关于抗老化低双乙酰啤酒酵母的研究进展

母 茜[1],王肇悦[2],张博润[2],任正隆[1]
(1.四川农业大学农学院,四川 雅安 625014;2.中国科学院微生物研究所,北京 100101)

摘 要: 老化和双乙酰含量是影响啤酒风味的重要因素,其制约了啤酒生产技术的发展,影响企业提高产品质量和经济效益。笔者从啤酒中双乙酰的合成、降低啤酒中双乙酰含量、提高啤酒抗老化能力几个方面对抗老化、低双乙酰啤酒酵母的研究进展进行了综述。(孙悟)

关键词: 啤酒; 双乙酰; 抗老化; 啤酒酵母
中图分类号:TS262.5;TS261.4 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2007)09-0083-03

Research Advance in Anti-aging and Low-diacetyl of Beer Yeast

MU Qian[1],WANG Zhao-yue[2],ZHANG Bo-run[2] and REN Zheng-long[1]
(1.Agriculture College of Sichuan Agriculture University,Ya'an,Sichuan 625014;2.Microbiology Research Institute of CAS,Beijing 100101,China)

Abstract:Both aging and diacetyl content are important factors influencing beer flavor,restricting the development of beer production techniques,and influencing the economic benefits of the manufacturers.In this paper,the research advance in anti-aging and low-diacetyl of beer yeast was reviewed based on the analysis of the synthesis of diacetyl in beer and the measures to reduce diacetyl content and to improve beer anti-aging performance.

Key words:beer;diacetyl;anti-aging;beer yeast

双乙酰是啤酒中的主要风味物质,它在发酵过程中产生,是酵母代谢的主要副产物,由于双乙酰的口味阈值很低(0.10 mg/L)[1],当它在啤酒中的含量超过该阈值时就会产生一种令人不愉快的酸馊味,严重影响啤酒的口味和质量。随着现代工艺技术的不断发展,不少厂家采用高温发酵、缩短发酵周期的方法,降低啤酒自身的还原能力,双乙酰的问题就突显出来了。

氧化是导致啤酒风味老化的主要原因之一。目前,采用的选育抗老化菌株的方法除了有通过改进酿造工艺及采用先进设备及装置以外,采用分子生物学手段来选育高效表达抗氧化剂(如二氧化硫、谷胱甘肽、SOD)的啤酒酵母菌株,能更有效地改善啤酒的老化问题。

1 双乙酰的合成

双乙酰在啤酒中形成的途径有很多,主要是由α-乙酰乳酸脱羧氧化而成。双乙酰的前驱物质α-乙酰乳酸是酵母合成缬氨酸时的中间产物。α-乙酰乳酸在酵母细胞内形成,经过细胞膜、细胞壁渗透到细胞外经非酶促作用氧化脱羧形成双乙酰,双乙酰再在酵母体内还原酶的作用下被还原成2,3-丁二醇。

收稿日期:2007-05-29
作者简介:母茜(1984-),女,羌族,四川绵阳人,在读硕士研究生。
联系人:任正隆,E-mail:auh5@sicau.edu.cn。

2 关于降低啤酒中双乙酰含量的策略

2.1 减少α-乙酰乳酸的生成

首先要选择优质的酵母菌种,控制酵母使用的代数,保持较高的活力。同时要保证酵母中α-氨基酸的含量,防止过多的缬氨酸在酵母体内累积,从而就可以减少α-乙酰乳酸的生成[2]。

2.2 利用α-乙酰乳酸脱羧酶的作用,加速α-乙酰乳酸的分解

在发酵过程中加入α-乙酰乳酸脱羧酶,主要是利用α-乙酰乳酸脱羧酶支路代谢途径,可使α-乙酰乳酸快速降解为乙偶姻(3-羟基-2-丁酮),从而大大地减少了由α-乙酰乳酸生成双乙酰的数量,从而在发酵过程中大大降低了双乙酰的峰值,缩短了发酵时间。彭智辉等人[3]曾提出过利用α-乙酰乳酸脱羧酶和葡萄糖氧化酶共同催化降低双乙酰的构想,并从理论上论证了其可行性,至于实际应用还有待于进一步研究。

2.3 利用基因工程技术

随着分子生物学研究的深入和基因工程的发展,目前国内外已有大量的研究人员对基因重组酵母工程菌

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

株的构建进行了探索和研究，并取得了一些显著的成就。目前所采用的基因工程手段来降低双乙酰生成的方法主要是：减弱 α-乙酰乳酸合成酶的活性；提高缬氨酸生物合成途径以后的酶活，使 α-乙酰乳酸在未转变为双乙酰之前就被迅速转化为其他物质。

日本的 Sone[4]等人将产气肠杆菌的 α-乙酰乳酸脱羧酶基因导入啤酒酵母中，芬兰的 Suihko 等人(1990 年)和 Blomqvist(1991 年)等构建了含土生克雷伯氏菌或产气肠杆菌 ALDC 基因的重组啤酒酵母菌株[4]。发酵实验证明，重组菌株比对照菌株的双乙酰总含量有明显的降低，而其他生理指标，例如发酵速度、生长情况和絮凝沉降等都和对照基本相同，同时发酵时间也大大缩短。基因重组技术目前尚未完全实现工业化，一个很重要的原因是用引入来源于细菌的相应基因的酵母工程菌生产出的啤酒是否安全，是否能被消费者接受，还需要一定时间的实践证明，但是自克隆技术的开展为解决这一问题开辟了一条全新的道路。

自克隆技术是指利用来源于酵母本身的目的基因来构建酵母工程菌，不引入其他任何的外源 DNA 片段，因此具有生物安全性。随着对酵母形成双乙酰机理及其分子遗传学的逐渐了解，通过基因工程的手段修饰异亮氨酸-缬氨酸生物合成途径，从而降低双乙酰的形成成为可能。研究发现，缬氨酸生物合成途径中的酶主要是由 ILV 基因控制的，其中 ILV2、ILV3、ILV5 与双乙酰的含量水平关系密切，α-乙酰乳酸合成酶 (AHAS) 就是 ILV2 基因的产物。Cesey 和 Massehelein 等对乙酰羟基合成酶和同分异构还原酶的基因进行了研究[1]，并将乙酰羟酸同分异构还原酶基因(ILV5)在酵母染色体中整合取代乙酰羟酸合成酶基因(ILV2)，从而在降低合成酶基因拷贝数的同时，也提高了同分还原异构酶基因的拷贝数。经过这种方法改造得到的啤酒酵母中乙酰羟酸合成酶的活性降低，而同分异构还原酶的活性却大幅度提高，从而其产生双乙酰的能力也大幅度降低，达到降低双乙酰含量和缩短啤酒后酵期的目的。Villa 等人[5]及 Villanueba 等人[6]用携带 ILV5 基因的质粒转化啤酒酵母，所获得的啤酒酵母工程菌中的双乙酰生成量比受体菌降低约 70%；而单独转化 ILV3 的酵母，双乙酰浓度则降低了约 40%；当 ILV3 和 ILV5 同时在酵母细胞中高效表达时，双乙酰生成量降低了约 60%。李艳等人[7]通过构建 ILV2 整合性质粒，并采用同源重组将携带丧失了 ILV2 功能的线性化质粒整合至啤酒酵母染色体上，所得到的转化菌的双乙酰含量比原始菌株降低约 30%。在上述的相关研究报道中，虽然啤酒酵母中双乙酰的含量都有不同程度的降低，但是他们的操作过程都是依赖于酵母质粒完成的，而酵母质粒一般都是由大肠杆菌-酵母穿梭质粒衍生而来的，因此获得的酵母工程菌细胞中还含有外源大肠杆菌的 DNA 和细菌抗药性标识基因，而这些基因的敲出是酵母菌在用于大规模工业化生产前必须解决的问题。

Mithieux 等人[8]在 1995 年通过共转化方法将多拷贝 ILV5 基因片段串联整合到啤酒酵母染色体上，获得了双乙酰含量降低了约 60%、遗传稳定的工业酵母菌株，由于在最后获得的工程菌中没有细菌基因，只增加了酵母本身 ILV5 基因的拷贝数，这种利用酵母本身 DNA 对啤酒酵母进行的遗传修饰，实现了真正意义上的自克隆。张吉娜等人[9]用两侧具有 ILV2 同源序列的 DNA 片段转化青岛啤酒酵母，使该酵母染色体上与酿酒酵母同源的等位基因 ILV2 内部 DNA 片段被铜抗性基因 (CUP1) 和 γ-谷氨酰半胱氨酸合成酶基因 (GSH1) 所取代，获得的酵母工程菌 α-乙酰乳酸合成酶活力明显降低，双乙酰含量也比原始菌株降低了约 25%，由于整个遗传操作过程中涉及的铜抗性标识基因 CUP1 和 γ-谷氨酰半胱氨酸合成酶基因 GSH1 均来自于啤酒酵母自身，没有任何外源基因的涉入，因此所构建的酵母菌株具有生物安全性，所获得的自克隆啤酒酵母工程菌具有重要的应用价值。

2.4 利用激光诱变选育低双乙酰的啤酒酵母

用激光照射酵母菌，可以通过产生光、电、热、压力和电磁效应的综合作用，直接或间接地影响酵母菌，引起细胞 DNA 或 RNA 改变，导致酶的激活或钝化，进而引起细胞分裂和细胞代谢活动的改变。用激光对啤酒酵母进行诱变处理，经过发酵，检测发酵液中双乙酰的含量，从而选育出双乙酰含量低的啤酒酵母菌株。曾经也有人利用紫外线来诱变啤酒酵母，也选育出了双乙酰含量较低的啤酒酵母菌株[10]。

3 关于提高啤酒抗老化能力的策略

风味稳定性作为啤酒的重要质量指标之一，从 20 世纪 70 年代开始就受到国外学者的关注[11]。啤酒酵母是影响啤酒风味稳定性的重要因素之一，主要是因为酵母在啤酒发酵过程中会产生一些反式二烯醛类化合物，这些被认为是啤酒产生老化味的物质或者前驱物质，同时啤酒包装后在运输和贮存过程中会产生一些令人不愉快的不新鲜味，即老化味。啤酒酵母自身也会产生一些抗老化的还原型物质，例如还原型谷光甘肽 (GSH1) 和超氧化物岐化酶。目前抗老化措施主要包括：

3.1 利用紫外线诱变

江南大学的李崎等[12]人对一株啤酒酵母青②进行紫外线诱变，在蛋氨酸浓度为 15 g/L 的耐性平板上筛选获得一株菌株，然后在 11 ℃、稀释率为 0.035 h 的条件下对上述菌株进行高浓度蛋氨酸(20 g/L)连续驯养，然后分离得到一株菌株。连续发酵几代后检测发现该菌中 GSH 含量明显高于一般的菌株，且遗传性稳定，而其他常规指标和品尝风味则基本一致。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3.2　基因工程技术方法

基因工程手段可以从根本上解决啤酒抗老化的问题。目前,采用基因工程手段选育抗老化啤酒酵母的思路基本上都是使啤酒酵母在发酵过程中过量地生成一些特定的抗氧化剂,例如还原型谷胱甘肽(GSH)、二氧化硫等。由于二氧化硫含量不宜太高,并且啤酒研究人员对于来自于酵母代谢产生的二氧化硫一直有赞成和反对两种不同的观点,因此生产上是否应该通过提高二氧化硫含量解决啤酒老化问题还有待于进一步探讨。谷胱甘肽作为酵母自身代谢产生的小分子短肽,并不会影响啤酒的风味和口感;相反,作为一种生物活性物质,其存在还可提高啤酒的保健功能,因此高产谷胱甘肽啤酒酵母菌种的选育也越来越受到人们的重视。酵母细胞内谷胱甘肽由γ-谷氨酰半胱氨酸合成酶(GSH1)和谷胱甘肽合成酶(GSH2)相继催化的两个反应合成,其中GSH1编码的γ-谷氨酰半胱氨酸合成酶催化的是限速步骤。酵母细胞内的GSH1活性不高,因此通过自克隆技术提高限速步骤的反应活性,便可以提高酵母细胞合成谷胱甘肽的能力,达到增强啤酒的抗老化能力的目的,还可以提升啤酒的保健功效。

近年来,我国学者在这方面做了一些研究,也取得了一定的成果。中国科学院微生物研究所酵母分子遗传与育种研究室首先使用携带GSH1基因的酵母大肠杆菌穿梭质粒,使GSH1基因在啤酒酵母中高效表达,所构建工程菌中谷胱甘肽含量比对照菌提高了50%[13]。在此研究基础上,他们又采用同源重组技术,将来自啤酒酵母YSG-26的GSH1基因整合至青岛啤酒酵母YSF31的乙酰乳酸合成酶基因ILV2内部,在破坏ILV2基因的同时,也增加了GSH1基因的拷贝数,100 L发酵罐的中试结果表明,新构建的啤酒酵母工程菌中不但谷胱甘肽含量提高了34%,同时双乙酰的含量也有了明显的降低[9]。所酿制的啤酒陈化以后,经专家品评,得到一致好评。由于在构建过程中所涉及的基因均来自啤酒酵母本身,并没有其他外源基因的摄入,因此所构建菌株具有生物安全性。

在啤酒酿造过程中,啤酒酵母生成的谷胱甘肽可分泌一小部分到细胞外,与氧化性物质反应,从而保护啤酒中的老化前体物质不被氧化,以达到延长啤酒保鲜期的作用。由于分泌到胞外的谷胱甘肽只占啤酒酵母生成的谷胱甘肽的一小部分,因此其抗老化的能力也是有限的,为此我们在寻求一种更好的途径来解决啤酒老化的问题。SOD即超氧化物歧化酶,是生物体内防御氧化损伤的一种十分重要的生物酶。由于SOD具有清除体内O^{2-}的能力,能较好地抵御氧自由基和其他氧化物自由基对细胞质膜的毒性,在机体保护方面起重要作用,因此在啤酒抗老化方面有较大的研究价值。虽然SOD是一种胞内的酶,但是通过基因工程手段调控SOD的分泌表达,将更有助于提高啤酒的抗老化能力。中科院微生物所酵母分子遗传与育种实验室正在进行这项工作,希望在啤酒抗老化的研究方面有所突破。

4　展望

随着现代社会人们生活水平的不断提高,对于啤酒这一休闲生活饮品的口感风味等的要求也越来越高。生产出深受广大消费者喜爱,又安全美味的啤酒是啤酒工作者始终追求的目标。随着分子生物学技术突飞猛进的发展,采用遗传修饰等分子育种技术选育性能优良的啤酒酵母菌的研究已得到了广泛的应用,特别是自克隆技术在啤酒酵母菌种改良方面的应用,由于在整个工程菌的构建中,没有任何外源基因的参与,因此这种工程菌生产出来的啤酒更容易被广大的消费者所接受。

参考文献:

[1] 秦玉静,高东,刘巍峰.啤酒生产中双乙酰形成的分子遗传学及其控制[J].工业微生物,1999,29(2):40-44.

[2] 任永新,崔进梅.降低微型自酿啤酒双乙酰含量[J].中国啤酒,2000,(8):.

[3] 彭智辉,林炜铁,冯杰龙.酶共催化降低啤酒中双乙酰含量的研究设想[J].酿酒科技,2001,(1):66-67.

[4] 陈乃用.α-乙酰乳酸脱羧酶加速啤酒成熟的研究进展及应用[J].工业微生物,2001,(3):54-57.

[5] Villa K D, Lee S. J Am Soc Brew Chem, Control of vicinal diketone production by brewer's yeast. I. Effects of ILV5 and ILV3 gene amplification on vicinal diketone production and ILV enzyme activity[J]. 1995, 53(2):49-53.

[6] Villanueba K D, Goossens E, Masschelein C A. J Am Soc Brew Chem, Subthreshold vicinal diketone levels in lager brewing yeast fermentations by means of ILV5 gene amplification[J]. 1990, 48(3):111-114.

[7] 李艳,铁翠娟,王正祥,等.低双乙酰啤酒酵母工程菌的构建[J].酿酒,2002,29(6):77-79.

[8] Mithieux S M, Weiss A S. Tandem integration of multiple ILV5 copies and elevated transcription in polyploid yeast[J]. 1995, 11:311-316.

[9] 张吉娜,何秀萍,郭雪娜,等.低双乙酰抗老化啤酒酵母工程菌的构建[J].生物工程学报,2005,21(6):942-946.

[10] 汪志君,高庆,等.紫外诱变筛选低高级醇和双乙酰含量的啤酒酵母[J].中国酿造,2005,(6):13-17.

[11] Hashimoto N. Brewing science. Bristol: Stonebridge Press, 1981.

[12] 李崎,潘学启,顾国贤.选育抗老化啤酒酵母提高啤酒风味稳定性的研究[J].生物工程学报,2004,20(6):912-917.

[13] Fan X Y, He X P, Guo X N, et al. Increasing glutathione formation by functional expression of the gamma glutamylcysteine synthetase gene in Saccharomyces cerevisiae[J]. Biotechnol Lett, 2004, 26:415-417.

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net