

## 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

郝欣, 肖冬光\*, 张翠英

(工业微生物教育部重点实验室, 天津市工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

**摘要:**【目的】通过构建酿酒酵母类丙酮酸脱羧酶基因(*YDL080C*)缺失的工程菌株, 研究该基因对酿酒酵母浓醪发酵产高级醇特别是异戊醇的影响。【方法】以酿酒酵母工业菌株 AY-15 的单倍体 a-8 或  $\alpha$ -22 的基因组 DNA 为模板, PCR 分别扩增 *YDL080C* 上下游非编码区片段 YA 和 YB; 以 pUG6 质粒为模板, PCR 扩增 KanMX 抗性基因片段。分别将 YA、YB 和 KanMX 片段连入 pUC19 载体, 构建重组质粒 pUC-YABK; 并以其为模板, PCR 扩增 YA-KanMX-YB 重组盒, 分别电转化单倍体 a-8 和  $\alpha$ -22。将转化子和亲本分别进行酒精浓醪发酵, 发酵结束后测定其发酵性能和高级醇的生成量。【结果】筛选获得了 *YDL080C* 基因缺失突变株。酒精发酵后发酵性能和高级醇测定结果显示, 转化子的异戊醇及总高级醇生成量与对应的单倍体亲本相比没有明显变化, 但酒精度分别比亲本提高了 0.6 (% , v/v) 和 0.4 (% , v/v)。【结论】*YDL080C* 基因缺失对降低酿酒酵母发酵产高级醇特别是异戊醇没有明显作用, 但会使酒精度有所提高。

**关键词:** 酿酒酵母; 类丙酮酸脱羧酶; 类丙酮酸脱羧酶基因(*YDL080C*); 高级醇

**中图分类号:** Q935   **文献标识码:** A   **文章编号:** 0001-6209 (2010) 08-06-1030

高级醇 (higher alcohols) 俗称杂醇油 (fusel alcohols), 是指具有 3 个碳链以上的一价醇类, 是酵母酒精发酵过程中生成的重要副产物, 它对形成酒的风味和促使酒体丰满、浓厚起着重要的作用。但高级醇含量超过一定标准, 饮用后易“上头”, 对人体有很大伤害, 因此, 合理控制高级醇生成量已成为近年来许多科学家研究的热点。大约 80% 的高级醇是在主发酵期间随酵母繁殖而形成, 也就是酵母在合成细胞蛋白时形成, 主要包括正丙醇、异丁醇、异戊醇、活性戊醇和苯乙醇等。高级醇产生有两大途径, 一是氨基酸转氨途径 (Ehrlich 途径), 即氨基酸先经过转氨作用形成酮酸, 再被脱羧还原形成比原氨基酸少一个碳的高级醇<sup>[1-2]</sup>。二是糖代谢途径 (Harris 途径), 即高级醇由糖代谢通过丙酮酸合成的途径生成<sup>[3-4]</sup>, 也就是葡萄糖经 EMP 途径和 TCA 循环来合成形成氨基酸的前体物—— $\alpha$ -酮酸, 然后

进一步脱羧还原形成相应的高级醇。

在 Ehrlich 和 Harris 途径的基础上, 采用基因工程的方法打断高级醇特别是异戊醇的代谢通路, 对菌种进行有目的的改造是降低高级醇的有效方法。近年来对降低高级醇生成量的基因, 如: *YDL080C*<sup>[5-8]</sup>、*BAT1* 及 *BAT2*<sup>[9-14]</sup> 和 *PDC* 基因族<sup>[6-7, 15]</sup> 等均有研究。Dickenson 等人报导的 *YDL080C* 基因编码的类丙酮酸脱羧酶是  $\alpha$ -酮基异己酸生成异戊醇的代谢途径中的关键酶, 敲除 *YDL080C* 基因可使异戊醇的生成量显著降低<sup>[5-8]</sup>。

本实验利用分子生物学技术, 在 pUC19 质粒的基础上构建了重组质粒 pUC-YABK, 利用同源重组的方法敲除酿酒酵母基因组上 *YDL080C* 基因, 以研究酿酒酵母 *YDL080C* 基因缺失对高级醇生成量的影响。

**基金项目:** 国家“863 计划”(2006AA020101); 天津科技大学科学研究基金项目(20050412)

\* 通信作者。Tel: +86-22-60601667; Fax: +86-22-60602298; E-mail: xdg@tust.edu.cn

**作者简介:** 郝欣 (1983 -), 女, 天津人, 博士研究生, 主要从事酵母遗传改良和现代酿造技术的研究。E-mail: happyhaoxin@163.com

**收稿日期:** 2010-01-12; **修回日期:** 2010-04-01

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种和质粒:** 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) AY-15 的单倍体菌株 a-8、 $\alpha$ -22 及大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109 均为天津科技大学天津市工业微生物重点实验室保藏, 其中 AY-15 是从酒糟中分离出来的酿酒酵母工业菌株, 无营养缺陷标记。pUG6 质粒由德国 Hegemann 教授惠赠, pUC19 质粒购自宝生物工程 (大连) 有限公司。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** 限制性内切酶、T<sub>4</sub> DNA 连接酶和 Taq DNA 聚合酶均购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 氨苄青霉素 (Amp) 购自 Amresco 公司; 遗传霉素 (G418) 购自 Merck 公司; PCR 仪购自 Biometra 公司; AgilentGC 7890 型气相色谱仪购自安捷伦科技有限公司。

**1.1.3 培养基和培养条件:** *E. coli* JM109 保存和培

养采用 LB 培养基, 转化子筛选时添加终浓度为 100 mg/L 的 Amp, 37°C 静置培养; *S. cerevisiae* 单倍体菌株 a-8 和  $\alpha$ -22 用 YEPD 培养基保存和培养, 转化子用含有终浓度为 600  $\mu$ g/mL G418 的 YEPD 培养基进行筛选鉴定, 30°C 静置培养。

**1.1.4 引物:** 根据 GenBank 报道的 *S. cerevisiae* YDL080C 基因序列 (Gene ID: 851479) 设计 PCR 反应引物 (表 1)。在 YDL080C 基因上下游分别设计一对引物 YA-U 和 YA-D 及 YB-U 和 YB-D, 分别扩增 YDL080C 基因两侧非编码区的基因片段 YA 和 YB, 用于同源重组敲除 YDL080C 基因。根据 pUG6 质粒序列设计扩增 KanMX 片段的引物 K-U 和 K-D。在 YDL080C 基因上游 YA 片段的外部设计引物 Y-S, KanMX 序列内部设计引物 K-S; 在 KanMX 序列内部设计引物 K-X, YDL080C 基因下游 YB 片段的外部设计引物 Y-X, 分别用于验证 YDL080C 基因完全敲除。

表 1 PCR 反应引物

Table 1 PCR primers

Primer	Sequence (5'→3')	Size/bp	Restriction site
YA-U	CCGGAATTCAAACCTGCGTATATTTGACTTCGAC	34	<i>EcoR</i> I
YA-D	CGGGGTACCTATGCCGTAAAGTATGAAGAAAGGG	34	<i>Kpn</i> I
YB-U	CGGGGTACCTCTGATCTCTCCGCCCTACTACC	32	<i>Kpn</i> I
YB-D	CGCGGATCCCAACTGGGACATTGGCAGCGTTAGT	34	<i>Bam</i> H I
K-U	CGGGGTACCCAGCTGAAGCTTCGTACGC	28	<i>Kpn</i> I
K-D	CGGGGTACCCGATAGGCCACTAGTGGATCTG	31	<i>Kpn</i> I
Y-S	CAGTTATCCTACGACAGAAGTGGTT	25	—
K-S	CGTACTCCTGATGATGCATGGTTA	24	—
Y-X	AGAACCTCAGTGGCAAATCCTAA	23	—
K-X	TAGTCTGGGTGAGAATATGGTTGA	24	—

### 1.2 酿酒工艺

从 4°C 保藏的 YEPD 固体斜面取 1 环菌种接入装有 4 mL 一级种子培养基的试管中, 30°C 静置培养 24 h。进入稳定期后接种到下一级培养。每 150 mL 三角瓶装 36 mL 二级种子培养基, 按 10% 接种量接入一级培养菌液, 30°C 静置培养 16–17 h, 对数期的后期接种到下一级培养。每 250 mL 三角瓶装 60 g 玉米粉, 按 1:2.2 的量加入 60°C–70°C 温水糊化, 经液化、糖化后添加适量营养盐及酸性蛋白酶, 制成发酵培养基, 按 10% 接种量接入二级培养液, 30°C 静置发酵 60 h。每隔 12 h 称重一次, 发酵结束后测定 CO<sub>2</sub> 累积失重、发酵时间、酒精度、残还原糖及高级醇含量。

### 1.3 DNA 操作技术

基因组 DNA 的提取、大肠杆菌转化与质粒提取均参考文献 [16] 进行操作。DNA 酶切与连接参照

产品说明书进行操作。

**1.3.1 PCR 反应:** 目的基因的 PCR 反应条件为: 94°C 4 min; 94°C 40 s, 54°C 2 min, 72°C 2 min, 30 个循环; 72°C 10 min。0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。

**1.3.2 重组质粒 pUC-YABK 的构建:** 将纯化的 YA 片段用 *EcoRI* 和 *KpnI* 双酶切, 与同经 *EcoRI* 和 *KpnI* 双酶切的 pUC19 质粒连接, 构建重组质粒 pUC-YA。将纯化的 YB 片段用 *KpnI* 和 *BamHI* 双酶切, 与同经 *KpnI* 和 *BamHI* 双酶切的 pUC-YA 质粒连接, 构建重组质粒 pUC-YAB。将 KanMX 片段用 *KpnI* 酶切, 与同经 *KpnI* 酶切的 pUC-YAB 质粒连接, 构建重组质粒 pUC-YABK。

### 1.4 酵母转化

以质粒 pUC-YABK 为模板, 用引物 YA-U 和 YB-D 进行 PCR 扩增, 得到 YA-KanMX-YB 重组盒,

按照文献[16]进行电转化法转化酵母细胞。

### 1.5 测序与序列分析

PCR 扩增并割胶纯化用于测序的 YS-Kan 片段和 Kan-YX 片段,由上海生工生物工程技术有限公司测序。序列通过 NCBI 数据库(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)中的 nucleotide blast 程序寻找与其最接近的序列并进行比对。

### 1.6 分析方法

**1.6.1** CO<sub>2</sub> 失重、还原糖和酒精度的测定:按照参考文献[17]进行操作。

**1.6.2** 气相色谱法测定高级醇:发酵结束后蒸馏发酵液得到含有高级醇的待测样品。根据 Agilent GC 7890 气相色谱仪说明书以及关于白酒的检测文献,设定气相色谱仪检测白酒的条件为:色谱柱:105 m × 0.530 mm 毛细管柱;柱温 75℃;进样室温度 200℃;检测器温度 250℃;载气:高纯氮气;柱体积

流速 45.00 mL/min;氢气流速 30 mL/min;空气流速 400 mL/min;尾吹速度 25 mL/min;分流比 20:1;进样量 1 μL。

## 2 结果

### 2.1 重组质粒 pUC-YABK 的构建

重组质粒 pUC-YABK 的构建流程如图 1 所示。将重组质粒 pUC-YA 经 *Eco*RI 和 *Kpn*I 双酶切,获得 2700 bp 和 460 bp 的片段;重组质粒 pUC-YAB 经 *Kpn*I 和 *Bam*HI 双酶切,获得 3160 bp 和 630 bp 的片段;重组质粒 pUC-YABK 经 *Bam*HI 酶切,获得的 3800 bp 和 1600 bp 片段均与预期结果一致,证明重组质粒构建成功。以 pUC-YABK 质粒为模板, YA-U 和 K-U 为引物进行 PCR 扩增,得到 2100 bp 片段,证明 KanMX 基因片段的方向与 YA 和 YB 的方向相反(图略)。

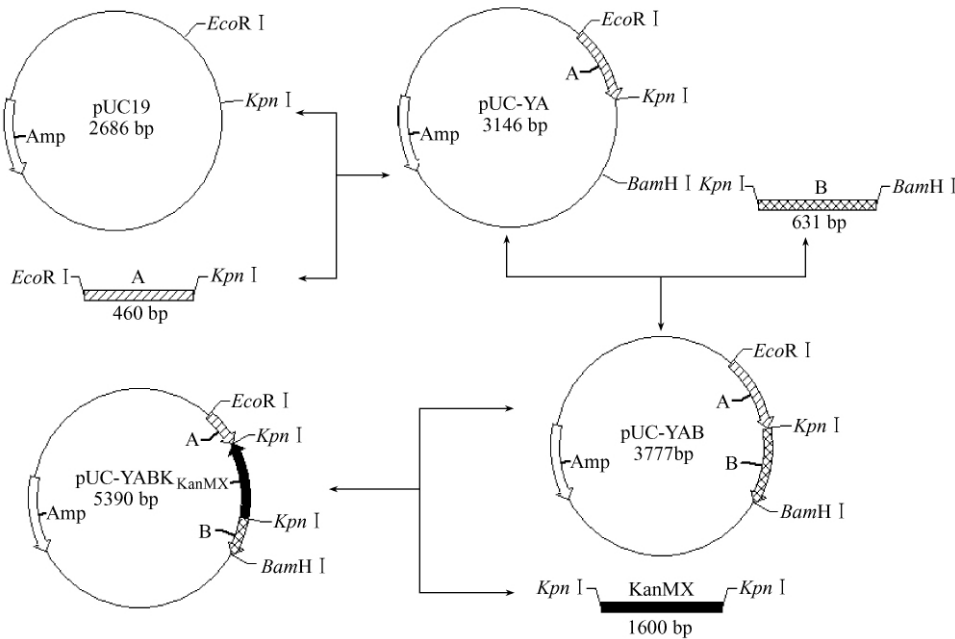


图 1 pUC-YABK 质粒构建过程

Fig. 1 Construction of plasmid pUC-YABK.

### 2.2 YDL080C 缺失突变株的构建

**2.2.1** YDL080C 重组过程:按方法 1.4 转化重组盒 YA-KanMX-YB,通过 YA 和 YB 片段与酵母染色体上 YDL080C 基因两侧的同源序列同时发生两次同源重组,从而整合到酵母染色体上并随染色体一起复制。重组后一方面将 KanMX 基因引入酵母染色体,使重组菌株产生 G418 抗性;另一方面, KanMX 片段同源重组替换了酵母染色体上的 YDL080C 基因,从而实现该基因的敲除(图 2)。

**2.2.2** G418 抗性筛选转化子:电转化后通过 G418

抗性平板筛选共获得 a 型转化子 21 株、α 型转化子 26 株,初筛表明 YA-KanMX-YB 重组盒成功转入到酿酒酵母单倍体染色体中。初筛得到的转化子与对应亲本经 G418 抗性平板验证,结果显示:单倍体亲本在 G418 浓度大于等于 600 mg/L 的平板上不能生长,而突变株能够耐受 1200 mg/L 的 G418 浓度生长。(图 3,α 型突变株划线平板图略)。

**2.2.3** YDL080C 缺失突变株的测序鉴定:随机挑取在 G418 浓度为 1200 μg/mL 条件下生长良好的菌株 a-Y-1 提取的总 DNA 为模板,分别以 Y-S 和 K-S

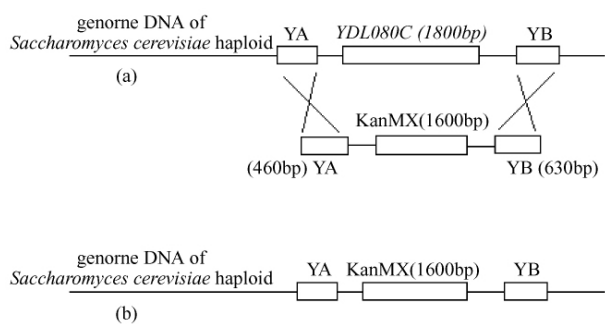


图2 *YDL080C* 的重组过程

Fig. 2 Double homologous recombination of *YDL080C* gene in *S. cerevisiae*. a. Double homologous recombination between YA-KanMX-YB cassette and *YDL080C* gene in haploid of *S. cerevisiae* a-8 or  $\alpha$ -22; b. Illustration of sequencing results of the recombinant mutants.

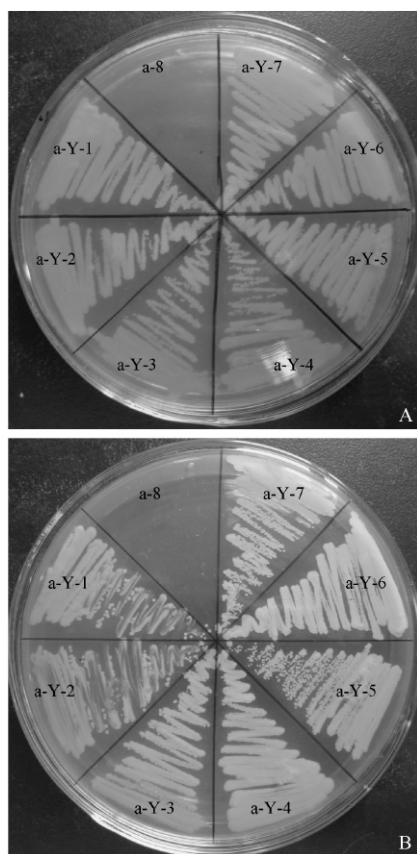


图3 a-8 与其转化子的 G418 抗性比较

Fig. 3 Comparison of G418 resistance among *S. cerevisiae* a-8 and its mutants. A: G418 - 600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; B: G418 - 1200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

及 Y-X 和 K-X 为引物进行 PCR 扩增, 扩增出大小为 2250 bp 的 YS-Kan 片段和 1500 bp 的 Kan-YX 片段; 分别以菌株 a-8 和 a-Y-1 提取的总 DNA 为模板, 以 Y-S 和 Y-X 为引物进行 PCR 扩增, 扩增出大小为 4400 bp 的 YSX-p 片段和 4100 bp 的 YSX-m 片段, 且与预期的目的产物大小一致。将 YS-Kan 片段和

Kan-YX 片段分别测序, 结果表明 YS-Kan 片段和 Kan-YX 片段序列分别与酿酒酵母 *YDL080C* 基因的上下游序列及 KanMX 序列同源, 同源率为 100%, 进一步证明 YA-KanMX-YB 重组盒已成功转入到酿酒酵母单倍体染色体中, 并且 KanMX 抗性基因替代了单倍体菌株 a-8 和  $\alpha$ -22 基因组上的 *YDL080C* 基因。

### 2.3 转化子与亲本发酵性能及高级醇生成量的测定

测定亲本 a-8 和  $\alpha$ -22 及其对应突变株的生长曲线并计算了代时。结果显示, 亲本及突变株的代时均为 120 min 左右, 表明突变株的生长没有受到影响。将亲本与对应的随机挑取的 3 株转化子同时进行酒精浓醪发酵, 发酵结束后测定菌株发酵性能及高级醇生成量 (表 2)。结果显示, 单倍体亲本的异戊醇含量分别为 216.36 mg/L 和 241.09 mg/L, 对应转化子异戊醇含量的平均值分别为 223.29 mg/L 和 256.96 mg/L; 单倍体亲本的总高级醇含量分别为 346.82 mg/L 和 364.12 mg/L, 对应的转化子总高级醇含量的平均值分别为 347.03 mg/L 和 377.59 mg/L。由结果看出, 转化子与单倍体亲本的异戊醇及总高级醇生成量没有明显差异, 但转化子的酒精度平均值比亲本分别高 0.6 (% , v/v) 和 0.4 (% , v/v)。

### 3 讨论

高级醇是酿酒酵母代谢的必要产物, 也是白酒风味物质之一, 但是高级醇含量超过一定量又会影响到白酒风味。高级醇主要有两条代谢途径, 一是氨基酸转氨途径 (Ehrlich 代谢途径), 另一是糖代谢途径 (Harris 途径)。Growell 等指出, 正常发酵中 75% 的高级醇来自糖代谢, 25% 来自氨基酸脱羧还原, 并且异戊醇占总高级醇的 50% 以上。由于异戊醇是高级醇中的主要成分, 因此降低异戊醇是控制高级醇的首要目标。Dickenson 等人研究证实,  $\alpha$ -酮基异己酸分解为异戊醇的关键酶是类丙酮酸脱羧酶, 由 *YDL080C* 基因编码, 因此, 构建的类丙酮酸脱羧酶基因片段 (*YDL080C*) 缺失的工程菌由于不能合成类丙酮酸脱羧酶, 从而阻断或减弱  $\alpha$ -酮基异己酸向异戊醇的代谢, 将显著降低异戊醇的生成量<sup>[5-8]</sup>。

本实验中, 通过 PCR 扩增得到 *YDL080C* 基因上游非编码区 460 bp 基因片段 YA 和下游非编码区 630 bp 基因片段 YB 以及 1600 bp 的抗性基因 KanMX 片段, 构建出重组质粒 pUC-YABK。电

表 2 菌株高级醇生成量及发酵性能

Table 2 Yeasts fermentation performance and the production of higher alcohols

Yeast strains	Weight loss of CO <sub>2</sub> /g	c(Ethanol)/(% , v/v)	Residual total sugar/(g/100 mL)	Generation time/min	c(n-propyl alcohol)/(mg/L)	c(Isobutyl alcohol)/(mg/L)	c(Isoamyl alcohol)/(mg/L)	c(Higher alcohols)/(mg/L)
a-8	24.4	14.6 ± 0.1	0.160	118	54.23	76.23	216.36	346.82
a-Y-1	24.4	15.2 ± 0.1	0.154	114	53.72	69.91	224.33	347.69
a-Y-2	24.3	15.2 ± 0.1	0.156	129	53.63	72.38	220.17	346.18
a-Y-3	24.4	15.2 ± 0.1	0.152	123	53.95	67.90	225.38	347.23
α-22	23.3	14.8 ± 0.1	0.197	120	55.87	67.16	241.09	364.12
α-Y-1	24.0	15.2 ± 0.1	0.162	127	55.08	65.02	267.90	388.00
α-Y-2	24.3	15.3 ± 0.1	0.158	115	55.20	65.34	253.56	374.10
α-Y-3	24.1	15.2 ± 0.1	0.161	120	55.45	65.79	249.42	370.66

Triple independent experiments for each strain.

转化 YA-KanMX-YB 重组盒与酵母单倍体染色体进行双同源重组,成功敲除了酿酒酵母单倍体 a-8 和 α-22 基因组上的 *YDL080C* 基因,得到转化子 a-Y-1、a-Y-2、a-Y-3、α-Y-1、α-Y-2 和 α-Y-3。将转化子和亲本分别进行酒精发酵,结果表明:(1)转化子生长没有受到影响;(2)转化子比亲本的酒精度略有升高;(3)异戊醇及总高级醇生成量二者相比没有明显变化,这与 Dickinson 等人研究认为异戊醇会降低 94% 的结论不一致。敲除 *YDL080C* 基因异戊醇生成量没有降低,原因一可能是由于高级醇存在两条代谢途径,当糖代谢合成高级醇途径受到破坏后,高级醇的代谢转向氨基酸转氨途径,导致高级醇最终生成量没有明显变化;原因二可能是不同菌株遗传背景不同,对于本实验用的酿酒酵母来说,*YDL080C* 基因在亮氨酸到异戊醇合成途径中的功能可能是冗余的。有研究报道从 α-酮基异己酸直接向异戊醇的代谢过程中起作用的酶不仅有 *YDL080C* 基因编码的类丙酮酸脱羧酶,还有 *PDC* 基因族编码的丙酮酸脱羧酶<sup>[5]</sup>;此外,α-酮基异己酸生成异戊醇的途径可能不唯一<sup>[5]</sup>,因此,仅敲除 *YDL080C* 基因并不能明显降低高级醇生成量。另外,*YDL080C* 缺失突变株酒精度高于亲本,在其它文献中尚无报导,可能的原因是敲除 *YDL080C* 基因使得类丙酮酸脱羧酶参与的其它代谢途径受阻,例如异亮氨酸生成活性戊醇的途径<sup>[7]</sup>受阻,加强了分支链途径合成氨基酸的量,而氨基酸的增加反馈抑制了丙酮酸的代谢,从而可能提高菌株发酵后的酒精度。

Eden 等对酿酒酵母中支链氨基酸的分解代谢的研究表明,分支链氨基酸转移酶(BCAT)的缺失可阻断或减弱氨基酸转变成 α-酮酸,减少缬氨酸向异丁醇和亮氨酸向异戊醇的转化而降低高级醇<sup>[9-11]</sup>。为了进一步分析敲除 *YDL080C* 基因异戊醇生成量没有降低的原因,下一步将在酿酒酵母单

倍体亲本及 *YDL080C* 基因缺失转化子的基础上分别敲除氨基酸分解代谢途径中支链氨基酸转氨酶(BCAT)基因 *BAT1* 或者 *BAT2*,检测发酵后高级醇生成量的变化,从而进一步揭示高级醇特别是异戊醇的合成机制。

## 参考文献

- [1] Sentheshanmuganathan S. The formation of tyrosol (2-*p*-hydroxyethanol) from tyrosine by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*, 1956, 64: 37-38.
- [2] Sentheshanmuganathan S. The mechanism of formation of higher alcohols from amino acids by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*, 1960, 74: 568-576.
- [3] Giudici P, Romano P, Zambonelli C. A biometric study of higher alcohol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Canadian Journal of Microbiology*, 1990, 36: 61-64.
- [4] Ough CS, Guymon JF, Crowell EA. Formation of higher alcohols during grape juice fermentations at various temperatures. *Journal of Food Science*, 1966, 31: 620-625.
- [5] Dickinson JR, Lanterman MM, Danner DJ, Pearson BM, Sanz P, Harrison SJ, Hewlins MJE. A <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance investigation of the metabolism of leucine to isoamyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(43): 26871-26878.
- [6] Dickinson JR, Salgado LEJ, Hewlins MJE. The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(10): 8028-8034.
- [7] Dickinson JR, Harrison SJ, Dickinson JA, Hewlins MJE. An investigation of the metabolism of isoleucine to active amyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(15): 10937-10942.
- [8] Dickinson JR, Harrison SJ, Hewlins MJE. An investigation of the metabolism of valine to isobutyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(40): 25751-25756.
- [9] Schoondermark-Stolk SA, Tabernero M, Chapman J, Ter

- Schure EG, Verrips CT, Verkleij AJ, Boonstra J. Bat2p is essential in *Saccharomyces cerevisiae* for fusel alcohol production on the non-fermentable carbon source ethanol. *FEMS Yeast Research*, 2005, 5: 757-766.
- [10] Yoshimoto H, Fukushige T, Yonezawa T, Sone H. Genetic and physiological analysis of branched-chain alcohols and isoamyl acetate production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 59: 501-508.
- [11] Eden A, Van Nederveelde L, Drukker M, Benvenisty N, Debourg A. Involvement of branched-chain amino acid aminotransferases in the production of fusel alcohols during fermentation in yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 55: 296-300.
- [12] Eden A, Benvenisty N. Characterization of a branched-chain amino-acid aminotransferase from *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*, 1998, 14: 189-194.
- [13] Eden A, Simchen G, Benvenisty N. Two yeast homologs of *ECA39*, a target for c-Myc regulation, code for cytosolic and mitochondrial branched-chain amino acid aminotransferases. *The Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(34): 20242-20245.
- [14] Kispal G, Steiner H, Court DA, Rolinski B, Lill R. Mitochondrial and cytosolic branched-chain amino acid transaminases from yeast, homologs of the *myc* oncogene-regulated *Eca39* protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(40): 24458-24464.
- [15] Yoshimoto H, Fukushige T, Yonezawa T, Sakai Y, Okawa K, Iwamatsu A, Sone H, Tamai Y. Pruvate decarboxylase encoded by the *PDC1* gene contributes, at least partially, to the decarboxylation of  $\alpha$ -ketoisocaproate for isoamyl alcohol formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2001, 92(1): 83-85.
- [16] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [17] 王福荣. 酿酒分析与检测. 第一版. 北京: 化学工业出版社, 2005.

## Effect of *YDL080C* gene deletion on higher alcohols production in *Saccharomyces cerevisiae* haploids

Xin Hao, Dongguang Xiao<sup>\*</sup>, Cuiying Zhang

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

**Abstract:** [ **Objective** ] The deletion of pyruvate decarboxylase-like enzyme gene (*YDL080C* gene) in industrial *Saccharomyces cerevisiae* haploids a-8 and  $\alpha$ -22 were respectively constructed, and the effect of *YDL080C* gene deletion on the production of higher alcohols, especially isoamyl alcohol, was investigated in high gravity ethanol fermentation. [ **Methods** ] Upper and down stream fragments YA (460 bp) and YB (630 bp) of *YDL080C* gene were amplified by PCR using the genomic DNA of *S. cerevisiae* haploids a-8 and  $\alpha$ -22, respectively; KanMX marker for G418 resistance from plasmid pUG6 was cloned by PCR. Fragments YA, YB and KanMX were respectively inserted into the same plasmid pUC19 using *EcoRI* and *KpnI*, *KpnI* and *BamHI*, and *KpnI* sites in the order of YA-KanMX-YB to construct the recombinant vector pUC-YABK. The recombinant cassette YA-KanMX-YB was cloned from plasmid pUC-YABK by PCR and respectively transformed into industrial yeast haploid a-8 and  $\alpha$ -22. By the double homologous recombination, *YDL080C* gene deletion mutants were constructed and selected by the growth extent on YEPD agar plates containing 600  $\mu\text{g}/\text{mL}$  G418. At the end of high gravity ethanol fermentation, fermentation performance and higher alcohols production of parental haploids and their mutants were determined. [ **Results** ] *YDL080C* deletion mutants were respectively selected from their corresponding parental haploid a-8 and  $\alpha$ -22. The alcohol fermentation results showed that higher alcohols, especially isoamyl alcohol, were almost invariable among the mutants and their corresponding parental haploids. However, mutants yielded more amount of ethanol of 0.6 (% , v/v) and 0.4 (% , v/v) over its parental haploid, respectively. [ **Conclusion** ] Deletion of *YDL080C* gene in *S. cerevisiae* haploids has no noticeable effect on decreasing the production of higher alcohols, especially isoamyl alcohol, but it seems to somehow increase the production of ethanol.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*; pyruvate decarboxylase-like enzyme; *YDL080C* gene; higher alcohols

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2006AA020101) and the Science and Technology Development Funds of Tianjin University of Science and Technology (20050412)

<sup>\*</sup> Corresponding author. Tel: +86-22-60601667; Fax: +86-22-60602298; E-mail: xdg@tust.edu.cn

Received: 12 January 2010/ Revised: 1 April 2010