

利用淀粉的啤酒酵母工程菌研究进展

刘增然^{1,2} 何秀萍¹ 张博润¹ 刘世贵²¹(中科院微生物研究所,北京,100080) ²(四川大学生命科学院,成都,610041)

摘 要 简要概述了利用淀粉的啤酒酵母工程菌的构建、外源淀粉酶基因在工程菌中的遗传稳定性及其表达和分泌淀粉水解酶问题的研究现状,分析了目前存在的问题,提出了今后的研究方向,并展望了其应用前景。

关键词 淀粉酶基因 糖化酶基因 克隆和表达 啤酒酵母工程菌

啤酒是一种低酒精度的饮料酒,深受公众的喜爱。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,肥胖人逐渐增多,糖尿病患者急剧增加,低热量食品的需求量日益加大。低热能啤酒有很大的市场空间。在美国低热能啤酒市场占有率为 13%。我国人口众多,低热能啤酒有更广阔的市场潜力。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,但是有关直接利用淀粉的啤酒酵母工程菌来降低啤酒热能的研究不多。

1 利用淀粉的啤酒酵母工程菌的构建

酵母对碳源的利用主要受 2 个因素的限制:一个是其乙醇耐受力,另一个是自身酶系。鉴于啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)生长快、发酵度高、乙醇耐受力较强。几个世纪以来,一直被用于食品发酵生产,但其不能发酵利用淀粉。淀粉价格低廉,是一种很有潜力的生物资源,发酵行业一直借助淀粉酶来分解利用淀粉。不过外加酶可能对啤酒风味等产生不利影响。与啤酒酵母有很近亲源关系的糖化酵母(*Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus*)可产生糖化酶利用淀粉和糊精,

但同时也赋予啤酒浓重的酚醛味,不适于啤酒生产。结林卡油脂酵母(*Lipomyces kononenkoae*)可以产生 α -淀粉酶、糖化酶、异淀粉酶等淀粉水解酶,是有效的水解生淀粉的酵母,但其生长缓慢,乙醇耐受力低,同样不适于啤酒生产^[1]。为了解决这些问题,将分泌淀粉酶的微生物与啤酒酵母一起发酵生淀粉,淀粉转化乙醇效率比单菌发酵或用酶预处理发酵效率高,只是一部分淀粉被微生物生长所消耗,使乙醇产量下降。所以对啤酒酵母进行遗传改造使其直接利用生淀粉是解决这些问题的最佳方案。

可采用属间原生质体融合和基因重组等育种技术构建利用淀粉的啤酒酵母工程菌。糖化酵母与啤酒酵母的原生质体融合的融合子具有啤酒酵母的生长代谢优势,可以水解 α -1,4 糖苷键,利用 25% ~ 30% 的麦芽糊精^[2]。但融合子在获得淀粉酶基因的同时也带入不利于啤酒生产的 *Pof1* 基因。用基因重组技术构建能利用淀粉的啤酒酵母工程菌是最有效的方法。近几年,用不同来源的 α -淀粉酶基因构建啤酒酵母工程菌的研究不少^[3]。其中包括来自小麦、小鼠唾液腺和胰脏、人的唾液腺等动植物组织的 α -淀粉酶基因;来自原核生物的解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)和淀粉脱枝假单胞菌(*Pseudomonas amyloderamosa*)的 α -淀粉酶基因;来

自低等真核生物西方许旺酵母(*Schwan-niomyces occidentalis*)的 α -淀粉酶基因及不同曲霉的淀粉酶基因。同时用来自泡盛曲霉(*Aspergillus awamori*)扣囊复膜孢酵母(*Saccharomycopsis fibuligera*)及糖化酵母的糖化酶基因构建啤酒酵母工程菌也有研究。各种来源的淀粉酶基因在啤酒酵母工程菌中表达效率不尽相同。Ryoich^[4]曾对11种不同来源的淀粉酶基因所编码的 α -淀粉酶的氨基酸序列进行比较,发现不同来源的淀粉酶同源程度不同,酶活性有差异,但各种淀粉酶的氨基酸序列都有4个同源区。

在啤酒发酵生产中,淀粉酶或糖化酶不能完全水解淀粉,只有二种酶同时作用,淀粉才得以完全糖化。1988年Kim将携带淀粉酶基因的附加体型质粒转入糖化酵母,转化子可以利用93%的淀粉。但因糖化酵母亲株的*Pof1*基因表达产生阿魏酸脱羧酶,使代谢中产生4-乙烯基邻甲氧苯酚,有酚醛异味,不适于啤酒生产^[2]。Andries^[14]及Janse^[5]将糖化酵母的糖化酶基因和解淀粉芽孢杆菌的 α -淀粉酶基因转化啤酒酵母构建工程菌,发现2基因可以融合表达,产生双功能淀粉酶,其水解效率比单酶水解效率高。Shibuya^[6]也通过PCR扩增的方法获得 α -淀粉酶和糖化酶的融合基因,将其转化啤酒酵母,表达的双功能淀粉酶水解淀粉效率比2种酶混合作用效率高。Andries等人在1995年用同一质粒共表达解淀粉芽孢杆菌的 α -淀粉酶基因、糖化酵母的糖化酶基因和肺炎克氏杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)的支链淀粉酶基因,使啤酒酵母可以利用99%的熟淀粉,但不能利用生淀粉。1995年,Moraes^[7]将来自枯草杆菌及小鼠胰腺的 α -淀粉酶基因和泡盛曲霉的糖化酶基因克隆到啤酒酵母中,对淀粉酶基因和糖化酶基因独立表达、同一质粒共表达及融合表达作了对比研究,证明融合表达产物—双功能淀粉酶不仅水解可溶性淀粉,而且水解生淀粉,水解淀粉效率最高。Ma^[8]借助整合质粒和酵母乙醇脱氢酶启动子(*ADH1*),将

泡盛曲霉的糖化酶基因和淀粉脱枝假单孢菌的异淀粉酶基因整合到啤酒酵母染色体上,得到的转化子转化淀粉的效率>95%。由此可见,不同来源的淀粉酶基因和糖化酶基因可融合表达双功能淀粉酶,一步水解淀粉产生葡萄糖,缩短啤酒生产的糖化周期,降低外加淀粉酶的消耗。

为了获得高表达、高安全性并有效利用生淀粉的啤酒酵母工程菌,Andries等人^[14]对同化生淀粉的结林卡油脂酵母 α -淀粉酶编码基因序列及其表达调控进行研究,确证该基因具有其他来源淀粉酶的同源序列,所表达的淀粉酶活性最高。其后又将该基因在啤酒酵母中表达,发现表达产物也可有效水解生淀粉^[1]。Moses^[9]进一步对结林卡油脂酵母 α -淀粉酶基因*LKA1*在工业啤酒酵母中表达进行了研究,发现在不同种的啤酒酵母菌中,*LKA1*基因的表达水平及淀粉发酵程度受酵母宿主遗传背景的影响。

2 异源淀粉酶基因的遗传稳定性及其表达对啤酒酵母的影响

外源淀粉酶基因转化啤酒酵母,可随质粒自主复制表达,也可随酵母染色体一起复制表达。由于酵母表达载体为多拷贝,淀粉酶基因可得到较好表达。早期的啤酒酵母工程菌的构建多是用穿梭载体,但淀粉酶基因的过表达会对酵母发酵性能产生不利影响;啤酒酵母在啤酒发酵的连续传代中产生质粒丢失现象,酵母水解淀粉的特性也随连续发酵而丢失。Bir^[10]对啤酒酵母工程菌中的重组质粒的遗传稳定性研究发现:培养基组成影响酵母所携的重组质粒的稳定性;只要酵母生长介质含葡萄糖,质粒稳定性就高。目前通常将淀粉酶基因插入酵母本身的基因表达盒,用酵母启动子来调控淀粉酶基因表达、提高其遗传稳定性。使外源淀粉酶基因稳定遗传的最有效方法是将其整合到酵母染色体上来构建工程菌。Cha^[10]将糖化酶基因克隆到啤酒酵母,对其以质粒形式自主表达和随

酵母染色体复制表达进行了对比研究,结果证明糖化酶基因整合在酵母染色体上得到稳定表达,表达效率随整合位置不同而有所改变。外源淀粉酶基因的表达对啤酒酵母发酵特性产生一定的影响,其染色体整合表达影响酵母自身的基因转录活性;自主表达则与酵母竞争转录因子和转录酶,对啤酒酵母产生一定的代谢负担,增加其蛋白合成的能耗。

3 啤酒酵母工程菌异源淀粉水解酶的分泌

异源蛋白在啤酒酵母细胞中合成受一系列细胞自身代谢的影响,将外源基因插入表达载体不能确保其高效表达。基因表达和蛋白分泌是一个复杂的体系,包括从基因转录到蛋白分泌的一系列过程。最近几年的研究主要集中在寻找有效方法使表达的淀粉酶穿越细胞膜向培养液分泌。已发现异源淀粉酶蛋白的分泌效率受基因启动子类型、分泌信号的大小及电荷、分泌蛋白、糖基化程度和宿主等的影响。虽然对影响其分泌的因素了解不多,但可以肯定,分泌信号是淀粉酶分泌、糖基化和折叠所不可缺少的因素,在其分泌定位方面也起重要作用。用于啤酒酵母工程菌构建研究的分泌序列有 *SUC2*、*PHO5*、*Killer toxin*、*Mfa1*。*Mfa1* 和 *Killer toxin* 分泌序列引导淀粉酶蛋白分泌至培养介质;*SUC2* 和 *PHO5* 分泌序列引导蛋白分泌至细胞周质。进一步研究证明:来自糖化酵母的 *STA* 信号序列也可以有效地引导蛋白分泌。现已建立几个模型体系,用 *STA* 信号序列引导蛋白分泌。但是信号肽引导淀粉水解酶向胞外分泌的机理仍不十分清楚^[11]。

还有人设法将淀粉水解酶固定在酵母细胞表面来解决外源蛋白分泌问题。Toshiyuki^[12]首次用细胞表面工程方法将米根霉糖化酶编码基因及信号肽与 α -凝集素羧基末端的 1/2 基因融合构建重组质粒转化啤酒酵母,使其在甘油醛-3-磷酸脱氢酶启动子控制下表达。所分泌的糖化酶不向培养介质分泌,

而是固定在细胞表面。Shibasak^[13]进一步研究了这种细胞表面工程菌糖化酶的分泌,发现糖化酶与 α -凝集素形成异源融合蛋白附着在酵母细胞表面。对糖化酶进行间接荧光抗体分析,发现融合蛋白首先是出现在细胞出芽处,然后遍布整个子母细胞。

4 讨论

虽然利用淀粉的啤酒酵母工程菌构建已取得很大进展,但异源淀粉酶基因在工程菌中表达的不稳定问题仍然存在,尤其是啤酒酵母表达载体在连续培养中的丢失问题;异源淀粉酶基因表达对菌体生长代谢、发酵特性、啤酒风味的影响有待进一步深入研究,特别是对啤酒发酵中风味形成及其影响因素的研究(包括生物化学方面和基因表达调控方面)。我国是一个农业大国,高淀粉含量的农作物大量存在。构建能直接发酵淀粉的酵母工程菌用于工业生产,具有广泛的应用前景。

参考文献

- Andries J C S, Julius M, Isak S P. *Yeast*, 1996, 12: 925 ~ 937
- Roy S T T. 1986, April, 98 ~ 104
- Andries J C S, Isak S P. *Gene*, 1991, 100: 85 ~ 93
- Ryoichi N, Tadayuki I, Shuichi A. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1986, 23: 355 ~ 360
- Janse B J H, Pretorius I S. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1995, 42: 878 ~ 883
- Ichiro S, Gakuzo T, Harumasa S. *Biosci Biotech Biochem*, 1992, 56(6): 884 ~ 889
- L M P de Moraes, Astolfi-filho S, Oliver S G. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1995, 43: 1067 ~ 1076
- Ma Yih-Jer. *Appl Biochem*, 2000, 3191: 55 ~ 59
- Gundllapalli Moses S B, Cordero Otero R R, La Grange D C. *Biotechnology Letters*, 2002, 651: 651 ~ 656
- Hyung J C, Hee J C, Suk S C. *Applied Biochemistry, and Biotechnology*, 2002, 87: 81 ~ 93
- Marten M R, Seo J H. *Biotechnol Bioeng*, 1989, 34: 1133 ~ 1139
- Toshiyuki M. *Applied and Environmental Microbiology*

- gy, 1997(4):1362~1366
- 13 Shibasaki Y. FEMS Microbiology Letters, 2000, 192 (2):243~248
- 14 Andries J C Steyn, Julius M, Isak S. Pretorius Gene, 1995, 166:65~71

The Research Progress on Engineered Strains of *Saccharomyces cerevisiae* for Efficient Starch Utilization

Liu Zengran^{1,2} He Xiuping¹ Zhang Borun¹ Liu Shigui²

(¹ Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing, 100080)

(² Life Science Institute, Sichuan University, Chengdu 610041)

ABSTRACT In the article, the research progress on the construction of starch-utilising engineered strains of *Saccharomyces cerevisiae* and the related properties were summarized. The existing problems that limited its industrial application were put forward and the bright prospects of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* capable of converting starch were opened out.

Key words amylase-encoding gene, glucoamylase-encoding gene, cloning and expression, engineered strains of *Saccharomyces cerevisiae*



西门子股份有限公司赢得燃料乙醇 60 万 t 年装置 DCS 项目

西门子股份有限公司自动化与驱动集团过程控制部在北京与吉林燃料乙醇有限责任公司签署了燃料乙醇 60 万 t 年装置 DCS 项目。西门子公司的新一代过程控制系统 PCS7 在与其他公司的传统 DCS 的竞争中脱颖而出。

该项目是一个典型的全集成自动化应用实例,并实现了现代化工厂管理和控制的一体化。项目使用 PCS7 过程控制系统,包括 2 台工程师站、9 台操作员站、8 台 AS-417H 控制器和 8 000 多外 I/O 点。项目所有的工程组织及现场服务全部由上海西门子工业自动化有限公司承担。

PCS7 系统在项目中,除负责对乙醇装置及公用工程装置的控制外,还负责与其他第三方设备的通讯。乙醇装置包括玉米贮存、脱胚制浆、乙醇生产、玉米油和储运站等工段,这些工段地域分散,特别适合现场总线的应用。在该项目的竞争中,西门子公司的集成自动化、PROFIBUS 过程现装总线等技术优势得到了充分体现。

美国扩大燃料酒精的生产

位于威斯康星州 Monroe 附近的 Badger State 燃料酒精厂投产。每年将加工 38.1 万 t 谷物,生产 1.514 亿 L 燃料酒精,外加大约 12 万 t DDGS。密歇根州的 LLC 公司也于近期完成了在该 ARO 附近一个与此规模相当的燃料酒精厂的建设。这些新厂的建成使美国燃料酒精厂的总数达到了 67 个,年生产能力达到 98.4 亿 L。另外还有 11 家新燃料酒精厂正在建设之中。