

利用淀粉的酿酒酵母基因工程菌研究进展

廖昱泓,赵德刚

(贵州大学农业生物工程省级重点实验室,贵州 贵阳 550025)

摘要: 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。在酿酒酵母中已表达的淀粉酶基因包括 α -淀粉酶基因和糖化酶基因。外源淀粉水解酶能在酵母中高效表达并分泌,其主要因素在于:在构建载体时组入强启动子;酿酒酵母中带有合适的酵母受体系统;具有外源淀粉酶蛋白的分泌信号;外源淀粉酶基因的遗传稳定性和生长介质。构建分解淀粉酿酒酵母已取得相当大的进展,但在构建的多数菌株利用糊精及淀粉的能力仍然有限,而且降解速率较慢。构建直接分解和利用淀粉的酵母工程菌,可简化工艺、节省能源和酶制剂、降低成本,有重要的应用前景。(孙悟)

关键词: 微生物; 酿酒酵母; 基因工程菌; α -淀粉酶基因; 糖化酶基因

中图分类号:TS261.1;Q78 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2005)06-0044-04

Study Progress of *S.cerevisiae* Genetic Engineering Strain Using Amylum

LIAO Yu-hong and ZHAO De-gang

(Agriculture Bioengineering Provincial Key Lab of Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China)

Abstract: *S.cerevisiae*, as an important microbe in fermenting industry, is mainly applied in ethanol industry, beer brewing and baking industry. The amylase gene expression in *S.cerevisiae* included α -amylase gene and saccharifying enzyme gene. The main factors for high efficiency expression and secretion of exogenous amyllum hydrolase in *S.cerevisiae* are as follows: involvement of strong promoter in carrier construction; appropriate receptor system carried by *S.cerevisiae*; in possession of secretion signals of exogenous amyllum hydrolase; genetic stability and growth medium of exogenous amylase gene. Much progress had been achieved in the construction of *S.cerevisiae*. However, present techniques still limited the construction of multiple strains by amyllum and dextrin and the degradation rate was comparatively low. The development of yeast engineering strain with direct decomposition capability could simplify technical process, save energy and zymin, and reduce production cost, which was of important application foreground. (Tran. by YUE Yang)

Key words: microbe; *S.cerevisiae*; genetic engineering strain; α -amylase gene; saccharifying enzyme gene

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是发酵工业的重要微生物,主要用于酒精、啤酒和面包工业。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。但酒精酵母因缺乏水解淀粉酶类不能直接利用淀粉,淀粉须先经蒸煮,经 α -淀粉酶液化,再经酸解或糖化酶处理转变成葡萄糖等可发酵性糖后才能被利用。改良菌种可获得能直接分解和利用淀粉的酵母工程菌,可简化工艺、节省能源和酶制剂、降低成本,有重要的应用前景。目前构建分解淀粉的酿酒酵母菌种的方法有:酵母杂交育种、原生质融合技术、基因工程技术。本文主要概述利用基因工程技术构建分解淀粉的酿

酒酵母及其应用。

1 利用淀粉的酿酒酵母工程菌的构建

目前在酿酒酵母中已表达的淀粉酶基因包括 α -淀粉酶基因和糖化酶基因。

α -淀粉酶又称液化酶,最适 pH 为 5~6,稳定 pH 范围为 5.8~8,霉菌 α -淀粉酶很耐酸,在 pH2.0 时仍有分解淀粉 80% 的活性。典型的 α -淀粉酶从内部无规则地切断淀粉分子,属内切酶。它可随机作用于支链淀粉、糖原的 α -1,4 糖苷键,对 α -1,6 糖苷键不能水解,由于同时对整个分子进行进攻,淀粉粘度下降很快。

收稿日期:2004-12-23

作者简介:廖昱泓(1973-),女,江西吉安人,硕士研究生。

小麦、小鼠唾液腺和胰脏、人的唾液腺等动植物组织,原核生物的解淀粉芽孢杆菌(*B.amylolique ficans*)和淀粉脱脂假单孢菌(*Pseudomonas amylocleramosa*),低等真核生物施旺(*Schwanniomyces occidentalis*) 酵母及不同曲霉都含有 α -淀粉酶。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。各种来源的 α -淀粉酶基因在啤酒酵母工程菌中的表达效率不尽相同。Ryoichi 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^[1]。

耐高温 α -淀粉酶是淀粉水解中最重要的酶制剂之一。目前工业上最常用的耐高温 α -淀粉酶来源于地衣芽孢杆菌,其最适 pH 为 6.0 左右,与目前最常用的来源于黑曲霉的糖化酶的最适 pH(4.0~5.0)差别较大,淀粉用淀粉酶水解后获得的液化液用于糖化前需要调整 pH 值,因此获得耐酸性的耐高温 α -淀粉酶对改进淀粉转化工艺有重要意义。沈微、华国强等将嗜热古菌(*Pyrococcus furiosus*) 的胞外 α -淀粉酶结构基因插入酵母菌表达载体中多克隆位点,重组质粒转入酿酒酵母中成功表达出高嗜热 α -淀粉酶活性:具有较高的热稳定性,且最适 pH4.5~5.0,与来源于黑曲霉的糖化酶的最适 pH(4.0~5.0)相近,淀粉用淀粉酶水解后获得的液化液用于糖化前不需要调整 pH 值^[2]。

施旺酵母产的 α -淀粉酶具有最明显脱脂活力,即 α -1,6 糖苷键水解活力,这是葡萄糖淀粉酶催化活力的一部分,可部分代替葡萄糖淀粉酶的功能。并且该酶可在 60℃被不可逆灭活,可以方便地灭活,不影响后续工艺。这在酿酒和面包工艺过程中显示出特殊的优点^[3]。王永吉、刘宏迪等从西方许旺酵母中克隆到 α -淀粉酶基因,并利用其自身的启动下,将其克隆入表达载体中,转化酿酒酵母,获得了高效表达并分泌 α -淀粉酶,水解利用淀粉的啤酒酵母生产菌株^[4]。

构建分解淀粉的酿酒酵母的另一方面工作集中于将糖化酶基因引入酿酒酵母中。糖化酶即葡萄糖淀粉酶,是一种外切型糖苷酶,从淀粉的非还原性末端依次水解 α -1,4 糖苷键,切下一个个葡萄糖单元。对于支链淀粉,当遇到分支点时,它也可以水解 α -1,6 糖苷键,由此将支链淀粉水解成葡萄糖。

丝状真菌如黑曲霉(*Aspergillus niger*),泡盛曲霉(*Aspergillus awamori*)和扣囊拟内孢霉(*Endomycopsis fibuligera*)等都含有糖化酶 cDNA 基因。

黑曲霉是产生糖化酶的著名菌株。在产酶真菌中比较而言,黑曲霉糖化酶具有较强的耐酸性和耐热性,pH3.0,60℃,3 h 后,黑曲霉葡萄糖淀粉酶仍然具有 40%以上的活力;它的最适反应温度为 50~60℃,最适 pH

值 4.0~5.0。

罗进贤等利用 PGK 基因启动子启动切除了 5'端非编码的黑曲霉糖化酶 cDNA,减少了 5'端非编码区可能形成的 RNA 二级结构对基因表达的影响,改造后的糖化酶基因在酵母中表达与分泌水平、水解淀粉的能力都高于未改造的糖化酶基因^[5]。并将酵母 Ty 转座子的 δ 序列,重组进入酵母整合型质粒,转化酿酒酵母,实现了稳定表达^[6]。用固定化增殖活细胞包埋技术,制成具有糖化酒化“双功能”含黑曲霉糖化酶 cDNA 基因的固定化酵母,增强了大生产基因工程菌的糖化酒化能力。经淀粉质料酒工业规模生产,可降低酒精工业生产成本,实现对传统工艺的改造和工业化应用^[7]。

唐国敏等克隆了黑曲霉突变株的糖化酶 cDNA,实现了糖化酶基因在酿酒酵母中的表达^[8],并将糖化酶基因连同酵母 α 因子启动子及其分泌序列整合到酿酒酵母的基因组内,实现稳定表达^[9]。另外还进行了 DNA 对多倍体的工业酵母的转化研究^[10]。为进一步提高表达分泌水平,将酵母 Ty 转座子的 δ 序列重组进入酵母整合型质粒,转化酿酒酵母^[11]。

泡盛酒曲霉是能产生大量生淀粉分解酶类而又无蛋白酶和葡萄糖苷酶活力的菌株,其糖化酶最适温度为 60℃,对食用乙醇和酒精饮料的生产工艺较为有利。王永吉等克隆了泡盛曲霉糖化酶 I 基因,将其置于酵母烯醇酶启动子和终止子之间,构建了表达载体,转化非营养缺陷型酒精酵母,获得了能利用淀粉发酵产生酒精的转基因酵母菌株^[12]。

扣囊拟内孢霉具有较强的糖化酶活性,并在 pH 值为 2.0~7.6 时完全吸附于生淀粉上,对生淀粉降解的最适 pH 为 4.5,但对煮沸过的可溶性淀粉的水解 pH 为 5.5。该菌与酵母属亲缘关系较近。刘玉方、陈玉梅从扣囊拟内孢霉中分离了糖化酶基因,构建直接利用淀粉的酵母工程菌,使其在酿酒酵母中表达^[13]。

同时用来自酵母如糖化酵母(*Saccharomyces diasteticus*)、施旺酵母、扣囊复膜孢酵母(*Saccharomycopsis fibuligera*)本身带有的糖化酶基因构建啤酒酵母工程菌也有研究。

糖化酵母与酿酒酵母亲缘关系很近,在营养繁殖时期能分泌糖化酶而能利用淀粉或糊精,使用这些菌株生产时有浓重的令人不快的酚醛气味,不能用于生产。但它产生的糖化酶比黑曲霉产生的糖化酶更不耐热,在发酵后巴斯德处理过程中更易失活,这对低卡值啤酒在贮藏中保持风味很重要。文立民等把糖化酵母的糖化酶基因转入到经改造的酿酒酵母中,获得成功表达^[14]。

施旺酵母不但 α -淀粉酶,脱脂酶活性很高,其糖化酶活性也很高。文立民等把施旺酵母糖化酶基因克隆到酿酒酵母中获得了能降解生淀粉的克隆,而且具有较高的

发酵速率和酒精忍耐力^[15]。

在发酵生产中,淀粉酶或糖化酶不能完全水解淀粉,只有两种酶同时作用,淀粉才得以完全糖化。Andries 及 Janse 将糖化酵母的糖化酶基因和降解淀粉芽孢杆菌的 α -淀粉酶基因转化酿酒酵母构建工程菌,发现两基因可以融合表达,产生双功能淀粉酶,其水解效率比单酶效率高。Andries 等人在 1995 年用同一质粒共表达降解淀粉芽孢杆菌的 α -淀粉酶基因、糖化酵母的糖化酶基因和肺炎克氏杆菌的支链淀粉酶基因,使酿酒酵母可以利用 99% 的熟淀粉,但不能利用生淀粉。Shibuga 也通过 PCR 扩增的方法获得 α -淀粉酶和糖化酶的融合基因,将其转化酿酒酵母,表达的双功能淀粉酶水解淀粉效率比两种酶混合作用效率高。1995 年, Moraes 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酿酒酵母中,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 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脂假单孢菌的异淀粉酶基因整合到酿酒酵母染色体上,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,缩短生产的糖化周期,降低外加淀粉酶的消耗。

罗进贤等人将切除了 5' 端非编码区的黑曲霉糖化酶 cDNA 与大麦 α -淀粉酶基因重组构建重组表达质粒,转化酿酒酵母,获得含 α -淀粉酶和糖化酶双基因的酵母工程菌,在酵母 PGK 基因启动子和终止信号的调控下, α -淀粉酶和糖化酶基因获得高效表达, 99% 的表达产物分泌至胞外^[16]。将地衣杆菌 α -淀粉酶与黑曲霉糖化酶基因同时引入酿酒酵母,构建的工程菌在酶的表达和分泌水平及降解淀粉的能力方面都很高,但淀粉水解的速率仍较低^[17]。后来用酶学性质与黑曲霉糖化酶较接近的大麦 α -淀粉酶取代细菌 α -淀粉酶,构建含大麦 α -淀粉酶和黑曲霉糖化酶双基因的酿酒酵母工程菌,实现 α -淀粉酶和糖化酶的高表达和分泌,淀粉水解时间从 6 d(10% 淀粉)缩短至 47 h(15% 淀粉)^[18]。

唐国敏等用黑曲霉酸性 α -淀粉酶的 cDNA,构建了由酵母醇脱氢酶(ADH1)启动子和终止子引导表达,酸性 α -淀粉酶自身信号肽序列引导分泌的表达元件,与黑曲霉糖化酶 cDNA 的表达元件同时插入由酵母 rDNA 序列引导同源整合型表达载体中,两个基因表达元件均整合到酒精酵母染色体,获得双功能酒精酵母工程菌^[19]。

2 外源淀粉水解酶在酵母中高效表达与分泌的因素

2.1 所选择的启动子

一般在构建载体时要组入强启动子。经常使用的启动子有糖酵解酶如 PGK(3-磷酸甘油酸激酶)ENO1(烯醇酶 1)GPD(3-磷酸甘油醛脱氢酶)ADC1(乙醇脱氢酶 1)和 MF α 1(信息素 α -因子)等基因的组成型启动子。诱导型启动子如 PH05(酸性磷酸酶 5)半乳糖代谢途径 GAL1(半乳糖激酶)GAL10(UDP-D-半乳糖激酶)半乳糖 4-差向酶等基因的启动子也被使用。但有时强启动子启动外源基因转录会造成细胞中表达产物含量过高,而对细胞形成伤害。对于胞外淀粉酶基因的表达,使用组成型启动子优于诱导型启动子,因为酵母产生的组成型淀粉酶将分泌到培养液中,避免了外源蛋白质在细胞内积累而引起对细胞生长的抑制。

2.2 合适的酵母受体系统

由于大部分实验室所用的酿酒酵母中带有糖化酶基因的抑制基因,因此需构建淀粉酶和它的抑制基因都不存在的酵母作为受体菌。

2.3 外源淀粉酶蛋白的分泌信号

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。用于酿酒酵母工程菌构建研究的分泌序列通常来自其本身的分泌蛋白的信号序列,如 α -因子前导肽序列,蔗糖酶、酸性磷酸酯酶的信号肽序列。其主要功能是引导分泌蛋白从细胞内转移到细胞外,并对蛋白质翻译后的加工起重要作用。

2.4 外源淀粉酶基因的遗传稳定性

外源淀粉酶基因转化酿酒酵母,可随质粒自主复制表达,也可随酵母染色体一起复制表达。由于在生产中大量表达外源蛋白的过程不可能在选择培养基中进行,因而表达载体在没有选择压力的情况下能否稳定保持就很重要。

外源淀粉酶基因在细胞中的拷贝数会影响相应 mRNA 总量,对于非整合型质粒来说,增加表达载体在细胞中的拷贝数会提高相应 mRNA 总量。早期在构建酵母表达载体时常用附加型质粒,这种载体的优点是其拷贝数和转化频率都较高,但在有丝分裂过程中有一定的丢失,稳定性稍差。使外源淀粉酶基因稳定遗传的最有效方法是构建整合型质粒将其整合到酵母染色体上,提高其遗传稳定性。

尽管整合型质粒一般都是单拷贝或少数几个拷贝整合,携带的外源基因在酵母细胞中的拷贝数远小于附加型的拷贝数,但当外源基因表达与细胞染色体 DNA 的复制相关连时,翻译产物在分泌途径中的后加工效率会大大提高,因此整合型转化子的外源基因分泌有可能与附加型质粒相当或更高。如果在整合型质粒上引入酵母基因组的重叠序列作为外源基因靶向整合所需的同源序列,则有可能提高外源基因在酵母基因组中整合的

拷贝数,从而更进一步提高外源基因的表达水平。

已知酿酒酵母染色体 DNA 上含有数十个非随机分布的 δ 序列,如果使用含 δ 序列的整合型质粒进行转化就有可能获得多拷贝整合,有利于提高目的基因的表达水平。

罗进贤、唐国敏等都将酵母 Ty 转座子的 δ 序列作为同源序列引入整合型质粒,转化工程菌后外源基因获得高效表达,并高拷贝整合进宿主染色体,产物分泌到胞外。获得的工程菌遗传稳定性高,淀粉水解和酒精生产能力也很强^[6,9]。

rDNA 在酵母基因组中有 100~200 个重复单元,以顺向串联方式排列,如以此作为整合位点,则给载体提供了更多的整合机会,克服了通常整合型质粒一般都是单拷贝或少数几个拷贝整合的局限,同时又保留整合型质粒稳定性好的特点。唐国敏等在酵母整合型表达载体中,插入酵母 rDNA 序列,获得同时表达胞外酸性 α -淀粉酶和糖化酶的双功能酒精酵母工程菌,获得的工程菌遗传稳定性高,淀粉水解和酒精生产能力也很强^[19]。

Cha 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。

2.5 生长介质

Biro 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。

张小里等在摇瓶培养条件下,研究了氮源对含重组酿酒酵母生产 α -淀粉酶的影响。结果表明:分泌表达 α -淀粉酶不仅要求启动子作用,而且亦需要较为丰富的培养基为蛋白质合成及分泌作支持。在葡萄糖去阻遏条件下必须有天然氮源存在,基因表达才能被诱导。在酵母膏、蛋白胨和玉米浆等几种天然氮源中,酵母膏诱导分泌表达效果最好,另两种天然氮源亦可诱导分泌表达,但天然氮源的添加浓度必须适中,以防止某些未知组分抑制工程菌生长和基因表达^[20]。这些结果为工程菌的大量培养积累了资料,期待通过发酵罐高密度培养并结合氮源和碳源的适当流加,实现 α -淀粉酶的高效生产。

3 讨论

虽然构建分解淀粉酿酒酵母的工作已取得相当大的进展,但仍存在不少问题需要解决,构建的多数菌株

利用糊精及淀粉的能力是有限的,而且降解速率较慢。由于表达的淀粉酶只有 α -1,4 糖苷键和 α -1,6 糖苷键,而淀粉的快速、完全水解需要酵母菌能同时产生 α -淀粉酶、糖化酶和脱脂酶,那么外源淀粉酶基因在酿酒酵母中的表达量需要多高,各种水解酶需要怎样的组合才能得到满意的协同糖化和发酵速率以及较高的淀粉利用率都需要进一步探讨。从利用淀粉生产酒精方面考虑,受体菌应选择乙醇耐受性高且发酵速度快、生活力强的工业生产菌株,控制淀粉酶基因表达的酵母启动子应是不受淀粉水解和发酵过程中产生的葡萄糖抑制的高效组成型启动子,且表达框应多拷贝整合插入到酵母染色体上,以便得到高产稳定的水解淀粉的菌株。淀粉价格低廉、淀粉含量高的农作物在我国很多,构建直接分解和利用淀粉的酵母工程菌,可简化工艺、节省能源和酶制剂、降低成本,有重要的应用前景。

参考文献:

- [1] Ryoichi N, Tadayuki I, Shuichi A. Appl Microbiol[J]. Biotechnol, 1986 (23):355-360.
- [2] 沈微, 华国强, 王正祥, 等. 古菌(*Pyrococcus furiosus*)嗜热 α -淀粉酶基因在酿酒酵母中的表达[J]. 微生物学通报, 2003, 30(3):22-25.
- [3] Tuite M F. Strategies for the Genetic Manipulation of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Crit Rev Biotechnol, 1992(12):157-188.
- [4] 王永吉, 刘宏迪, 孙彤, 等. 西方许旺酵母 α -淀粉酶的基因克隆及其在啤酒酵母中的高效表达与分泌[J]. 中国科学(C 辑), 1998, 28(3):231-236.
- [5] 李文清, 罗进贤, 叶若邻, 等. 黑曲霉糖化酶 cDNA 的改造及其在酿酒酵母中的表达[J]. 微生物通报, 1998, 25(4):205-209.
- [6] 罗进贤, 叶若邻, 张添元, 等. 用基因重组技术构建可降解淀粉和产生酒精的酵母工程菌[J]. 食品与发酵工业, 2000, 26(5):1-4.
- [7] 吴淑魁, 罗进贤, 陈海滨, 等. 固定化“双功能”酵母基因工程菌在酒精工业生产中的应用[J]. 酿酒科技, 2004(2):61-63.
- [8] 唐国敏, 龚辉. 黑曲霉糖化酶在酿酒酵母中的表达和分泌[J]. 生物工程学报, 1994, 10(3):213-217.
- [9] 唐国敏, 杨开宇, 等. 黑曲霉糖化酶基因在酿酒酵母中的整合及其在整合子中的稳定表达[J]. 生物工程学报, 1995, 11(4):321-324.
- [10] 唐国敏, 钟丽婵, 杨开宇. 具有糖化酶活性的工业啤酒酵母菌构建及其发酵特性[J]. 生物工程学报, 1996, 12(4):489-491.
- [11] 唐国敏, 郝乔然, 钟丽婵. 水解淀粉的酿酒酵母菌的构建[J]. 微生物学报, 1996, 36(4):250-255.
- [12] 王永吉, 刘宏迪. 泡盛曲霉 (*Aspergillus awamori*) 葡萄糖淀粉酶基因克隆及在酒精酵母中的表达与分泌[J]. 科学通报, 1997, 42(10):1099-1103.
- [13] 刘玉方, 陈玉梅. 糖化酶基因的克隆和在酿酒酵母中表达[J]. 微生物学报, 1996, 36(6):423-427.
- [14] 文立民, 于松涛, 李浩, 等. 糖化酵母糖化酶基因在酿酒酵母 (下转第 50 页)

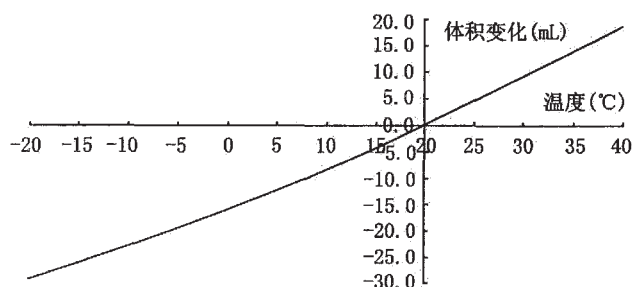


图 2 60%(v/v)白酒体积变化量与温度关系图

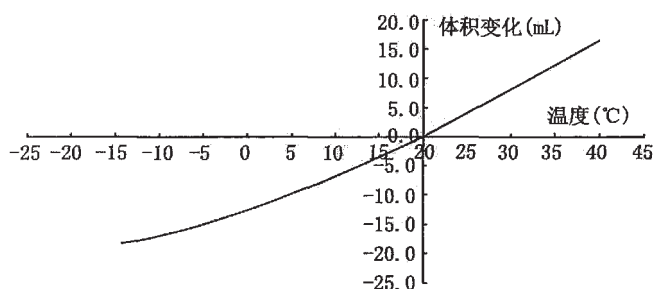


图 3 45%(v/v)白酒体积变化量与温度关系图

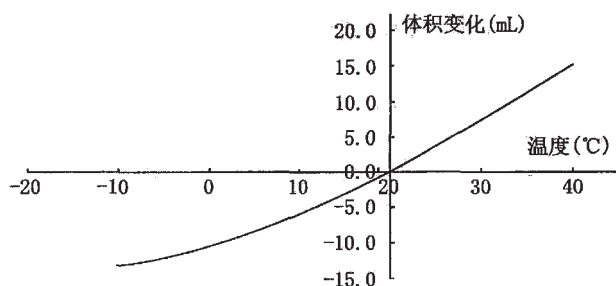


图 4 38%(v/v)白酒体积变化量与温度关系图

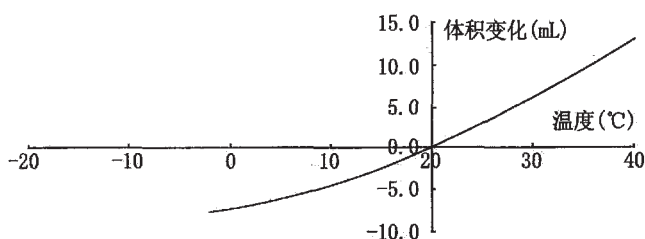


图 5 29%(v/v)白酒体积变化量与温度关系图

上,温度每增加 5℃,体积增大约 4 mL;0℃以下,温度每下降 5℃,体积减少约 3 mL。

②45%(v/v) 的白酒体积变化量的规律:0℃以上,

温度每增加 5℃,体积增大约 3.5 mL;0℃以下,温度每下降 5℃,体积减少约 2 mL。

③38%(v/v) 的白酒体积变化量的规律:0℃以上,温度每增加 5℃,体积增大约 3 mL;0℃以下,温度每下降 5℃,体积减少约 2 mL,但-10℃以下,体积几乎不变化。

④29%(v/v) 的白酒体积变化量的规律:0℃以上,温度每增加 5℃,体积增大约 2 mL;0℃以下,体积几乎不变化。

3.4 现象透析

根据 3.3 的内容,我们就很容易理解这样的一种现象。在冬季,人们对北方地区 52%(v/v) 500 mL 白酒进行净含量检测,往往检测的结果在 480 mL 左右。我们知道,北方地区冬季的平均气温一般在-5~-15℃,所以,对于在 20℃下灌装的 500 mL 的白酒来说,若气温为-8℃,则将会减少 20 mL 左右,所以实际检测的结果为 480 mL 左右,但应属合格产品。

4 应用实践

从分析结果来看,不同酒度的白酒,在不同的灌装温度下,其净含量有不同的变化。1995 年 12 月 8 日,国家技术监督局令第 43 号《定量包装商品计量监督规定》第七条标明:以体积标注的定量包装商品,应当为 20℃条件下的体积^[3]。所以,在灌装时仅仅注意容量的控制是不够的,还要与温度结合起来考虑。即使在夏天灌装 52%(v/v) 的酒,净含量达到 504 mL,由于温度较高,所以也可能存在计量不足的风险;在冬天灌装时,净含量达到 502 mL,但由于温度较低,所以存在着过量灌装,给企业形成损失。

所以,应多在春、秋两季灌装,或者说,将灌装的温度控制在 20℃左右,这样可便于企业操作;冬、夏两季灌装时,要结合灌装时的温度,参照表 2 的数据,进行灌装生产,才能保证净含量符合要求。

参考文献:

- [1] 国际酒精表[M].北京:计量出版社,1985.
- [2] 白酒酒精换算手册[C].成都:四川省标准计量管理局,1988.
- [3] 国家技术监督局令第 43 号:定量包装商品计量监督规定 [C].国家技术监督局,1995.

- [18] 罗进贤,李政海.大麦 α -淀粉酶和黑曲霉糖化酶在酿酒酵母中的表达和分泌[J].中国科学(C 辑),1998,28(1):50-56.
- [19] 王海燕,秦浚川,王敖全,等.黑曲霉酸性 α -淀粉酶基因和糖化酶基因对工业酒精酵母的整合及其共表达[J].微生物学报,2004,44(4):483-486.
- [20] 张小里,赵彬侠,马政生,等.氮源对酵母工程菌株生产 α -淀粉酶的影响[J].化学工程,2000,28(6):31-34.

(上接第 47 页)

- 中的克隆和表达[J].食品与发酵工业,1999(4):20-25.
- [15] 文立民,于松涛,等.糖化酵母糖化酶基因在酿酒酵母中的克隆与表达[J].食品与发酵工业,1994(4):732-737.
 - [16] 吴晓萍,李文清. α -淀粉酶和糖化酶的表达及酿酒酵母工程菌的构建[J].中山大学学报(自然科学版),1999(2):80-84.
 - [17] 罗进贤,何鸣,李文清,等. α -淀粉酶和糖化酶在酿酒酵母中的表达和分泌[J].生物工程学报,1994,10(4):299-305.