

转基因技术在改良酿酒酵母中的应用

魏 阔¹, 宋 长 征², 王 国 栋¹

(1. 西北农林科技大学 理学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 西北农林科技大学 葡萄酒学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要:在简要介绍酿酒酵母的改良方法基础上,综述了转基因技术在改良酿酒酵母中在提高发酵性能、改善葡萄酒感官特性、改善葡萄酒功能成分方面的应用,论述了转基因技术目前在酿酒工业中的进展情况,并对未来的发展进行了展望。

关键词:转基因技术;酿酒酵母;应用

中图分类号:Q 785; S 663.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)19-0203-04

随着葡萄酒生产和消费之间差距的加大,消费者从基础消费品到优质葡萄酒需求偏好的转变以及经济全球化的影响,使得葡萄酒生产者面临的竞争日益激烈。因此急需在葡萄酿造世界进行一场彻底的革命,由简单生产型向市场导向型的转变过程导致葡萄酿造产业越来越依赖生物技术的革新^[1]。随着转基因技术的发展,酿酒酵母在酿酒工业上的重要性日益凸显,葡萄酿造工业对于转基因酿酒酵母菌株的需求也不断增加^[2]。近年来,研究者得到了许多专门的具有广泛利用价值或专门酿酒特性,并且可以满足现代酿酒实践所需特性的酿酒酵母菌株。

1 酿酒酵母的改良方法

酿酒酵母的改良主要有以下4种途径:一是利用调查评估筛选。为了改善葡萄酒特性或者使生产流程中的特定环节变得更加便利,就需要寻找新型酵母菌株。多年来,对已有葡萄栽培区进行广泛的生物地理学调查和评估是对菌株选择和改良的出发点。传统的方法都是依赖于从葡萄或葡萄酒样品中分离筛选出新酵母,且是目前市场上绝大多数酿酒酵母菌株的来源^[3]。这些菌株大多数已被按照特定发酵条件、葡萄酒风格、葡萄

品种以及其它要求罗列在商业手册目录中。尽管为保持或改善葡萄酒品质而寻找新菌株在世界各地仍在继续,但除非引进新的选择标准,否则这种选择策略必然受到所选择特性的限制。而且天然的具有理想的混合型酿酒特性的酵母也是不大可能存在的。二是杂交和准性杂交。酿酒酵母很难进行有性杂交,它有两点限制因素:缺少标记基因;工业酵母的基因组结构^[4]限制孢子的形成效率和生存能力^[5]。尽管存在通过菌株孢子杂交分离出芽孢衍生物,并进行基因改良的成功案例^[6],但是一些研究者发现这些芽孢衍生物会造成母本菌株相关特性的丢失^[5]。准性杂交即种内或种间原生质体融合(基因组重排)。准性杂交中亟待解决的首要问题是缺乏标记基因。已有研究者通过寻找自然突变或诱导突变的抗药菌株来试图解决这一问题^[7],但是直到目前仍无显著进展,用于改良酿酒酵母的案例也很少。三是随机突变。用化学或者物理因素诱导产生随机突变是对工业微生物进行基因改良最简单的方法。这种方法已经广泛地应用于生产抗生素和酶制剂的微生物中。然而,酿酒酵母的染色体结构^[4]限制了随机突变的有效性,因为大多数基因在酵母体内都会出现2个或更多拷贝数,这使得选择隐性突变非常困难。将随机突变技术应用于酿酒酵母改良的案例也很少。已知的典型案例有起泡葡萄酒酵母菌株在二次发酵中自溶性的改良^[8-9]以及氮同化与发酵动力学的改良^[10]。四是转基因技术。酵母基因组的公布^[11]和转基因技术的发展

第一作者简介:魏阔(1988-),男,硕士研究生,研究方向为生物物理。E-mail:weikuo0506@gmail.com.

责任作者:王国栋(1957-),男,博士,教授,博士生导师,研究方向为生物物理。E-mail:wanggd211@163.com.

收稿日期:2014-05-27

breeding technology and pest control of jasmine, the most study focused on application value, but lack of theoretical depth and molecular biology research. In addition, the study of selective breeding has not been reported. In accordance with the serious problems of single variety, lower output, quality deteriorating, diseases and insect pests in jasmine industry, it was suggested to strengthen the research with jasmine breeding, and integrating with the technologies of *in-vitro* culture seedlings micro-propagation and a commercialize large-scale organic cultivation.

Keywords: *Jasminum sambac*; research status; efficient breeding; cultivation techniques

使得构建特殊的商业菌株成为可能。主要的方法是通过外源基因的表达或者调整基因表达剂量(过表达或者删除)。一般而言,所有被应用于构建食品发酵微生物的基因材料都应是来自于自克隆体或具有食品使用历史的GRAS(Generally Regarded As Safe)生物体,同时应避免使用分类学上与病原生物亲近的物种的DNA序列。大部分情况下采用的是外源基因的表达,其它情况是采用来自酿酒酵母的基因比如 $ATF1$ 、 $GPD1$ 或 $PGU1$ ^[2]。转基因技术的优势在于它在改造微生物过程中高度的控制水平,几乎任何生物的基因都可以整合到酵母基因组中。

然而2001年在对16 000名欧洲人的调查中显示,几乎所有(95%)回答者表示因为消极的态度而没有选择过消费转基因食品,60%的人表示转基因生物对环境有潜在的负面影响。消费者对转基因技术的担忧包括食品营养质量的改变、潜在的毒性、可能的抗生素抗性、转基因食品潜在的应变原性(致敏性)及致癌性、环境污染、无意识的基因转移、创造新病毒和毒素的可能性、宗教文化和道德上的担忧以及对未知的恐惧^[3]。

法规条例明确界定转基因生物及其标记产品的构建和安全评价,这是辅助消费者做出知情选择的关键步骤。因此需要在顺应现有立法要求下构建菌株,在转基因酵母释放后对周围环境进行危害性评估,对当前的重组DNA和蛋白质的检测方法进行评估,以及调查公众对转基因酵母菌株批评性看法的原因。转基因酵母的构建必须建立在自克隆的基础上。在此背景下,酿酒条件下具有满意酿酒特性的特殊菌株可以被用作构建转基因酵母的基因库,从而赋予探究菌株多样性一个新的维度^[3]。

2 转基因技术在改良酿酒酵母中的应用

考虑到法律和商业上的限制,一些研究机构已经开始致力于发展基因改良工程,满足现在和未来的GMO(Genetically Modified Organism)条例,并且让消费者更容易接受。该研究主要专注于2个目标:一是减少将非酵母DNA整合到改良菌株中,并避免使用具有抗生素抗性的基因作标记;二是将目的基因整合到酵母基因组中而不使用能自我复制的质粒载体,进而获得具有遗传稳定性的转化菌株。这项策略是Puig等^[12]在1998年提出,通过基因工程人工破坏 $URA3$ 基因以构建营养缺陷型菌株,之前在对酵母基因组进行大规模功能分析中这一方法曾被使用过^[13]。

在这一策略中,通过引入与启动子和终止子同源的序列,可以将中断盒导入到指定位点,然后通过同源重组除去标记基因。直到所有来自细菌的抗性基因或者其它序列都完全被消除,菌株即可以使用 $URA3$ 进行选择。这种方法的主要限制是每次构建新的工业菌株时,以上整个过程都要被重复^[3]。

现在,世界上许多实验室都已经得到改良的菌株,例如改善加工效率、酿酒特性和葡萄酒感官品质的菌株,它们在酿酒条件下的特性也得到了广泛的评估^[2]。转基因技术在改良酿酒酵母中的应用可以概述为以下3个方面。

2.1 提高发酵性能

提高发酵性能的主要目标在于增强活性干酵母的恢复力和抗压性,提高其对营养的摄取和同化能力,增强其对乙醇、蛋白质、肽等抑制性代谢产物的抵抗性,对亚硫酸盐等抗菌化合物的抗性,以及对其它环境应力因素的耐受性^[14]。

在生产活性干酵母的过程中,干燥过程会给酵母带来冷冻和渗透压力^[15]。一些蛋白(如水孔蛋白)和代谢物(如甾醇、海藻糖、糖原)能够增强酵母对物理或化学压力的耐受性,因此很有必要提高酵母积累这些化合物的能力。Pérez-Torrado等^[16]报道,过量表达糖原合酶基因($GSY1$ 与 $GSY2$)能够增强酿酒酵母在葡萄糖含量有限条件下的生存能力。此外,Tanghe等^[17]报道,酿酒酵母水通道蛋白基因($AQY1$ 与 $AQY2$)过量表达也能赋予菌株抗冻性。此外,脯氨酸等带电的氨基酸也能增强酿酒酵母对冷冻和干燥的耐受性。相关研究表明,敲除脯氨酸氧化酶基因($PUT1$)、脯氨酸合酶基因发生显性突变、或者敲除精氨酸合酶基因($CAR1$)都会增强菌株对冷冻、干燥和高渗透压的抵抗力^[18]。

在发酵条件下,酵母用来抵抗高渗透压的物质是甘油。在高渗透压条件下活化蛋白激酶MAPK,通过级联放大可以引起甘油合成中2个关键基因 $GPD1$ 和 $GPD2$ 的表达,从而引起快速合成超过常量50倍的甘油^[19]。另外,Lopes等^[20]报道 $GPD1$ 和 $GPD2$ 基因过表达的商业酵母在发酵前期具有生长优势。

在酿酒发酵中,引起发酵缓慢或停滞的主要原因是乙醇浓度过高,导致细胞膜流动性和渗透性增大,从而危害糖和氨基酸的运输。通过改良酿酒酵母中 $SUT1$ 、 $SUT2$ 、 $PMA1$ 和 $PMA2$ 基因可以积累固醇,导致ATP酶活性增强,进而使得酿酒酵母对乙醇的耐受性增强^[15]。另外也有报道称酿酒酵母 $ERG1$ 和 $ERG11$ 基因的结合表达也能导致固醇的积累^[21]。

营养成分的利用率低是影响酿酒酵母发酵性能的另一因素,而氮元素利用率低是最常见的限制发酵的因素。这种缺陷不仅会导致发酵的终止,而且也会产生一些不良的气味,比如硫化氢。解决的方法之一是修饰脯氨酸透性酶基因、脯氨酸氧化酶基因($PUT1$ 与 $PUT2$),增强用脯氨酸和精氨酸作为氮源的有效性^[22]。氮素的另一来源是酵母自身的溶解,因此可以通过调整酵母的代谢途径使得一部分处于发酵后期的酵母细胞自溶来解决这一问题^[23]。

2.2 改善葡萄酒感官特性

葡萄酒酿造最重要的指标是终产品的感官品质(外

观、香气和口感)。酿酒酵母承担葡萄醪向葡萄酒的转变,改善其颜色、口感和香味。主要过程包括促进化合物从固相葡萄醪中浸出,转化葡萄中的物质用以生产酵母代谢物^[24]。葡萄中的许多芳香化合物是以糖苷配基形式(单萜烯、萜烯、芳香族化合物等)存在的。研究表明酿酒酵母中的 β -糖苷酶基因(*BGL1*)过表达能够通过释放糖配体而影响葡萄酒的香气属性^[15]。

第一例用于改善葡萄酒品质的酵母是由 Pérez-González 等^[25]在 1993 年构建的,重组酵母表达了一个来自长枝木霉的内切葡聚糖酶基因,从而改善了单品种白葡萄酒的香气。Herrero 等^[26]通过克隆来自仙女扇的芳樟醇合成酶基因(*LIS*),在酿酒酵母中构建了单萜烯合成途径,从而合成了高于嗅觉阈值的游离态芳樟醇。

高浓度的酒精也会影响葡萄酒的感官特性,使之具有过度的热感,并掩盖葡萄酒的香气和风味。de Barros Lopes 等^[14]通过在酵母中过表达 *GPD1* 和 *GPD2* 实现了将部分糖转化成甘油而非乙醇。

另一些研究者通过转基因技术开发出能够同时进行酒精发酵和苹果酸乳酸发酵的酿酒酵母。他们通过将来自粟酒裂殖酵母的苹果酸盐透性酶基因(*mae1*)和苹果酸酶基因(*mae2*)在酿酒酵母中共表达而构建了苹果酸-乙醇酿酒酵母;同样,为了在酿酒酵母中设计出苹果酸乳酸发酵途径,研究者将乳酸菌的苹果酸乳酸基因(*mleS*)和裂殖酵母的苹果酸透性酶基因(*mae1*)在酿酒酵母中进行了共表达^[15]。刘延琳^[27]通过构建苹果酸-乳酸酶基因(*mleA*)和苹果酸通透酶基因(*mleP*)重组表达质粒,实现了 2 个基因在酿酒酵母中的共表达。苹果酸乳酸发酵要求的条件是低 pH 值和低温,而苹果酸乳酸工程酵母能够解决在高 pH 值高温条件下难以进行苹果酸乳酸发酵的问题。在发酵过程中,苹乳酵母可以在 3 d 内降低葡萄醪中的苹果酸并且不产生异常风味^[28]。

2.3 改善葡萄酒功能成分

白藜芦醇是在少数植物中合成的天然多酚类物质,在葡萄皮中含量较多,而在果肉中含量很少,因此红葡萄酒中含有白藜芦醇,而白葡萄酒中几乎没有。白藜芦醇还具有许多医疗保健作用,如抗氧化、抗肿瘤、抗血小板凝聚、抗细菌和真菌、防止人体低密度脂蛋白氧化等。因此,已成为科学家们高度重视的天然活性成分。

白藜芦醇合成途径中,4-肉桂酸羟化酶(C4H)催化 4-肉桂酸生成 4-香豆酸,在香豆酰辅酶 A 连接酶(4CL)和白藜芦醇合酶(STS)作用下生成白藜芦醇。基于这种认识,许多研究者通过不同方法构建了白藜芦醇合成途径。

有研究表明,红细菌属的 *TAL* 基因可以直接催化 L-酪氨酸生成 4-香豆酸,但是细菌与酵母菌遗传密码子的差异会限制该蛋白在酵母中的表达。另有试验表明树胶醛糖运输蛋白(*araE*)能对白藜芦醇高水平积累起到重要作用^[29]。最近的研究表明,通过构建含有 *araE*

基因、突变的 *TAL* 基因、4CL 基因和 STS 基因的表达载体,使得工程酵母在酿酒条件下合成高含量的白藜芦醇,并且所生产的白葡萄酒中白藜芦醇含量高于大多数市面上的红葡萄酒^[29]。

3 转基因技术在酿酒工业的应用进展

转基因技术在食品中的应用在欧洲、美国以及大多数其他国家都被严格管制。除了一般规定,新的酿酒实践还必须被国际葡萄与葡萄酒组织 OIV 所接受;另外为了“特殊产区”的葡萄酒销售,还要通过当局的认可,此外还要考虑消费者的选择参数^[3]。

与其它包装食品相比,向葡萄酒中添加额外的非葡萄酒中自然存在的物质是非常少的。大多数葡萄酒生产国的相关法律都明确规定任何未被列入允许添加剂清单的物质都是禁止使用的,尽管有些是无害的或是确实有益的。除了这些限制外,许多葡萄酒厂还受传统文化和地域文化的约束。葡萄酒的形象是用历史悠久的酿造工艺生产的、并带有浪漫精神的天然饮品,基于这一点,尤其不能接受任何与葡萄酒的形象冲突的改变^[16]。

转基因酵母的构建始于 20 世纪 90 年代早期,但必须阐明的是,尽管就目前的知识水平,对转基因酵母的潜在效益有乐观的期望,但是目前仅有 1 例重组酿酒酵母被批准应用于酿造葡萄酒^[3]。

1988 年,Gist-Brocade 得到了用其它菌株的系列基因代替麦芽糖透性酶和麦芽糖酶基因的转基因酵母,由于没有非酵母属酵母 DNA 的存在,得到了英国当局的认可。1993 年,1 株由国际酿酒研究机构构建的带有来自 *S. diastaticus* 酵母的淀粉酶基因和铜离子抗性基因的重组酵母也同样得到了批准。但是由于酿酒行业不愿意面对消费者的消极反应,没有 1 例菌株被应用到商业生产中^[4]。因此,此后就没有转基因酵母再被提交申请应用于工业生产。

4 展望

在科学技术与生活水平快速发展的今天,相信生物技术具有潜在的效益是毋容置疑的。只是现实中有太多的错综复杂的科学的、技术的、经济的、市场的、安全的、法律的、社会的、道德的因素需要考虑。转基因技术作为一项新兴的科学技术,期待会带来巨大的利用价值,服务生活,造福社会;但是在真正可以推广转基因产品之前,必须保持客观的态度,因为短期的利益而不切实际地期望转基因酵母菌株的商业化是荒谬的,而忽视转基因酿酒酵母对葡萄酒产业的巨大潜在效益也同样是不明智的。转基因技术应用于改良酵母的科学实践还需要广大科学工作者更多冷静客观的探索。

参考文献

- [1] Pretorius I S, Bauer F F. Meeting the consumer challenge through genetically customized wine-yeast strains[J]. Trends in Biotechnology, 2002, 20:

426-432.

[2] Schuller D, Casal M. The use of genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* strains in the wine industry[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 68:292-304.

[3] Cebollero E, Gonzalez-Ramos D, Tabera L, et al. Transgenic wine yeast technology comes of age: is it time for transgenic wine? [J]. Biotechnology Letters, 2007, 29:191-200.

[4] Dunn B, Levine R P, Sherlock G. Microarray karyotyping of commercial wine yeast strains reveals shared, as well as unique, genomic signatures[J]. BMC Genomics, 2005(6):53.

[5] Gimeno-Alcañiz J V, Matallana E. Performance of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation is affected by manipulation strategies based on sporulation[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2001, 24:639-44.

[6] Ramírez M, Regodón J A, Pérez F, et al. Wine yeast fermentation vigor may be improved by elimination of recessive growth-retarding alleles[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1999, 65:212-218.

[7] Ramirez M, Perez F, Regodon J A. A simple and reliable method for hybridization of homothallic wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64:5039.

[8] Gonzalez R, Martinez-Rodriguez A, Carrascosa A V. Yeast autolytic mutants potentially useful for sparkling wine production[J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 84:21-26.

[9] Martinez-Rodriguez A J, Gonzalez R, Carrascosa A V. Morphological changes in autolytic wine yeast during aging in two model systems[J]. Journal of Food Science, 2004, 69:233-239.

[10] Salmon J M, Barre P. Improvement of nitrogen assimilation and fermentation kinetics under enological conditions by derepression of alternative nitrogen-assimilatory pathways in an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64:3831-3837.

[11] Goffeau A, Barrell B, Bussey H, et al. Life with 6 000 genes[J]. Science, 1996, 274:546.

[12] Puig S, Ramon D, Perez-Ortin J E. Optimized method to obtain stable food-safe recombinant wine yeast strains[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46:1689-1693.

[13] Wach A, Brachat A, Pöhlmann R, et al. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Yeast, 1994, 10:1793-1808.

[14] de Barros Lopes M, Bartowsky E J, Pretorius I S. The application of gene technology in the wine industry[M]. New York: CRC Taylor and Francis, 2006; (40-1)-(40-21).

[15] Pretorius I S, Hoj P B. Grape and wine biotechnology: Challenges, opportunities and potential benefits[J]. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2005, 11:83-108.

[16] Pérez-Torrado R, Gimeno-Alcañiz J V, Matallana E. Wine yeast strains engineered for glycogen overproduction display enhanced viability under glucose deprivation conditions[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68:3339-3344.

[17] Tanghe A, van Dijck P, Dumortier F, et al. Aquaporin expression correlates with freeze tolerance in baker's yeast, and overexpression improves freeze tolerance in industrial strains[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68:5981-5989.

[18] Shima J, Hino A, Yamada-Iyo C, et al. Stress tolerance in doughs of *Saccharomyces cerevisiae* trehalase mutants derived from commercial baker's yeast[J], Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65:2841-2846.

[19] Rep M, Krantz M, Thevelein J M, et al. The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock[J]. Journal of Biological Chemistry, 2000, 275:8290-8300.

[20] Lopes M B, Gockowiak H, Heinrich A J, et al. Fermentation properties of a wine yeast over-expressing the *Saccharomyces cerevisiae* glycerol 3-phosphate dehydrogenase gene (GPD2)[J]. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2000, 6:208-215.

[21] Veen M, Stahl U, Lang C. Combined overexpression of genes of the ergosterol biosynthetic pathway leads to accumulation of sterols in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Fems Yeast Research, 2003, 4:87-95.

[22] Poole K. Enhancing yeast performance under oenological conditions by enabling proline utilisation[D]. Australia: The University of Adelaide, 2002.

[23] Lagorce A, Hauser N C, Labourdette D, et al. Genome-wide analysis of the response to cell wall mutations in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278:20345-20357.

[24] Lambrechts M, Pretorius I. Yeast and its importance to wine aroma-a review[J]. South African Journal of Enology and Viticulture, 2000, 21: 97-129.

[25] Pérez-González J A, González R, Querol A, et al. Construction of a recombinant wine yeast strain expressing beta-(1,4)-endoglucanase and its use in microvinification processes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59:2801.

[26] Herrero O, Ramon D, Orejas M. Engineering the *Saccharomyces cerevisiae* isoprenoid pathway for de novo production of aromatic monoterpenes in wine[J]. Metabolic Engineering, 2008, 10:78-86.

[27] 刘延琳. 酒球菌 *mleA* 和 *mleP* 基因的克隆及其在酿酒酵母中的转化与表达[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2004.

[28] Dequin S, Baptista E, Barre P. Acidification of grape musts by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains genetically engineered to produce lactic acid[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 1999, 50:45-50.

[29] Wang Y, Halls C, Zhang J, et al. Stepwise increase of resveratrol biosynthesis in yeast *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering[J]. Metabolic Engineering, 2011, 13:455-463.

The Application of Transgenic Technology in Modifying *Saccharomyces cerevisiae*

WEI Kuo¹, SONG Chang-zheng², WANG Guo-dong¹

(1. College of Science, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100; 2. College of Enology, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract: Based on brief introduction of modifying methods of *Saccharomyces cerevisiae*, the application of transgenic technology in modifying *Saccharomyces cerevisiae*, such as enhancing fermenting property, improving sensory characteristic functional component of wine were summarized. Current progress of transgenic technology in the wine industry and the future development were also discussed.

Keywords: transgenic technology; *Saccharomyces cerevisiae*; application