

酿酒酵母的基因改良

周世水

(华南理工大学生物科学与工程学院,广东 广州 510640)

摘 要: 酿酒酵母的发酵性能直接影响到酒的质量与生产成本。利用基因工程改良酿酒酵母可提高其生产性能。基因改良酿酒酵母的研究和应用有 ①增加酿酒酵母发酵性能的基因改良,如:构建含 α -乙酰乳酸脱羧酶基因的低双乙酰工程酵母;含乙醇乙酰酶基因的高生香工程酵母;含糖化酶、葡聚糖酶等基因的高发酵度工程酵母;高絮凝性工程酵母和嗜杀酵母。②增强或缺失酵母自身基因的菌种改良,如构建高级醇低生成量的工程酵母和构建双乙酰低生成量的工程酵母。(孙悟)

关键词: 酿酒酵母; 基因改良; 酵母

中图分类号: TS261.1;TQ920 J78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-9286(2005)07-0029-03

Genetic Improvement of *S.cerevisiae*

ZHOU Shi-shui

(Biology Science & Engineering College of South China Technical University, Guangzhou, Guangdong 510640, China)

Abstract: The fermenting performance of *S.cerevisiae* had direct effects on liquor quality and liquor production cost. Accordingly, the property of *S.cerevisiae* was improved by genetic engineering. The study of genetic improvement of *S.cerevisiae* covered: ①genetic improvement to add fermenting properties of *S.cerevisiae* such as construction of low diacetyl engineering yeast containing α -acetolactate decarboxylase gene, strong aroma-producing engineering yeast containing ethyl acetyl enzyme gene, high fermenting engineering yeast containing saccharifying enzyme and dextranase gene, high-flocculability engineering yeast, and sanguinary yeast; ②genetic improvement to strengthen or delete the inherent gene of *S.cerevisiae* such as construction of engineering yeast which produced fewer higher alcohols and engineering yeast which produced fewer diacetyl. (Tran. by YUE Yang)

Key words: *S.cerevisiae*; improvement of genes; yeast

对于液体酿造的啤酒和果酒来说,酿酒酵母是发酵的灵魂和命脉,因为其发酵性能直接影响到酒的质量与生产成本。生产上要求酿酒酵母不仅具有正常的生长繁殖性能,而且要具有优良的发酵性能,特别是高级醇、双乙酰等的生成量要低。因为这是提高酒的质量、降低生产成本的关键,而质优价廉的产品不仅能够提高企业的获利能力和市场竞争力,而且还能满足低价位需求的广大农村市场。因此,对于酿酒酵母的发酵性能需要不断改良,也就是在传统育种基础上进一步对酿酒酵母实施基因改良。

随着 1996 年酿酒酵母全基因序列图的完成,利用基因工程改良酿酒酵母就变得更加容易,并成为当前基因改良育种的主流。构建的工程酵母主要包括低双乙酰、

低高级醇、高生香、高发酵度、高絮凝性、高抗微生物污染等单一或综合发酵性能的内容。因此,本文分析和综合了基因改良酿酒酵母的研究和应用,希望能够推动啤酒企业菌种的基因改良工作,提高我国酒类行业的技术水平和产品质量。

1 增加酿酒酵母发酵性能的基因改良

这是指将外源基因转入酿酒酵母,给予菌种新的发酵性能,达到增强菌种发酵性能和应用价值的目的。

1.1 构建含 α -乙酰乳酸脱羧酶基因的低双乙酰工程酵母

对于增加了 α -乙酰乳酸脱羧酶基因(ALDC)的工程酵母,由于 ALDC 基因所合成的 α -乙酰乳酸脱羧酶

收稿日期 2005-01-27

作者简介:周世水(1971-),男,博士,讲师,主要从事各种酒的研究开发及其菌种的基因改良。

能够加速 α -乙酰乳酸转变成乙偶姻,从而减少了双乙酰的生成量,显著缩短了啤酒的成熟时间。如,Yamano S 等人将 ALDC 基因整合到酿酒酵母染色体上获得的工程酵母,发酵结果表明,可显著降低双乙酰的生成量,而其他发酵性能未发生改变^[1]。郭文杰^[2]、秦玉静^[3]等人分别构建出含 ALDC 基因的工程酵母,发酵实验证实,降低了啤酒中双乙酰含量,并缩短发酵周期 5 d 以上。其应用效果与 ALDC 基因生成的 α -乙酰乳酸脱羧酶量直接相关。虽然工程酵母发酵实验结果非常好,但是上述 ALDC 基因都来自细菌,存在生产的啤酒是否安全、能否被消费者接受的问题,尚需做进一步的食品安全性检验和经受长时间的检验,结果是企业在决定使用工程酵母时非常谨慎。但作为酿酒酵母菌种基因改良的一种途径,具有很好的研究价值。

1.2 构建含乙醇乙酰酶基因的高生香工程酵母

生香酵母主要属于产膜酵母和假丝酵母,是通过产生乙醇乙酰酶将乙醇与有机酸反应生成各种酯,如乙酸乙酯、己酸乙酯、乳酸乙酯等,从而提高酒的香味和口感。因此,利用基因工程将产膜酵母或假丝酵母中的乙醇乙酰酶基因用 PCR 扩增出来,然后再转入企业的酿酒酵母中,从而构建含乙醇乙酰酶基因的高生香工程酵母。这种工程菌特别适合酿造果酒,因为果汁中通常含有各种有机酸,从而更有利于生成各种酯。初步研究结果表明,工程酵母能够提高酒的香味和口感。

1.3 构建含糖化酶、葡聚糖酶等基因的高发酵度工程酵母

由于酿酒酵母的发酵只能利用单糖等还原糖,而对于多糖则很难利用。如果要生产超干型啤酒或果酒就需要基本消耗完酒液中的碳水化合物,而基因工程方法构建的菌种能够有效的解决。其技术路线是将已经清楚的糖化酶基因转入到酿酒酵母中,构建成具有糖化和发酵两种性能的工程酵母。例如,罗进贤等人将黑曲霉的糖化酶 GAI cDNA 和 MF-a1 因子的启动子-信号序列一同构建到载体上,再通过载体将完整的基因表达系统转入酿酒酵母 GRF18 中,筛选得到的工程酵母在含 10 % 的淀粉培养液中发酵,淀粉转化率达到 96.1 %,酒精含量达 5.6 %^[4]。

啤酒中的 β -葡聚糖会使酒体浑浊、泡沫持久力缩短和挂杯力减弱,影响到啤酒的质量。所以采用含 β -葡聚糖酶基因的工程酵母进行发酵,能消除啤酒中 β -葡聚糖的不良影响。例如,E.Hincheiff^[5]、黄兴奇^[6]、任建^[7]等人分别将来自枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)等的 β -葡聚糖酶基因克隆到酿酒酵母中,选育的工程酵母具有分解 β -葡聚糖的能力,可使麦芽汁粘度降低而提高过滤速度

和麦芽汁收率,从而改善啤酒质量。但是,构建 β -葡聚糖酶的工程酵母时,必须避免 β -葡聚糖酶对酵母的自溶作用,即选育低自溶的工程酵母,以达到提高啤酒质量和生产低热量新型啤酒的目的。

1.4 构建高絮凝性工程酵母

絮凝性是选育酿酒酵母的一个重要指标,因为絮凝性良好的菌种能够加速酒液的澄清,同时可防止发酵液中菌种存在时间过长,导致细胞自溶而影响酒的质量。因此,对细菌和酵母中絮凝能力强的菌种,采用基因工程技术,将其相关的基因调出并转入到酿酒酵母中,构建成高絮凝性的工程酵母。这不仅能够提高酒的质量,而且能够简化工艺操作和降低生产成本。目前国内外有一些通过原生质体融合方法来提高酵母絮凝性的研究^[8,9],而采用基因工程方法的研究也正在开展,这更能针对性地提高酿酒酵母的絮凝性。

1.5 构建嗜杀酵母

嗜杀酵母就是在酿酒酵母中引入对杂菌有抑制或杀死作用的基因,以有效控制杂菌的污染。嗜杀酵母能够更有效地维持液体纯种发酵,减少杂菌污染造成的危害,并简化工艺操作。目前,对于嗜杀酵母已经有采用原生质体选育菌种的例子^[10,11],而采用基因工程技术能够获得嗜杀性能更强的工程酵母,这对于企业稳定生产来说非常重要。

2 增强或缺失酵母自身基因的菌种改良

酿酒酵母的某些发酵性能对发酵酒来说是需要严格控制的,如双乙酰、高级醇等不良发酵副产物,可采用基因工程方法将相关基因进行缺失或降低活性,从菌种开始实现对这些副产物的有效控制。

2.1 构建高级醇低生成量的工程酵母

高级醇俗称杂醇油,是啤酒和果酒发酵的主要副产物,它能够形成酒的香气和风味,使酒口感柔和协调、酒体丰满圆润,但高级醇含量过高,反而会影响到酒的风味和口感,饮用后会“上头”,从而严重影响到酒的质量。例如,当啤酒中高级醇含量超过 100 mg/L、果酒中高级醇含量超过 550 mg/L 时,将使酒的口味和受欢迎程度明显下降。高级醇主要包括异戊醇、活性戊醇、异丁醇和正丙醇等,而异戊醇约占啤酒总高级醇的 50 %。研究表明,啤酒中 80 % 的高级醇是在主发酵期间形成的^[12,13],其中 75 % 的高级醇来自糖代谢,25 % 来自氨基酸脱羧还原生成。所以控制高级醇生成的根本方法是对酿酒酵母进行基因改良。

2.1.1 构建支链氨基酸转氨酶 (BCAT) 基因片段 eca 39,eca 40 缺失的工程酵母

BCAT 能够切断或减弱氨基酸转变成 α -酮酸的能力,从而减少缬氨酸到异丁醇、亮氨酸到异戊醇的生成,A. Eden 等人研究表明,异戊醇、活性戊醇和异丁醇受 *eca 39*,*eca 40* 的影响显著^[12]。Benvenisty 等人研究表明,缺失 *eca 39*,*eca 40* 的菌株能够显著降低异丁醇、双乙酰含量,但对异戊醇含量的影响不显著^[13]。Dickenson 等人研究证实,从缬氨酸到异丁醇的代谢途径中丙酮酸脱羧酶(PDC)是合成异丁醇的关键步骤^[14],而构建丙酮酸脱羧酶活性降低的工程酵母能够降低异丁醇的生成量。

2.1.2 构建丙酮酸脱羧异构酶基因 YDL080c 缺失的工程酵母

通过同源重组的方法,将酿酒酵母中的 YDL080c 基因 PCR 调出,进行基因改造后再转回原菌种,完成构建 YDL080c 基因缺失的工程酵母(本研究室正在做)。工程酵母由于 YDL080c 基因受到破坏而不能正常合成丙酮酸脱羧异构酶,从而阻断了亮氨酸代谢生成异戊醇,达到降低异戊醇的目的^[14]。

因此,构建 *eca 39*,*eca 40* 和 YDL080c 三个基因缺失的工程酵母,发挥协同作用来降低酒中的异丁醇、异戊醇和总高级醇含量。由于啤酒和果酒中高级醇生成后就很难去除,所以要通过低高级醇生成量的工程酵母、发酵工艺、培养基组成等优化,达到降低高级醇生成和提高酒质量的目的。

2.2 构建双乙酰低生成量的工程酵母

双乙酰是啤酒的特殊成分,是形成啤酒风味的重要物质,当含量过高时将产生令人不愉快的馊饭味。因此,基因改良酿酒酵母是控制啤酒中双乙酰生成的根本途径。

2.2.1 构建乙酰羧酸合成酶(AHAS)基因缺失或降低的工程酵母

嘉士伯酿酒酵母(*Saccharomyces carlsbergensis*)含有乙酰羧酸合成酶基因的两种不同结构的等位基因,一种类似于酿酒酵母的 *ILV₂* 基因,另一种不同于酿酒酵母基因^[15]。李艳等人采用同源重组等基因操作,取代菌种中的 *ILV₂* 基因,降低由 *ILV₂* 基因编码的 AHAS 酶活性,从而减少 α -乙酰乳酸的生成量。但 AHAS 又未完全失活,与亮氨酸、缬氨酸等营养缺陷型菌株不同,它没有影响到菌种的正常发酵性能。研究表明,基因 *ILV₂* 缺失的工程酵母发酵性能正常,而 AHAS 酶活性降低 75%,啤酒中双乙酰含量比原始菌株降低 30%^[16]。

2.2.2 构建羟基乙酰同分异构还原酶基因(*ILV₅*)高拷贝数的工程酵母

增加酵母基因中 *ILV₅* 的拷贝数,可提高羟基乙酰同分异构还原酶(RI)的活力,加速 α -乙酰乳酸转化成

缬氨酸,以有效减少 α -乙酰乳酸生成双乙酰的量。例如,Dillmans 等人通过增加酵母单倍体中 *ILV₅* 的拷贝数,提高 RI 酶活力 5~10 倍,使发酵过程中双乙酰含量的峰值降低 50%~60%^[17]。Mithieux S 等人将 *ILV₅* 基因转投入酵母中表达,使啤酒中双乙酰含量比原始菌株降低 50%,从而有效缩短啤酒的成熟时间^[18]。比利时研究人员用 *ILV₅* 取代 *ILV₂*,即达到降低 AHAS 酶活性,减少 α -乙酰乳酸的生成,以从根本上减少双乙酰的生成,又促进生成的 α -乙酰乳酸更多地转变成缬氨酸,而进一步降低了双乙酰的生成量。

3 讨论

利用外源基因构建的工程酵母,能够显著增加酿酒酵母的发酵性能,但发酵生产的啤酒和果酒作为最终消费产品,类似于转基因食品,其安全性尚需进一步检验,特别是能否被消费者接受还需长时间的考验。而通过强化酿酒酵母自身的优良发酵性能或弱化其不良发酵性能的基因改良选育的工程酵母,由于改变的是酵母自身的基因,而不是外源基因,所以一般不会对菌种的原有发酵性能。所以这种优良工程酵母更容易被企业接受和应用到生产实践。

参考文献:

- [1] Yamano S. Kondo K., et al. Construction of a brewer's yeast having α -acetolactate decarboxylase gene from *acetobacter aceti*. Ssp[J]. J. Biotech. 1994, 32: 173-178.
- [2] 郭文杰,何秀萍,等. 枯草杆菌 α -乙酰乳酸脱羧酶基因在啤酒酵母工业菌株中的表达[J]. 微生物学报, 2001, (41):105-108.
- [3] 秦玉静,刘巍峰,等. 含 α -乙酰乳酸脱羧酶基因重组酿酒酵母的啤酒发酵[J]. 山东大学学报(自然科学版), 2000,35(2): 235-239.
- [4] 罗进贤,吴晓萍,等. 可降解淀粉和产生酒精的酵母工程菌的构建[J]. 工业微生物, 2000,33(4): 15-18.
- [5] E.Hincheiff. Journal of General Microbiology. 1984.130: 1285-1288.
- [6] 黄兴奇,宋大新,等. 枯草芽孢杆菌 β -1,3-1,4-葡聚糖酶基因(*bgIS*)在酵母菌种的克隆与表达[J]. 微生物学报,1992,32(3):74-76.
- [7] 任建,杨艳,等. 细菌的 β -1,4-内切葡聚糖酶基因在酿酒酵母中的表达[J]. 微生物学杂志, 1997, 17(3): 30-36.
- [8] VS Javadekar H. Sivaraman and DV Gokhale. Industrial yeast strain improvement: construction of highly flocculent yeast with a killer character by protoplast fusion[J]. J. Ind. Microbiol. 1995.15(2):94-102.
- [9] 陈海昌,刘波,等. 原生质体融合技术提高酵母絮凝性的研究[J]. 微生物通报, 1997, (3):159-161.
- [10] 杜金华,张开丽,等. 嗜杀苹果酒酵母的构建[J]. 食品与发

(下转第 35 页)

和 APICHL 细菌鉴定试验,对 31 株有害菌进行了鉴定,结果表明,它们很可能是分属于 *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Leuconostoc citreum* 的乳酸菌,以 16S rDNA 序列分析的方法进行分析,同样得出这 31 株腐败菌分属于同样 5 个种的结论。而且,每一个菌株用 APICHL 细菌生理生化鉴定试验所得出的鉴定结论,都在 16S rDNA 序列分析中得到认证。在现代细菌分类中,用传统的理化鉴定方法结合先进的基因分析手段,会使菌种鉴定结果更为准确、可靠^[5]。在 31 株腐败菌中,有 15 株为 *Lactobacillus brevis*,占 48.4 % 6 株为 *Lactobacillus plantarum*,占 19.4 % 5 株为 *Lactobacillus paracasei*,占 16.1 % *Leuconostoc pseudomesenteroides* 和 *Leuconostoc citreum* 各有 2 株和 3 株,各占 6.5 % 和 9.7 %。

从腐败菌对啤酒的污染程度如形成大量生物沉淀来看,*Lactobacillus brevis* 最为严重。腐败菌对啤酒的风味产生较大的影响。污染了的啤酒其醇、酯类的量会有

较大幅度的变化,由于乳酸菌产生乳酸,因而污染酒的总酸含量增加,同时由于乳酸菌在代谢过程会产生双乙酰,因而使啤酒的双乙酰含量增加,从而使啤酒口感变差。*Lactobacillus brevis* 在啤酒腐败菌中所占的比例接近 50 %,为污染啤酒的主要菌群,因此进一步研究它们的营养需求、生长条件、代谢规律及与其他种群之间的相互关系,对有效地控制啤酒腐败菌对啤酒的影响,保证啤酒风味的纯正,具有十分重要的意义。

参考文献:

- [1] 顾吉来.啤酒酵母及有害菌检查[C].中国酿酒工业协会. 1996.101.
- [2] 凌代文,东秀珠.乳酸菌分类鉴定及实验方法[M].北京:中国轻工业出版社,1999.118.
- [3] 杜连祥,等.工业微生物学实验技术[M].天津:天津科学技术出版社,1992.102.
- [4] 姜泊,张亚历,周殿元.分子生物学常用实验方法[M].北京:人民军医出版社,1996.107.
- [5] 汪恩涛,曲春枫,冯继东,等. 16S rRNA 基因序列确定根瘤菌的系统发育[J].高技术通讯,1995,(3) 55-57.

(上接第 31 页)

酵工业, 2001, 28(2): 20-23.

- [11] Gniewosz, Malgroszala, A. Raczynska-cabaj. Modification of wine yeast from *saccharomyces cerevisiae* species by electrofusion of protoplasts[J]. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 1996, 8(3): 17-25.
- [12] A. Eden, L. Van Nedervelde, et al. Involvement of branched-chain amino acid aminotransferases in the production of fusel alcohols during fermentation in yeast[J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2001, 55(3): 296-300.
- [13] Benvenisty, Nissim. Method for reduction of fusel oils in alcoholic beverages and food productions[J]. PCT Int. Appl. WO9950422.
- [14] Dickenson, J. Richard, Harrison, Scott J. et al. An investigation of the metabolism of valine to isobutyl alcohol in

saccharomyces cerevisiae[J]. J. Biol. Chem., 1998, 273(40): 25751-25756.

- [15] Gjermansen, Nilsson-Tillgren T, et al. Toward diacetylless brewer's yeast. Influence of ILV2 and ilv5 mutations[J]. J. Basic. Microbiol. 1998, 28: 175-183.
- [16] 李艳,铁翠娟,等. 低双乙酰啤酒酵母工程菌的构建[J]. 酿酒, 2002, 29(6): 77-79.
- [17] Dillemans M. Goossens E. et al. Amplification effect of ILV5 gene on the production of vicinal diketones in *saccharomyces cerevisiae*[J]. J. Am. Brew. Chem., 1987, 45: 81-84.
- [18] Mithieux S. Weiss AS. Tandem integration multiple ILV5 copies and elevated transcription in polyploid yeast[J]. Yeast, 1995, 11: 311-316.

贵州茅台入选第二届“中国十佳上市公司”

本刊讯 2005 年 6 月 16 日,10 家优秀上市公司从国内 1300 多家上市公司中脱颖而出,荣膺第二届“中国十佳上市公司”称号。其中,贵州茅台首次获得“中国十佳上市公司”的称号。

当选“十佳”的上市公司包括:长江电力、中集集团、招商银行、中兴通讯、万科股份、宝钢股份、贵州茅台、上港集团、中国石化、佛山照明。其中,中集集团、贵州茅台和佛山照明是首次入选的上市公司。

“上市公司十佳”评选活动的主办方上海证券报和东吴证券有限责任公司表示,当选“十佳”的企业都是主业突出、信息披露公开透明、对投资者高度负责的上市公司,在目前国内上市公司普遍业绩不佳的情况下,这些企业代表着中国资本市场发展的方向。

此次“中国十佳上市公司”是通过近 5 万名个人投资者和近百家基金、证券公司等机构投资者的投票选举产生。(小小)