

## 酿酒酵母基因工程菌的构建及应用的研究

酿酒酵母是发酵工业的重要微生物,主要用于酒精、啤酒和面包工业。传统的酿酒酵母选育改良方法主要为自然筛选、诱变育种和杂交育种,但这些方法专一性不强。基因工程技术提高了选育及改良酿酒酵母方法的特异性。随着1996年酿酒酵母全基因组测序工作的完成,利用基因工程技术构建酿酒酵母基因工程菌已经成为当前的主流。科学家们也为酿酒酵母相应地构建了多种有效的质粒载体,并探索出相应的基因转化方法。

近年来,江南大学陈坚教授的研究团队对酿酒酵母基因工程菌的构建及应用进行了大量、深入的研究。CN201110127826.0公开了一种产丙酮酸的酿酒酵母基因工程菌及其构建方法和应用。该发明通过敲除酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK2-1C)硫胺素合成途径的关键调控基因THI2,干扰硫胺素的合成代谢,进而降低丙酮酸代谢关键酶(丙酮酸脱氢酶)的酶活性,从而减少通向乙醇的碳代谢流,最终促进丙酮酸的积累。该酿酒酵母基因工程菌在硫胺素限量添加的条件下,可积累丙酮酸,方法简单,产量可达 $6.77\pm 0.14\text{g/L}$ ,为研究代谢工程改造酿酒酵母生产C4二羧酸奠定了基础。CN201110091340.6公开了一种高产乳酸工程菌的构建方法和应用,其通过游离表达的方式,将源于*Streptococcus pneumoniae*的NADH氧化酶(*nox*)过量表达于整合了乳酸脱氢酶(LDH)的工程菌*S.cerevisiae* CEN.PK2-1C[LDH]中,构建了L-乳酸合成能力进一步提高的基因工程菌*S.cerevisiae* CEN.PK2-1C[LDH]-*nox*。该菌株用于发酵生产乳酸,发酵100h后,发酵液中L-乳酸产量比出发菌株增加了33%,达到20g/L,而乙醇积累量则下降了49%,为8.2g/L。CN201110355356.3公开了一种低产尿素的黄酒酵母代谢工程菌及其构建方法,是将脲基酰胺酶基因DUR1,2编码框置于酿酒酵母组成型高表达TPI1转录启动子和TPI1转录终止子控制之下,通过同源重组将TPI1p-DUR1,2-TPI1t基因盒稳定整合入菌株黄酒酵母菌株基因组中得到的黄酒酵母代谢工程菌;该发明的黄酒酵母代谢工程菌株具有明显的产尿素水平低的特点,利用其发酵生产的黄酒EC含量低,且风味基本保持不变。CN201010559061.3公开了一种产延胡索酸的酿酒酵母基因工程菌及其构建方法和应用。该发明从能够大量积累延胡索酸的米根霉(*Rhizopusoryzae* NRRL1526)克隆延胡索酸积累途径中的关键基因苹果酸脱氢酶基因(RoMDH)和富马酸酶基因(RoFUM1),通过连接到能在酿酒酵母中高拷贝双向表达质粒pY26TEF/GPD,转化酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae* BMA64),获得产延胡索酸的酿酒酵母基因工程菌,产量可达26.2mg/L。陆健在CN201110410845.4中公开了一种通过“自克隆”手段构建低产尿素黄酒酵母工程菌及其构建方法。该工程菌中精氨酸酶基因(CAR1)被破坏,从而降低黄酒酵母对精氨酸的代谢,减少黄酒醪液中尿素的含量,进而降低黄酒中氨基甲酸乙酯(EC)的含量。采用本基因工程菌发酵后,尿素含量可降低73%,氨基甲酸乙酯含量也会大幅降低。马正,饶志明等(2007)研究了一步法产1,3-丙二醇酿酒酵母基因工程菌,其将分别来源于大肠杆菌和肺炎克雷伯氏菌的基因片段yqhD和dhaB串联表达,构建重组表达载体pYX212-zeocin-pGAP-yqhD-pGAP-dhaB;并得到重组酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)W303-1A/pYX212-zeocin-pGAP-yqhD-pGAP-dhaB。该重组菌和对照*S.cerevisiae*分别以葡萄糖为底物摇瓶发酵72h后,重组酿酒酵母发酵液中1,3-PD含量约为1.5g/L;而对照菌株不产1,3-PD。王付转(2008)采用遗传改良技术,使酿酒酵母絮凝基因FLO1在发酵性能优良的工业酿酒酵母中表达,得到絮凝重组工业酿酒酵母菌株,以利于在酒精发酵末期利用酵母自身的絮凝沉降能力从醪液中分离细胞,节约酒精生产能源成本。

由于基因重组酿酒酵母在诸多方面具有潜在优势,加上现代生物工程技术的飞速发展,其开发利用具有广阔的前景。

(江南大学图书馆 张群 供稿)