

抗老化啤酒酵母研究进展

杨静静^{1,2,3}, 王金晶^{1,2}, 李永仙^{1,2}, 郑飞云^{1,2}, 钟俊辉³, 李崎^{1,2}

1 江南大学 生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 酿酒科学与工程研究室, 江苏 无锡 214122

3 华润雪花啤酒(中国)有限公司, 北京 100005

杨静静, 王金晶, 李永仙, 等. 抗老化啤酒酵母研究进展. 生物工程学报, 2017, 33(4): 541-551.

Yang JJ, Wang JJ, Li YX, et al. Advances in anti-staling brewer's yeast. Chin J Biotech, 2017, 33(4): 541-551.

摘 要: 啤酒酵母是啤酒酿造的核心,对啤酒风味多样性及风味稳定性具有重要影响。风味稳定性是啤酒重要的质量指标之一,筛选或选育综合抗老化能力高的优良啤酒酵母菌株将成为有效解决该问题的途径之一。近年来,随着基因工程技术的发展及啤酒酵母基因组的不断阐明,人们对啤酒酵母菌种改良展开了大量的研究,以期解决啤酒酿造问题,改善啤酒质量。本文对采用传统方式及基因工程手段选育高产抗氧化物质或低产啤酒老化物质及老化前驱物的啤酒酵母的最新研究进展进行了综述。其中,对抗老化啤酒酵母的选育目标、评价方法及选育策略进行了讨论,并对抗老化啤酒酵母选育的研究热点及发展趋势进行了展望。

关键词: 啤酒, 啤酒酵母, 抗老化, 抗氧化, 风味稳定性, 菌种改良

Received: August 22, 2016; **Accepted:** December 2, 2016

Supported by: Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (PAPD), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2013AA102106-03), National Natural Science Foundation of China (Nos. 31571942, 31601558), Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20150159), Fundamental Research Funds for the Central Universities (Nos. JUSRP51306A, JUSRP51402A, JUDCF13008).

Corresponding author: Qi Li. Tel: +86-510-85918176; Fax: +86-510-85805219; E-mail: liqi@jiangnan.edu.cn

江苏高校优势学科建设工程资助项目 (PAPD), 国家高新技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2013AA102106-03), 国家自然科学基金 (Nos. 31571942, 31601558), 江苏省自然科学基金 (No. BK20150159), 江苏基础研究资助项目 (Nos. JUSRP51306A, JUSRP51402A, JUDCF13008) 资助。

网络出版时间: 2017-01-16

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20170116.1006.002.html>

Advances in anti-staling brewer's yeast

Jingjing Yang^{1,2,3}, Jinjing Wang^{1,2}, Yongxian Li^{1,2}, Feiyun Zheng^{1,2}, Junhui Zhong³, and Qi Li^{1,2}

1 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 Laboratory of Brewing Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 China Resources Snow Breweries (China) Company Limited, Beijing 100005, China

Abstract: Brewer's yeast is crucial in beer fermentation, mainly beer flavor diversity and stability. Beer flavor stability is one of the most influential beer quality aspects, and screening or breeding brewer's yeast with enhanced anti-staling capacity will be an effective solution. In recent decades, with the progress of genetic engineering and detailed description of brewer's yeast genome, great efforts have been made to improve brewer's yeast. This review highlights recent advances in classical and genetic engineering improvement of yeasts to produce more antioxidant compounds or less beer aging substances and precursors. Therein, improvement targets, evaluation methods and development strategies of anti-staling brewer's yeast are also discussed. Furthermore, hotspot and future trend of anti-staling yeast strain development are also proposed.

Keywords: beer, brewer's yeast, anti-staling, antioxidant, flavor stability, strain improvement

风味稳定性是啤酒最重要的质量指标之一^[1], 自上世纪以来一直是啤酒行业的研究热点。消费者主要通过饮用啤酒时的口感差异或变化来识别啤酒的好坏或特定品牌的啤酒, 啤酒老化是影响啤酒口感的主要因素。

对啤酒老化机理的研究可追溯到 20 世纪 60 年代, 氧化是啤酒老化的主要成因, Vanderhaegen 等^[2]综述了啤酒中多种老化物质的化学起源及形成机理。由于构成啤酒组分体系的复杂性, 国内外对啤酒老化研究的角度、途径不同, 由此形成了啤酒老化机理的复杂性。目前, 在老化机理研究中占主导地位的为活性氧的作用和羰基化合物的生成。啤酒老化现象是啤酒中的抗氧化物质、老化物质及老化前驱物受时间及温度等多种环境因素影响共同作用的结果, 影响因素包括原辅料、酿造工艺、啤酒酵母、储存及物流条件等。酿造科学家经过长期研究发现啤酒老化过程只能延缓而不能终止, 这使啤

酒老化问题至今仍然是一个无法攻关的学术难题。在过去的工业实践中, 酿造科学家注意到将酚类化合物、抗坏血酸钠、还原酮及亚硫酸盐等抗氧化物质添加到啤酒中可以抑制啤酒的氧化损害, 从而改善啤酒的风味稳定性。但是随着人们食品安全意识的日益提高, 啤酒工厂对外来添加物的管控越来越谨慎和严格, 这些外来添加物的使用越来越少甚至完全不使用。

近年来, 酿造科学家对啤酒及啤酒原料中的内源性抗氧化物质^[3-6]、生产工艺参数^[7-9]及某一种^[10]或一类老化物质^[11]对啤酒风味稳定性的影响进行了大量研究, 但这并不能从根本上解决该问题。而啤酒酵母是啤酒酿造的核心, 啤酒酵母自身就会代谢产生很多抗氧化物质、老化物质及老化前驱物, 这些物质与麦汁中原有的物质协同作用对啤酒风味稳定性具有重要影响, 并成为啤酒在储存过程中进一步发生老化的化学基础, 表 1 简述了部分啤酒中与老化相关、抗

氧化及促氧化物质。此外，由于活的啤酒酵母具有很好的还原活性，其本身就是优良的抗氧化剂。因此，筛选或选育综合抗啤酒风味老化

能力提高的优良啤酒酵母菌株将成为有效解决啤酒风味稳定性问题和延缓啤酒老化的途径之一。本文将对抗老化啤酒酵母的最新研究展开综述。

表 1 啤酒中老化相关、抗氧化及促氧化物质简述

Table 1 Summary of beer aging-related, anti-oxidant and pro-oxidant substances

Chemical class	Compounds	Function	Possible sources
Carbonyl compounds	Linear aldehydes		
	Acetaldehyde	Aged flavor imparted to beer; Major beer aging substance	Process and ingredients: yeast, high fermentation temperatures, over-pitching, under-aeration; Packaging and storage: oxidation of alcohol
	(<i>E</i>)-2-nonenal	Paper, wet cardboard flavor imparted to beer; Beer aging indicator	Packaging and storage: oxidation; Formed in malt and wort production; Released during storage
	Strecker aldehydes		
	2-methylbutanal	Beer aging indicators	Packaging and storage: released during storage
	3-methylbutanal		
	2-phenylaldehyde		
	Benzaldehyde		
	2-methylpropanal		
	Ketones		
	(<i>E</i>)- β -Damascenone	Beer aging indicator	Packaging and storage: breakdown of precursors from hops
	Heterocyclic compounds		
	Furfural	Caramel, bready flavor imparted to beer; Heat-related aging indicators	Packaging and storage: Maillard reaction products
5-Hydroxymethylfurfural (5-HMF)			
3-Methyl-2-butene-1-thiol (MBT)	Packaging and storage: photochemical reaction of isomerized hop alpha acids with fluorescent or sunlight		
S-compounds	Sulfur dioxide (Sulfite)	Anti-oxidant	Process and ingredients: yeast
	Glutathione (GSH)		
	Thioredoxin (TRX)		
	Superoxide dismutase (SOD)		
Polyphenols	(+)-catechin	Main anti-oxidant capacity contributors in light beer	Process and ingredients: mashing, wort boiling, malt and hops
	Gallic acid		
	Ferulic acid (high concentration)	Certain polyphenols behave as pro-oxidants	Packaging and storage: oxygen susceptible
Melanoidins	Ferulic acid (low concentration)	Main anti-oxidant capacity contributors in dark beer Present pro-oxidant properties	Ingredients: dark speciality malt

The table contents were summarized according to Vanderhaegen^[2].

1 抗老化啤酒酵母选育目标

目前,为了选育抗啤酒风味老化的啤酒酵母,要求选育后的啤酒酵母菌株发酵产生的啤酒抗氧化活性提高和/或其在储存过程中老化程度较低。此外,Bamforth也从实用性角度指出酵母对啤酒风味稳定性的直接影响主要体现在生成亚硫酸盐和还原羰基化合物的能力两个方面^[12]。目前,抗老化啤酒酵母的研究多集中于二氧化硫(SO₂)和乙醛这两个与啤酒风味稳定性密切相关的化合物。

除降低成品啤酒中分子氧及自由基对啤酒风味的损害,在发酵过程中啤酒酵母具有抵抗一系列环境应力对生长代谢的影响,也可以有效避免啤酒风味老化的潜在风险。因此,选育具有较好环境应力耐受能力的啤酒酵母也将成为选育抗老化啤酒酵母可能的重要目标之一。

1.1 增加抗氧化物质含量

由啤酒酵母代谢产生的抗氧化物质主要包括亚硫酸盐/SO₂、谷胱甘肽(GSH)、超氧化物歧化酶(SOD)及硫氧还蛋白等。

SO₂是啤酒酵母硫代谢途径中的重要中间代谢产物,也是啤酒中最有效的抗氧化剂之一^[13],SO₂对啤酒风味具有重要影响,FlavorActiV公司SO₂啤酒感官品评风味阈值为7 mg/L,超过此风味阈值通常会给啤酒口感上带来燃烧的火柴味,目前多个国家规定SO₂含量不能超过10 mg/L,否则必须在瓶身上标出,适量的SO₂对提高啤酒的风味稳定性具有积极作用。由于啤酒发酵过程中啤酒酵母产生SO₂含量的提高通常伴随着硫化氢(H₂S)含量的提高,H₂S在啤酒中的典型浓度为0.001–0.2 mg/L,其风味阈值很低,约为4 μg/L,微量的H₂S是Lager型啤酒风味

特征的重要组成部分,过量则呈现臭鸡蛋气味,给啤酒带来不良风味。迄今为止,高产SO₂成为选育抗老化啤酒酵母的主要选育方向,但一般都会同时结合对H₂S含量的影响进行酵母选育研究。程殿林等选育获得了一株高产SO₂的菌株M24,与出发菌株相比,其SO₂生成量提高了107%,H₂S生成量减少了51%^[14]。Yoshida等选育了一株高产SO₂而H₂S含量并未提高的突变株,主酵结束的嫩啤酒与成熟后的瓶装啤酒其SO₂含量分别为母本的2.8倍和2.6倍,而H₂S含量分别为母本的0.9倍和1.1倍^[15]。Chen等选育获得了一株高产SO₂和GSH、低产H₂S、具有较高抗氧化活性、风味更为稳定且使用安全的酿酒酵母,与出发菌株相比,其发酵液中的SO₂和GSH含量分别增加了31%和30.2%,而H₂S含量降低了74.9%,其相应的DPPH自由基清除率增加了24.6%,抗老化能力提高了33%^[16]。陈璐等选育出一株高产SO₂、低产H₂S且发酵性能优良的菌株TK-10,其SO₂产量比出发菌株提高了2–3倍^[17]。Iijima和Ogata等构建了SO₂分泌量提高的自克隆酿酒酵母,采用该酵母酿造的啤酒风味稳定性良好,SC-SSUI和SB-SSUI基因的同源转化株产生的SO₂含量从出发株的11 mg/L分别提高到21.2 mg/L和18.7 mg/L^[18]。

GSH是啤酒酵母在发酵过程中代谢产生的一种非常重要的抗氧化物质,可以与一系列的活性氧自由基发生非酶促反应,具有维持啤酒酵母细胞氧化还原平衡的能力。随着GSH含量的增加,啤酒的抗老化能力得到显著提高^[19]。蒋凯构建了一株高产GSH的啤酒酵母基因工程菌,由其发酵所获得的啤酒风味稳定性也得到提高^[20]。

SOD也是啤酒酵母抗氧化防御系统中的一种具有重要生理活性的抗氧化物质,但是对

于未经改造的啤酒酵母其不能分泌到胞外，因此无法对啤酒风味稳定性产生直接影响。但是 Wang 等通过在同一株酵母中共表达 *SOD1* 和 *GSH* 基因，同时删除 *ILV2* 和 *ADH2* 基因，促使 *SOD1* 和 *GSH* 分泌到胞外，由此构建了一株发酵性能良好的酵母菌株^[19]。

此外，硫氧还蛋白由于其抗氧化作用和对啤酒风味稳定的可能影响而逐渐获得研究者的关注。

由于啤酒风味的形成和稳定是多种代谢产物之间协同作用的结果，通过菌株改造改变某些化合物的含量水平存在影响风味平衡及产品质量的风险，故合理控制目标产物水平非常重要。因此，啤酒中的抗氧化物质的含量也不是越高越好，应在满足啤酒风味稳定性、胶体稳定性、泡沫稳定性等的基础上，且不带来其他不良风味并符合食品安全的范围内，抗氧化物质含量越高越好。目前，提高啤酒酵母代谢产生内源性抗氧化物质含量及其分泌到胞外的能力且不形成其他不良风味将成为未来抗老化啤酒酵母的重要选育目标之一。

1.2 降低老化物质或老化前驱物含量

早在 1966 年，Hashimoto 首次发现啤酒中老化味的形成伴随着挥发性羰基化合物含量的提高^[21]。由于酵母代谢产生包括乙醛在内的一系列羰基化合物，其含量高低具有明显的菌株依赖性。此外，啤酒酵母本身又具有极强的还原羰基化合物的能力。因此，选育低产老化物质和/或老化前驱物的啤酒酵母将会有效改善啤酒的风味稳定性。乙醛是啤酒中含量最高的一种羰基化合物，在啤酒中的典型浓度为 2–15 mg/L，在啤酒中的风味阈值范围为 5–15 mg/L，含量过

高会引起不良的风味，同时也会影响啤酒的抗老化能力。控制乙醛含量对改善啤酒风味，提高啤酒质量具有重要意义。李崎等选育了一株低产羰基化合物且 *GSH* 合成能力提高的抗老化啤酒酵母菌株 M_4^1 。沈楠等在此基础上选育了一株低产乙醛的啤酒酵母 D-A-14，由该突变株发酵获得的啤酒风味稳定性提高^[22]。Wang 等选育了一株低产乙醛，同时乙醇产量提高的突变株 MA12^[23]。

1.3 增强环境应力耐受能力

现代化的啤酒生产，高浓酿造及各种辅料的应用对啤酒酵母尤其是 Lager 型啤酒酵母对环境应力的耐受提出了新的要求。高渗透压、高乙醇应力等条件影响酵母细胞的活力及啤酒的质量。Sanchez 等将 Lager 型啤酒酵母孢子与酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 进行杂交从而获得了 13 株应力抗性增强的 Lager 型啤酒酵母杂合体，这些酵母在发酵结束后的活力也有所增强^[24]。Li 等基于细胞壁多糖组成选育了一株压力耐性提高的啤酒酵母，并对菌株中细胞应激反应相关的基因转录情况进行分析，发现酵母细胞完整性途径相关基因发生了不同程度的上调^[25]。Wang 等通过敲除 Lager 型啤酒酵母 *FKSI* 基因构建了一株新型啤酒酵母^[26]，该酵母细胞壁中 β -1,3 葡聚糖的含量降低，几丁质含量增加，细胞壁变厚，发生在细胞壁上的这些变化使得酵母对环境应力的耐受能力更强，在发酵过程中显示出了很好的鲁棒性，由其酿造的啤酒显示出了良好的抗氧化活性。尽管有研究表明氧化应力耐受能力提高的 Lager 型啤酒酵母突变株其发酵产生的啤酒未必具有更强的氧化稳定性^[27]，但是在工业大生产条件下啤酒酵

母具有更好的环境应力耐受能力是获得稳定啤酒质量,尤其是良好的啤酒风味稳定性的基础。因此,人们仍希望获得可耐受各种环境应力的啤酒酵母菌株,然而从该角度选育抗老化啤酒酵母菌株还需要更多的探索。

2 抗老化啤酒酵母选育评价手段

选育抗老化啤酒酵母的主要目的在于控制啤酒风味质量,延缓啤酒老化。在确定选育目标和评价抗老化啤酒酵母选育效果时,一个指标的改变很难影响到啤酒品质,而如果对整个啤酒品质具有显著影响,一定是啤酒本身组分发生了极大的变化,啤酒有可能风味不协调或者面临其他问题。因此,评价抗老化啤酒酵母的选育除了考虑目标化合物的评价,通常还需要基于啤酒抗老化能力评价及风味品评。综合评价啤酒的抗老化能力,即除研究单一目标化合物之外,尤其是针对 SO_2 和乙醛这一类易与其他物质结合的化合物,要结合其他重要老化指标、抗氧化力指标及常规风味指标共同评价。

目前,传统的啤酒老化指标和抗氧化指标仍是啤酒风味老化研究中的常用指标,如 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) 自由基清除率常用于评价啤酒本身的抗氧化力,硫代巴比妥酸 (TBA) 值作为常用的啤酒老化指标评价啤酒的老化程度。但是采用这些方法评价抗老化啤酒酵母选育效果都存在一定缺陷,如 DPPH 法是一种常用的评价抗氧化力的体外的化学方法,不适合生理环境,因此不适用于有利于健康或者有利于酵母生长或抵抗氧化应力的抗氧化活性的评价。此外,由酵母代谢产生的微量抗氧化物质中除 SO_2 外,其他均为对健康有益的抗氧化物质。因此,尚需要探索新的抗氧化

活性评价方法鉴别由不同啤酒酵母发酵带来的啤酒抗氧化活性之间的差别。此外,这些体外的抗氧化力测定方法还具有共同的缺点,就是它们都没有测定抗氧化物质对细胞活力的影响。这些缺陷可以通过使用活的细胞和生理相关的氧化剂解决,活的细胞系统将为测定抗氧化活性提供最佳平台^[28]。

自 2007 年 Wolfe 和 Liu 发表了细胞抗氧化方法^[29]以来,这种“基于细胞的抗氧化活性评价方法”(CAA),比一般的化学方法能够更好地阐述生物系统的复杂性,解决了传统化学评价方法不能反映抗氧化物质在体内的真实活性及可能的运行机制问题,对评价对健康有益的抗氧化物质具有独特的优越性。由于啤酒酵母在啤酒发酵过程中代谢产生很多抗氧化物质,这些抗氧化物质大部分是在啤酒发酵后期啤酒酵母响应高压、高渗的抗氧化防御系统的一部分,对酵母在生理条件下具有抗氧化应力的保护,这些物质对啤酒风味稳定性具有保护作用。因此,采用细胞抗氧化活性评价指标将有助于构建评价这一类筛选目标选育效果的平台。该方法在酿酒领域中的应用尚无报道,同时,这种方法是否可用于啤酒酵母本身抗氧化活力评价或啤酒酵母自溶研究也有待进一步探究。

另外,Wu 等报道了一种基于氧化剂诱导的酿酒酵母生长停滞的高通量的抗氧化剂筛选方法^[28]。这种方法利用了氧化应力调节酵母细胞生长停滞的生理现象,从生理角度对抗氧化物质进行评价,并采用多种氧化剂及抗氧化剂使筛选更为全面,能够筛选不同化学属性的化合物的氧化清除活性及在细胞内的抗氧化活性。目前,这种抗氧化活性筛选方法在国内酿酒领域里尚没有应用报道,酿酒酵母作为一种典型

的模式细胞用于评价抗氧化物质在生理条件下的抗氧化作用对研究啤酒在发酵过程中的抗氧化活性具有一定意义。

3 抗老化啤酒酵母的选育策略

经典和传统的酵母育种主要依靠酵母形成孢子,孢子间交配形成新种,以期获得优良特性。近年来,随着DNA序列分析的完成,酵母作为外源基因克隆和表达的受体及载体系统逐步完善,酵母的人工育种得到广泛和实质性的开展。因此,从酵母菌种改良的角度出发,筛选或者采用基因工程技术构建高产某种抗氧化物质或某些抗氧化物质组合,低产老化物质或者老化前驱物的啤酒酵母,从而从本质上改善啤酒的风味稳定性。

3.1 传统育种技术选育抗老化啤酒酵母

李崎等采用紫外诱变筛选蛋氨酸耐性菌株,进而利用高浓度蛋氨酸连续驯养,获得了1株巯基化合物产生减少而GSH合成能力提高的抗老化啤酒酵母菌株M₄¹[30]。在此基础上,沈楠等进一步以M₄¹为出发菌株,经过紫外线诱导、双硫仑平板初筛和乙醛培养基驯化复筛,获得了1株低产乙醛的啤酒酵母D-A-14。采用该突变株酿造的啤酒中乙醛含量为2.86 mg/L,与出发菌株相比下降了76%,总高级醇含量也有所降低,从而改善了啤酒的风味稳定性及协调性。Wang等采用UV突变的传统育种技术,采用乙醇为唯一碳源,4-MP为筛选标记筛选到1株低产乙醛,且乙醇产量提高的突变株MA12^[23]。

Chen等通过紫外诱变的非基因工程方法获得了1株高产SO₂和GSH、低产H₂S的酿酒酵母,由其酿造的啤酒具有较高抗氧化活性、风

味稳定性良好且可安全使用^[16]。程殿林等对BY-1菌进行紫外诱变处理,通过醋酸铅显色平板、不同硫源鉴别平板、SO₂及H₂S生成量的测定,选育出1株能适量高产SO₂的菌株M24^[14]。陈璐等以啤酒酿造Lager酵母TS-01为出发菌株,依次利用含乙硫氨酸、羟基正缬氨酸的平板进行定向育种,采用硝酸铅平板分离出高产SO₂、低产H₂S的菌株,然后通过EBC管、100 L中试发酵试验,以发酵液的SO₂、H₂S、双乙酰、乙醛、高级醇的含量和发酵度为筛选指标获得1株发酵性能优良的菌株TK-10^[17]。随后,以出发菌株TS-01为对照进行600 t大生产对比实验,实验结果表明新筛选出的菌株TK-10发酵液SO₂生成量明显提高,成品酒抗氧化性能有所提高,口感良好。Sanchez等将Lager型啤酒酵母孢子与*S. cerevisiae*进行杂交获得了13株应力抗性增强的Lager型啤酒酵母杂合体,在发酵结束后新获得的酵母菌株活力也有所提高^[24]。

综上所述,由于啤酒酵母应用领域的特殊性,人们更加青睐采用传统育种技术选育抗老化啤酒酵母菌株,并在该领域获得了很多成功。然而采用传统育种技术获得所需表型特性概率极低^[31],也极易发生性状的回复突变,因此可采用不同的基因工程技术手段或者多目标策略构建抗老化啤酒酵母菌株并进行相关机理探索。

3.2 逆向代谢工程策略选育抗老化啤酒酵母

SO₂对啤酒风味稳定性具有重要影响,啤酒酵母可通过还原吸收的硫酸盐生成SO₂。过表达SSUI和/或MET14^[32]或钝化或敲除MET10^[33]均可获得高产SO₂的突变株。然而,敲除了MET10的Lager型啤酒酵母菌株很有可能会因胞内甲硫氨酸含量减少或酵母生长缓慢而获得不需要

的表型。此外,采用重组 DNA 技术选育的酵母菌株不能用于商业化生产啤酒。因此,采用逆向代谢组学技术选育抗老化酵母将有效地解决这一问题。Yoshida 等采用整合代谢组和转录组学分析手段,对 mRNA 丰度和细胞内代谢物的浓度进行全局分析,鉴定了差异的分子基础,并依此成功获得了高产 SO_2 而 H_2S 含量并未增加的突变株^[15]。

3.3 采用酵母“基因自克隆技术”构建抗老化啤酒酵母

自克隆技术是利用来源于酵母本身的目的基因构建酵母工程菌,不引入其他任何的外源 DNA 片段,因此具有生物安全性。在食品及饮料酒领域,酵母基因工程菌、转基因作物并不受消费者欢迎。采用酵母“基因自克隆技术”对酵母基因组进行改造由于其不引入外源 DNA,有助于消除消费者对贴有基因工程菌标签的产品的恐惧感,卡塔赫纳生物安全议定书对自克隆酵母并不进行管控。基因自克隆技术在工业啤酒酵母菌株改造中具有重要的实际应用价值。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 GSH 含量比对照菌株提高了 50%^[34],并在此基础之上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,100 L 发酵罐的中试结果表明,所构建酵母工程菌的 GSH 含量提高了 34%,所产啤酒抗老化能力提高 1.5 倍^[35]。王金晶等采用同源重组技术在啤酒酵母中引入来源于其本身

的 GSH 限速酶基因 *GSH1*,同时破坏了调控乙醛合成的乙醇脱氢酶 II 基因 *ADH2*,构建了 1 株 GSH 产量提高了约 10 mg/L 的啤酒酵母,其风味稳定性较出发菌株提高了 1.3 倍^[36]。*SSUI* 基因编码亚硫酸盐转运蛋白,Iijima 和 Ogata 通过基因重组技术高效表达 *SSUI* 成功构建了亚硫酸盐分泌量提高的自克隆酿酒酵母,采用该酵母酿造的啤酒风味稳定性良好^[18]。因此,采用自克隆技术构建抗老化啤酒酵母将非常实用有效,并更具商用化可能。

3.4 采用多基因改造策略构建抗老化啤酒酵母

Wang 等通过在同 1 株酵母中共同表达 *SOD1* 和 *GSH* 基因,使 *SOD1* 和 GSH 产量增加,同时敲除 *ILV2* 和 *ADH2* 基因,构建了 1 株发酵性能良好的酵母菌株,由该菌株酿造的啤酒抗氧化性能及抗老化能力均明显增强^[19]。Donalies 等通过过表达 *MET14* 和 *SSUI* 基因构建抗老化啤酒酵母菌株,其亚硫酸盐分泌量增加^[32]。由于啤酒酵母基因组倍性的复杂性,采用多基因改造策略在啤酒酵母,尤其是 Lager 型的抗老化啤酒酵母菌株选育中存在较大难度。但是由于啤酒组分的复杂性,多基因改造策略极有可能是提高啤酒综合抗老化能力最适合的抗老化啤酒酵母选育策略。

4 展望

世界各地的专业机构试图对啤酒酵母进行基因改造,以期获得优良啤酒酵母菌株。通过增加抗氧化物质、降低老化物质或老化前驱物含量提高啤酒风味稳定性成为抗老化啤酒酵母选育的主要选育方向。此外,提高啤酒酵母代谢产生的对人体健康有益的抗氧化物质含量,

增强啤酒这一产品的健康属性；抑制啤酒酵母在工业大生产复杂环境应力条件下的衰变，防止有害物质进入酵母细胞及防止酵母自溶等将成为新的研究热点。

采用基因工程技术如 CRISPR/Cas9 等基因编辑系统对啤酒酵母进行多基因综合改造可以为抗老化啤酒酵母选育提供重要的机理上的佐证。此外，由于通过异源同组 DNA 如抗性基因的基因工程菌的使用受到极大关注，而无法进行商业化应用，因此采用“基因自克隆技术”选育抗老化啤酒酵母，因其生物安全性更易被消费者接受^[37]，而极具吸引力^[38]。

此外，采用酿酒酵母和真贝酵母杂交产生新的 Lager 型啤酒酵母，从中找到抗啤酒风味老化能力更强的啤酒酵母具有很好的商用化前景。但由于 1 株新酵母只有发酵性能及风味特性优良，才需考虑抗啤酒风味老化的能力强弱，因无法明确选育目标，因此如何确定选育目标和选育策略将杂交技术用于抗老化啤酒酵母的选育值得思考。

由于 Lager 型啤酒酵母异源多倍体的杂交属性和极差的孢子形成能力，对其进行遗传学改造将极具挑战性。随着 Lager 型啤酒酵母基因组学研究^[39-42]的不断深入，结合系统生物学、代谢工程以及高通量的筛选方法为抗老化啤酒酵母选育打开新通道，未来将推动这一领域的发展。

REFERENCES

- [1] Bamforth CW, Lentini A. The flavor instability of beer//Bamforth CW, Russell I, Stewart G, Eds. Beer: A Quality Perspective. New York: Academic Press, 2009: 85-109.
- [2] Vanderhaegen B, Neven H, Verachtert H, et al. The chemistry of beer aging—a critical review. *Food Chem*, 2006, 95(3): 357-381.
- [3] Woffenden HM, Ames JM, Chandra S, et al. Effect of kilning on the antioxidant and pro-oxidant activities of pale malts. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(17): 4925-4933.
- [4] Maillard MN, Soum MH, Boivin P, et al. Antioxidant activity of barley and malt: relationship with phenolic content. *LWT-Food Sci Technol*, 1996, 29(3): 238-244.
- [5] Abrahamsson V, Hoff S, Nielsen NJ, et al. Determination of sulfite in beer based on fluorescent derivatives and liquid chromatographic separation. *J Am Soc Brew Chem*, 2012, 70(4): 296-302.
- [6] Leitao C, Marchioni E, Bergaentzlé M, et al. Fate of polyphenols and antioxidant activity of barley throughout malting and brewing. *J Cereal Sci*, 2012, 55(3): 318-322.
- [7] Li HP, Sun GF, Zhao MM, et al. Effects of fermentation process parameters on the antioxidant activity of green beer. *Sci Technol Food Industr*, 2012, 33(21): 156-159 (in Chinese). 李会品, 孙桂芳, 赵谋明, 等. 发酵工艺参数对嫩啤酒抗氧化力的影响. *食品工业科技*, 2012, 33(21): 156-159.
- [8] Saison D, De Schutter DP, Overlaet-Michiels W, et al. Effect of fermentation conditions on staling indicators in beer. *J Am Soc Brew Chem*, 2009, 67(4): 222-228.
- [9] Leitao C, Marchioni E, Bergaentzlé M, et al. Effects of processing steps on the phenolic content and antioxidant activity of beer. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(4): 1249-1255.
- [10] Wu MJ, Clarke FM, Rogers PJ, et al. Identification of a protein with antioxidant activity that is important for the protection against beer ageing. *Int J Mol Sci*, 2011, 12(9): 6089-6103.
- [11] Costa MSD, Gonçalves C, Ferreira A, et al. Further insights into the role of methional and phenylacetaldehyde in lager beer flavor stability. *J*

- Agric Food Chem, 2004, 52(26): 7911–7917.
- [12] Bamforth CW. The science and understanding of the flavour stability of beer: a critical assessment. *Brauwelt Int*, 1999, 17(2), 98–110.
- [13] Andersen ML, Outtrup H, Skibsted LH. Potential antioxidants in beer assessed by ESR spin trapping. *J Agric Food Chem*, 2000, 48(8): 3106–3111.
- [14] Cheng DL. The breeding of *Saccharomyces cerevisiae* producing compatible level of SO₂ and studies on the flavor stability of beer [D]. Tianjin: Tianjin University of Science & Technology, 2005 (in Chinese).
程殿林. 适量高产 SO₂ 菌种选育与啤酒风味稳定性的研究 [D]. 天津: 天津科技大学, 2005.
- [15] Yoshida S, Imoto J, Minato T, et al. Development of bottom-fermenting *Saccharomyces* strains that produce high SO₂ levels, using integrated metabolome and transcriptome analysis. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74(9): 2787–2796.
- [16] Chen YF, Yang X, Zhang SJ, et al. Development of *Saccharomyces cerevisiae* producing higher levels of sulfur dioxide and glutathione to improve beer flavor stability. *Appl Biochem Biotechnol*, 2012, 166(2): 402–413.
- [17] Chen L, Wan XJ, Yin H, et al. Screening of brewer's yeast strain TK-10 with high antioxygenic property and its industrial fermentation. *Food Ferment Industr*, 2012, 38(7): 77–81 (in Chinese).
陈璐, 万秀娟, 尹花, 等. 抗氧化啤酒酵母菌株 TK-10 的选育及工业生产验证. *食品与发酵工业*, 2012, 38(7): 77–81.
- [18] Iijima K, Ogata T. Construction and evaluation of self-cloning bottom-fermenting yeast with high *SSUI* expression. *J Appl Microbiol*, 2010, 109(6): 1906–1913.
- [19] Wang ZY, Bai XJ, He XP, et al. Secretion expression of SOD1 and its overlapping function with GSH in brewing yeast strain for better flavor and anti-aging ability. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2014, 41(9): 1415–1424.
- [20] Jiang K, Li Q, Gu GX. Improvement of beer anti-staling capability by genetically modifying industrial brewing yeast with high glutathione content. *Chin J Biotech*, 2007, 23(6): 1071–1076 (in Chinese).
蒋凯, 李崎, 顾国贤. 构建高产谷胱甘肽啤酒酵母基因工程菌提高啤酒抗老化能力的研究. *生物工程学报*, 2007, 23(6): 1071–1076.
- [21] Hashimoto N. Report of the Research Laboratories of Kirin Brewery Co., Ltd., No.9. Takasaki: Research Laboratories of Kirin Brewery Co., Ltd., 1966.
- [22] Shen N. Screening of brewer's yeast of low acetaldehyde production [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2013 (in Chinese).
沈楠. 低产乙醛啤酒酵母的选育 [D]. 无锡: 江南大学, 2013.
- [23] Wang JJ, Shen N, Yin H, et al. Development of industrial brewing yeast with low acetaldehyde production and improved flavor stability. *Appl Biochem Biotechnol*, 2013, 169(3): 1016–1025.
- [24] Sanchez GR, Solodovnikova N, Wendland J. Breeding of lager yeast with *Saccharomyces cerevisiae* improves stress resistance and fermentation performance. *Yeast*, 2012, 29(8): 343–355.
- [25] Li XE, Wang JJ. Strengthening of cell wall structure enhances stress resistance and fermentation performance in lager yeast. *J Am Soc Brew Chem*, 2014, 72(2): 88–94.
- [26] Wang JJ, Xu WN, Li XE, et al. Absence of *fks1p* in lager brewing yeast results in aberrant cell wall composition and improved beer flavor stability. *World J Microbiol Biotechnol*, 2014, 30(6): 1901–1908.
- [27] Berner TS, Arneborg N. The role of lager beer yeast in oxidative stability of model beer. *Lett Appl Microbiol*, 2012, 54(3): 225–232.
- [28] Wu MJ, O'Doherty PJ, Fernandez HR, et al. An antioxidant screening assay based on oxidant-induced growth arrest in *Saccharomyces cerevisiae*. *Fems Yeast Res*, 2011, 11(4): 379–387.
- [29] Wolfe KL, Liu RH. Cellular antioxidant activity

- (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(22): 8896–8907.
- [30] Li Q, Pan XQ, Gu GX. Improvement of beer flavor stability by screening anti-staling brewer's yeast. *Chin J Biotech*, 2004, 20(6): 912–917 (in Chinese).
李崎, 潘学启, 顾国贤. 选育抗老化啤酒酵母提高啤酒风味稳定性的研究. *生物工程学报*, 2004, 20(6): 912–917.
- [31] Attfield PV, Bell PJL. Genetics and classical genetic manipulations of industrial yeasts//de Winde JH, Ed. *Functional Genetics of Industrial Yeasts*. Berlin Heidelberg: Springer, 2003: 17–55.
- [32] Donalies UEB, Stahl U. Increasing sulphite formation in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of *MET14* and *SSU1*. *Yeast*, 2002, 19(6): 475–484.
- [33] Hansen J, Kielland-Brandt MC. Inactivation of *MET10* in brewer's yeast specifically increases SO₂ formation during beer production. *Nat Biotechnol*, 1996, 14(11): 1587–1591.
- [34] Fan XY, He XP, Guo XN, et al. Increasing glutathione formation by functional expression of the γ -glutamylcysteine synthetase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett*, 2004, 26(5): 415–417.
- [35] Zhang JN, He XP, Guo XN, et al. Genetically modified industrial brewing yeast with high-glutathione and low-diacetyl production. *Chin J Biotech*, 2005, 21(6): 942–946 (in Chinese).
张吉娜, 何秀萍, 郭雪娜, 等. 低双乙酰抗老化啤酒酵母工程菌的构建. *生物工程学报*, 2005, 21(6): 942–946.
- [36] Wang JJ. Genetic modification and application studies of industrial brewing yeast strains [D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2011 (in Chinese).
王金晶. 工业啤酒酵母菌的遗传修饰与应用研究 [D]. 北京: 中国科学院研究生院, 2011.
- [37] Akada R. Genetically modified industrial yeast ready for application. *J Biosci Bioeng*, 2002, 94(6): 536–544.
- [38] Saerens SMG, Duong CT, Nevoigt E. Genetic improvement of brewer's yeast: current state, perspectives and limits. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 86(5): 1195–1212.
- [39] Caesar R, Palmfeldt J, Gustafsson JS, et al. Comparative proteomics of industrial lager yeast reveals differential expression of the *cerevisiae* and non-*cerevisiae* parts of their genomes. *Proteomics*, 2007, 7(22): 4135–4147.
- [40] Nakao Y, Kanamori T, Itoh T, et al. Genome sequence of the lager brewing yeast, an interspecies hybrid. *DNA Res*, 2009, 16(2): 115–129.
- [41] Walther A, Hesselbart A, Wendland J. Genome sequence of *Saccharomyces carlsbergensis*, the world's first pure culture lager yeast. *G3-Genes Genom Genet*, 2014, 4(5): 783–793.
- [42] Baker E, Wang B, Bellora N, et al. The genome sequence of *Saccharomyces eubayanus* and the domestication of lager-brewing yeasts. *Mol Biol Evol*, 2015, 32(11): 2818–2831.

(本文责编 郝丽芳)