

专论与综述

分子生物学技术在啤酒酿造业中的应用*

李艳¹ 何秀萍² 张博润^{2*} 诸葛健¹

(江南大学生物工程学院 无锡 214036)¹ (中国科学院微生物研究所 北京 100080)²

摘要: 分子生物学技术的运用为传统啤酒酿造业注入了新的活力。文中简要介绍分子生物学技术在啤酒酵母工程菌构建、啤酒发酵中污染杂菌的鉴定以及在啤酒原料分析等方面的应用概况。

关键词: 分子生物学技术, 啤酒酿造, 应用

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 06-0068-05

啤酒酿造是生物技术最古老的形式之一, 在漫长的发展过程中, 啤酒行业从产品种类、发酵技术以及设备方面都经历了不少的变革, 尤其是近几年来分子生物学技术的运用使得在啤酒酵母菌的选育、啤酒发酵中污染杂菌的鉴定以及啤酒酿造原料的分析上都有较大的发展, 这对提高啤酒的质量, 增加啤酒产品的种类, 缩短啤酒发酵的周期, 增加经济效益等方面作出了重要贡献, 有力地推动了啤酒行业的发展。

1 啤酒酵母工程菌的构建

啤酒酵母菌是啤酒发酵的灵魂, 啤酒工业使用的酵母菌株通常为二倍体或多倍体, 一般不能产生有活力的孢子, 采用常规的诱变育种技术很难获得理想的优良啤酒酵母菌株, 因而长期以来主要通过自然筛选的方法选育较好的生产菌株。啤酒生产用酵母菌株存在一些有待克服的问题, 例如不能有效地利用广泛的基质发酵生产啤酒, 对高渗透压的耐性较低, 啤酒发酵周期较长, 啤酒中双乙酰含量较高等等。近年来随着酵母菌遗传学及分子生物学研究的深入发展, 采用分子生物学技术构建具有优良特性的啤酒酵母工程菌已成为可能。

1.1 产β-葡聚糖酶啤酒酵母工程菌的构建 尽管生产啤酒的主要原料大麦含有一定量的β-葡聚糖酶, 但在制麦, 糖化等过程中几乎全部被破坏而失去活性。而通常使用的啤酒酵母菌不能利用β-葡聚糖, 导致过量的β-葡聚糖残留在糖化醪中。残留在醪液中的β-葡聚糖除了会引起啤酒过滤困难外, 还可能导致成品啤酒中形成胶粒和混浊, 影响啤酒的风味和质量。通常的解决办法是在啤酒酿造过程中添加一定量的β-葡聚糖酶。William将 *Bacillus subtilis* 的β-葡聚糖酶基因克隆于 *MF al* 启动子和分泌信号序列下游, 转化啤酒酵母获得的转化子能产生具有活性的β-葡聚糖酶, 其中85%以上的β-葡聚糖酶可以从酵母细胞中分泌出来, 但是由于麦汁的pH值相对较低, 从而导致产生的β-葡聚糖酶在发酵过程中水解β-葡聚糖的活力很低^[1]。随后 Penttila 等克隆了 *Trichoderma ree-*

* 国家自然科学基金资助项目 (No.39970010)
Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No.39970010)

* * 联系人

收稿日期: 2001-11-05, 修回日期: 2001-12-16

sei 中编码内切- β -1, 4-葡聚糖酶的基因 *EGII*。将 *EGII* 插入到酵母载体的磷酸甘油激酶基因 (*PGK*) 启动子和终止序列之间, 采用多拷贝或整合质粒转化啤酒酵母。所得转化子均可以有效地降低麦汁中的 β -葡聚糖含量, 加快啤酒的过滤速度而没有改变啤酒的感观风味和酵母原有的发酵性能^[2]。

1.2 构建产低热能的啤酒工程菌 啤酒酵母一般仅能利用单糖, 双糖及三糖, 而不能利用约占麦汁总糖 25% 的多糖和糊精。成品啤酒中含有这些糖类物质不利于肥胖人群和糖尿病人饮用。通过基因技术的改造能使酵母具有产生淀粉葡萄糖苷酶 (AMG) 或 α -淀粉酶的能力, 将麦芽四糖、糊精和淀粉降解为葡萄糖、麦芽糖和麦芽三糖等可发酵性糖, 减少了成品啤酒中的糖分, 生产出低糖和低热能的啤酒。糖化酵母 (*Saccharomyces diastaticus*) 具有产生及外分泌淀粉葡萄糖苷酶 *GAI*, *GAI*, *GAI* 的能力, 这 3 种酶由 3 个不连续基因 *STA1* (*DEX2*), *STA2* (*DEX1*), *STA3* (*DEX3*) 编码。由 *STA2* 编码的酶 (*GAI*) 能催化水解糊精的 α -1, 4 糖苷键, 但不能作用于 α -1, 6 糖苷键, 只能一定限度地降解糊精。Modena 将 *STA2* 基因克隆到工业用啤酒酵母菌中, 发酵试验表明重组工程菌发酵后的发酵液中残留糊精含量较亲株低 30%^[3]。William 将小麦的 α -淀粉酶基因导入啤酒酵母中构建工程菌, 实验室规模的发酵实验表明, 含 α -淀粉酶基因的工程菌的发酵能力较亲株有明显的提高。

1.3 熟化期短的啤酒酵母工程菌的构建 双乙酰是啤酒中一个主要的风味物质, 口味阈值很低 (0.02 ~ 0.10mg/L), 其含量已成为啤酒发酵成熟与否的重要标志, 加速啤酒的成熟即缩短后发酵的主要措施就是要除去双乙酰。双乙酰是由啤酒酵母细胞体内所进行的缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸生物合成的中间产物 α -乙酰乳酸分泌到细胞体外时, 由非酶促的氧化脱羧反应自发产生的。在双乙酰的代谢途径中, 羧酸还原异构酶是控制双乙酰前体物质 α -乙酰乳酸积累的关键酶, 此外若将编码 α -乙酰羧酸合成酶的基因 (*ILV2*) 表达能力削弱, α -乙酰乳酸的合成量也会大幅度下降。所以改变 *ILV2*, 以降低 *AHAS* 的酶活, 同时修饰 *R1* 的基因 (*ILV5*), 提高 *R1* 的酶活, 从而限制 α -乙酰乳酸的积累, 并促使其向氨基酸合成的方向转化, 是构建选育低双乙酰产生的啤酒酵母的基本策略。Goossens 等构建了带有甲磺隆抗性 *SMR-410* 基因和 *ILV5* 的整合载体质粒, *SMR-410* 与 *ILV2* 有高度的同源性, 只有第 574 个碱基不同, 转入酵母后质粒将在酵母染色体 X III 上的 *ILV2* 位点处发生整合, 使 *ILV5* 的拷贝数有小幅度的提高。用获得的转化子进行发酵实验, 发酵液中双乙酰含量的平均值比亲株低 53% 左右, 而啤酒风味没有改变^[4]。Masschelein 等利用基因重组技术用 *ILV5* 取代 *ILV2*, 在降低 *ILV2* 的拷贝数的同时提高了 *ILV5* 的拷贝数^[5]。经过这种改造的酵母降低了产双乙酰能力, 但要注意在酵母染色体上必须保留一个 *ILV2*, 否则会造成酵母本身异亮氨酸和缬氨酸合成的缺陷。另一方面, α -乙酰乳酸可在 α -乙酰乳酸脱羧酶 (*ALDC*) 的作用下形成乙偶姻, 从而有效地降低双乙酰的产生。 α -乙酰乳酸脱羧酶在啤酒酵母中不存在, 而在细菌中普遍存在。Sone 等克隆了 *Enterobacter aerogenes* 的 *ALDC* 基因在啤酒酵母中表达, 结果证明转化子的每毫克蛋白有 2 ~ 3 个 α -乙酰乳酸脱羧酶活力单位, 转化子所生产的嫩啤酒中双乙酰含量很低^[6]。Fujii 等将 *Enterobacter aerogenes* 的 *ALDC* 基因克隆到含有核糖体 DNA (*rDNA*) 酵母整合质粒 (*YIP*) 上, 通过转化将其整合到酵母的染色体上, 得到含有 20 个以上 *ALDC* 基因拷贝的转化子, 转化株的 *ALDC* 基因在非选择条件下稳定。发酵试验表明转化子在主酵后的双乙酰含量比亲株降低 50% 以上, 而酵母的生长速度和乙醇的

生成能力都没有受到影响^[7]。Yamano 等比较了乙醇脱氢酶 (ADHI)、磷酸甘油酸激酶 (PGK) 和甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GPD) 启动子对 ALDC 基因在啤酒酵母中表达所起的作用, 实验表明在发酵条件下含有 PGK 启动子的 ALDC 基因在酵母中表达水平最高, 说明 PGK 启动子是 ALDC 基因在酵母中高效表达的最强启动子^[8]。我国的研究者也开始了这一领域的研究, 中国科学院微生物研究所与青岛啤酒股份有限公司合作研究开发带有枯草芽孢杆菌 ALDC 基因青岛酵母工程菌并已经进入中试阶段^[9]。

1.4 亚硫酸盐形成的控制 亚硫酸盐是啤酒酵母硫代谢的中间产物, 能与啤酒中主要的老化物质羰基化合物通过复杂的反应生成对风味稳定性无影响的较稳定的复合物, 能够延长啤酒风味的保鲜期。对啤酒酵母中含硫氨基酸的硫吸收和生物合成途径的研究表明缺失编码高丝氨酸邻乙酰转移酶 MET2 基因的酵母菌不能产生邻乙酰高丝氨酸, 从而不能对亚硫酸盐的形成起阻遏作用, 这样缺失 MET2 基因的突变株中就能大量形成亚硫酸盐。此外, MET10 基因编码了一个 115kD 的亚硫酸盐还原酶必需的多肽, 它可能是酶的亚单位, 缺失 MET10 基因的啤酒酵母中亚硫酸盐的产量也会大幅度增加。Hansen 等用异源多倍体啤酒酵母 *S. carlsbergensis* 为出发菌株, 以 G418 抗性作为筛选重组子的标记, 构建了缺失 3 或 4 个 MET2 拷贝或者是缺失 3 或 4 个 MET10 拷贝的异源多倍体酵母工程菌^[10]。发酵实验证明这些重组子其它各方面性能指标均较好, 但发酵速度过慢。丹麦嘉士伯实验室也正在进行这方面的研究。

1.5 提高啤酒废酵母的利用值 发酵生产啤酒后的酵母细胞是啤酒生产重要的副产物, 每生产 1m³ 啤酒可得到 20kg 含水 80% 的湿酵母泥或 3.9 kg 干酵母, 这些酵母一般直接收集经干燥后得到酵母粉, 作为动物饲料; 或者是经水解后获得核酸、蛋白质和其它细胞自溶物质, 如复合核苷、复合氨基酸粉。现在通过基因工程技术可以进一步提高啤酒废酵母的商业价值, 即通过转入异源基因, 使酵母能够生产有价值的异源蛋白质。啤酒酵母具有食品安全性, 是生产药物蛋白较好的宿主。酵母合成异源蛋白质的途径有两种: 一是组成型合成, 异源蛋白质伴随着啤酒发酵而合成; 二是调节型合成, 异源蛋白质的合成过程与啤酒发酵过程分开进行。Hinchliffe 等人将高价值的人血清白蛋白的基因克隆到啤酒酵母中, 使其能够调控表达。当啤酒酵母进行啤酒的生产发酵时, 酵母所携带的人血清白蛋白的基因不表达, 而当啤酒生产结束后, 将酵母转入含有诱导剂-乳糖的培养基中, 人血清白蛋白的基因开始表达, 产生大量的胞内人血清白蛋白。更重要的是, 转化子与亲株相比, 发酵能力相似, 所生产的啤酒风味上也没有改变^[11]。

此外, 为了适应多样的消费群体和使啤酒酿造技术更为合理, 便于控制, 有关研究者进行了不同特色的酵母工程菌的研究, 如构建产无醇啤酒的啤酒酵母菌株, 带有杀伤毒素、抗污染的啤酒酵母菌株, 耐酒精度和耐高渗透压的啤酒酵母菌株等。但是我们必须牢记啤酒是直接供给人们消费的食品, 在使用基因工程技术改良菌种的时候应尽量使用食品级微生物的基因或啤酒生产所用的原料的基因。

2 啤酒酿造中杂菌的检测

在啤酒酿造中通常采用两种传统的方法检测杂菌: 1) 是培养生长在啤酒中的微生物, 这种方法虽然可以较为准确地测定杂菌, 但需要花较长的时间, 通常要几天或几个星期, 对生产指导具有延缓性。2) 是通过分类学鉴定检测杂菌, 这种方法虽然快

速,但难以预测被检测到菌造成啤酒酸败的能力。聚合酶链式反应(PCR)技术为检测啤酒杂菌提供了新的快捷方法,此方法快速灵敏,不需要微生物培养和分类学鉴定。目前美国,日本以及我国的研究者都在致力这方面的研究,主要采用了3种技术:1)使用一套特异性引物的PCR技术,我们知道一些乳酸菌,尤其是 *Lactobacillus* 属能对酒花中异 α 酸产生抗性,在啤酒中生长时引起啤酒酸败给酿造工业带来严重的问题。据研究能在啤酒中生长的具有酒花抗性 *Lactobacillus* 一般都带有与酒花抗性有关的类 *horA* 基因,根据 *horA* 基因的部分编码序列设计PCR引物,通过PCR扩增就能预测出存在啤酒当中的任一种 *Lactobacillus*^[12]。2)随机扩增多态DNA分析多聚酶链反应技术,研究者使用寡聚核苷酸引物对微生物的16S rRNA基因进行PCR扩增,比较,能鉴别出啤酒腐败菌的属种^[13]。3)使用嵌套多聚酶链反应技术检测啤酒中腐败菌,此技术可以减少酵母细胞存在产生的干扰^[14]。

3 啤酒酿造原料的鉴定

大麦是生产啤酒的主要原料,其质量品质直接影响到麦芽制作、啤酒酿造过程和成品啤酒的质量。而只有纯品优质的啤酒大麦才能通过制麦工艺生产出优质的麦芽,因此有效地鉴定大麦品种是非常重要的。传统的鉴定方法是通过麦粒的外观形状、生理生化指标以及其在微型制麦中发芽品质来鉴定,此方法耗时长,受诸多因素的影响,重复性差,往往得不到满意的结果。随着植物基因技术的运用,这一问题将得到解决。

近几年来,北美大麦基因组图谱计划(NABGMP)用限制性片段长度多态性(RFLP)标志的方法构建了大麦的遗传连锁图。它的优点在于它能直接发现同源染色体上核苷酸碱基序列的差异,与传统的形态学和生物化学标志不同的是RFLP分析与基因表达无关,且检测容易、易于实现自动化^[15]。Blak等人先后设计了115种大麦已知DNA片段序列的PCR引物,将大麦DNA通过PCR扩增,仅将扩增产物通过凝胶电泳分析便能明显的区分出不同的大麦品种;Henry等研究者用来自于大麦 α -淀粉酶基因引物,通过PCR成功地鉴定了形态上相似的制麦大麦和饲料大麦。与此同时,Araki等研究者采用随机扩增多态DNA(RADP)和混浊配对的扩增性片段长度多态性(ALPHA)两种植物基因技术成功地建立了11个品种的酒花基因指纹库。对于未知品种的酒花只需提取其任一部分的DNA进行PCR扩增便能在两天内鉴定出其品种来^[16]。

参考文献

- [1] William E. International Industrial Biotechnology, 1987, 7 (3): 264 ~ 268.
- [2] Penttila M, Suikko M-L, Lehtinen Y, et al. Current Genetics, 1987, 12: 413 ~ 420.
- [3] Modena D, Vanoni M, England S, et al. J Archives in Biochemistry and Biophysics, 1986, 248: 138 ~ 150.
- [4] Goossens E, Debourg A, Villanueva K D, et al. Proceedings of the Congress of the European Brewery Convention, 1993, 251 ~ 258.
- [5] Masschelein C A, Goossens E, Goffin O, et al. J Am Soc Brew Chem, 1987, 45: 81 ~ 84.
- [6] Sone H, Kondo K, Fujii T, et al. Appl Environ Microbiol, 1988, 54 (1): 38 ~ 42.
- [7] Fujii T, Nagasawa N, Iwamatsu A, et al. Appl Environ Microbiol, 1990, 56 (4): 997 ~ 1003.
- [8] Yamano S, Tomizuka K, Tanaka J, et al. J Biotechnol, 1994, 37: 45 ~ 48.
- [9] 郭文洁, 何秀萍, 铁翠娟, 等. 微生物学报, 2001, 41 (1): 105 ~ 108.
- [10] Hansen J, Kjelland-Brandt M C. Proceedings of the Congress of the European Brewery Convention, 1995, 319 ~ 328.
- [11] Edward H. J Inst Brew. 1992, 98: 27 ~ 31.
- [12] Juvonen R, Satokari K, Mallison, et al. J Am Soc Brew Chem, 1999, 57 (3): 99 ~ 103.

- [13] Thomas A T, Robert S, Louse S. *J Am Soc Brew Chem*, 1996, **54** (2): 91 ~ 96.
- [14] Robert J S, Terrance M C. *J Am Soc Brew Chem*, 1996, **54** (2): 78 ~ 84.
- [15] Habernicht K, Blake T K. *J Am Soc Brew Chem*, 1999, **57** (2): 64 ~ 71.
- [16] Araki Y, Tsuchiya M, Takashio, *et al*. *J Am Soc Brew Chem*, 1998, **56** (3): 93 ~ 98.