

RIM21 基因缺失对拉格啤酒酵母絮凝性能的影响

周雪飞^{1,2}, 索婧怡^{1,2}, 侯丹^{1,2}, 刘春风^{1,2}, 钮成拓^{1,2}, 郑飞云^{1,2}, 李崎^{1,2}, 王金晶^{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

周雪飞, 索婧怡, 侯丹, 等. *RIM21* 基因缺失对拉格啤酒酵母絮凝性能的影响. 生物工程学报, 2021, 37(12): 4373-4381.

Zhou XF, Suo JY, Hou D, et al. Effect of *RIM21* gene disruption on flocculation of lager yeast. Chin J Biotech, 2021, 37(12): 4373-4381.

摘要: 拉格啤酒酵母是我国啤酒酿造的主要菌种。细胞絮凝是啤酒酵母重要的生产性状, 在不影响发酵性能的情况下适度提高酵母的絮凝能力, 有助于发酵结束时细胞和产物的分离, 有利于工业化啤酒生产, 具有较高的经济价值。前期在对一株工业用拉格啤酒酵母 G03 及其絮凝突变株的研究中, 挖掘到一个可能影响啤酒酵母絮凝性的候选基因 *RIM21*。为了验证该基因的作用, 文中在 G03 中对 *RIM21* 进行了敲除, 发现 *RIM21* 敲除后, 酵母在 11 °C 发酵条件下的絮凝性能增强, 基因 *FLO5*、*Lg-FLO1* 及细胞壁完整性途径中的部分基因表达上调。同时, CO₂ 失重、酒精度、发酵度等发酵指标未有明显变化。另外, 发现 *RIM21* 的缺失增强了啤酒酵母对细胞壁抑制剂的耐性。研究结果为阐释低温发酵条件下啤酒酵母的絮凝调控机理及菌株絮凝性的改善提供了基础。

关键词: 拉格酵母, 低温发酵, 絮凝, 基因缺失, *RIM21*

Effect of *RIM21* gene disruption on flocculation of lager yeast

Xuefei Zhou^{1,2}, Jingyi Suo^{1,2}, Dan Hou^{1,2}, Chunfeng Liu^{1,2}, Chengtuo Niu^{1,2}, Feiyun Zheng^{1,2}, Qi Li^{1,2}, and Jinjing Wang^{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: Lager yeast is the most popular yeast strain used for beer production in China. The flocculation of yeast plays an important role in cell separation at the end of fermentation. Therefore, appropriately enhancing the flocculation capability of the lager yeast without affecting its fermentation performance would be desirable for beer industry. Our previous study showed that the defect of gene *RIM21* might contribute to the enhanced flocculation capability of a lager yeast G03. To further investigate the role of the *RIM21* gene in flocculation of strain G03, this study constructed a *RIM21*-deleted mutant strain G03-*RIM21Δ* through homologous recombination. Deletion of *RIM21* improved the flocculation capability of strain G03 during wort fermentation at 11 °C without changing its fermentation performance

Received: December 17, 2020; **Accepted:** March 5, 2021

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 31601558, 31571942).

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

国家自然科学基金 (Nos. 31601558, 31571942) 资助。

significantly. The expression of *FLO5*, *Lg-FLO1* and some other genes involved in cell wall integrity pathway were up-regulated in strain G03-*RIM21Δ*. In addition, the disruption of *RIM21* enhanced resistance of yeast cells to cell wall inhibitors. These results provide a basis for elucidating the flocculation mechanism of lager yeast under low-temperature fermentation conditions.

Keywords: lager yeast, low temperature fermentation, flocculation, gene disruption, *RIM21*

絮凝是指酵母细胞之间相互粘附、聚集成团的现象,该过程是无性的、可逆的,且依赖于钙离子的存在^[1]。酵母的絮凝为工业生产提供了有效、便利的产物和细胞的分离方式,大幅节约了生产成本,且有助于酵母细胞的回收和再利用^[2]。

啤酒酵母是啤酒酿造的灵魂,可分为拉格型(Lager)和艾尔型(Ale)两类。目前我国的市售啤酒中90%以上为拉格啤酒。拉格型啤酒酵母 *Saccharomyces pastorianus* 由酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 和真贝酵母 *Saccharomyces eubayanus* 杂交而来^[3],发酵温度一般在8–15℃。对啤酒酿造而言,酵母絮凝性能的好坏与啤酒的出酒率、透明度和过滤性能直接相关。絮凝性过强可能导致糖利用不完全或发酵速率迟缓,而絮凝性过差则会造成过滤困难^[4–6]。所以,在不影响发酵性能的情况下适度提高啤酒酵母的絮凝能力,对于啤酒生产有重要意义。

酵母的絮凝是细胞壁表面絮凝蛋白与相邻酵母细胞壁外侧甘露糖残基的特异性结合^[1]。絮凝蛋白由 *FLO* 基因家族编码,主要为 *FLO1*、*FLO5*、*FLO9*、*FLO10* 和 *Lg-FLO1*^[7]。酵母絮凝的调控机制十分复杂,不仅受菌株遗传背景的影响,而且受温度、氧气、pH、乙醇浓度、营养等因素的影响^[7–10]。有研究发现,在缺氧条件下,脂质不饱和度的降低会激活内质网膜流动性传感器,从而诱导 *FLO1* 的表达^[11],促进絮凝的发生;氮源饥饿引起 *Lg-FLO1* 基因表达量上调^[8],诱导啤酒酵母的絮凝。酵母絮凝还受保守的 MAPK 信号通路的调节,依赖于 MAPK Slt2 及细胞壁完整性 (Cell wall integrity, CWI) 途径中 Rlm1 的激活^[12]。

本实验室前期对一株工业用拉格型啤酒酵母

G03 及其絮凝突变株进行了比较基因组学分析,发现基因 *RIM21* 在突变菌中发生了移码突变。移码突变会导致基因编码的蛋白质序列发生改变,从而使基因表达产物的功能丧失。Rim21 是碱性 pH 响应途径 *RIM101* 通路的传感器^[13],在碱性 pH 压力响应、盐胁迫响应^[14]、弱酸胁迫响应^[15]等方面均能发挥作用。研究表明,Rim21 与 MAP 激酶 Slt2 并行参与细胞壁的组装^[16],但其具体的作用机制尚不明确。Rim21 还可作为质膜传感器,通过感知质膜的脂质不对称来响应内质网压力应激^[17]。转录组学研究显示,絮凝型和非絮凝型酵母的差异表达基因与胁迫响应、细胞壁重构有关^[18]。因此,结合文献报道,推测 *RIM21* 基因缺失对拉格酵母 G03 的絮凝性能具有重要影响。为了验证这一推测,本研究构建了 *RIM21* 缺失的 G03 重组菌,探究了该基因缺失对菌株在低温发酵条件下的絮凝性能、发酵性能和胁迫耐受性能的影响。通过分析 *FLO* 基因及细胞壁完整性途径基因的表达量,初步分析了 *RIM21* 缺失对菌株絮凝性能的影响机制。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株与培养基

拉格啤酒酵母 *S. pastorianus* G03: 中国某啤酒厂使用工业酵母,实验室保藏;质粒 pUG6: 实验室保藏。

YPD 培养基 (g/L): 葡萄糖 20, 酵母粉 10, 酪蛋白胨 20; 固体培养基添加 20 g/L 琼脂粉; 抗性筛选培养基添加 G418 至终浓度为 200 μg/mL。

12 °P 麦汁发酵培养基：制备方法参考文献[19]所述。

1.1.2 实验试剂

酵母提取物、硫酸钙、醋酸钠、葡萄糖、乙酸、乙二胺四乙酸-二钠、氯化钠、氯化钾、乙醇等试剂，均购于国药集团化学试剂有限公司；酪蛋白胨购于生工生物工程（上海）股份有限公司；钙荧光白购于 Sigma；DNA 提取试剂盒购于天根生化科技（北京）有限公司。PrimeSTAR[®] Max DNA 聚合酶购于宝日生物技术（北京）有限公司。

0.051%硫酸钙溶液：称取 0.51 g 硫酸钙溶解于 1 L 蒸馏水。

醋酸钠-硫酸钙缓冲液：称取 0.51 g 硫酸钙、6.8 g 醋酸钠和 4.05 g 乙酸溶解于 1 L 蒸馏水中，再加入 4.5%的乙醇。用醋酸调节 pH 至 4.5。

5 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠 (EDTA-2Na) 溶液：称取 1.68 g EDTA-2Na 溶解于 1 L 蒸馏水。

1.2 仪器与设备

恒温生化培养箱，上海博迅实业有限公司；组合式摇箱，太仓市强乐实验设备有限公司；漩涡混合仪，骋克仪器（上海）有限公司；Five Easy Plus 台式 pH 计，METTLER TOLEDO 公司；紫外可见分光光度计，UNICO（上海）仪器有限公司；PCR 仪，美国 Bio-Rad 公司；Anton Paar 全自动啤酒分析仪，安东帕（上海）商贸有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 重组菌的构建

根据 NCBI 中酿酒酵母 S288c 的 *RIM21* 基因 (Gene ID: 855422) 序列来设计同源重组敲除引物，引物列表见表 1。参考 Baudin 等^[20]的短侧翼同源区 PCR 介导的基因破坏方法 (SFH-PCR)，使用引物 *RIM21-a* 和 *RIM21-b*，以质粒 pUG6 为模板，通过 PCR 扩增获得含有 G418 抗性的基因破坏盒，抗性基因两端分别为基因 *RIM21* 蛋白质编码区上游 66 bp 和下游 68 bp 的同源序列。采用电转化的方法将基因破坏盒导入啤酒酵母感受态细胞中。感受态细胞的制备及电转化方法参考文献[21]所述。转化后的细胞涂布至含有 200 μg/mL G418 的 YPD 平板上，28 °C 培养 2–3 d 后挑取转化子，使用两对引物 *RIM21-LA* 和 *KAN-1*、*RIM21-RA* 和 *KAN-2* 对转化子 DNA 进行 PCR 验证。

1.3.2 重组菌的遗传稳定性

将重组菌在不含 G418 抗性的液体 YPD 培养基中 28 °C、180 r/min 连续转接 10 代，并用第 10 代重组菌分别在不含 G418 抗性和含有 G418 抗性的 YPD 平板上划线。

1.3.3 生长曲线的测定

从固体培养基中挑取一环酵母单菌落于 5 mL 液体 YPD 培养基中，28 °C、180 r/min 培养过夜后，接种至 100 mL YPD 中，调整初始 *OD*₆₀₀ 为 0.1。定期取样，在波长 600 nm 处测定吸光值。

表 1 敲除盒构建及转化子验证所需的引物

Table 1 Primers for the construction of gene disruption cassette and verification of transformants

Names	Sequences (5'–3')
<i>RIM21-a</i>	CCTGTGCGCACTTAATCAGTCATTTTTAGACTATCGTTTTTTAGTAGCACATAAGGAGGAAGACAC TCGACATGGAGGCCAGAAATACCC
<i>RIM21-b</i>	GTTTCTGCTGTGTCCTTCAAATATGGCCTATATGGTCGCTGGTAAAAGTGGCAGAGCTATTGTTA TTGGACAGCAGTATAGCGACCAGC
<i>RIM21-LA</i>	GACTGGTACTACAGATTCGGTGTC
<i>RIM21-RA</i>	GCATATGCATCTTGAGCATGCATG
<i>KAN-1</i>	ATCGCGAGCCCATTATACC
<i>KAN-2</i>	GGTATAAATGGGCTCGCGATAATG

1.3.4 啤酒发酵实验

本研究中的啤酒发酵实验均在三角瓶中进行。酵母菌株经过活化并扩培后,以 1.2×10^7 个细胞/mL 的浓度接种到装有 150 mL 12 °P 麦汁的锥形瓶中, 11 °C 静置发酵 7 d。每个锥形瓶需用单向排气阀加水密封以模拟厌氧发酵条件。

1.3.5 啤酒酵母絮凝性能的测定

定量测量絮凝 F 值: 从发酵液中收集酵母细胞, 用去离子水洗涤两次后再次重悬于去离子水, 并调整细胞浓度至 4.5×10^7 个/mL, 根据 Bendiak 等^[22]描述的方法测定絮凝 F 值。

定性观察: 取 1 mL 细胞悬浮液, 经 0.051% 硫酸钙溶液洗涤后重悬于 1 mL 醋酸钠-硫酸钙缓冲液中, 转移至 1.5 mL EP 管或 35 mm 培养皿中, 充分扰动后静置 10 min 再观察。

1.3.6 啤酒酵母发酵性能的测定

在发酵过程中, 每日测定锥形瓶中的二氧化碳排放量, 作为评价发酵速率和性能的初级指标。发酵结束后, 采用全自动啤酒分析仪测定成品啤酒的理化指标, 如酒精含量、表观发酵度和真实发酵度。

1.3.7 酵母细胞胁迫耐受分析

从固体培养基中挑取酵母单菌落于 5 mL YPD 培养基中, 28 °C、180 r/min 培养过夜后, 以 1% 接种量转接至 20 mL YPD 培养基中。28 °C、180 r/min 培养 8 h 后, 将培养液离心并收取酵母细胞。用无菌水将细胞洗涤 2 次后, 调整细胞浓度至 4.5×10^7 个/mL, 并分别稀释 10^0 、 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 倍, 共 6 个浓度梯度。吸取 5 μ L 不同浓度梯度的酵母菌液点样于含有 0.5 mol/L 氯化钾、30 μ g/mL 钙荧光白、30 μ g/mL 刚果红、10% 乙醇的 YPD 平板上, 28 °C 培养 60 h。

1.3.8 基因表达量的测定

从发酵液中收集酵母细胞并用无菌水洗涤 2 次。提取酵母中的总 RNA 后, 使用 TaKaRa 公司逆转录试剂盒 PrimeScript RT reagent Kit, 将

RNA 逆转录为 cDNA。以 cDNA 为模板, *ACT1* 为内参基因, 根据文献[12]描述的方法测定并分析目标基因的表达量。

2 结果与分析

2.1 *RIM21* 缺失的 G03 基因工程菌的构建

为了构建 *RIM21* 缺失的 G03 基因工程菌, 使用引物 *RIM21*-a 和 *RIM21*-b, 以含有 *KanMX* 抗性的质粒 pUG6 为模板, 通过 PCR 扩增获得 *RIM21* 基因破坏盒。PCR 产物经纯化后, 通过电击转化法导入啤酒酵母 G03 中。分别使用两对引物 *RIM21*-LA 和 *KAN-1*、*RIM21*-RA 和 *KAN-2*, 对转化子基因组进行 PCR 验证。琼脂糖凝胶电泳检测显示了敲除成功的重组菌株 G03-*RIM21A* (图 1)。

2.2 重组菌 G03-*RIM21A* 的遗传稳定性

为验证重组菌的遗传稳定性, 将出发菌和重组菌在不含 G418 抗性的液体 YPD 中连续转接 10 次, 并用第 10 代菌液划线, 结果如图 2 所示。图 2B 抗性平板中的空白区域为出发菌划线, 其余区域均为重组菌划线。结果表明, 在传代 10 次后, 重组菌仍然可以在含有 G418 的 YPD 平板上生长, 表明重组菌的遗传稳定性良好。

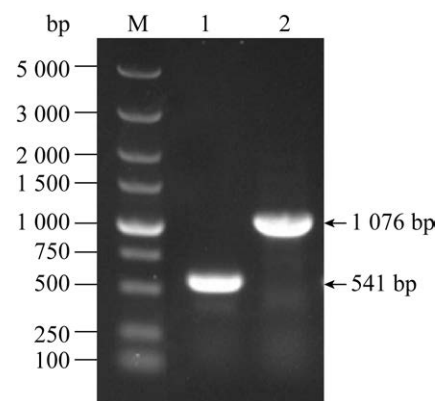


图 1 重组菌株 G03-*RIM21A* 的验证

Fig. 1 Verification of the mutant G03-*RIM21A*. Lane M: DNA marker DL5000; lane 1: primer pair *RIM21*-LA/*KAN-1*, 541 bp; lane 2: primer pair *RIM21*-RA/*KAN-2*, 1 076 bp.

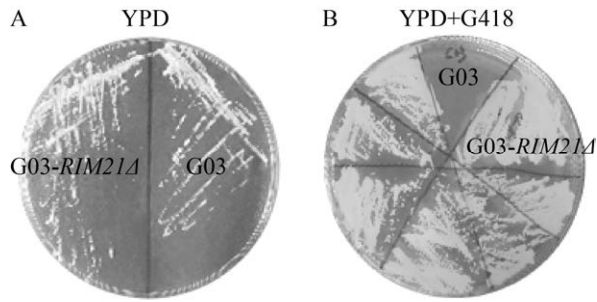


图2 重组菌株 *G03-RIM21Δ* 传代 10 次后的遗传稳定性验证

Fig. 2 Genetic stability of the mutant *G03-RIM21Δ* passaged for 10 times in YPD plate without G418 (A) or with G418 (B).

2.3 重组菌 *G03-RIM21Δ* 与出发菌 *G03* 的生长性能比较

为了分析出发菌 *G03* 及重组菌 *G03-RIM21Δ* 的生理性能, 测定了它们在 YPD 中的生长曲线。图 3 的结果显示, *G03* 和 *G03-RIM21Δ* 在 28 °C 条件下的 YPD 中都能正常生长, *G03* 在 9 h 左右进入对数生长期, *G03-RIM21Δ* 的生长则略有延迟。*G03-RIM21Δ* 与 *G03* 整体生长趋势基本一致, 生长性能没有明显差别。

2.4 重组菌 *G03-RIM21Δ* 和出发菌 *G03* 的絮凝性能对比

在 11 °C 条件下, 在浓度为 12 °P 的麦汁中, 对出发菌 *G03* 和重组菌 *G03-RIM21Δ* 进行发酵,

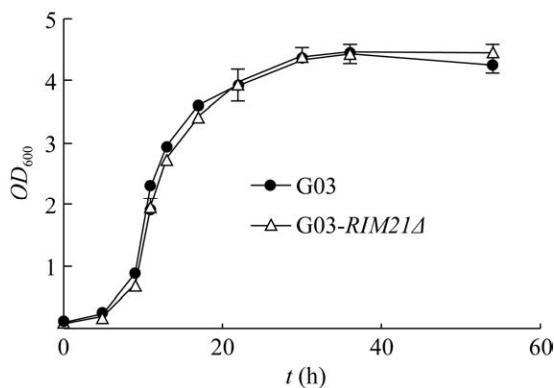


图3 出发菌 *G03* 和重组菌 *G03-RIM21Δ* 生长曲线
Fig. 3 The growth curve of strain *G03* and the mutant *G03-RIM21Δ*.

并在发酵过程中测定了菌株的絮凝 F 值。由图 4 可知, 在发酵过程中, 两株菌的絮凝 F 值均随着发酵的进行而增长, 重组菌的絮凝 F 值始终高于出发菌。

在发酵结束时, 对重组菌和出发菌细胞的絮凝情况进行定性观察。图 5A 显示了细胞在醋酸钠-硫酸钙缓冲液中的沉降速度, 重组菌的沉降速度明显快于出发菌; 由图 5B 可知, 重组菌的细胞聚集程度明显强于出发菌。

表 2 比较了常温 (25 °C) 和低温 (11 °C) 发酵结束后出发菌和重组菌的絮凝 F 值。低温发酵结束后, 重组菌的絮凝 F 值比出发菌增加了 20.06%;

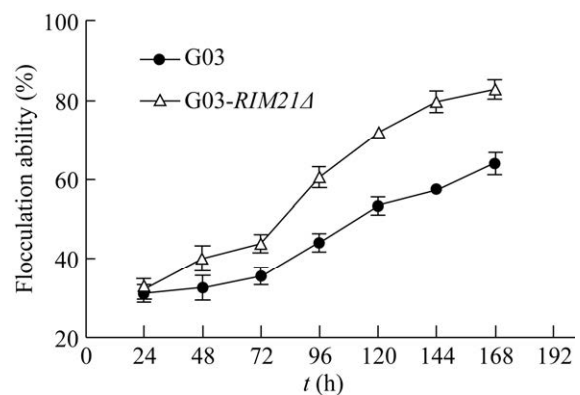


图4 发酵过程中出发菌 *G03* 和重组菌 *G03-RIM21Δ* 的絮凝 F 值

Fig. 4 Flocculation rate of strain *G03* and the mutant *G03-RIM21Δ* during fermentation.

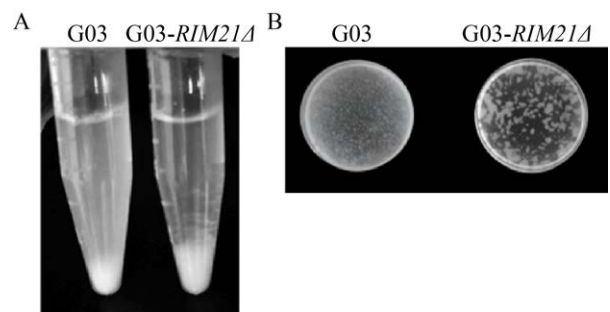


图5 出发菌 *G03* 和重组菌 *G03-RIM21Δ* 在 1.5 mL EP 管 (A) 中和 35 mm 平板 (B) 中的絮凝

Fig. 5 Flocculation of strain *G03* and the mutant *G03-RIM21Δ* in 1.5 mL micro tube (A) and in 35 mm plate (B).

表 2 出发菌 G03 和重组菌 G03-RIM21A 在不同温度下发酵后的絮凝 F 值

Table 2 Flocculation rate of strain G03 and the mutant G03-RIM21A after fermentation at different temperatures

Flocculation rate	Temperature (°C)	
	25	11
G03 (%)	55.90±2.57	63.06±2.28
G03-RIM21A (%)	56.78±3.12	83.12±2.33

然而, 常温条件下二者的 F 值并无明显差异。上述结果表明, 基因 *RIM21* 的缺失会导致拉格酵母 G03 在低温发酵后的絮凝能力明显增强。

2.5 重组菌 G03-RIM21A 和出发菌 G03 的发酵性能对比

在 11 °C 发酵过程中, 对出发菌和重组菌的每日 CO₂ 失重进行测定, 可以初步判定重组菌在低温发酵时的发酵速率。如图 6 所示, 出发菌与重组菌的发酵速率没有明显差别。发酵结束后, 重组菌与出发菌的酒精度、表观发酵度和真实发酵度也没有明显区别 (图 7), 表明 *RIM21* 的缺失不会对 G03 的发酵能力造成不良影响。

2.6 RIM21 的缺失对菌株胁迫耐受性的影响

为了解基因 *RIM21* 缺失对菌株 G03 的影响, 按照 1.3.6 所述的方法对比了出发菌和重组菌对

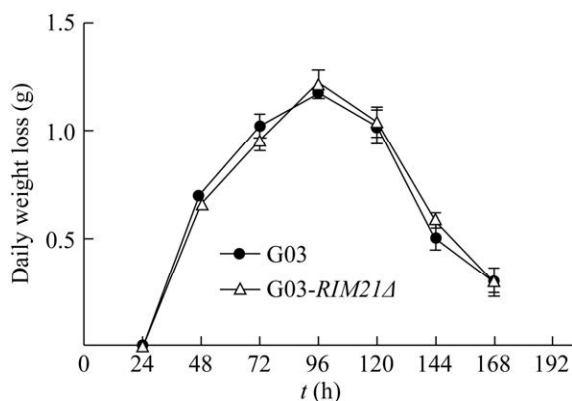


图 6 出发菌 G03 和重组菌 G03-RIM21A 的每日 CO₂ 失重

Fig. 6 Daily weight loss of strain G03 and the mutant G03-RIM21A.

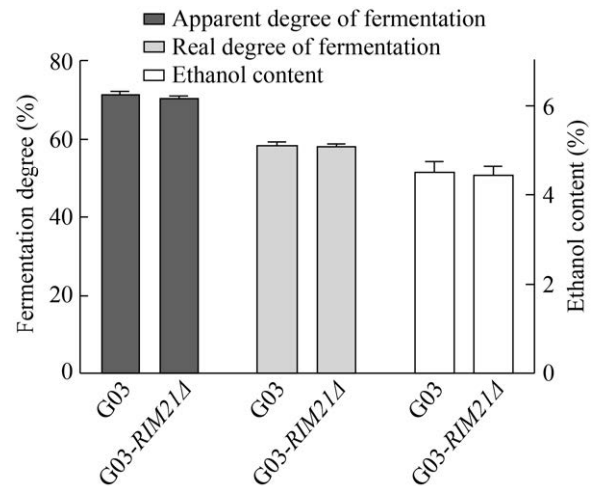


图 7 出发菌 G03 和重组菌 G03-RIM21A 的发酵液指标分析

Fig. 7 Fermentation performance of strain G03 and the mutant G03-RIM21A.

不同胁迫的耐受性, 结果如图 8 所示。在 0.5 mol/L KCl 的渗透压胁迫下, 重组菌的生长未受到明显抑制。与出发菌相比, *RIM21* 的缺失使重组菌对 10%乙醇胁迫的耐受性略有减弱。

荧光增白剂 (Calcofluor white, CFW) 和刚果红 (Congo red, CR) 是两种细胞壁抑制剂, 其中 CFW 能与酵母细胞壁中的几丁质结合^[23], CR 能与细胞壁中的 β -1,3 葡聚糖结合^[24], 从而造成细胞壁损伤, 破坏酵母细胞壁的正常组装, 抑制酵母生长。图 8 表明, 重组菌对这两种细胞壁抑制剂的抗性明显强于出发菌, 表明 *RIM21* 的缺失引起了 G03 细胞壁的重构。通常, 酵母细胞壁的重构是酵母细胞应对环境压力的一种方式^[25]。

2.7 RIM21 基因缺失促进菌株低温絮凝的机制分析

为了探究在低温发酵条件下 *RIM21* 缺失对菌株絮凝性能的影响机制, 在发酵 96 h 时取样, 根据 1.3.8 所述的实验方法测定了出发菌和重组菌 *FLO* 基因及细胞壁完整性途径相关基因的表达量, 结果如图 9 所示。图 9A 表明, *FLO1* 和 *FLO10* 在出发菌和重组菌中均不表达, 重组菌中 *FLO5*

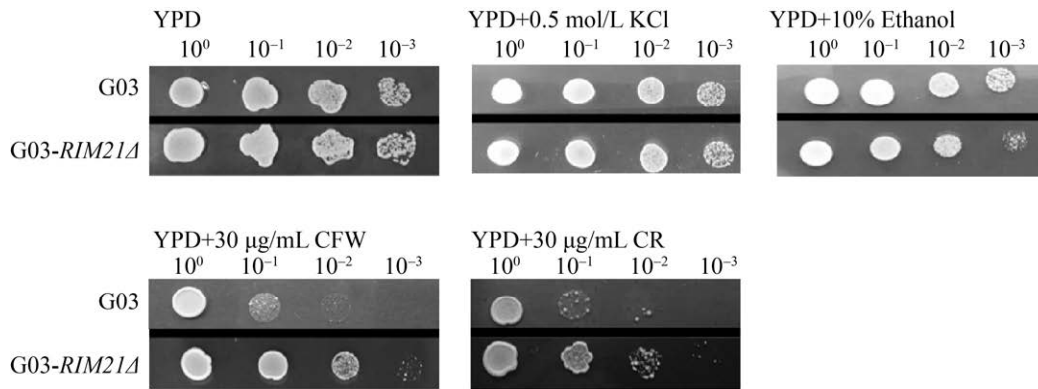


图 8 出发菌 G03 和重组菌 G03-*RIM21Δ* 不同胁迫的耐受性
Fig. 8 Tolerance to stresses of strain G03 and the mutant G03-*RIM21Δ*.

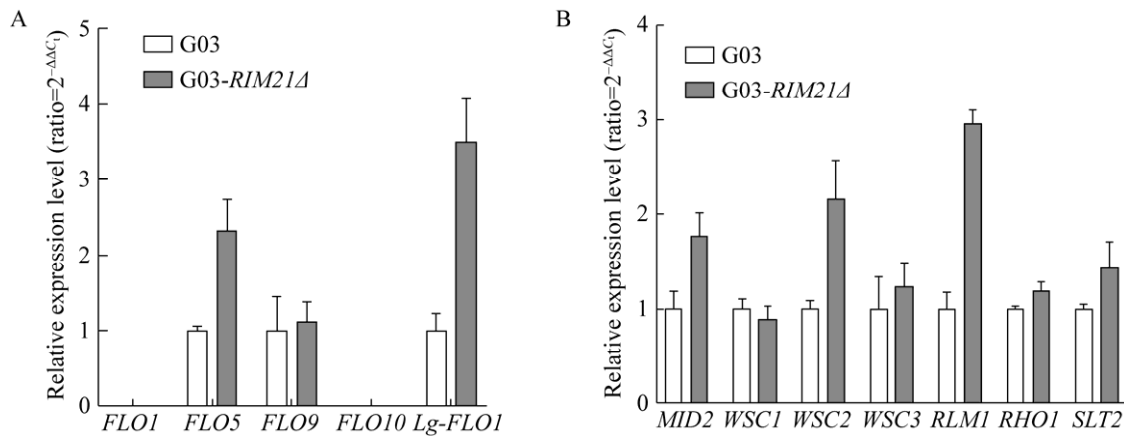


图 9 G03-*RIM21Δ* 与 G03 中 (A) *FLO* 基因及 (B) 细胞壁完整性途径相关基因的表达量分析
Fig. 9 Expression level of *FLO* genes (A) and genes involved in CWI pathway (B) of the mutant G03-*RIM21Δ* relative to strain G03 measured on the 4th day of fermentation.

和 *Lg-FLO1* 表达量分别是出发菌株的 2.32 倍和 3.48 倍。图 9B 分析了细胞壁完整性途径中基因 *MID2*、*WSC1*、*WSC2*、*WSC3*、*RLMI*、*RHO1*、*SLT2* 的表达量。其中，重组菌的 *RLMI*、*WSC2*、*MID2* 的表达量分别是出发菌的 2.96 倍、2.15 倍和 1.77 倍。这些结果表明，在低温发酵条件下，*RIM21* 的缺失上调了 *FLO* 基因及细胞壁完整性途径的部分基因。

3 讨论

絮凝是酵母重要的生产性状。在发酵结束后，酵母的絮凝将有利于产物和细胞的分离。同时，

絮凝也是酵母细胞应对恶劣环境压力时的自我保护机制^[26]。本研究以 *RIM21* 为靶基因，通过同源重组法构建了一株 *RIM21* 基因缺失的拉格酵母重组菌 G03-*RIM21Δ*。对重组菌进行 11 °C 低温发酵，发现基因 *RIM21* 的缺失使菌株的絮凝 F 值增加了 20%，使菌株对 10% 乙醇胁迫耐受略有减弱，但菌株的生长和发酵能力未受影响；同时，*RIM21* 的缺失还增强了菌株对细胞壁抑制剂的抗性。

FLO5 和 *Lg-FLO1* 的表达对啤酒酵母的絮凝具有重要作用^[4,8]。相对于出发菌株，重组菌中基因 *FLO5* 和 *Lg-FLO1* 表达的上调，这从转录水平上解释了重组菌絮凝性增强的原因。有文献报道

酵母细胞中 CWI 途径被激活后, *FLO* 基因上调表达^[12]。因此, 进一步测定了 CWI 途径中的相关基因, 发现重组菌中的基因 *WSC2*、*MID2*、*RLM1* 也有上调。*WSC2*、*MID2* 是细胞壁上的压力传感因子^[23]。*Rlm1* 是 CWI 途径中关键的转录因子, 它参与了 CWI 途径的激活^[27]。目前尚无文献表明 *Rim21* 与 *Rlm1* 之间存在相互作用。CWI 途径可在多种压力条件下被激活^[28], 因此推测 *RIM21* 的缺失可能导致重组菌在低温发酵条件下比出发菌具有更强的压力应激反应, 从而导致 CWI 途径部分基因的上调。对出发菌和重组菌进行比较转录组学和蛋白组学分析, 将有助于阐释 *RIM21* 基因缺失对啤酒酵母低温絮凝性能的影响机制。

目前, 尽管基因工程菌用于啤酒生产仍存在安全风险, 但本研究为啤酒酵母的絮凝调控机理提供了一定的理论依据。基因 *RIM21* 有望成为工业拉格酵母 G03 絮凝突变株选育的新靶点。

REFERENCES

- [1] Stratford M. Yeast flocculation: calcium specificity. *Yeast*, 1989, 5(6): 487-496.
- [2] Varela C, Bartel C, Nandorfy DE, et al. Identification of flocculant wine yeast strains with improved filtration-related phenotypes through application of high-throughput sedimentation rate assays. *Sci Rep*, 2020, 10: 2738.
- [3] Libkind D, Hittinger CT, Valério E, et al. Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(35): 14539-14544.
- [4] Verstrepen KJ, Derdelinckx G, Verachtert H, et al. Yeast flocculation: what brewers should know. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, 61(3): 197-205.
- [5] 崔云前, 裘祥雨, 吉春晖, 等. 啤酒酵母絮凝影响因素及改善途径的研究概况. *食品工业*, 2020, 41(3): 246-250.
Cui YQ, Xi XY, Ji CH, et al. Research on influencing factors and improving ways of beer yeast flocculation. *Food Ind*, 2020, 41(3): 246-250 (in Chinese).
- [6] 李静怡. 构建 *flo8* 缺陷型啤酒酵母基因工程菌改良絮凝性能[D]. 无锡: 江南大学, 2010.
Li JY. Improvement of brewing yeast flocculation ability of genetically construction in *flo8* mutant[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2010 (in Chinese).
- [7] Soares EV. Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: a review. *J Appl Microbiol*, 2011, 110(1): 1-18.
- [8] Ogata T. Nitrogen starvation induces expression of *Lg-FLO1* and flocculation in bottom-fermenting yeast. *Yeast*, 2012, 29(11): 487-494.
- [9] Fleming AB, Beggs S, Church M, et al. The yeast Cyc8-Tup1 complex cooperates with Hda1p and Rpd3p histone deacetylases to robustly repress transcription of the subtelomeric *FLO1* gene. *Biochim Biophys Acta Gene Regulat Mechan*, 2014, 1839(11): 1242-1255.
- [10] Bester MC, Pretorius IS, Bauer FF. The regulation of *Saccharomyces cerevisiae FLO* gene expression and Ca^{2+} -dependent flocculation by Flo8p and Mss11p. *Curr Genet*, 2006, 49(6): 375-383.
- [11] Degreif D, Rond TD, Bertl A, et al. Lipid engineering reveals regulatory roles for membrane fluidity in yeast flocculation and oxygen-limited growth. *Metab Eng*, 2017, 41: 46-56.
- [12] Sariki SK, Kumawat R, Singh V, et al. Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on activation of Slt2 and Rlm1 regulated by the cell wall integrity pathway. *Mol Microbiol*, 2019, 112(4): 1350-1369.
- [13] Obara K, Yamamoto H, Kihara A. Membrane protein Rim21 plays a central role in sensing ambient pH in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 2012, 287(46): 38473-38481.
- [14] Obara K, Higuchi M, Ogura Y, et al. Rapid turnover of transcription factor *RIM101* confirms a flexible adaptation mechanism against environmental stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells*, 2020, 25(10): 651-662.
- [15] Mira NP, Lourenço AB, Fernandes AR, et al. The *RIM101* pathway has a role in *Saccharomyces cerevisiae* adaptive response and resistance to propionic acid and other weak acids. *FEMS Yeast Res*, 2009, 9(2): 202-216.
- [16] Castrejon F, Gomez A, Sanz M, et al. The *RIM101*

- pathway contributes to yeast cell wall assembly and its function becomes essential in the absence of mitogen-activated protein kinase Slt2p. *Eukaryot Cell*, 2006, 5(3): 507-517.
- [17] Obara K, Kihara A. The RIM101 pathway contributes to ER stress adaptation through sensing the state of plasma membrane. *Biochem J*, 2017, 474(1): 51-63.
- [18] di Gianvito P, Tesnière C, Suzzi G, et al. Different genetic responses to oenological conditions between a flocculent wine yeast and its *FLO5* deleted strain: insights from the transcriptome. *Food Res Int*, 2018, 114: 178-186.
- [19] 李欣儿. 基于细胞壁多糖组成的压力耐性啤酒酵母的选育[D]. 无锡: 江南大学, 2014.
Li XE. Screening of stress-resistant brewing yeast based on cell wall polysaccharides composition[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2014 (in Chinese).
- [20] Baudin A, Ozier-Kalogeropoulos O, Denouel A, et al. A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21(14): 3329-3330.
- [21] 李磊. 啤酒酵母抗氧化相关蛋白组学研究及调控[D]. 无锡: 江南大学, 2020.
Li L. Analysis and regulation of proteomics related antioxidation in brewer's yeast[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020 (in Chinese).
- [22] Bendiak DV, van der Aar P, Barbero F, et al. Yeast flocculation by absorbance method. *J Am Soc Brew Chem*, 1996, 54(4): 245-248.
- [23] Orlean P. Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Genetics*, 2012, 192(3): 775-818.
- [24] Ram AFJ, Klis FM. Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on Calcofluor white and Congo red. *Nat Protoc*, 2006, 1(5): 2253-2256.
- [25] 张明芳, 王金晶, 钮成拓, 等. 啤酒酵母细胞壁环境压力应答机制研究进展. *生物工程学报*, 2019, 35(7): 1214-1221.
Zhang MF, Wang JJ, Niu CT, et al. Progress in brewer's yeast cell wall stress response. *Chin J Biotech*, 2019, 35(7): 1214-1221 (in Chinese).
- [26] Verstrepen KJ, Klis FM. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol Microbiol*, 2006, 60(1): 5-15.
- [27] Levin DE. Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. *Genetics*, 2011, 189(4): 1145-1175.
- [28] Jiménez-Gutiérrez E, Alegría-Carrasco E, Sellers-Moya Á, et al. Not just the wall: the other ways to turn the yeast CWI pathway on. *Int Microbiol*, 2020, 23(1): 107-119.

(本文责编 郝丽芳)