

Lager 啤酒酵母 *RLM1* 基因调控对其抗自溶性能的影响

王金晶^{1,2}, 李梦琦^{1,2}, 侯丹^{1,2}, 许维娜^{1,2}, 郑飞云^{1,2}, 刘春凤^{1,2}, 钮成拓^{1,2}, 李崎^{1,2}

1 江南大学 生物工程学院 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

王金晶, 李梦琦, 侯丹, 等. Lager 啤酒酵母 *RLM1* 基因调控对其抗自溶性能的影响. 生物工程学报, 2019, 35(6): 1059–1070.

Wang JJ, Li MQ, Hou D, et al. Regulations of *RLM1* gene affect the anti-autolytic ability of lager yeast. Chin J Biotech, 2019, 35(6): 1059–1070.

摘 要: 啤酒酵母的自溶会严重影响啤酒的品质, 而酵母的质量也被认为是啤酒酿造的关键因素之一。前期在啤酒酵母自溶的研究中发现细胞完整性途径中重要的转录因子 *RLM1* 基因与酵母自溶有密切关系。本研究在啤酒酵母单倍体菌株中对 *RLM1* 进行敲除与过表达, 发现 *RLM1* 敲除后, 酵母菌抗自溶性能差, 而 *RLM1* 过表达则有助于酵母的抗自溶。另外, 发现 *RLM1* 基因的敲除影响了酵母的抗渗透压性能、细胞壁损伤的耐受性、抗氮饥饿性能和温度耐受性。研究发现细胞壁组装及 DNA 损伤应答相关基因 *GAS1* 的表达随 *RLM1* 的过表达与敲除而调整, 而 CWI 途径中其他相关基因的调控方式并没有明显的规律, 推测 *RLM1* 可能主要影响了 CWI 途径中 *GAS1* 基因的表达, 进而提高啤酒酵母在恶劣环境中的抗逆性。此研究结果对于进一步选育抗自溶啤酒酵母以及了解啤酒酵母的自溶机制提供了基础。

关键词: lager 啤酒酵母, 抗自溶性能, *RLM1*, 细胞壁完整性

Regulations of *RLM1* gene affect the anti-autolytic ability of lager yeast

Jinjing Wang^{1,2}, Mengqi Li^{1,2}, Dan Hou^{1,2}, Weina Xu^{1,2}, Feiyun Zheng^{1,2}, Chunfeng Liu^{1,2}, Chengtuo Niu^{1,2}, and Qi Li^{1,2}

1 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 Laboratory of Brewing Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: The autolysis of brewer's yeast seriously affects the quality of beer and the quality of yeast is considered as one of the key factors in beer brewing. Previous studies on brewer's yeast autolysis showed that *RLM1* gene, an important transcription factor in cell integrity pathway, is closely related to the autolysis of yeast. In this study, *RLM1* was knocked out

Received: December 24, 2018; **Accepted:** February 28, 2019

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 31771963, 31571942).

Corresponding author: Jinjing Wang. Tel/Fax: +86-510-85918176; E-mail: jjwang@jiangnan.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 31771963, 31571942) 资助。

网络出版时间: 2019-03-21

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20190321.1053.001.html>

and overexpressed in a haploid brewer's yeast. *RLM1* disruption resulted in poor anti-autolysis performance of yeast, whereas overexpression of *RLM1* contributed to the anti-autolytic ability of yeast. In addition, *RLM1* gene knockout affected the osmotic stress resistance, cell wall damage resistance, nitrogen starvation resistance and temperature tolerance of yeast strain. The transcriptional level of *GAS1* involved in cell wall assembly and DNA damage response was regulated along with the expression of *RLM1*, whereas other genes in CWI pathway did not show apparent regularity. *RLM1* might mainly affect the expression of *GAS1* so as to improve the stress resistance of lager yeast in harsh environment. The result from this study help further understand the mechanism of yeast autolysis and lay a foundation for breeding brewer's yeast strain with better anti-autolytic ability.

Keywords: lager yeast, anti-autolytic ability, *RLM1*, cell wall integrity

环境胁迫一直是发酵工业中最普遍且不容忽视的问题之一。酵母是饮料工业中常用的菌种之一,也被认为是啤酒酿造的关键因素之一。啤酒发酵过程中,酵母细胞在多次胁迫下会发生自降解,这种自降解过程通常发生在啤酒的后酵期,对啤酒的品质有显著影响^[1]。啤酒酿造过程中如有超过 5% 的酵母细胞自溶就会对啤酒风味、泡沫稳定性、胶体稳定性造成影响并可能带来微生物污染的危害^[2]。

啤酒发酵后期发生的酵母自溶主要是由营养缺乏、应激反应以及酒精压力引起的。细胞壁是细胞的第一道防线,对环境中的不利因素作出反应。细胞壁完整性 (Cell wall integrity, CWI)、细胞壁的组织 and 生物合成主要由该通路负责^[2-3]。以 CWI 通路激活为主导的细胞转录重编程将细胞从各种应激条件下解救出来。酵母细胞壁上存在压力传感因子,包括 *Mtl1*、*Mid2*、*Wsc1*、*Wsc2* 以及 *Wsc3*, 当这些因子感受到压力时,触发了丝裂原活化蛋白激酶 (Mitogen-activated protein kinase, MAPK) 级联反应,在细胞内进行全局转录调控进而形成不同的应激反应来维持酵母细胞的生存^[3-4]。在 CWI 通路下游, *Slr2* 磷酸化后激活包括 *Swi4*/*Swi6* 和 *Rlm1*^[5] 在内的转录因子。据报道, *Slr2* 和 *Rlm1* 是密切相关的,在细胞壁受到损伤时, *Rlm1* 传导了大多数依赖于 *Slr2* 的转录激活作用,同时, CWI 途径与其他信号通路的转录因子之间存在的连接也必须通过 *Rlm1* 依赖的通路进

行调控^[6]。此外,最近的研究显示, *RLM1* 基因参与了乙酰转移酶 (*Spt-Ada-Gcn5*-acetyltransferase, SAGA) 复合物对细胞壁应激反应的转录调控,敲除 *RLM1* 将导致 CWI 通路失活^[4]。

自溶过程中,啤酒酵母细胞逐渐丧失生存能力,许多与应激反应相关的基因受到调控,以适应环境的变化。酵母细胞壁结构和形态将逐渐改变以应对环境中的胁迫压力^[1,7]。前期研究发现在酵母自溶过程中, CWI 途径中的压力传感因子编码基因包括 *MID2* 和 *MTL1* 表达水平下调,而 CWI 途径中 *BCK1* 和 *RLM1* 表达水平发生上调^[8]。同时,具有较强抗自溶能力的酵母细胞表现出刚性的细胞壁结构和较强的抗应激能力^[9]。虽然转录因子 *Rlm1* 在 CWI 通路中的作用在酿酒酵母中已有相关的报道,但是其在啤酒酵母抗自溶方面的研究尚少,同时,啤酒酵母由于其遗传背景的复杂性表现出与酿酒酵母不同的发酵及生理特性^[10-11]。因此,本研究对 lager 型啤酒酵母菌中的 *RLM1* 进行调控,研究其对啤酒酵母抗自溶能力的影响及作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和培养基

菌株 H5 为本研究室保藏的啤酒酵母单倍体菌株;克隆扩增质粒 pMD19-T simple 及大肠杆菌宿主菌 *E. coli* JM109 均购于 TaKaRa 公司;质粒

pUG6 为本研究室保藏^[12]。

LB 培养基 (1 L): 10 g 蛋白胨, 5 g 酵母抽提物, 10 g NaCl, pH 7.4, 固体培养基添加 20 g 琼脂粉, 121 °C 灭菌 20 min^[12]。含有氨苄青霉素的抗性培养基终浓度为 100 µg/mL。

YPD 培养基 (1 L): 10 g 酵母抽提物, 20 g 蛋白胨, 20 g 葡萄糖, pH 6.0, 115 °C 灭菌 15 min。含有 G418 的抗性培养基终浓度分别为 200 µg/mL、300 µg/mL 和 400 µg/mL。含有 NaCl 的抗性培养基的浓度为 1 mol/L。米卡芬净抗性培养基终浓度为 30 ng/mL。Calcofluor white 抗性培养基终浓度为 10 µg/mL。

YNB-N 培养基 (1 L): 1.7 g 无氨基酸无硫酸铵酵母氮源, 20 g 葡萄糖, 固体培养基添加 20 g 琼脂粉, 115 °C 灭菌 15 min^[12]。

1.1.2 试剂

质粒抽提试剂盒、大肠杆菌感受态制备试剂盒、限制性内切酶及连接酶购自 TaKaRa 公司; YNB 合成培养基、蛋白抽提试剂盒、溶菌酶购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; Fluorescent brightener 28 (Calcofluor white) 购自 Sigma-Aldrich 公司; 米卡芬净购自上海灏云药业。

1.2 主要方法

1.2.1 *RLM1* 基因的敲除与过表达

根据酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 的 *RLM1* 序列设计引物 RLM1-F/RLM1-R 扩增啤酒酵母 *RLM1* 基因, 测序后以所测 *RLM1* 的序列设计中断引物 RLM1-LF/RLM1-LR。各引物如表 1 所示。以 pUG6 质粒为模板, RLM1-LF/RLM1-LR 为引物用短侧翼序列 PCR 介导的一步法 (SFH-PCR)

表 1 构建菌株所用引物

Table 1 Primers used in this study

Name	Sequence (5'-3')
RLM1-F	TGGGTAGACGGAAGATTGAAA
RLM1-R	TTATATTTTGCTTGAATTTTTTT
RLM1-LF	ATGGGTAGACGGAAGATTGAAATCCAGAGGATTTCTGATGACAGACAGCTGAAGCTTCGTACGC
RLM1-LR	TTATATTTTGCTTGAATTTTTTTCTCCTGAAATATCAGTCGAAAAAGCATAGGCCACTAGTGGA TCTG
Upper-F	ATAAGAATGCGGCCGCTGGAGTTGCCCCCTTCTCTAAGC
Upper-R	CGGGGTACCGGACTAGTTCTTGGTAATCTTGTGAAACTCC
Lower-F	CTAGCTAGCTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTTGGATG
Lower-R	CGGTGGTACCATGGGCCCCCTTTGATGATTCATAATAACTTTTCG
<i>PGK1</i> -F	GGACTAGTTATTTTAGATTCTGACTTCAACTCAAG
<i>PGK1</i> -R	CGGGGTACCACATGCATGCACGCTGACTGTTTTATATTTGTTGTAAAAAGTAG
KanMX-F	ACATGCATGCTAGGTCTAGAGATCTGTTTAGCTTG
KanMX-R	CGGGGTACCCTAGCTAGCATTAAGGGTTCTCGAGAGCTCGTTTTTCG
RLM1-F	ACGCGTCGACATGGGTAGACGGAAGATTGAAATCCAG
RLM1-R	ACATGCATGCTTATATTTTGCTTGAATTTTTTTC
Up-1-F	TACGGAAACCTTGTTACGACT
Up-1-R	CCAAATATGTATTTCTTGCAATTG
Up-2-F	GGTTCACCTACGGAAACCTTG
Up-2-R	TTGACCAATTTATGCAAGTTTAT
Down-1-F	CGTAATGGCTGGCCTGTTG
Down-1-R	AAATCTCGACCCTTTGGAAG

扩增带有 *RLM1* 上下游同源臂的基因 *KanMX*, DNA 片段经纯化后进行测序, 构建成功后被用于转化啤酒酵母单倍体菌株 H5, 转化子涂布于新鲜的 YPD 平板, 24 h 后影印至含有 200 $\mu\text{g/mL}$ 的 G418 抗性平板上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h, 挑取阳性转化子进行菌落 PCR 验证, 获得 *RLM1* 敲除菌株。

以基因组 DNA 为模板, 以通用引物 EF3、EF4 扩增啤酒酵母 18S rDNA 序列, 测序后设计引物扩增其上下游各 200 bp 左右的片段作为同源臂。通过 PCR 获得 *PGK1* 启动子与目的基因 *RLM1*, 同时以 pUG6 为模板, PCR 获得抗性基因 *KanMX*, 表 1 为基因扩增所用引物及相应的酶切位点。将上述片段以 TA 克隆的方式连接至 pMD19-T simple 质粒上, 经 *Not* I 和 *Apa* I 双酶切后线性转化至 H5。在 G418 抗性平板上挑选阳性菌落并进行菌落 PCR 验证, 获得 *RLM1* 过表达菌株。根据 G418 抗性的强弱筛选高拷贝数的过表达菌株^[12]。挑取阳性转化子接种至 10 mL YPD 培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养 12 h, 3 000 $\times g$ 离心 5 min, 收集菌体并在无菌生理盐水中重悬, 调节菌体浓度至 $OD_{600}=1.0$, 梯度稀释后点滴至 G418 浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 、300 $\mu\text{g/mL}$ 及 400 $\mu\text{g/mL}$ 的抗性平板上^[12]。28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h, 观察菌株的生长状况, 最终筛选获得含有高拷贝数的 *RLM1* 过表达菌株。

1.2.2 Rlm1 蛋白的 SDS-PAGE 分离及质谱鉴定

将出发菌株 H5 和过表达菌株在 5 mL YPD 培养基中 28 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养 12 h, 后将菌液全部转接至 50 mL YPD 培养基, 28 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 3–5 h, 至菌液浓度为 $OD_{600}=1.0$ –1.5, 3 000 $\times g$ 离心 5 min, 弃上清收集菌体, 用 PBS 缓冲液清洗 3 次, 再用 Tris-HCl 缓冲液重悬菌体, 加入蛋白酶抑制剂复合物, 超声破碎提取蛋白质^[12-13]。Rlm1 是核蛋白, 因此本研究采用细胞核蛋白/浆蛋白抽提试剂盒同时抽提细胞质蛋白和核蛋白。

将蛋白样品与上样缓冲液混合, 沸水浴 5 min 后上样, 进行 SDS-PAGE 检测。将目的条带切下并进行 MALDI-TOF-TOF/MS 分析, 鉴定其是否为目的蛋白 Rlm1^[12]。

1.2.3 抗自溶指数测定

参考前期研究的酵母抗自溶指数检测方法, 抗自溶指数为 $(A_{260}/A_{280})/\text{死亡率}$, 跟踪测定出发菌 H5、基因敲除菌株及过表达菌株的 A_{260} 、 A_{280} 和死亡率, 计算获得抗自溶指数来表征各菌株的抗自溶性能^[14]。

1.2.4 胁迫耐受性分析

将 H5、基因敲除菌株和过表达菌株培养 12 h 后离心收集菌体, 重悬于无菌水中, 分别取样点滴至 NaCl 抗性平板、荧光增白剂抗性平板和米卡芬净抗性平板, 同时 1 000 倍稀释后涂布于 YNB-N 平板, 分析其对渗透压、细胞壁损伤和氮饥饿的抗性; 再将菌液点样于 YPD 平板, 在 22 $^{\circ}\text{C}$ 、28 $^{\circ}\text{C}$ 、37 $^{\circ}\text{C}$ 和 42 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 检测其对温度的耐受性。

1.2.5 啤酒发酵实验

取一环保藏的斜面菌转接至 10 mL 12 $^{\circ}\text{P}$ 麦汁试管中, 于 28 $^{\circ}\text{C}$ 下活化 24 h, 后以 1% 的接种量转接至含有 70 mL 12 $^{\circ}\text{P}$ 麦汁的三角瓶中于 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h, 按 2×10^7 CFU/mL 酵母细胞浓度转接至含 2 L 12 $^{\circ}\text{P}$ 麦汁的 3 L 带发酵栓的锥形瓶中, 11 $^{\circ}\text{C}$ 发酵 5 d。主酵结束后收集发酵液及酵母细胞进行理化指标分析。

1.2.6 细胞形态学分析

发酵结束后, 收集酵母细胞, 使用 5% 戊二醛 (0.1 mol/L 磷酸缓冲液, pH 7.2) 进行前固定, 之后使用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液漂洗酵母细胞, 用 1% 锇酸 (0.1 mol/L 磷酸缓冲液, pH 7.2) 进行后固定, 再用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液漂洗, 乙醇梯度脱水, 样品进行临界点干燥后转载至样品台上, 离子溅射仪镀膜后置于扫描电子显微镜下观察其细胞形态^[13], 醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色后进行

超薄切片, 置于透射电子显微镜下观察^[13-14]。

1.2.7 qRT-PCR 分析

收集酵母细胞重悬于无菌水中, 用试剂盒提取总 RNA 并按 TaKaRa 公司反转录试剂盒 PrimeScript RT reagent Kit 进行反转录, 获得的 cDNA 保存待用。使用 TaKaRa 公司的 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒和 Roche Light Cycler 480 II PCR 扩增仪 (Roche Diagnostics) 对 CWI 途径中关键基因进行 qRT-PCR 检测^[13], 条件如下: 95 °C 预变性 30 s; 变性 95 °C 5 s, 退火/延伸 55 °C 20 s, 循环 40 次; 95 °C 10 s, 65 °C 1 min, 95 °C 10 s。每个样品 3 个平行, 取平均值作为计算的基础。

2 结果与分析

2.1 *RLM1* 基因的敲除及过表达

用引物 RLM1-F/RLM1-R 以啤酒酵母单倍体菌株 H5 的基因组 DNA 为模板, PCR 扩增目的基因 *RLM1*。产物纯化后测序, 测序结果表明, 啤酒酵母 H5 的 *RLM1* 序列长度为 2 043 bp^[14], 与 NCBI 公布的酿酒酵母 *S. cerevisiae* S288c 的 *RLM1* 相似性达到 98%。根据 H5 的基因序列设计中断引物 RLM1-LF/RLM1-LR, 同时以 pUG6 质

粒为模板扩增 *KanMX*, 构建 *RLM1* 基因中断盒^[12], 总长度为 1 704 bp。片段线性化后转化啤酒酵母单倍体菌株 H5, 在含有 200 µg/mL G418 的 YPD 平板上筛选获得阳性转化子, 并进行 PCR 验证, 结果如图 1A 所示。出发菌 H5 应获得大小为 2 043 bp 的片段, 阳性转化子应获得 1 704 bp 的片段, 结果与预期相符, 最终得到基因敲除菌命名为 H-*rlm1Δ*。

将 18S rDNA 上游同源臂、*PGK1* 启动子、目的基因 *RLM1*、抗性基因 *KanMX*、18S rDNA 下游同源臂依次连接至 pMD19-T simple 上, 构建 *RLM1* 过表达载体。获得的质粒经 *Not* I 和 *Apa* I 双酶切后转化至啤酒酵母单倍体菌株 H5, 与 H5 基因组中 18S rDNA 发生同源重组, 替换原有片段, 采用影印法筛选阳性转化子, 目的基因拷贝数的高低以重组菌 G418 抗性的强弱来表征。即 G418 抗性强的重组菌, 其 *KanMX* 拷贝数高, 对应的 *RLM1* 拷贝数也高^[12,15]。过表达所获得的阳性重组菌影印至浓度为 200、300、400 µg/mL 的 G418 抗性平板上。结果发现, 重组菌最高能耐受 400 µg/mL G418, 28 °C 培养 48 h 后, 在含有 400 µg/mL G418 的抗性平板上挑选生长情况较

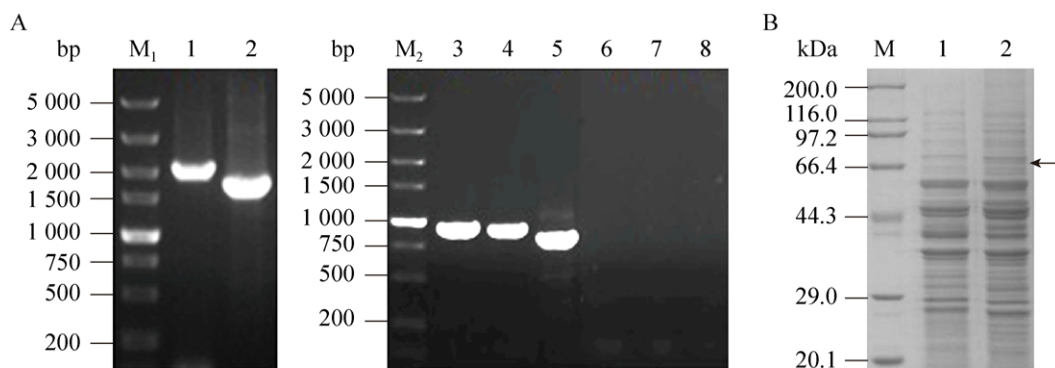


图 1 重组菌 H-*rlm1Δ* 及 H/*rlm1* 的构建及验证

Fig. 1 Construction and verification of the recombinant strains. (A) PCR verification of recombinant strains. Lane M₁: DNA marker DL5000; lane 1: H5; lane 2: recombinant strain H-*rlm1Δ*, primer pairs: RLM1-F/RLM1-R; Lane M₂: DNA marker DL5000; lane 3–5: H/*rlm1*; lane 6–8: host strain H5. Lane 3, 6: primer pair Up-1-F/Up-1-R; lane 4, 7: primer pair Up-2-F/Up-2-R; lane 5, 8: primer pair Down-1-F/Down-1-R. (B) SDS-PAGE verification of H/*rlm1*. Lane M: marker; lane 1: H5; lane 2: H/*rlm1*.

好的菌株进行 PCR 验证, 分别以 Up-1-F 和 Up-1-R、Up-2-F 和 Up-2-R、Down-1-F 和 Down-1-R 作为引物, 以 H5 为对照。目标片段大小应为 964 bp、944 bp 及 856 bp, 结果 (图 1A) 与预期相符。同时, 提取筛选获得的过表达菌株的细胞核蛋白和细胞质蛋白进行 SDS-PAGE 检验, 结果如图 1B 所示。目的条带被切下后进行 MALDI-TOF-TOF/MS 分析, 其中得分最高的蛋白质为 Rlm1 (登录号 gi|6325168), 说明 *RLM1* 基因在重组菌中得到了过表达^[12], 将获得的过表达菌株命名为 H/*rlm1*。

2.2 *RLM1* 基因调控对菌株抗自溶性能的影响

啤酒酵母对于啤酒的酿造至关重要, 啤酒优良的风味主要是由其代谢产物产生, 而啤酒酵母在发酵后期发生的自溶会导致细胞内容物的渗漏和溶出, 这是啤酒中杂异味的主要来源。在有些情况下, 例如在贮酒期间环境压力大、代谢产物积累和营养物质枯竭等, 啤酒酵母在短时间内发生大量的自溶, 对啤酒的质量造成剧烈的影响。具有较好抗自溶能力的啤酒酵母将对啤酒的风味有积极的贡献。

将 H-*rlm1*Δ、H/*rlm1* 与 H5 培养至稳定后期, 收集酵母泥, 用柠檬酸缓冲液洗涤 2-3 遍, 每 100 mL 缓冲液中加入 1 g 酵母泥, 30 °C 下进行模拟自溶, 跟踪 A_{260} 、 A_{280} 和死亡率的数值^[12], 计算抗自溶指数, 各酵母的抗自溶能力以抗自溶指数来表征^[14]。图 2 为 3 株菌的抗自溶指数和死亡率的比较结果。*RLM1* 敲除菌 H-*rlm1*Δ 死亡速度最快, 抗自溶指数数值相对最低, 表明其自溶程度高, 抗自溶性能差。开始时, H/*rlm1* 死亡速度快于 H5, 但随后逐渐减慢, 可发现其抗自溶指数高于 H5, 表明其抗自溶性能较好。

前期研究中发现 *RLM1* 在不同酵母及不同自溶态下的转录水平各异, 抗自溶性能好的酵母中 *RLM1* 的转录水平较高, 而抗自溶性能差的酵母

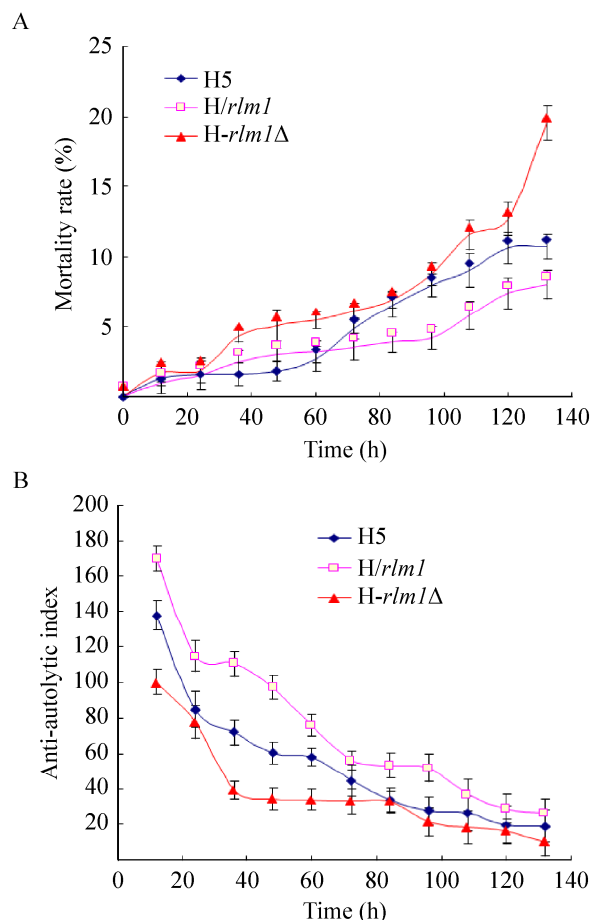


图 2 重组菌与原始菌死亡率 (A) 以及抗自溶指数 (B) 的比较

Fig. 2 Mortality rate (A) and anti-autolytic index (B) of recombinant strains and host strain.

中 *RLM1* 的转录水平较低^[8,12]。本研究结果也进一步印证了前期研究的结果, 同时可以推断 *RLM1* 的敲除影响了啤酒酵母的抗自溶能力, 而高表达量的 *RLM1* 可以减缓自溶的进程。

2.3 *RLM1* 基因调控对菌株胁迫耐受性的影响

2.3.1 渗透压及细胞壁损伤耐受性分析

在含有 1 mol/L NaCl 的 YPD 平板上对 H5、H-*rlm1*Δ 和 H/*rlm1* 进行点样分析, 于 28 °C 培养 48 h 后观察其生长情况, 检测各菌株对渗透压的耐受性, 结果如图 3 所示。H/*rlm1* 对渗透压的抗性稍强于出发菌 H5, 而 H-*rlm1*Δ 对渗透压的抗性明显弱于出发菌 H5^[12]。

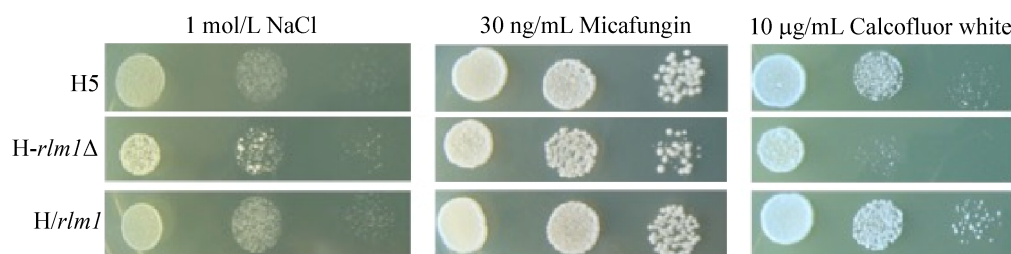


图3 重组菌与原始菌对渗透压及细胞壁损伤耐受性分析

Fig. 3 Resistance of recombinant strains and host strain against osmotic stress and cell wall damaging agents.

米卡芬净 (Micafungin) 能够非竞争性抑制酵母细胞壁必需成分 β -1,3-葡聚糖的合成, 是葡聚糖合成酶的抑制剂^[9], 可导致细胞壁合成的缺陷。荧光增白剂 (Calcofluor white) 能够与细胞壁组分几丁质结合, 细胞壁有破损的细胞会对荧光增白剂敏感^[17]。米卡芬净和荧光增白剂均能造成细胞壁压力, 进而引起细胞壁的损伤。将 H5、H-*rlm1* Δ 和 H/*rlm1* 分别点滴至含有 30 ng/mL 米卡芬净和含有 10 μ g/mL 荧光增白剂的抗性平板上^[12], 在 28 $^{\circ}$ C 条件下培养 48 h, 观察其生长情况, 评价各菌株对细胞壁损伤的耐受性情况。结果如图 3 所示, H-*rlm1* Δ 对米卡芬净和荧光增白剂均比较敏感, 特别在荧光增白剂平板上, 其生长被强烈抑制。H/*rlm1* 对米卡芬净的抗性与 H5 类似, 但 H/*rlm1* 对荧光增白剂的抗性略强于 H5。结果表明 *RLM1* 的缺失严重影响了细胞对几丁质相关的细胞损伤的抗性。

2.3.2 温度耐受性分析

在 YPD 平板上进行 H5、H-*rlm1* Δ 和 H/*rlm1* 进行点样, 分别放置于 22 $^{\circ}$ C、28 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C 和 42 $^{\circ}$ C 环境中培养, 检验其对温度的耐受性情况。三株菌在 42 $^{\circ}$ C 均不能生长 (结果未展示), 如图 4 所

示 H-*rlm1* Δ 在低温 (22 $^{\circ}$ C) 和高温 (37 $^{\circ}$ C) 下的生长能力与 H5 相比略有下降, H/*rlm1* 的生长状态与 H5 相当, 说明 *RLM1* 敲除后菌株对温度的耐受性受到一定的影响。另外, lager 型啤酒发酵温度一般在 11 $^{\circ}$ C 左右, 因此考察了 3 株菌在 11 $^{\circ}$ C 条件下的生长能力, 在低温胁迫的情况下, H-*rlm1* Δ 生长能力稍差一些, 但没有明显的区别。

2.3.3 氮饥饿耐受性分析

将 H5、H-*rlm1* Δ 和 H/*rlm1* 菌液稀释后涂布于 YNB-N 平板, 28 $^{\circ}$ C 培养 48 h, 检测各菌株对氮饥饿的耐受性情况。菌落计数结果为 H5 菌落数为 70 ± 5 , H-*rlm1* Δ 菌落数为 21 ± 4 , H/*rlm1* 菌落数为 92 ± 7 。从饥饿抗性来看, H/*rlm1* 强于 H5, 而 H-*rlm1* Δ 明显弱于 H5, 结果表明 *RLM1* 表达对菌株的氮饥饿耐受性起到了增强作用。

2.4 *RLM1* 基因调控对菌株发酵性能及抗自溶性能的影响

将重组菌与原始菌用于啤酒发酵试验, 在主发酵结束时, 测定了发酵液的几个主要参数, 以评价不同菌株的发酵能力。如表 2 所示, 从发酵度和真实浓度来看, 不同菌株的发酵能力相当,

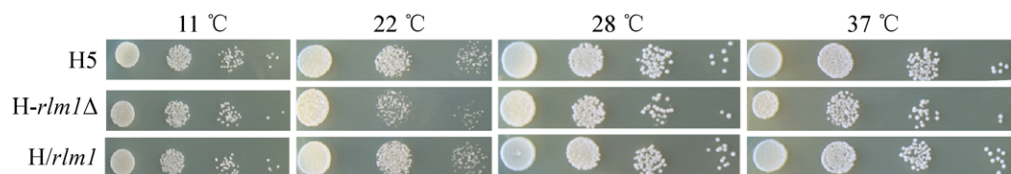


图4 重组菌与原始菌对温度耐受性的比较

Fig. 4 Temperature tolerance of recombinant strains and host strain.

表 2 啤酒发酵液指标分析

Table 2 Parameters measured from fermentation liquor ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

	H/ <i>rlm1</i>	H- <i>rlm1</i> Δ	H5	F value	P value
Real attenuation (%)	70.39 \pm 0.37	69.68 \pm 0.60	69.94 \pm 0.47	4.67	0.036
Real extract (%)	4.07 \pm 0.00	4.08 \pm 0.01	4.08 \pm 0.01	7.76	0.009
Diacetyl (μ g/L)	137.00 \pm 7.00	137.33 \pm 16.33	142.08 \pm 31.86	32.671	0.007
Acetaldehyde (mg/L)	3.39 \pm 0.00	2.96 \pm 0.00	3.11 \pm 0.00	607.044	1.61e-05
Ethyl acetate (mg/L)	7.14 \pm 0.01	8.58 \pm 0.13	7.08 \pm 0.04	47.115	2.15e-04
Isoamyl acetate (mg/L)	0.19 \pm 0.00	0.21 \pm 0.00	0.18 \pm 0.00	9.035	0.15
Isoamyl alcohol (mg/L)	53.84 \pm 1.89	59.36 \pm 0.69	58.87 \pm 1.08	24.298	0.001
Isobutanol (mg/L)	17.00 \pm 0.04	19.39 \pm 0.04	18.21 \pm 0.09	20.233	0.002
Dimethyl sulfide (mg/L)	68.67 \pm 2.13	80.67 \pm 2.03	75.87 \pm 3.31	14.09	0.001

主要风味化合物包括双乙酰、乙醛、乙酸乙酯、乙酸异戊酯、异戊醇、异丁醇和双硫醚 (DMS) 含量也没有太大的差别, 在正常发酵过程中, 健康的酵母不会发生自溶, 细胞内蛋白酶也不会水解自身物质, 主酵结束后对发酵液相关指标的测定结果表明基因调控对啤酒酵母的发酵能力及啤酒的主体风味没有直接的影响。

为了解释不同菌株抗自溶能力的差异, 收集发酵后细胞进行了扫描电镜 (SEM) 及透射电镜 (TEM) 分析。如图 5 所示, 与 H5 相比, H/*rlm1* 细胞体积略变小, 呈椭圆形, H-*rlm1* Δ 细胞体积略大, 且在发酵后更容易表现出皱缩及内凹的形态。与原始菌株比较, *RLM1* 的敲除可能影响酵母细胞的大小及在发酵过程中的耐受性。但是, 比较不同菌株的生长曲线, 3 个菌株之间没有显著差异。因此, 推测 *RLM1* 基因修饰导致了啤酒酵母的形态改变。同时, 啤酒发酵结束后收集

3 株菌进行透射电镜分析, 结果与 SEM 结果吻合。H5 细胞核区完整, 胞质液泡大 (图 6A)。在 H/*rlm1* 细胞发现液泡变小且分散 (图 6B-C), H-*rlm1* Δ 细胞中则发现了逐渐的染色质凝聚和核区的分散 (图 6D-E)。基因敲除的菌株中明显出现了细胞损伤和衰老的现象。

Rlm1 是 CWI 途径中重要的转录因子, 对其编码基因 *RLM1* 的调控可能直接影响细胞完整性途径中其他基因的表达。分析了发酵开始与结束时与 CWI 通路和细胞壁构建相关的基因 (包括 *WHI3*、*SNF2*、*KDX1*、*SWI4*、*FKS1*、*SLT2*、*ARV1*、*GAS1*、*SMI1*、*PTC1*、*RHO1*、*PKC1*、*BCK1*、*FKS2*、*SWI6*、*MLP1*、*WSC2*、*ROM1*、*ROM2*、*MTL1*、*TUS1*、*MID2*)^[17-18] 的相对 mRNA 水平, 其中许多基因在调节啤酒酵母的自溶过程中起着重要作用。结果发现, H/*rlm1* 中与 CWI 途径相关的基因在啤酒发酵结束时大部分发生上调 (图 7), 上调

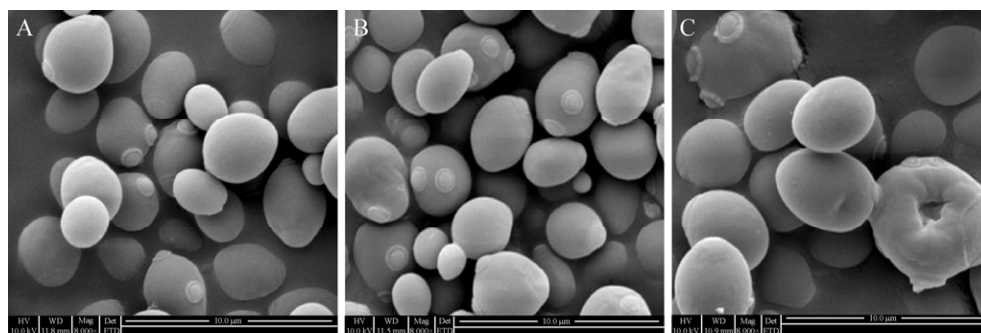
图 5 H5 (A)、H/*rlm1* (B) 及 H-*rlm1* Δ (C) 的扫描电镜图 ($\times 8\,000$)

Fig. 5 Scanning electron microscopy ($\times 8\,000$) images of host strain H5 (A), recombinant strain H/*rlm1* (B) and H-*rlm1* Δ (C) after beer fermentation.

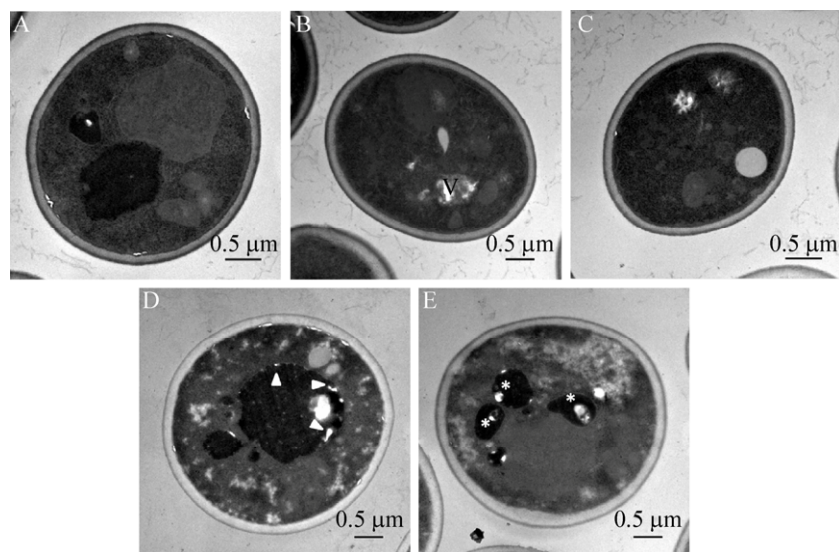


图6 H5 (A)、*H/rlm1* (B、C) 及 *H-rlm1Δ* (D、E) 的透射电镜图 ($\times 25\,000$)

Fig. 6 Transmission electron microscopy ($\times 25\,000$) images of host strain H5 (A), recombinant strain *H/rlm1* (B–C) and *H-rlm1Δ* (D–E) after beer fermentation. Regular nuclear area and large vacuole was viewed in A, small vacuoles (V) was viewed in B and C. Progressive chromatin condensation (Δ) was found in D and fragmented nucleus (*) was viewed in E.

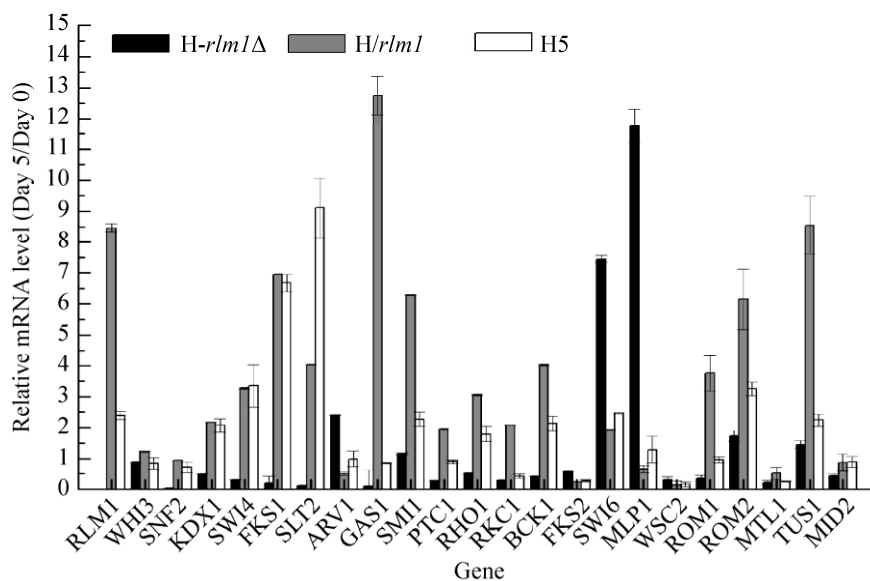


图7 H5、*H-rlm1Δ* 和 *H/rlm1* 中细胞壁完整性途径相关基因调控水平分析

Fig. 7 qRT-PCR analysis of genes relative to CWI pathway in *H-rlm1Δ*, *H/rlm1* and H5 before and after beer fermentation.

最多的基因为 *GAS1*, 该基因涉及细胞壁组装^[19]和 DNA 损伤应答^[20], 其表达水平较啤酒发酵开始时上调了 12.75 倍。而据报道参与细胞壁合成的 *SMI1* 上调了 6.29 倍。*FKS1*、*RHO1*、*PKC1*、

BCK1、*KDX1*、*SWI4*、*SLT2*、*ROM1*、*ROM2*、*TUS1* 在 *H/rlm1* 中表达相对上调, 其他基因的调控不明显。在 H5 菌株中也发现了类似的调控模式, 尽管 *RLM1* 的上调并不充分。然而, 与 *H/rlm1* 相比,

H5 中 *GAS1* 基因没有发现明显的调控。另一方面, 大部分基因的调控在 H-*rlm1Δ* 中发生下调, *GAS1* 基因表达也发生明显下调, 而 *SWI6* 和 *MLP1* 基因表达上调。*MLP1* 是与细胞核的稳定性及细胞形态相关的基因^[21], 该基因在 H-*rlm1Δ* 发生了明显上调 (11.76 倍)。细胞在发酵过程中受到损伤时, *MLP1* 基因可能发生上调以维持细胞的形态稳定。与发酵开始时相比, 转录辅助因子 Swi6 编码基因的表达水平上调了 7.45 倍。*WSC2*、*MTL1* 等细胞壁应激传感基因^[22]在 3 株菌中均呈现相似的调控水平。

3 讨论

在工业生产中, 由于受到成本的限制, 啤酒酵母需要被重复使用, 酵母的自溶一般会发生啤酒发酵的后酵期以及在多次反复回用之后, 目前国内大多数啤酒厂的啤酒酵母大多使用代数至 5 代, 第 5 代之后的酵母的生理性能发生大幅度下降, 自溶率显著增加, 造成酿造的啤酒的品质与风味受到极大的影响。而国际上优质的啤酒酵母一般可使用至 15 代。国内啤酒厂常用的啤酒酵母在传代使用过程中, 大部分啤酒酵母在使用至第 3 代时不会立即出现自溶的现象, 而第 4 代及第 5 代发酵结束后, 抗自溶性能较弱的酵母细胞就会出现明显的自溶现象^[16]。啤酒酵母抗自溶性能的提高能够有效地增加酵母的回用次数, 进一步提高生产效率, 降低成本。酵母细胞的应激反应被认为是一种进化适应, 使酵母能够对不利的环境条件作出反应, 并保持细胞的繁殖力。研究表明转录因子 Rlm1 参与了 MAPK 通路和细胞壁完整性 (CWI) 途径的激活^[23], 其编码基因 *RLM1* 是 Mpk1 在 CWI 通路下游的功能基因, 也参与了细胞壁完整性的维护。如前所述, *RLM1* 基因在酵母中表达不同, 其在抗自溶能力较强的啤酒酵母菌中表达水平较高, 而在抗自溶能力较弱的啤

酒酵母菌中表达水平较低^[8]。

自溶过程中, 细胞逐渐丧失生存能力, 电子运输、戊糖-磷酸盐途径、脂肪酸氧化、糖原分解代谢、海藻糖合成代谢、呼吸代谢等大部分能量的产生和利用也都受到干扰^[24]。在之前的研究中, 我们发现 25 个基因在酵母自溶过程中对细胞的拯救、防御和毒性起作用, 其中 12 个基因下调, 13 个基因上调。下调和上调的基因均参与了抗氧化应激、渗透压、化学刺激、热休克、DNA 损伤、pH 和饥饿等应激反应^[8]。在酵母自溶过程中, *KNH1*、*WSC2*、*DFG5*、*TPS3*、*RLM1* 等基因被发现可能有重要的作用^[2]。CWI 通路是负责细胞壁组织和生物合成的主要系统, 在细胞壁应激反应时, 转录因子 Rlm1 被招募到 *RLM1* 和 *SLT2* 基因的启动子上, 激活这两个基因启动细胞的转录重编程^[4,25-26]。*RLM1* 基因的敲除可能导致产生了细胞壁缺陷从而引起了 H-*rlm1Δ* 细胞对米卡芬净及荧光增白剂抗性的减弱。该基因作为参与 CWI 激活自调节反馈环的重要基因^[25], 其破坏导致 *RLM1* 反馈环的破坏, 进而影响 *SLT2* 在细胞壁损伤应力下的表达。啤酒酵母在自溶过程中会迅速丧失生存能力, 同时激活一系列应激反应对细胞进行改造以适应环境^[1]。前期研究中从两个不同自溶阶段的啤酒酵母菌株的蛋白质二维凝胶电泳谱可以清楚地发现, 在自溶过程中发现了蛋白质的大规模降解以及蛋白质数量的下降, 同时也出现了一些新的蛋白质^[2], 结合转录组学数据我们推测啤酒酵母细胞对其基因组进行了大量的重编程以响应环境变化^[8]。酵母细胞作为一种动态变化的结构, 在生长和发酵过程中通过氧化剂应激、渗透应激、乙醇应激、饥饿应激等多种应激反应系统来调节细胞壁的组成和结构^[1,7,23]。细胞壁完整性通路调节酵母细胞使其在恶劣的环境中能够遵循严格的规律来维持其细胞结构的完整。

酵母在酿造工业中应用广泛, 啤酒酵母更是

被认为是啤酒发酵的核心。对啤酒酵母的基因组测序工作证实了其杂交的本质^[11,27-28], 由于长期的种内及种间的杂交, 啤酒酵母的倍性出现了非整倍体等特征, 直接对其进行遗传改造很难清楚地了解某个基因的功能。本研究所采用的啤酒酵母单倍体菌株 H5 是从中国啤酒厂广泛使用的 lager 型啤酒酵母菌株中选育而来的, 具有一定的代表性。在单倍体啤酒酵母菌株中研究 *RLM1* 基因的功能, 能够直观地了解该基因在啤酒酵母菌中的功能及基因调控对啤酒酿造的影响。基因修饰虽然不影响菌株的生长和发酵性能, 但仍然影响酵母菌株的应激反应, 导致啤酒发酵结束后菌株细胞形态差异较大。啤酒酵母细胞在发酵过程中经历了多种压力胁迫交替出现的历程, 如高渗透压胁迫、乙醇胁迫、营养消耗、罐体压力等^[1,7], 所有这些压力都会导致细胞的损伤和老化。*RLM1* 基因的缺失可能加速了衰老过程, 发酵过程结束后也发现了胞内细胞器的损伤。研究发现细胞壁组装及 DNA 损伤应答相关基因 *GAS1* 的表达随 *RLM1* 的过表达与敲除而调整, 而 CWI 途径中其他相关基因的调控方式并没有明显的规律, 推测 *RLM1* 可能主要影响了 CWI 途径中 *GAS1* 基因的表达, 进而提高啤酒酵母在恶劣环境中的抗逆性。

本研究基于同源重组的方法对 *RLM1* 进行敲除和过表达, 获得了重组菌 H-*rlm1*Δ 和 H/*rlm1*。研究了重组菌在啤酒发酵过程中的抗自溶性能, 发现 *RLM1* 敲除影响了酵母的抗自溶能力。敲除了 *RLM1* 使啤酒酵母对细胞壁损伤、氮饥饿、渗透压的耐受性以及温度的敏感性受到影响^[14]。结合 qRT-PCR 发现 CWI 途径中与涉及细胞壁组装和 DNA 损伤应答的 *GAS1* 在 *RLM1* 过表达时显著上调。对 *RLM1* 基因的调控能够影响酵母的抗自溶能力, 为选育抗自溶能力高的啤酒酵母菌株提供参考依据。

REFERENCES

- [1] Gibson BR, Lawrence SJ, Leclaire JP, et al. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *Fems Microbiol Rev*, 2007, 31(5): 535–569.
- [2] Xu WN, Wang JJ, Li Q. Comparative proteome and transcriptome analysis of lager brewer's yeast in the autolysis process. *FEMS Yeast Res*, 2014, 14(8): 1273–1285.
- [3] Rodicio R, Heinisch JJ. Together we are strong-cell wall integrity sensors in yeasts. *Yeast*, 2010, 27(8): 531–540.
- [4] Sanz AB, Garcia R, Rodriguez-Peña JM, et al. Cooperation between SAGA and SWI/SNF complexes is required for efficient transcriptional responses regulated by the yeast MAPK Slt2. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(15): 7159–7172.
- [5] Watanabe Y, Irie K, Matsumoto K. Yeast *rlm1* encodes a serum response factor-like protein that may function downstream of the Mpk1 (slt2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol*, 1995, 15(10): 5740–5749.
- [6] García R, Bermejo C, Grau C, et al. The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *J Biol Chem*, 2004, 279(15): 15183–15195.
- [7] Gibson BR, Lawrence SJ, Boulton CA, et al. The oxidative stress response of a lager brewing yeast strain during industrial propagation and fermentation. *FEMS Yeast Res*, 2008, 8(4): 574–585.
- [8] Xu WN, Wang JJ, Li Q. Microarray studies on lager brewer's yeasts reveal cell status in the process of autolysis. *FEMS Yeast Res*, 2014, 14(5): 714–728.
- [9] Li XE, Wang JJ, Li Q. Screening and RT-PCR analysis of stress resistant brewing yeast. *Food Ferment Ind*, 2014, 40(8): 18–23 (in Chinese).
李欣儿, 王金晶, 李崎. 压力耐受啤酒酵母的筛选及其 RT-PCR 研究. *食品与发酵工业*, 2014, 40(8): 18–23.
- [10] Wendland J. Lager yeast comes of age. *Eukaryot Cell*, 2014, 13(10): 1256–1265.
- [11] Nakao Y, Kanamori T, Itoh T, et al. Genome sequence of the lager brewing yeast, an interspecies hybrid. *DNA Res*, 2009, 16(2): 115–129.
- [12] Xu WN. Study on the evaluation and mechanism of autolysis in lager brewer's yeast[D]. Wuxi: Jiangnan

- University, 2014 (in Chinese).
- 许维娜. 啤酒酵母自溶评价及机理研究[D]. 无锡: 江南大学, 2014.
- [13] Ding HJ. Physiological and autolysis properties of brewer's yeast during passage [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2018 (in Chinese).
- 丁华建. 啤酒酵母在传代过程中的生理与自溶性能研究[D]. 无锡: 江南大学, 2018.
- [14] Ding HJ, Duan HX, Wang JJ, et al. Comparison of physiological performance differences between two lager yeasts during serial re-pitching and autolysis. Food Ferment Ind, 2018, 44(10): 57–64 (in Chinese).
- 丁华建, 段鸿绪, 王金晶, 等. 两株 lager 啤酒酵母在传代及自溶过程中生理性能差异的比较. 食品与发酵工业, 2018, 44(10): 57–64.
- [15] Martínez-Rodríguez AJ, Polo MC, Carrascosa AV. Structural and ultrastructural changes in yeast cells during autolysis in a model wine system and in sparkling wines. Int J Food Microbiol, 2001, 71(1): 45–51.
- [16] Dodou E, Treisman R. The *Saccharomyces cerevisiae* mads-box transcription factor Rlm1 is a target for the Mpk1 mitogen-activated protein kinase pathway. Mol Cell Biol, 1997, 17(4): 1848–1859.
- [17] Orlean P. Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. Genetics, 2012, 192(3): 775–818.
- [18] Venters BJ, Wachi S, Mavrich TN, et al. A comprehensive genomic binding map of gene and chromatin regulatory proteins in *Saccharomyces*. Mol Cell, 2011, 41(4): 480–492.
- [19] Nuoffer C, Jenő P, Conzelmann A, et al. Determinants for glycosphospholipid anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* GAS1 protein to the plasma membrane. Mol Cell Biol, 1991, 11(1): 27–37.
- [20] Eustice M, Pillus L. Unexpected function of the glucanotransferase Gas1 in the DNA damage response linked to histone H3 acetyltransferases in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 2014, 196(4): 1029–1039.
- [21] Niepel M, Molloy KR, Williams R, et al. The nuclear basket proteins Mlp1p and Mlp2p are part of a dynamic interactome including Esc1p and the proteasome. Mol Biol Cell, 2013, 24(24): 3920–3938.
- [22] Kim KY, Truman AW, Caesar S, et al. Yeast Mpk1 cell wall integrity mitogen-activated protein kinase regulates nucleocytoplasmic shuttling of the Swi6 transcriptional regulator. Mol Biol Cell, 2010, 21(9): 1609–1619.
- [23] Levin DE. Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: The cell wall integrity signaling pathway. Genetics, 2011, 189(4): 1145–1175.
- [24] Wang JJ, Li MQ, Zheng FY, et al. Cell wall polysaccharides: Before and after autolysis of brewer's yeast. World J Microb Biot, 2018, 34: 137.
- [25] Monerawela C, Bond U. Brewing up a storm: The genomes of lager yeasts and how they evolved. Biotechnol Adv, 2017, 35(4): 512–519.
- [26] Baker E, Wang B, Bellora N, et al. The genome sequence of *Saccharomyces eubayanus* and the domestication of lager-brewing yeasts. Mol Biol Evol, 2015, 32(11): 2818–2831.
- [27] Ishihara S, Hirata A, Nogami S, et al. Homologous subunits of 1,3-beta-glucan synthase are important for spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. Eukaryot Cell, 2007, 6(2): 143–156.
- [28] Martin-Yken H, Dagkessamanskaia A, Basmaji F, et al. The interaction of Slt2 MAP kinase with Knr4 is necessary for signalling through the cell wall integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Microbiol, 2003, 49(1): 23–35.

(本文责编 郝丽芳)