

简报

具有糖化酶活性的工业啤酒酵母菌的 构建及其发酵特性

唐国敏 钟丽婵 杨开宇

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

郑仰民 曹向阳

(北京中策北京啤酒有限公司 北京 100022)

低糖度啤酒又称干啤酒, 1987年首先在日本上市, 很快流行欧美。干啤酒具有纯正、爽口、低热值等特点, 因而口感好又有益于健康, 颇受欢迎, 加之与普通啤酒相比, 干啤酒生产对原料淀粉利用率高, 因此干啤酒是我国啤酒工业的发展方向。干啤酒生产要求把发酵度提高到75%以上, 关键在于提高麦芽汁中的酵母可发酵糖的比例, 现今多采用外加糖化酶或异淀粉酶的工艺来解决。Lancashire和Kim^[1,2]利用基因工程技术已分别把 *Schwanniomyces occidentalis* 和 *S. diastaticus* 的糖化酶基因引入啤酒酵母, 以期用于干啤酒的直接发酵生产。我们已陆续报道黑曲霉糖化酶在实验室酿酒酵母中的表达和分泌^[3-5], 在此基础上又进行了DNA对多倍体的工业酵母的转化研究, 本文即报道具有糖化酶功能的啤酒酵母的构建及工程菌的发酵特性。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

酵母菌 B48 为北京啤酒厂曾使用的啤酒酵母。pBEJ16 是含有 G418 抗性基因的酵母自主复制型质粒, 系 Dr. Hadfield C. 赠给, pKGI 是黑曲霉糖化酶表达分泌的整合型质粒, 由本组构建^[6]。

1.2 培养基

YPD 培养基补加 G418 50 μ g/ml 用于对工业啤酒酵母的转化, HC 培养基用于整合糖化酶基因的共转化子的筛选, YPD 和 HC 培养基的组成见文献^[3]。啤酒发酵试验使用 12% 麦芽汁, 由北京中策北京啤酒公司生产车间提供。

1.3 DNA 操作

质粒 DNA 制备和限制酶切等按“分子克隆”一书所述进行^[6]。

1.4 工业酵母转化

采用修改的 Saki 方法^[7], 取 pBEJ16 和线性化的 pKGI 对 B48 进行共转化, 质粒 DNA 用量比为 pBEJ16 : pKGI = 1 : 3。转化后在把在 YPD/G418 选择平板上长出的 G418 抗性转化子复印到 HC 平板上, 30 $^{\circ}$ C 培养 3d 后按文献 [3] 所述的平板检测法用肉眼检出含糖化酶基因的共转化子。

1.5 分泌糖化酶活力分析

糖化酶活力分析方法见文献 [3]。

1.6 啤酒发酵试验

500ml 三角瓶装 200ml 12% 麦芽汁, 接种后置 25 $^{\circ}$ C 静止培养 4d, 其间每天上午下午各振荡一次, 发酵结束后作啤酒分析。

1.7 啤酒分析

酒精度、原浓、真浓 (残余糖度) 和发酵度测定在 SCABA5600 型啤酒全自动分析仪上进行。显微

本文系国家“八·五”攻关项目资助课题。

本文于 1996 年 4 月 24 日收到。

镜 观察细胞形态, 啤酒风味由品尝鉴定。

2 结果和讨论

2.1 黑曲糖化酶基因对啤酒酵母的转化

pBEJ16 和 pKGl 对 B48 共转化时, 抗性转化子出现频率为 60~200 个/ μg 抗性质粒 DNA。将转化平板菌落复印到 HC 平板后, 获得一个产生明显透明圈的菌落 (图 1), 此即整合了糖化酶基因的共转化子, 命名为 B48GXR, 其转化子的出现频率为 0.3 个/100 个抗性转化子, 糖化酶基因对 B48 的整合频率为 0.1/ μg 糖化酶表达质粒 DNA。转化子 B48GIR 在 YPD 培养液中 30 $^{\circ}\text{C}$ 42h 测得分泌糖化酶活力为 1.8u/ml。

2.2 B48GIR 中 G418 抗性的消除

接种 B48GIR 至 YPD 培养液, 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 24h, 如此连续转移培养两次后将培养液作适当稀释, 涂布 YPD 平板。菌落长成后复印到 YPD 和 YPD/G418 平板上, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2d, 挑选在 YPD 上生长, 在 YPD/G418 上不生长的菌落点接到新的 YPD 平板上。菌落长成后再复印到 YPD, YPD/G418 和 HC 平板上, 结果见图 2。图 2 所示结果知, 在 31 个消灭了 G418 抗性的敏感株中, 有 29 株显示了大小不等的糖化酶分泌活性。



图 1 分泌糖化酶的啤酒酵母转化子
(图中箭头所示)

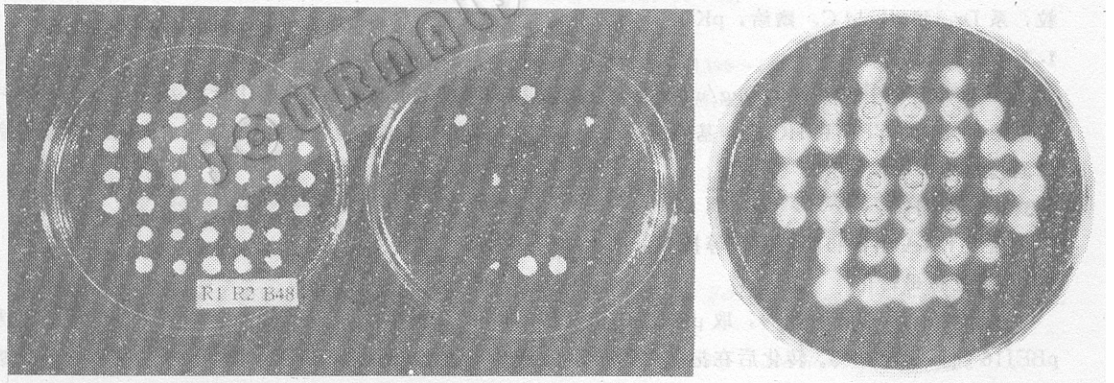


图 2 消灭 G418 抗性并分泌糖化酶的啤酒酵母转化子的平板筛选左为 YPD 平板中为 YPD/G418 平板, 右为 HC 平板

RIR2 为非选择条件下连续转移培养后仍保留 G418 抗性的转化子, 最末一个菌落为 B48

2.3 工程菌的稳定性

选择 4 个产生大透明圈的 G418 敏感的转化子, 命名为 B48G1-1, 2, 3, 4, 在 YPD 培养基中连续转移培养 3 次, 分泌糖化酶活力的测定结果表明, 所有这 4 个工程菌都是稳定的 (数据略)。

2.4 工程菌的 Southern 印迹分析

从工程菌 B48G1-2 和对照株 B48 分别抽提染色体 DNA, 各取 5 μg 分别用 XhoI 和 EcoRI 完全酶切后作 Southern 印迹分析, 以 pKGl 中的 Hind III-BamHI 糖化酶 cDNA 片段为探针。结果 B48G1-2 染色体 DNA 呈现了明显的杂交带 (图 3), 证明糖化酶基因已经整合到了受体株 B48 的染色体 DNA 中。

2.5 啤酒发酵试验

选择 B48G1-2 和 B48G1-4 作发酵试验, 并以 B48 为对照, 试验结果见表 1。

表 1 啤酒发酵试验结果

菌株	酒精度 %	真浓 %	原浓 %	真发酵度 %
B48G1-2	5.21	2.26	12.34	81.7
G48G1-4	5.14	2.36	12.32	80.8
B48	4.28	3.76	12.24	69.3

取样镜检, 工程菌 2 号和 4 号细胞形态整齐, 饱满, 与对照株 B48 相同。啤酒风味经品尝鉴定正常, 与对照株 B48 相同。

以上试验结果表明, 把黑曲霉糖化酶基因引入啤酒酵母可提高啤酒发酵度, 但并未影响菌株生长和啤酒风味, 因此可望用于生产干啤酒和淡色啤酒。但在此工程菌构建中使用了完整 pKGI 质粒 DNA 的整合, 这就使 B48 染色体中除糖化酶基因还同时插入了其它载体 DNA 片段。为确保安全, 整入单一糖化酶基因的工作正在进行中。

致谢 本工作得到轻工部食品发酵所王薇青先生的指导和支持, 特致谢意。

参 考 文 献

- [1] Lancashire W E, Carter A T, Howard J J *et al.* " Superattenuating Brewing Yeast". Proc. 21st EBC Congress, Zürich. 1989. pp. 491~498.
- [2] Kim K, Bajszar G, Lee S Y. Appl Biochem Biotech. , 1994. 44; 161~185.
- [3] 唐国敏, 龚 辉, 钟丽婷等. 生物工程学报, 1994, 10 (3); 213~217.
- [4] 唐国敏, 杨开宇. 生物工程学报, 1995, 11 (4); 321~324.
- [5] 唐国敏, 郝乔然, 钟丽婷等. 微生物学报, 1996, 36 (4); 250~255.
- [6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory. 1989.
- [7] Sakai K, Yamamoto M. Agric Biol Chem, 1986, 50; 1177~1182.

Construction of a Brewer's Yeast Having Glucoamylase Activity and Its Fermentation Characteristics

Tang Guomin Zhong Lichan Yang Kaiyu
(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)
Zheng Yangmin Cao Xiangyang
(Beijing Zhong Ce Beijing Beer Ltd Co, Beijing 100022)

Abstract The brewer's yeast having glucoamylase activity was constructed by integrating glucoamylase cDNA from *Aspergillus niger* into the genome of brewer's Yeast B48. The integration was achieved by cotransformation of YEP type plasmid pBEJ16 carrying G418 resistance expression element and YIP type plasmid pKG1 carrying glucoamylase expression-secretion element and was verified by Southern blot analysis. The engineered yeast was stable. The fermentation test demonstrated that the lower residual dextrin level was obtained compared with control strain B48. Thus the fermentation rate was raised to 80.5%. No alteration of growth and brewing properties was observed. Beer quality was judged to be good.

Key words Glucoamylase, cotransformation, brewer's yeast

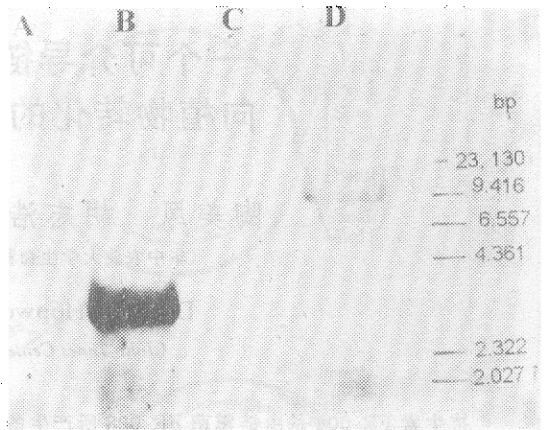


图 3 工程菌 B48G1-2 的 Southern 印迹分析
A. B48DNA/EcoRI, B. B48G1-2 DNA/EcoRI
C. B48 DNA/XhoI, D. B48G1-2 DNA/XhoI