

自克隆技术在工业啤酒酵母改良中的研究概况

王肇悦 张 峰 何秀萍 张博润*

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘要: 自克隆技术由于具有生物安全的优点, 已成为对工业微生物、尤其是食品微生物进行遗传修饰的首选技术, 简要介绍了自克隆技术在工业啤酒酵母菌种改良中的研究概况。

关键词: 自克隆技术, 啤酒酵母, 菌种改良

中图分类号: 14. 04 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 06-0138-04

A Survey and Outlook of Research in Breeding of Industrial Brewing Yeast by Self-cloning Technique

WANG Zhao-Yue ZHANG Feng HE Xiu-Ping ZHANG Bo-Run*

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract: Self-cloning is a favorable technique in modification of industrial microorganisms especially food microorganisms because of its bio-safety. A survey and outlook of research in breeding of self-cloning industrial brewing yeast were introduced in this study.

Key words: Self-cloning, Beer yeast, Breeding

酵母是啤酒发酵的灵魂和命脉, 优良菌种的选育对于提高啤酒质量至关重要, 而通过传统育种方法获得的酵母菌种的性能改良程度有限。随着生物工程技术的飞速发展和酿酒酵母遗传背景的深入研究, 通过基因工程手段对酿酒酵母进行遗传改良已成为啤酒企业紧迫而重大的战略性课题。目前虽然已有不少关于啤酒酵母基因工程菌的报道, 但由于菌株的生物安全性不能保证, 而无法应用到工业生产上。自克隆技术由于在 DNA 操作过程中没有外源基因介入, 因此所构建的啤酒酵母工程菌为生物安全菌株, 具有重要的实际应用价值。

1 自身克隆技术

根据目的基因的来源和所构建酵母工程菌是否含有外源 DNA 片段, 可以将工业酵母菌的遗传修饰分为非自身克隆和自身克隆^[1,2]两种技术。

通过自身克隆技术构建的酵母工程菌中, 不但目的基因来源于酵母菌本身, 而且不引入任何其他的外源 DNA 片段, 所以这种酵母工程菌更容易被企业接受和应用到生产实践中。自克隆技术主要包括以下 3 种技术: (1) 一步基因中断法是用一个标记基因替换一个不需要的酵母基因, 通过标记基因两端附加的同源 DNA 序列和染色体 DNA 之间的同源重组, 用标记基因替换不需要的基因。(2) 采用共转化和一步基因替代法将需要的酵母基因整合到染色体上。酵母基因与带有抗药性标记基因的复制型质粒一起共转化, 当需要的目的基因插入到染色体上后, 在选择培养基上筛选已丢失质粒的

* 通讯作者 Tel: 86-010-62637679, E-mail: zhangbr@sun.im.ac.cn

收稿日期: 2006-01-20, 修回日期: 2006-04-10

转化子^[3]。一步基因替代法是将一个需要的基因与一个酵母标记基因一起直接插入。(3) 通过酵母基因替换进行自身克隆。Inokoshi 等人^[4]利用 *GALp-GIN11* 反选择标记, 通过两步替换技术构建了一株自克隆工业酵母菌。由于抗浅蓝菌素突变株在清酒发酵过程中产生一种风味物质(己酸乙酯), 因此已用于清酒酿造业。与这种风味物质形成相关的基因是编码脂肪酸合成酶的基因 *FAS2*, 在抗浅蓝菌素突变株中, 该脂肪酸合成酶的第 1250 个氨基酸(Gly)突变成 Ser(*FAS2-1250S*)。许多含有 *FAS2-1250S* 的面包酵母突变株得到了商业上的应用。从抗浅蓝菌素突变株克隆到 *FAS2-1250S* 的突变基因, 将其插入到含有 *AUR1-C* 转化标记和 *GALp-GIN11* 反选择标记的双功能载体中, 然后将获得的质粒整合到清酒酵母染色体的 *FAS2* 位点, 在以半乳糖为唯一碳源的培养基上筛选已发生了基因替换的转化子。鉴于反选择得到的菌落可能是突变株也可能是野生型 *FAS2*, 必须再从能在以半乳糖为唯一碳源的培养基上生长的转化子中筛选出含有 *FAS2* 突变基因的转化子, 并确定其是否丢失了全部质粒 DNA 序列。两步基因替换技术可以获得不同优良特性的酵母工程菌。

2 自克隆技术在工业啤酒酵母改良中的研究概况

2.1 自克隆技术降低啤酒发酵过程中双乙酰含量

双乙酰是成品啤酒的主要异味物质, 其含量是感官品评啤酒是否成熟的主要依据。双乙酰是由酵母菌异亮氨酸-缬氨酸生物合成途径中的中间产物 α -乙酰乳酸渗透到胞外经非酶促氧化脱羧反应生成的。一般在啤酒发酵后期还原双乙酰需要约 8~10d 的时间, 因而双乙酰的形成与消除是啤酒风味成熟的重要限速步骤。啤酒发酵过程中双乙酰含量取决于下面 3 个因素: 乙酰羟酸类的形成; 乙酰羟酸类形成连二酮(即戊二酮与双乙酰); 双乙酰的消除。因此通过发酵工艺的改善和基因工程等方法均能降低双乙酰的含量, 如: 减少双乙酰前体物 α -乙酰乳酸的生成量; 加快双乙酰的还原; 添加抗氧化剂; 发酵前添加 α -乙酰乳酸脱羧酶等。

随着对酵母菌双乙酰形成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。缬氨酸生物合成途径各种酶由 *ILV* 基因编码, 其中 *ILV2*、*ILV3*、*ILV5* 等基因与双乙酰含量水平密切相关。 α -乙酰乳酸合成酶(AHAS)是 *ILV2* 基因的产物。*ILV2* 基因在卡尔型酵母体内有两个不同的等位基因, 一个与 *Saccharomyces cerevisiae* 同源, 另一个与 *Saccharomyces calbergensis* 同源。Gjermansen 等人^[5]不仅将与 *S. cerevisiae* 同源的 *ILV2* 基因造成一段缺失而且通过整合质粒将 *ILV5* 基因插入其中, 获得了 α -乙酰乳酸生成量很低、双乙酰产量很少的啤酒酵母菌株。Villa 等人^[6]及 Villanueva 等人^[7]用携带 *ILV5* 基因的质粒转化啤酒酵母, 所获得的酵母工程菌的双乙酰生成量比对照菌降低约 70%; 单独转化 *ILV3* 的酵母, 双乙酰浓度降低约 40%^[5]; 当 *ILV3* 和 *ILV5* 同时在酵母细胞中高表达时, 双乙酰的生成量降低约 60%。李艳等人^[8]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, 所得转化菌的双乙酰含量比原始菌株降低约 30%。上述研究报道中, 虽然转化菌中双乙酰的生成量都有一定程度的降低, 但由于遗传操作过程是依赖于酵母菌质粒完成的, 而酵母菌质粒一般是由大肠杆菌穿梭质粒衍生而来, 因此获得的遗传修饰的工业酵母菌细胞中外源大肠杆菌 DNA 序列和细菌抗药性标记基因的敲除是这些酵母菌商业化应用之前必需解决的

问题。

Mithieux 等人^[3]通过共转化方法将多拷贝 *ILV5* 基因片段串联整合至啤酒酵母染色体上, 获得了双乙酰含量降低约 60%、遗传稳定的工业酵母菌株, 由于最后获得的工程菌中没有抗性标记和细菌基因, 只增加了酵母本身 *ILV5* 基因的拷贝数, 这种利用酵母本身 DNA 对啤酒酵母的遗传修饰, 实现了真正意义上的自克隆。刘增然等^[9]将两侧具有 *ILV2* 同源序列、内部嵌合有 α -淀粉酶基因的 DNA 片段整合至工业啤酒酵母菌 J1 染色体的 *ILV2* 基因簇上, 所构建重组菌不含细菌载体序列和酵母抗药性选择标记, 其发酵液中双乙酰含量比对照菌降低 60%, 该工程菌的遗传稳定性为 100%, 可以比较安全地用于啤酒生产。张吉娜等人^[10]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, 获得的酵母工程菌的 α -乙酰乳酸合成酶活力明显降低, 双乙酰含量比原始菌株降低约 25%, 由于整个遗传操作过程中涉及的铜抗性标记基因 *CUP1* 和 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶基因 *GSH1* 均来自于啤酒酵母本身, 没有任何外源基因的参与, 因此所构建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。

2.2 自克隆技术提高啤酒发酵过程中谷胱甘肽含量 风味稳定性是啤酒的重要质量指标之一, 啤酒包装后在运输和储存过程中会产生一些令人不愉快的不新鲜味, 即老化味。引起啤酒老化的因素很多, 主要是由于氧化作用产生了一些反式二烯醛类化合物。啤酒行业工作者通过对啤酒的酿造和分装工艺的研究, 采取了各种技术和装置以减少啤酒氧化的可能性, 但是要从根本上解决啤酒氧化问题则需要利用基因工程手段尤其是自克隆技术构建抗老化的啤酒酵母。目前, 采用分子生物学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某些特定的抗氧化剂, 包括还原型谷胱甘肽 (GSH) 和二氧化硫等, 从而在啤酒运输、储藏过程中作用于残留在啤酒中的溶解氧, 以防止老化前体物质的转化。由于二氧化硫含量不宜太高, 含量过高对人体和口感均不利, 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; 而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。

谷胱甘肽是由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸经肽键缩合而成的活性三肽。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, 达到延长啤酒保鲜期的作用。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。酵母细胞虽然含有谷胱甘肽, 但其 *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, 提高酵母细胞合成谷胱甘肽的能力, 不但可以增强啤酒的抗老化能力, 还可以提升啤酒的保健功效, 具有重要的理论意义和应用前景。

近几年我国学者已开始了高产谷胱甘肽的抗老化啤酒酵母菌株的选育, 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%^[11]；在此研究基础上，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，增加 *GSH1* 基因的拷贝数，100L 发酵罐的中试结果表明，所构建酵母工程菌的谷胱甘肽含量提高了 34%，所产啤酒抗老化能力是受体菌所产啤酒的 1.5 倍，同时所酿制啤酒陈化以后，经专家品评，一致认为啤酒风味优于受体菌所酿制啤酒，因此该酵母工程菌具有广阔的应用前景^[10]。

2.3 自克隆技术在构建含有淀粉酶基因的工业啤酒酵母中的应用 啤酒是一种低酒精度的饮料酒，深受公众的喜爱，但是它所含的糊精类低聚糖不能被啤酒酵母发酵利用，是啤酒热能的主要来源。随着人们生活水平的提高及饮食结构的改变，低热量食品的需求量日益加大。降低啤酒中糊精类低聚糖含量、生产低热能啤酒一直是我国啤酒行业试图实现的目标。尽管目前国内已有采用添加酶制剂和调整生产工艺来生产低热能啤酒的工艺，但是如果采用能直接利用淀粉的啤酒酵母工程菌生产啤酒，将会大大降低啤酒生产成本。 α -淀粉酶已广泛用于食品、饮料工业，它存在于许多动植物和微生物中。刘增然等^[9]将从扣囊复膜孢酵母克隆的 α -淀粉酶基因 *AMY* 嵌合到乙酰乳酸合成酶基因 *ILV2* 基因内部，并采用这种嵌合基因片断转化工业啤酒酵母菌 J1，所构建重组菌淀粉酶活性达 4.8U/mL，可以有效利用淀粉这一廉价碳源，有很大的应用价值。将该重组菌用于工业发酵或酿造生产，生产原料不需外加酶预处理，将使产品的生产成本降低。考虑到空间、时间、发酵效率及其在非选择条件下的稳定表达，工程菌适于工业啤酒生产。

3 自克隆技术在工业啤酒酵母改良中的应用前景

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，由于自克隆技术主要是通过自身遗传物质的重组来强化酿酒酵母的优良发酵性能或弱化其不良发酵性能，在工程菌构建过程中，没有外源基因参与，因此这种工程菌更容易被消费者接受。相信不久的将来，具有更加优良酿造特性的自克隆啤酒酵母工程菌将会不断涌现，自克隆技术在啤酒酵母育种中的应用必将给啤酒生产业带来更大的经济效益。

参考文献

- [1] Akada R. *J Biosci Bioeng*, 2002, **94**: 536~544.
- [2] Hirokawa I, Aritomi K, Hoshida H, *et al.* *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, **65**: 68~73.
- [3] Mithieux S M, Weiss A S. *Yeast*, 1995, **11**: 311~316.
- [4] Inokoshi J, Tomoda H, Hashimoto H, *et al.* *Mol Gen Genet*, 1994, **244** (1): 90~96.
- [5] Gjermansen C, Nilsson-Tillgren T, Petersen J G, *et al.* *J Basic Microbiol*, 1988, **28** (3): 175~183.
- [6] Villa K D, Lee S. *J Am Soc Brew Chem*, 1995, **53** (2): 49~53.
- [7] Villanueva K D, Goossens E, Masschelein C A. *J Am Soc Brew Chem*, 1990, **48** (3): 111~114.
- [8] 李艳, 铁翠娟, 王正祥, 等. *酿酒*, 2002, **29** (6): 77~79.
- [9] 刘增然, 何秀萍, 龙章富, 等. *高技术通讯*, 2004, **24** (7): 20~24.
- [10] 张吉娜, 何秀萍, 郭雪娜, 等. *生物工程学报*, 2005, **21** (6): 942~946.
- [11] Fan X Y, He X P, Guo X N, *et al.* *Biotechnol Lett*, 2004, **26**: 415~417.