Amp抗性	本研究
大肠杆菌 JM109		本研究室保藏
酿酒酵母 W303 (<i>S. cerevisiae</i>)	MATa ade2-1 ura3-1 his3-11 trp1-1 leu2-3 leu2-112 can1-100 (ATCC)	本研究室保藏
fks1-QT	<i>FKS1</i> 基因敲除,原始菌株为W303	本研究
fks2-QT	<i>FKS2</i> 基因敲除,原始菌株为W303	本研究
fks3-QT	<i>FKS3</i> 基因敲除,原始菌株为W303	本研究

1.1.2 培养基及试剂

1) LB 培养基:氯化钠 10 g/L,酵母提取物 5 g/L,胰蛋白胨 10 g/L。筛选阳性转化子时加入 Amp 150 μ g/mL,固体培养基添加琼脂量为 18~20 g/L。

2) YPD 培养基:葡萄糖 20 g/L,酵母提取物 10 g/L 胰蛋白胨 20 g/L。筛选转化子时需添加 G418 至 200 μ g/mL,固体培养基添加琼脂量为 18~20 g/L。

3) 环境胁迫抗性平板:在 YPD 平板上填加无水乙醇至 8%浓度、NaCl 至 0.4 mol/L 浓度。

4) 麦汁培养基:将经过糖化工艺的麦汁过滤后煮沸 60~80 min。并添加酒花,添加量为 0.3 g/L,酒花分三次加入,刚煮沸时加入 1/2,煮沸 30 min 添加 1/4,煮沸前 10 min 添加 1/4。

5) 柠檬酸盐缓冲液:柠檬酸 10.5 g/L,柠檬酸三钠 14.7 g/L,用 1 mol/L 柠檬酸溶液调至 pH=4.0。

Amipicillin、IPTG Dioxane Free (IPTG) 与 Magenta-Gal(X-Gal) 购自生工生物(上海)股份有

限公司;质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒与胶纯化试剂盒均购自美国欧米茄公司;克隆载体 pMD 19T-simple、T4DNA 连接酶、感受态细胞制作试剂盒均购自 TaKaRa 公司;G418 购自 TIANGEN 生化科技有限公司;其他实验用试剂均购自 Sinopharm Chemical Reagent Co. Ltd.公司。

1.2 实验方法

1.2.1 基因克隆及质粒的构建 根据 pUG6 质粒的序列以及 SGD 公布的 *FKS* 家族基因序列,引物序列如表 2 所示。以 pUG6 质粒为模板,表 2 所示序列为引物,通过 PCR 分别扩增含有 *KanMX* 基因和 *FKS1*、*FKS2*、*FKS3* 同源臂的目的基因片段(中断盒),将 PCR 产物回收纯化后的与载体 pMD 19T-simple TA 连接得到重组质粒。重组质粒构建流程如图 1 所示,将重组质粒分别转入大肠杆菌 JM109 中保存。

表 2 敲除盒扩增引物

Table 2 Primers for amplification of disruption cassettes

引物名称	引物序列(5'-3')	片段/bp
<i>fks1</i> -QF	TTAAAATAAGCAAGTAGCTGAAATCAAGTCTTTCATACAACGGTCAGACCTAGGTCTAGAGATCTGTTTACGTTG	75
<i>fks1</i> -QR	TTTGGATAGAATATCAGTAAAATCAAGCGTTCAAGCAAGTATTGATTGTAATTAAGGGTTCTCGAGAGCTC	71
<i>fks2</i> -QF	AGGAAAAAATAAAAAAGTGGACAATAAAATAATTATTAATACTGTCATAGTTTAGGTCTAGAGATCTGTTTACGTTG	75
<i>fks2</i> -QR	TTGCGTGATAAACTTGCTTAGAAACAAAAATAGATTGTAATACTAAAAAATTAAGGGTTCTCGAGAGCTC	71
<i>fks3</i> -QF	CATATTGGGAAAAGAAAAACATACTGAGAAGGAAAGTTAAGGAGTTGAATTAGGTCTAGAGATCTGTTTACGTTG	75
<i>fks3</i> -QR	GGCACCAGCTCGCTTTATCAGCTACTCAAATAACTTTTTTTTTTTATCCATTAAGGGTTCTCGAGAGCTC	71 ^[19]

将得到重组质粒按照醋酸锂转化法转化到原始菌株 W303 中,为能达到高效的同源重组,设计引物中两个核苷酸序列之间同源序列为 50 bp 左右^[20]。转化后先涂布到 YPD 平板上,在 28 $^{\circ}$ C 条件下,培养至肉眼可见菌菌落,采用平板影印法影印到含有 200 μ g/mL G418 的平板上,对长出的菌落进行验证。验证所需引物如表 3 所示。

1.2.2 酵母生长性能分析 将原始菌株和重组菌株活化后以转接至 200 mL YPD 液体培养基中培养,接种后的菌浓约为 10^6 个/mL。28 $^{\circ}$ C 180 r/min 培养。在此培养过程中每 2 h 取一次样品,吸光光度法测定菌液在 560 nm 下的吸光值,并绘制生长曲线。

1.2.3 酵母细胞壁多糖分析 培养收集酵母泥 5

g,加入 100 mL 醋酸锂-SDS 溶液(醋酸锂 50 mmol/L,SDS 0.034 mol/L)溶液,在 70 $^{\circ}$ C 水浴温育 10 min,每隔 2.5 min 将三角瓶内的液体摇匀。将提取液在 5 000 r/min 下离心 10 min,除去菌体碎片。将上清液收集后,用 1 倍体积的 95%乙醇在 4 $^{\circ}$ C 沉淀多糖^[21]。加入 75 μ L 72%(w:v)浓硫酸,20~25 $^{\circ}$ C 放置 3 h,中间间隔一定时间混合体系。3 h 后,加入 950 μ L 纯水稀释浓硫酸至 1 mol/L 硫酸,准确沸水浴 4 h。反应结束后,滴加饱和 Ba(OH)₂ 至中性,4 $^{\circ}$ C 静置过夜,第 2 天测定溶液 pH 在 6~9 之间可进行下一步反应。离心去除沉淀,调整体积至 20 mL^[21]。将细胞壁酸解液稀释至适合浓度,经 0.45 μ m 滤膜过滤后上高效离子色谱进行分离检测。

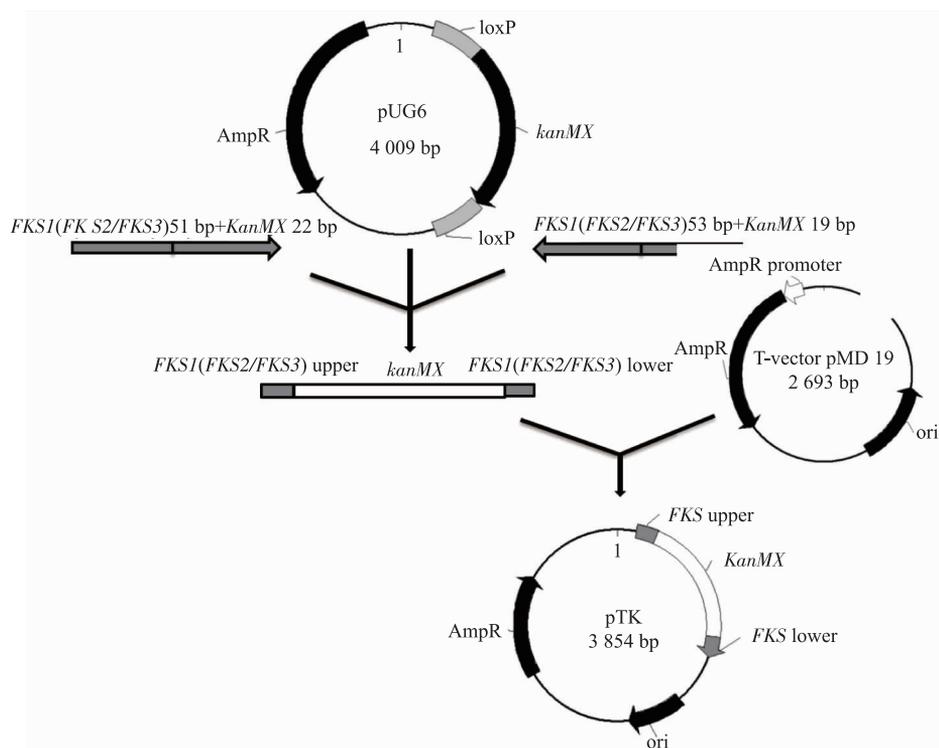


图 1 重组质粒构建示意图

Fig. 1 Construction of the recombinant plasmid

表 3 重组菌验证引物

Table 3 Primers for verified transformants

引物名称	引物序列(5'-3')	片段/bp
F1-UF	GATCAACAACCTTATCAGG	19
F1-UR	TCGCCGCAGCCGAACGACCG	20
F1-DF	AGACCATGAACACTGATCAACA	22
F1-DR	CATCTTGAGAGTTTCTGGT	19
F2-UF	ATTTCTCACTTGATAACCTTA	21
F2-UR	GCCGCAGCCGAACGACCGA	19
F2-DF	AGTGTATATATACTTCAGACTTA	20
F2-DR	TCATCACTATATGAGATTCCACG	20
F3-UF	ATTTCTCACTTGATAACCTTA	28
F3-UR	GCCGCAGCCGAACGACCGA	19
F3-DF	CGCGCAATTAAGTCTTGG	19
F3-DR	CATTGTTGAGATTTAGCTGT	19

1.2.4 酵母抗胁迫能力分析 抗性平板分析:对原始菌株和重组菌株的各项耐压性能的评价是根据菌体在不同压力 YPD 平板上的生长情况。将菌种活化后,取 5 mL 菌液转移到 30 mL YPD 培养基中,饥饿培养则接入相同体积的无菌水中培养 6 h。收集菌体并用无菌水洗涤两次,用血球计数板镜检计

数,根据稀释倍数比例,调节菌体浓度为 10^7 个/mL,10 倍梯度稀释,依次取 3.5 μ L 菌液点种在含有 8% (v/v)乙醇、0.4 mol/L NaCl 的抗性平板上,培养 2~3 d,观察生长情况。

1.2.5 液体发酵抗性分析 在斜面上取一环菌接种于 10 mL 麦汁培养基中,活化 36 h,在 9 mL 麦汁试管接入 1 mL 菌液,活化 48 h,将全部菌液接入 70 mL 三角瓶中于培养 48 h,所有活化温度都为 28 $^{\circ}$ C。离心收集酵母泥,按照 0.5% (w/v)的比例接入 300 mL 厌氧瓶中于 28 $^{\circ}$ C 下发酵,在发酵第 3,7 d 和 12 d 分别取样。

1)测定酵母死亡率,取得的样品与亚甲基紫染色液混合,染色 5 min,将混合液滴在血球计数板上镜检计数。红色为死亡细胞,无色为活细胞,计数并计算酵母死亡率。酵母死亡率计算公式如下

$$\text{酵母死亡率} = \frac{\text{死细胞数}}{\text{细胞总数}} \times 100\% \quad (1)$$

2)将收集的发酵液离心收集菌体,2.5%的戊二醛固定后,用扫描电镜(SEM)进行细胞显微学在 6 000 的倍数下观察细胞形太。

3)发酵结束后,测定发酵液酒精度。

2 结果与分析

2.1 *FKS1*、*FKS2* 和 *FKS3* 基因缺失型菌株的构建

将该基因中断盒转化入原始菌株 W303，通过同源重组法用 *KanMX* 替换 *FKS1* 基因，从而敲除 *FKS1* 基因。将得到的转化子提取基因组，进行 PCR 验证，结果如图 2 所示，图 2(a)设计引物是 *FKS1* 基因上游同源臂和 *KanMX* 之间的序列，扩增的是阳性结果为 1 213 bp；图 2(b)设计引物是扩增 *FKS1* 基因上下游同源臂之间的序列。重组菌 PCR 结果为 2 100 bp，原始菌株结果为 5 844 bp，不添加模板结果为空白，验证结果符合理论值，构建的重组菌命名为 *fks1*-QT。

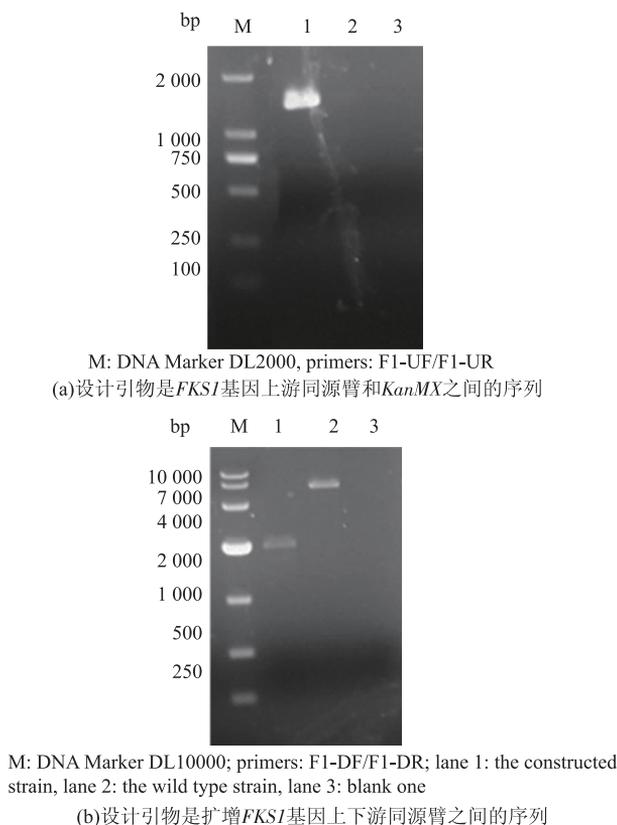


图 2 PCR 验证重组菌中 *fks1*-QT 中 *FKS1* 基因敲除
Fig. 2 PCR verification of the *FKS1* knocked-out in *fks1*-QT strain

同样的分子操作构建 *FKS2* 和 *FKS3* 缺陷型菌株。*FKS2* 和 *FKS3* 缺陷菌株的基因组分别 DNA 用 F2-UF/F2-UR、F2-DF/F2-DR 和 F3-UF/F3-UR、F3-DF/F3-DR 引物对进行 PCR 验证，结果如图 3 和图 4 所示，验证结果符合理论值，将重组菌株命名为 *fks2*-QT 和 *fks3*-QT。

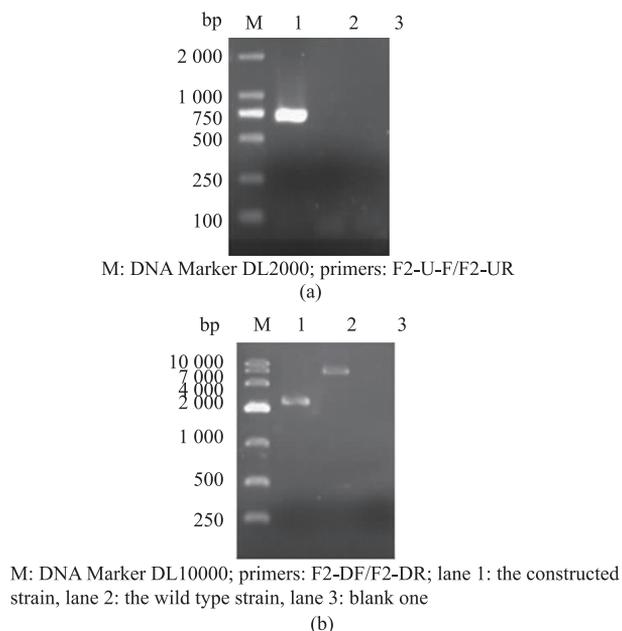


图 3 PCR 验证重组菌中 *fks2*-QT 中 *FKS2* 基因敲除
Fig. 3 PCR verification of the *FKS2* knocked-out in *fks2*-QT strain

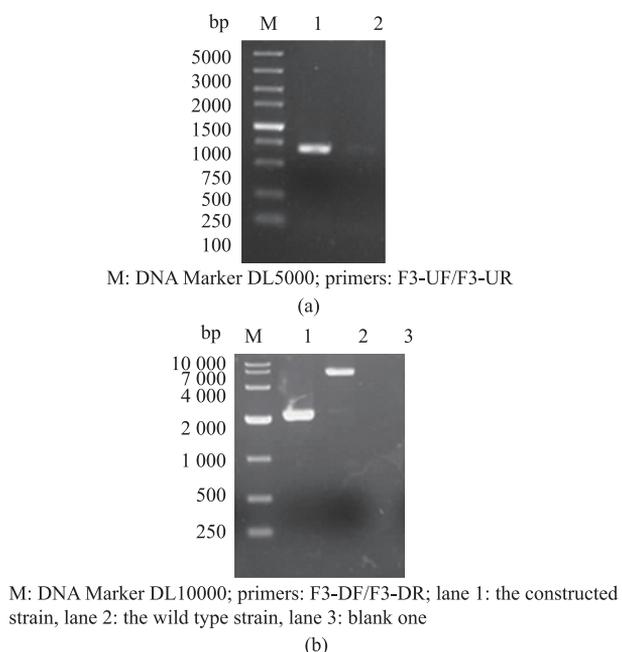


图 4 PCR 验证重组菌中 *fks3*-QT 中 *FKS3* 基因敲除
Fig. 4 PCR verification of the *FKS3* knocked-out in *fks3*-QT strain

2.2 重组菌生长性能分析

酵母的生长活性对酵母的工业应用有重要作用，图 5 所示为各重组菌株与原始菌的生长曲线，

由图5可知,重组菌株 *fks2*-QT 和 *fks3*-QT 的生长速度和原始菌株 W303 差异不大,而重组菌种 *fks1*-QT 的生长速度始终慢于原始菌株。*FKS1* 基因是合成细胞壁葡聚糖酶的关键基因,敲除 *FKS1* 基因的菌株合成酵母细胞壁葡聚糖的能力减弱,酵母细胞壁的正常代谢功能受到影响,从而影响酵母的生长。*FKS2* 基因对合成细胞壁葡聚糖有一定影响较小,*FKS2* 基因的缺失并没有影响酵母细胞的生长。*FKS3* 对酵母细胞的生长并无太大影响。因此,*FKS1* 基因对维持酵母细胞活性有一定作用,*FKS1* 基因的缺陷导致细胞的生长速度减缓,*FKS2*、*FKS3* 基因对酵母的生长率没有明显的影响作用。

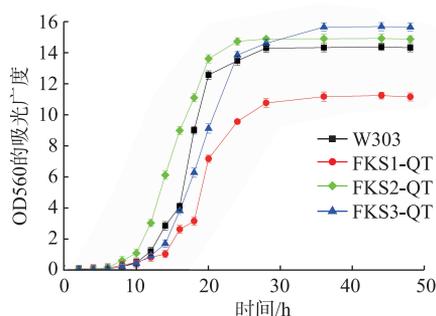


图5 重组菌株和原始菌株的生长曲线

Fig. 5 Growth curves of the recombination strains and wild type strain

2.3 不同菌株细胞壁多糖含量的分析

重组菌株和原始菌株酵母细胞壁多糖的含量如图6所示,重组菌株 *fks1*-QT (1.77 ± 0.11) mg/g, 3- β -葡聚糖的含量相对于原始菌株 W303 (3.44 ± 0.097) mg/g 降低了约 60%。重组菌株 *fks2*-QT (2.76 ± 0.13) mg/g 和 *fks3*-QT (3.10 ± 0.15) mg/g 的 1,3- β -葡聚糖的含量相对于原始菌株 W303 分别降低了 19.5% 和 3.8%,变化程度不大。*FKS1* 基因的缺失导致酵母菌株细胞壁 1,3- β -葡聚糖的含量大幅度降低。*FKS2* 基因缺失导致酵母菌株细胞壁 1,3- β -葡聚糖的含量明显降低,*FKS2* 基因对和细胞壁葡聚有影响但作用不大。*FKS3* 基因缺失对酵母菌株细胞壁 1,3- β -葡聚糖的含量并无太大影响。

重组菌株 *fks1*-QT 细胞壁中甘露聚糖的含量为 (3.42 ± 0.10) mg/g, 相对于原始菌株 W303 (2.81 ± 0.09) mg/g 增加了 17.8%, 重组菌株 *fks2*-QT 和 *fks3*-QT 细胞壁甘露聚糖的含量相对 W303 有一定

程度减少。重组菌株 *fks1*-QT (0.28 ± 0.04) mg/g 细胞壁中几丁质相对于原始菌株 W303 (0.12 ± 0.03) mg/g 增加了 57.1%, 重组菌株 *fks2*-QT 和 *fks3*-QT 细胞壁几丁质的含量相对 W303 没有太大变化。突变菌株细胞壁中 1,3- β -葡聚糖的含量都有不同程度的降低,酵母细胞壁成分是动态的,为了维持细胞壁完整性,其他多糖会随之产生变化。

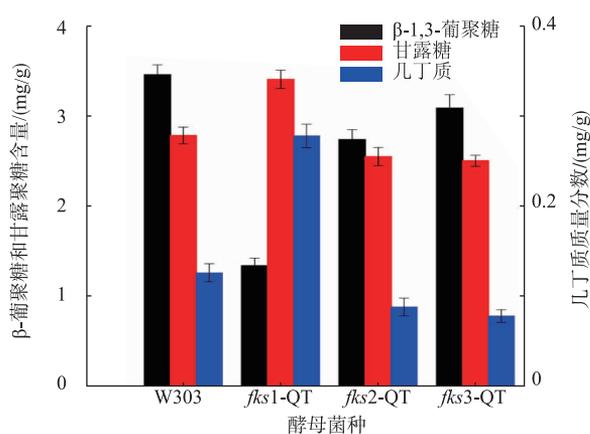


图6 细胞壁多糖含量

Fig. 6 Content of polysaccharides in cell wall

2.4 抗环境胁迫能力分析

酵母菌株在工业应用中要面对发酵液中环境的压力,是反映酵母性能的重要指标。原始菌株和重组菌株对渗透压、酒精浓度以及对饥饿的抗性如图7所示:在含有 0.5 NaCl mg/g 及饥饿培养条件下,原始菌株 W303 的生长优势最明显,而重组菌株 *fks1*-QT 的生长性能最差,而在在 10%乙醇的环境压力下,原始菌株 W303 的抗性最差。酵母细胞壁有抵抗外界渗透压的作用,细胞 1,3- β -葡聚糖的含量减少,导致酵母细胞细胞壁抵抗外界渗透压能力变弱,突变菌株在在含有 0.5 NaCl mg/g 的条件下生产性能较差。细胞壁 1,3- β -葡聚糖的含量减少导致突变菌尤其是 *FKS1* 基因缺失菌株对环境适应能力变弱,在饥饿培养条件下生长状况较差。在 10%乙醇环境压力下,原始菌株的生长状况较差。该结论可以证明,*FKS* 家族基因对细胞抗渗透压和饥饿的能力有重要作用,而对抗酒精胁迫的能力有负面影响。

2.5 酵母液体发酵实验

为判断不同菌株在啤酒发酵条件下的状况,将菌株置于麦汁培养基中发酵,模拟发酵环境。分别

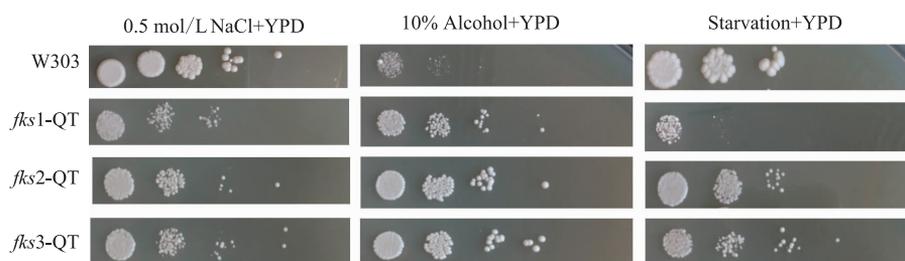


图7 不同菌株在抗性平板上的生长状况

Fig. 7 Different strains growth condition in stressful environment

于第2、7和12天取发酵液,测定酵母死亡率,并扫描电镜观察酵母的形态(图8)。如表4所示,第2天不同菌株的死亡率差异不大,酵母细胞的形态都是饱满、圆润、没有破损的,随着时间的推移不同菌株酵母的死亡率差异越大。第12天时,*fks1*-QT菌株的死亡率最高,观察SEM图片,细胞出现较大范围的自溶状况,细胞内容物流出,严重干瘪变形。*fks2*-QT菌株的死亡率与原始菌株W303接近,且与原始菌株W303相同部分酵母开始有破损,小范围的酵母出现自溶状况。重组菌株*fks3*-QT的死亡率低,并且低于原始菌株W303的死亡率,细胞依旧圆润,比较完整,良好的抵抗外界压力。由此证明,*FKS1*基

因通过控制对细胞壁的完整性对抵抗发酵环境的压力有重要的作用,*FKS3*基因对细胞抵抗发酵环境的压力作用有负面作用。

表4 细胞在发酵液中的死亡率

Table 4 Mortality rate of yeast cells in the fermentation broth

时间/d	W303/%	<i>fks1</i> -QT/%	<i>fks2</i> -QT/%	<i>fks3</i> -QT/%
3	0.61±0.01	1.07±0.02	0.84±0.01	0.60±0.02
7	3.00±0.02	5.73±0.04	4.21±0.01	2.68±0.01
12	8.61±0.01	17.19±0.03	11.8±0.04	8.03±0.02

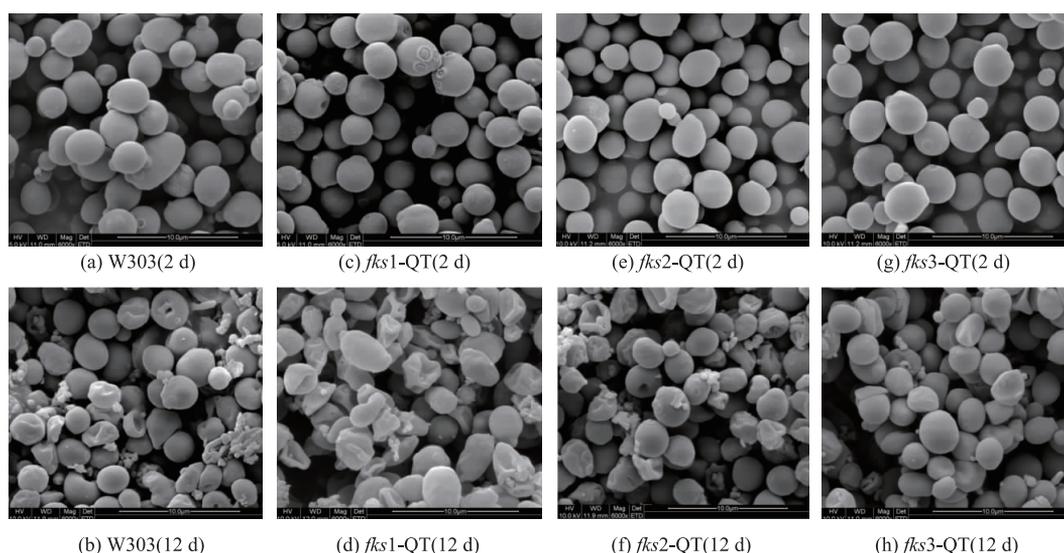


图8 原始菌株和重组菌株的扫描电镜(SEM)分析

Fig. 8 SEM analysis of wild type strain and mutant strains

2.6 *FKS* 家族基因对酵母合成乙醇能力的影响

模式菌株W303不具备工业酵母良好的发酵性能,但有完整的合成乙醇的途径,测定重组菌株和原始菌株的酒精度,可反映*FKS*家族基因对酵母细胞合成乙醇的影响,对工业酵母有一定的指导意

义。经过15d的发酵后测定发酵液的酒精度(图9),重组菌株*fks3*-QT(1.53±0.031)%的酒精度最高,之后依次为W303(1.23±0.032)%*fks2*-QT(0.85±0.031)%*fks1*-QT(0.485±0.031)%。根据2.5节的分析*FKS*家族基因对酵母的活性、对外界环境

的耐压性有不同的影响,抗发酵环境压力强的菌株 *fks3*-QT 活性更强导致发酵合成的乙醇浓度最高,抗发酵环境压力较弱的菌株 *fks1*-QT 活性更弱导致发酵合成的乙醇浓度最低。因此,FKS 家族基因通过影响酵母在发酵时的细胞状态,从而影响酵母合成乙醇的能力。

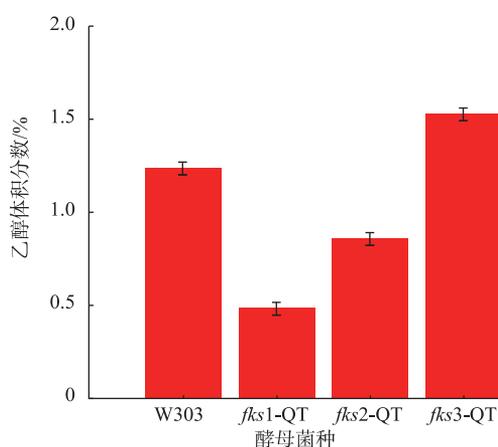


图9 不同菌株发酵酒精度

Fig. 9 Fermentation liquid alcohol of different strains

3 结语

酵母抵抗外界环境的压力对酵母在发酵工业

中,尤其是啤酒行业的生产起着关键的作用。了解酵母抗压力机制,对选育强壮的酵母有重要的指导作用。酵母也常被用来作为模式生物研究真核细胞的遗传学和生理学,但是多倍体酵母中,多位基因存在时在基因改良过程中有可能发生回复突变^[23],单倍体 W303 模式菌株则可以避免这些问题。

本研究运用生物学手段得到 FKS 家族基因单个敲除的重组菌株,比较原始菌株和重组菌种的生长状况、细胞壁多糖含量、抗胁迫能力以及在发酵环境下的死亡率等。发现重组菌株 *fks1*-QT 细胞壁 1,3- β -葡聚糖相对于原始菌株 W303 的含量降低了 60%,且生长性能较差,但抗酒精胁迫抗性更强,而渗透压和饥饿耐受性较差,在发酵环境中也更容易死亡。重组菌株 *fks2*-QT 细胞壁中 β -葡聚糖的含量略低于原始菌株 W303,其他生理形状与原始菌株相差不大。重组菌株 *fks3*-QT 在发酵环境中的死亡率低于原始菌株,SEM 电镜中 *fks3*-QT 的状态、酒精代谢活性也优于原始菌株,因此 *FKS1* 基因对酵母维持细胞耐受性、保证细胞正常生长有重要的作用,而 *FKS3* 基因对酵母耐受性有负面作用,但其作用机理仍待研究。

参考文献:

- [1] PANCHAL C J, STEWART G G. The effect of osmotic pressure on the production and excretion of ethanol and glycerol by a brewing yeast strain[J]. *Journal of the Institute of Brewing*, 1980, 86(5): 207-210.
- [2] POWELL C D, QUAIN D E, SMART K A. The impact of brewing yeast cell age on fermentation performance, attenuation and flocculation[J]. *FEMS Yeast Research*, 2003, 3(2): 149-157.
- [3] CAHILL G, MURRAY D M, WALSH P K, et al. Effect of the concentration of propagation wort on yeast cell volume and fermentation performance[J]. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 2000, 58(1): 14-20.
- [4] EKBERG J, RAUTIO J, MATTINEN L, et al. Adaptive evolution of the lager brewing yeast *Saccharomyces pastorianus* for improved growth under hyperosmotic conditions and its influence on fermentation performance [J]. *FEMS Yeast Research*, 2013, 13(3): 335-349.
- [5] POWELL C D, VAN ZANDYCKE S M, QUAIN D E, et al. Replicative ageing and senescence in *Saccharomyces cerevisiae* and the impact on brewing fermentations[J]. *Microbiology*, 2000, 146(5): 1023-1034.
- [6] GUO H, SUN X, LI B. Adsorption of lysozyme using citric acid modified waste beer yeast [J]. *Separation Science and Technology*, 2012, 47(7): 1038-1043.
- [7] XU Weina, WANG Jjinjin, CHEN Xi, et al. Changes in autolysis solution of brewer's yeasts and the evaluation of autolysis[J]. *Journal of Food Science & Biotechnology*, 2013, 32(6): 574-580. (in Chinese)
- [8] KLIS F M, BOORSMA A, DE GROOT P W. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Yeast*, 2006, 23(3): 185-202.
- [9] INOUE M, SUGO E, TOHOYAMA H, et al. Cell wall metabolism and autolytic activities of the yeast *Saccharomyces exiguus* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 1997, 21(1-2): 11-14.
- [10] ORLEAN P. Biogenesis of yeast wall and surface components [M]. In J. R. Pringle, J. R. Broach, and E. W. Jones (ed.), *The*

- molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*. **New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1997; 229-362.
- [11] LIU Yuanyuan, WANG Qiang, LIU Hongzhi. Fermentation conditions optimization and kinetics analysis for cell wall polysaccharides production of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture [J]. **Journal of Food Science & Biotechnology**, 2010, 29(6): 941-947. (in Chinese)
- [12] OHYA Y. Biosynthetic enzymes for (1-3)-beta-D-glucans, (1-3;1-6)-beta-D-glucans from yeasts: biochemical properties and molecular biology[M]. Elsevier Inc, 2009.
- [13] DIJKGRAAF G J P, ABE M, OHYA Y, et al. Mutations in *Fks1p* affect the cell wall content of beta-1,3- and beta-1,6-glucan in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Yeast**, 2002, 19(8): 671-690.
- [14] KELLY R, REGISTER E, HSU M J, et al. Isolation of a gene involved in 1,3-beta-D-glucan synthesis in *Aspergillus nidulans* and purification of the corresponding protein[J]. **Journal of Bacteriology**, 1996, 178(15): 4381-4391.
- [15] MAZUR P, BAGINSKY W. In vitro activity of 1,3-beta-D-glucan synthase requires the GTP-binding protein *Rho1*[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 1996, 271(24): 14604-14609.
- [16] LI Jia, WANG Jinjin, LI Qi. Overexpression of *FKS1* to improve yeast autolysis-stress [J]. **Chinese Journal of Biotechnology**, 2015: 1344-1354. (in Chinese)
- [17] ISHIHARA S, HIRATA A, NOGAMI S, et al. Homologous subunits of 1,3-beta-D-glucan synthase are important for spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Eukaryotic Cell**, 2007, 6(2): 143-156.
- [18] REINDERS J, ZAHEDI R P, PFANNER N, et al. Toward the complete yeast mitochondrial proteome: multidimensional separation techniques for mitochondrial proteomics[J]. **Journal of Proteome Research**, 2006, 5(7): 1543-1554.
- [19] 李佳. 细胞壁葡聚糖合成对酵母自溶性能的影响[D]. 无锡: 江南大学, 2015.
- [20] AVLON Y, KUPIEC M. New insights into the mechanism of homologous recombination in yeast [J]. **Mutation Research/Fundamental & Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 2004, 566(3): 231-248.
- [21] 吴建, 谢蓉蓉, 朱道辰, 等. 从酵母细胞壁中提取多糖的方法: 中国, CN10460460A[P]. 2015-05-13.
- [22] FRANCOIS J M. A simple method for quantitative determination of polysaccharides in fungal cell walls [J]. **Nature Protocol**, 2006, 1(6): 2995-3000.
- [23] DONALDSON U E, NGUYEN H T, STAHL U, et al. Improvement of *Saccharomyces* yeast strains used in brewing, wine making and baking[J]. **Spring Berlin Heidelberg**, 2008, 111: 67-98.

会 议 消 息

加拿大批准生育酚在脱水鱼汤和脱水软体动物肉汤中使用

2019年8月8日,加拿大卫生部发布 NOM/ADM-0136 号文件,修订允许使用的防腐剂列表,批准在脱水鱼汤和脱水软体动物肉汤中使用生育酚(tocopherols)。

据通知,在加拿大,生育酚已经被允许作为抗氧化剂用于几种食品中,包括冷冻鱼片和冷冻加工鱼片等。该规定于2019年8月8日生效。

[信息来源]食品伙伴网. 加拿大批准生育酚在脱水鱼汤和脱水软体动物肉汤中使用 [EB/OL]. (2019-8-8). <http://news.foodmate.net/2019/08/529639.html>