固定化“双功能”酵母基因工程菌在酒精工业生产中的应用*

吴淑魁¹, 罗进贤², 陈海滨¹, 李文清², 叶若邻², 黄树华¹, 程少菊², 周玲¹

(1.广西柳州市京龙科技开发有限公司, 广西 柳州 545006; 2.中山大学生命科学院, 广东 广州 510275)

摘要: 应用基因克隆技术将黑曲霉产糖化酶基因cDNA转入经优化的受体菌(酿酒酵母京龙JL108号), 获得多株具有产糖化酶能力的酿酒酵母, 再经反复筛分、驯化获得JL1(YIp128D.17N), 采用变性PVA固定化增殖活细胞包埋技术, 将JL1制成具有糖化酒化“双功能”的固定化酵母, 大幅度提高细胞数, 增强了大生产基因工程菌的糖化、酒化能力, 载体产酶能力在10 u/g·h以上, 酒精发酵醪液中酶活达20 u/ml以上, 在年产5000 t的富川县酒精厂进行工业性生产应用试验, 技术指标完全达到并超过传统工艺的生产水平, 淀粉出酒率达55%以上。

关键词: 基因工程; 双功能菌; 固定化; 糖化酶基因; 酵母基因工程菌

中图分类号: Q78; TS262.2; Q814; TS261.1 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2004)02-0061-02

Application of Immobilized “Double Functions” Genetic Engineering Yeast in the Production of Alcohol

WU Shu-kui¹, LUO Jin-xian² and CHEN Hai-bin¹ et al.

(1. Jinglong Science & Technology Development Co. Ltd., Liuzhou, Guangxi 545006;

2. Life Science College of Zhongshan University, Guangzhou, Guangdong 510275, China)

Abstract: The gene cDNA of *aspergillus niger* (which produced saccharifying enzyme) was transferred into the optimized acceptor yeast (liquor-making yeast Jinglong JL108) by genic clone techniques. As a result, multiple strains of liquor-making yeast in possession of saccharifying enzyme-producing capability were obtained. After repetitive selection and domestication, the strain of JL1 (YIp128D.17N) was obtained. Then JL1 was made into immobilized yeast in possession of “double functions” including saccharifying capability and alcoholizing capability by the technique of denaturing PVA immobilized proliferation living cell embedment. The technique could greatly improve cell amount and strengthen saccharifying capability and alcoholizing capability of genetic engineering yeast in mass production. The enzyme-producing capability of the carrier was above 10 u/g·h and the enzyme survivability in fermented liquid was above 20 u/ml. The trial production in Fuchuan Grain Distillery with annual alcohol yield as 5,000 tons proved that the technical indexes had completely achieved or exceeded the corresponding indexes before. And the yield rate of amyllum was above 55%. (Tran. by YUE Yang)

Key words: genetic engineering; double functions yeast; immobilized; gene producing saccharifying enzyme; genetic engineering yeast

发酵法酒精生产中普遍使用的微生物菌种为酵母菌, 从自然界获得的酵母菌不能产生水解淀粉或糊精的酶类。因此, 在利用玉米、木薯、红薯等淀粉质原料生产酒精的过程中, 须经过液化、蒸煮、糖化等复杂工序, 添加由其他微生物合成的糖化酶制品, 方能使淀粉转化为还原糖, 被酵母所利用, 工艺复杂, 物耗高, 成本高。20世纪80年代, 国外有多个实验室开始克隆糖化酶基因, 并将之转化酿酒酵母获得表达^[1-3]。但由于表达水平不高, 淀粉水解率低, 无法进入实用阶段。

本项目在中山大学研究小组从事糖化酶基因克隆表达和酵母工程菌构建的基础上, 将含黑曲霉糖化酶基因的整合型表达载体YIp128D.17N转化柳州市京龙科技开发有限公司优选的酿酒酵母京龙108获得酵母基因工程菌JL1(YIp128D.17N), 并由京龙公司研制成能水解淀粉发酵酒精的固定化双功能酵母工程菌, 经淀粉质原料酒精工业规模生产, 效果良好, 可简化糖化工序, 节约糖化酶,

降低酒精生产成本, 实现了对传统工艺的技术改造和工业化应用, 并通过了科技成果鉴定。

1 材料与方法

1.1 受体菌(酿酒酵母京龙108号) 柳州市京龙科技开发有限公司提供。

1.2 黑曲霉糖化酶基因 中山大学生命科学院克隆。

1.3 京龙1(YIp128D.17N) 中山大学生命科学院提供。

1.4 固定化“双功能”酵母基因工程菌 柳州市京龙科技开发有限公司提供。

1.5 大生产使用原料和辅料 木薯, 淀粉含量63%~64%, 本地产; 耐高温淀粉酶2000 u/ml, 广东产; 硫酸, 浓度98%, 本地产。

1.6 酵母基因工程菌酒精发酵性能测试 将酵母基因工程菌接入米曲汁培养基中, 在31~32℃培养至对数生长期, 然后接入三角瓶液体培养基, 厌氧发酵3~4 d, 检测酶活及淀粉转化率。并与

* 广东省自然科学基金(940628), 广州市重点科技项目(96-226-2)及广西柳州市科技开发计划(20020106)资助。

收稿日期: 2003-07-16; 修回日期: 2003-09-24

经过蒸煮液化但未经糖化的木薯和玉米为原料制作的三角瓶培养基作对比。

1.7 实验检测方法 发酵液中酒精含量、残还原糖、过滤残总糖、带渣残总糖的测定见参考文献[4]。

醪液酶活按QB/T(1803-93)^[5]中糖化酶测定方法测定。酵母计数用血球计测定。

1.8 固定化酵母基因工程菌的工业性试验 试验地点为广西富川县酒精厂,生产能力5000 t/a。采用工艺条件如下:

1.8.1 粉碎工序:干法一级粉碎,原料粉碎粒度1~1.2 mm。

1.8.2 蒸煮工序:采用中温蒸煮,耐高温淀粉酶添加量4~5 u/g,1#拌料锅温度55~65℃,2#液化锅温度90±5℃,加热器温度105±2℃,液化率10%±2%,蒸煮醪冷却至28~30℃泵往发酵罐。

1.8.3 发酵工序:采用固定化连续发酵工艺,流加罐:1#、2#发酵罐,流加罐内添加硫酸,pH控制在3.3~3.7,温度31~34℃,后酵温度36℃以下。启动阶段或蒸煮醪粘度过大、泵料困难时,在糖化罐酌情添加糖化酶20~40 u/g,指标正常后逐步减少至停加。

1.8.4 成熟醪的蒸馏:成熟醪经三塔蒸馏流程后提出成品酒精,酒精质量均达食用酒精GB10343-89普级以上。

2 结果与讨论

2.1 酵母基因工程菌发酵性能分析(见表1~表3)

培养基	发酵时间(h)				
	12	24	48	72	84
木薯培养基	3.5	8.6	13.0	13.8	13.6
玉米培养基	2.8	8.5	12.6	12.7	12.9

注:10个批次平均值。

从最终发酵结果来看,未添加糖化酶时,木薯或玉米淀粉出酒率达52%以上,达到传统工艺发酵水平。这说明酵母基因工程菌具有很强的糖化能力,可以满足生产的需要。

醪液的酶活在48 h基本上达到峰值,随着发酵时间的延长,醪液中的酶活指标基本上不再升高,酶的代谢产物或其他产物是否

表2 木薯培养基发酵指标

时间(h)	发酵前淀粉浓度(%)	酒精度(% v/v)	带渣总糖(%)	过滤总糖(%)	还原糖(%)	糖转化(%)	淀粉出酒率(%)
68	17.2	10.7	1.2	0.72	0.10	103.6	
84		10.9	0.98	0.59	0.08	104.8	53.3

注:10个批次平均值。

表3 玉米培养基发酵指标

时间(h)	发酵前淀粉浓度(%)	酒精度(% v/v)	带渣总糖(%)	过滤总糖(%)	还原糖(%)	糖转化(%)	淀粉出酒率(%)
68	17.2	10.5	1.32	0.78	0.13	103.2	
84		10.8	1.08	0.50	0.10	104.3	52.8

注:10个批次平均值。

对酵母分泌的酶起到抑制作用,有待进一步探索。

2.2 固定化酵母工程菌载体的制备

固定化方法采用独特的变性PVA包埋技术,针对酵母基因工程菌的特点,对载体的结构及性能进行深入研究,反复试验不同的载体配方,确定了最佳的固定化载体制作工艺,使酵母基因工程菌的产酶速度及产酒能力得到充分发挥。

经过固定化,酵母基因工程菌在发酵过程中迅速大量增殖(酵母数达40亿个/g载体),形成强大的种源优势,为充分发挥酵母基因工程菌的糖化能力,实现工业化应用提供了必要的条件。

2.3 固定化酵母基因工程菌的产酶能力

取一定量增殖后的固定化酵母放入木薯液体培养基中,不加糖化酶,在31~33℃下培养,定时检测醪液中酶活,与游离酵母基因工程菌比较,其结果见表4。

表4 酶活力检测比较 (u/ml·h)

菌类	接种量(%)	24 h酶活	48 h酶活	72 h酶活	产酶速度(u/g·h)
游离酵母工程菌	5	7.9	13.8	14.1	6.5
固定化酵母工程菌	5	14.6	20.5	21.3	12.2

表5 广西富川酒精厂固定化酵母工程菌新技术应用指标

项目	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	合计	平均	
糖化醪	锤度(BX)	13.9	15.6	14.2	16.2	16.7	14.8	15.2	15.5	16.8	15.7	154.6	15.5
	还原糖(%)	4.3	3.1	3.80	4.05	3.34	5.2	4.56	5.9	3.2	3.3	40.8	4.08
	DEX(%)	31	19.87	27	25	20	35	30	30	19	21	276	27.6
1#罐	锤度(BX)	5.8	6.5	6.9	7.4	7.9	4.9	5.6	5.5	6.8	6.5	63.8	6.38
	酒分(% v/v)	4.8	3.8	3.9	4.5	4.0	5.4	4.8	5.2	4.4	4.2	45	4.5
	挥发酸(%)	0.025	0.012	0.009	0.010	0.007	0.006	0.0084	0.0072	0.015	0.0108	0.110	0.011
	还原糖(%)	6.7	1.95	1.78	2.30	2.10	1.25	1.8	1.5	2.45	2.10	18.9	1.89
	pH	2.9	3.1	3.4	3.4	3.5	3.6	3.4	3.5	3.0	3.7	33.3	3.3
成熟醪	锤度(BX)	0	-0.1	-0.4	-0.6	-0.5	-0.4	-0.3	-0.6	-0.3	-0.5	-337	-33.7
	酒分(% v/v)	7.6	8.6	8.0	9.1	9.4	8.4	8.6	8.7	9.5	8.7	86.6	8.7
	挥发酸(%)	0.040	0.029	0.02	0.018	0.022	0.027	0.021	0.019	0.021	0.023	0.24	0.024
	带渣总糖(%)	0.71	0.59	0.58	0.42	0.65	0.68	0.60	0.50	0.48	0.59	5.8	0.58
	过滤原糖(%)	0.52	0.38	0.25	0.28	0.31	0.40	0.37	0.35	0.32	0.39	3.57	0.36
生产成绩	残还原糖(%)	0.13	0.09	0.06	0	0	0	0	0.10	0	0	0.38	0.038
	发酵率(%)	90	91	92	92	92.5	93.1	92.8	91.5	93.5	91.6	920	92
	蒸馏率(%)												98.5
	淀粉出酒率(%)												55.3
	木薯单耗(t)												28.5
糖化酶单耗(kg)												1.1	

注:木薯淀粉含量63.4%。

(下转第64页)

性,有利于长期保存。

导致啤酒产生混浊的多酚物质来源于麦皮和酒花,主要是黄烷羟基衍生物类,其他酚类只有聚合成聚合物才能对啤酒混浊起作用;蛋白质和多酚形成混浊物主要是在重金属作用下氧化聚合而成的。

如何提高啤酒非生物稳定性的问题,在过去的研究中,人们始终以除去形成啤酒母体混浊物质如蛋白质、多酚类物质为主要内容。至今啤酒行业仍以硅胶或单宁除去蛋白质类物质,吸附多酚、花色苷类物质或以蛋白酶降解蛋白质等以求提高啤酒非生物稳定性,其结果并不令人满意。但蛋白质、多酚类物质作为啤酒的有效成分,过多的除去会影响啤酒的口感和泡沫,而且这些物质又是人体所必需的。

2 Vb-Na抗氧化剂

Vb-Na为新型天然抗氧化保鲜稳定剂,其作用机理,一是螯合金属离子,生成难溶的螯合沉淀物,经过滤而除去,能消除二元多酚氧化聚合物的催化剂;二是快速有效地除去啤酒中的溶解氧,防止多酚类物质的氧化聚合,使之不能形成聚合物的前驱物质。Vb-Na的作用机理不是除去啤酒中的蛋白质和多酚物质,而是除去啤酒中的溶解氧和啤酒中的金属离子,防止多酚类物质的氧化、聚合,消除金属离子催化加速作用,从而提高啤酒非生物稳定性,提高啤酒的风味质量,延长啤酒保质期。

因此,Vb-Na可阻止单宁花色苷多酚物质的聚合,这样一来就不用加甲醛。另外,Vb-Na是从可食性植物中提取的天然抗氧化因子及其衍生物,属维生素B族,与其特有的相乘性物质络合而成的新型天然抗氧化保鲜稳定剂。广泛应用于啤酒行业,在防止啤酒氧化、控制啤酒贮存过程中的双乙酰回升、提高非生物稳定性和风味稳定性、延长啤酒保质期都具有极为显著的效果,同时对防止啤酒杀菌后出现的“泡沫环”亦有良好的效果。添加该产品对啤酒的口感、泡沫等均无任何副作用。

产品状态:白色晶状粉末,有吸潮性,易溶于水或啤酒。

2.1 Vb-Na的主要成分

维生素B族及其他天然物质。

pH值:5~6

氯化物(以Cl计): ≤ 0.05

重金属(以Pb计): ≤ 0.003

砷(以As计): ≤ 0.0003

2.2 Vb-Na的功效及其特点

2.2.1 抗氧化保鲜

目前啤酒行业通常使用Vc、异Vc钠、葡萄糖氧化酶、亚硫酸盐以及它们的组合物等抗氧化剂来控制成品啤酒的氧化,可这些化学抗氧化剂不仅对啤酒口味有不同的副作用,而且没有一种能使啤酒在保质期内始终保持新鲜。如果啤酒溶解氧在2.0 g/L以上时,即使添加普通抗氧化剂,啤酒仍然迅速氧化。

Vb-Na新型天然抗氧化稳定剂,它能够很好地除去啤酒中的溶解氧,螯合啤酒中的金属离子,所以它的抗氧化效果迅速持久。如果使用量适当,它的抗氧化效果和抗氧化持久性优于任何一种抗氧化剂。即使在啤酒高溶解氧(2.5 mg/L以上)含量情况下,同样可使啤酒在保质期内保持新鲜口味,彻底去除啤酒的老化味。

Vb-Na新型天然抗氧化保鲜稳定剂,由于能高效持久地除去啤酒中的溶解氧和瓶颈氧,使啤酒中含氧量在杀菌后始终处于低水平,从根本上彻底解决了成品啤酒双乙酰回升的难题。实践证明,即使啤酒中的溶解氧在2~5 mg/kg时,添加本品70 mg/kg,成品啤酒贮存4个月时,双乙酰仅回升0.01 mg/kg。能保证成品啤酒在保质期内双乙酰不超标,没有啤酒老化味的回弹。Vb-Na是一种不可多得的啤酒抗氧化剂。

2.2.2 防止双乙酰回升

啤酒中双乙酰含量的高低是啤酒质量的重要标志,也是判定成品啤酒级别的限定性指标,为了控制酿造中双乙酰及成品啤酒双乙酰回升,啤酒企业做了很多努力,甚至不惜使用价格昂贵的 α -乙酰乳酸脱羧酶来控制双乙酰的降解和回升。但令人遗憾的是都没有能够很好地解决成品啤酒双乙酰回升的问题。很多啤酒出厂时检验是优级品,但是随着长途运输和销售时间的延长,双乙酰回升超标,老化味严重,变为不合格品,不仅有损企业形象,而且也损害了消费者的利益。●

(上接第62页)

2.3.1 由于固定化载体内的酵母数多(>27 亿/g),产酶速度较快,醪液中最终酶活达20 u/ml以上,产酶速度比游离菌种快约1倍,最终酶活提高25%(以上)。

2.3.2 酒精生产中糖化酶的添加量约为100 u/g(以原料计,以下同),经计算,糖化酶在醪液中的酶活约为20 u/ml,而固定化酵母基因工程菌最终酶活超过20 u/ml,与添加糖化酶的量相当。

2.4 固定化“双功能”酵母基因工程菌在工业化生产中的应用
工业化酒精发酵结果见表5。

3 结论

根据小试及生产应用的验证,固定化“双功能”酵母基因工程菌的使用条件及能达到的生产技术指标如下:

3.1 本产品适用于木薯、玉米、红薯等淀粉质原料,也同样适用于糖蜜原料。

3.2 载体菌种优良,耐糖浓度达24%,耐酒精度达13%,耐酸

pH2.8。

3.3 固定化酵母增殖后产酶能力 >10 u/g·h。

3.4 生产中醪液糖化酶活力 >20 u/ml,淀粉转化率 $>105\%$ 。

3.5 载体酵母数 >27 亿/g,膨胀比 >2.0 。

3.6 固定化酵母抗污染能力强,生产稳定,有效使用期可达一年。

参考文献:

- [1] Ashiriri T, Nakamura M, Tanaka Y et al.[J]. Agric. Boil.1986,50: 957-694.
- [2] Cole G E, McCabe P C, Inlow D et al.[J]. Boil. Technology.1988, 6:417-421.
- [3] 李文清,何鸣,罗进贤.中国科学(B辑)[J].1994,24:942-947.
- [4] 蔡定域.酿酒工业分析手册[M].北京:中国轻工业出版社,1988.
- [5] QB/T(1803-93),工业酶制剂标准[S].