

二种重组 α -乙酰乳酸脱羧酶在啤酒生产中降低双乙酰的作用

尹 东 曾庆华 卢大宁 栾恒淳 黄百渠*

(东北师范大学遗传与细胞研究所 长春 130024)

李彦舫

(中国人民解放军农牧大学 长春 130062)

摘要: 利用已构建的含有短芽孢杆菌(*Bacillus brevis*)和产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*) α -乙酰乳酸脱羧酶(α -acetolactate decarboxylase, α -ALDC)基因的工程菌株,并使它们分别在大肠杆菌中高效表达,获得重组 α -ALDC。在实验室,用2L体积的麦芽汁进行啤酒生产试验,添加2种重组 α -ALDC后,使啤酒中的双乙酰含量快速下降到或始终保持在0.1mg/L以下。证明得到的重组 α -ALDC能有效地降低啤酒中双乙酰含量。

关键词: 短芽孢杆菌,产气肠杆菌, α -乙酰乳酸脱羧酶,双乙酰

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(1999)-06-0406-03

* 联系人, Fax: 0431-5687517, e-mail: huangbq@ivy.nenu.edu.cn

收稿日期: 1998-10-08 修回日期: 1999-01-14

APPLICATION OF THE RECOMBINANT α -ALDCs FOR REDUCING THE CONCENTRATION OF DIACETYL DURING BREWING PERFORMANCE

YIN Dong, Zeng Qinghua, LU Daming, LUAN Hengchun, HUANG Baiqu

(Institute of Genetics and Cytology, Northeast Normal University, Changchun, 130024)

Li Yanfang

(Changchun University of Agriculture and Animal Sciences of the Chinese People's Liberation Army, Changchun 130062)

Abstract: Two α -ALDC genes were cloned from *Bacillus brevis* and *Enterobacter aerogenes* by PCR amplification. Both genes over expressed α -ALDC in *E. Coli* DH5 α . In laboratory scale (2L) brewing with the recombinant α -ALDCs the formation of diacetyl in beer was much lower than control. The result indicated that the recombinant α -ALDCs caused a decrease in diacetyl production during beer fermentation.

Key words: *Bacillus brevis*, *Enterobacter aerogenes*, α -acetolactate decarboxylase, Diacetyl

α -乙酰乳酸脱羧酶(α -ALDC, EC4.1.1.5)可有效地降低啤酒中双乙酰的含量,加快啤酒成熟,缩短生产周期,提高设备利用率。由于双乙酰是啤酒成熟和质量的重要指标(优质啤酒双乙酰浓度一般在0.1mg/L左右),因此自80年代初期以来,有关 α -ALDC的研究一直受到重视。目前国外已有多个 α -ALDC基因被克隆^[1~5],国内也克隆了来自短芽孢杆菌的 α -ALDC^[6~7]。本文利用短芽孢杆菌(*Bacillus brevis*)^[7]和产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)的 α -ALDC基因构建的大肠杆菌工程菌株,制备出2种重组 α -ALDC。把它们分别用于实验室小型啤酒生产试验中,都成功地降低了啤酒中双乙酰的含量,从而证明得到的这2种重组 α -ALDC可进一步开发成能应用于啤酒工业的工业用酶。同时还对比了添加粗制的重组 α -ALDC与提纯的重组 α -ALDC以及添加时间对降低啤酒生产过程中双乙酰含量的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:带有短芽孢杆菌 α -ALDC基因的重组大肠杆菌DH5 α (pBVYI);带有产气肠杆菌 α -ALDC基因的重组大肠杆菌DH5 α (pBVYII)

由本室构建。

1.1.2 培养基:LB培养基和添加大量元素及微量元素的改良LB培养基。培养基大量元素母液($\times 20$): $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 184g/L; KH_2PO_4 60g/L; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2g/L; $(NH_4)_2SO_4$ 20g/L。培养基微量元素母液($\times 200$): $CuSO_4 \cdot H_2O$ 2mg/L; $MnSO_4 \cdot H_2O$ 2mg/L; $ZnSO_4$ 40mg/L; $CoCl_2$ 40mg/L; $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ 20mg/L。

1.1.3 发酵罐: Virtis公司产全自动发酵罐,罐容积2L。

1.2 方法

1.2.1 重组大肠杆菌表达培养: LB培养基200mL(DH5 α (pBVYII)的培养基需加大量及微量元素), Amp⁺。37 $^{\circ}C$ 过夜培养后,转入装有1800mL培养基的2L发酵罐中,37 $^{\circ}C$ 培养3~4h,然后将温度升到42 $^{\circ}C$,继续培养4~5h,整个发酵过程pH保持7.0。离心收集菌体。

1.2.2 菌体破碎及酶液制备:用0.85% NaCl洗涤菌体2次,0.85% NaCl将菌体沉淀悬起,用通化电子设备厂产超声机处理(75%功率)。DH5 α (pBVYI)的提取液加入乙酸钠缓冲液(pH4.6终浓度0.05mol/L),55 $^{\circ}C$ 水浴7min,离心后收集的上清即为粗制的短芽孢杆菌重组 α -ALDC-B。将粗制 α -ALDC-B经S-100层析柱

层析后,可得到纯化的重组 α -ALDC-B^[7], DH5 α (pBVYII)的提取液,离心后取上清,用饱和硫酸铵分级沉淀,收集饱和度在35%~75%之间的沉淀,即得到粗制的产气肠杆菌的重组 α -ALDC-E。

1.2.3 酶活力测定:按 Loken 等^[8]的方法测定酶活力大小。1u定义为30℃,pH6.0条件下,1min内,使 α -乙酰乳酸脱羧生产1 μ mol乙偶姻的 α -ALDC酶量。

1.2.4 重组 α -ALDC在啤酒生产中的应用:啤酒酵母和糖化处理的麦芽汁由长春阿尔卑斯啤酒厂提供,每罐装2L麦芽汁(罐容积2.5L),加酶量为100u/L。发酵时间4.5d,温度8℃,每12h测1次双乙酰含量。

1.2.5 双乙酰测定:双乙酰含量的测定参照管敦仪^[9]的方法进行。

2 结果与讨论

2.1 粗制和提纯的重组 α -ALDC对双乙酰的作用

每罐装2L麦芽汁,加酶量为100u/L。1号罐为对照,不加酶,2号罐加入提纯的 α -ALDC-B,3号罐加入粗制的 α -ALDC-B,4号罐加入粗制的 α -ALDC-E。整个发酵过程4.5d。结果表明,加入提纯的和粗制的重组酶都可使发酵过程中的双乙酰浓度始终保持在0.1mg/L以下(图1)。在啤酒工业中,若也能象实验室小型啤酒生产那样使用粗制的重组 α -ALDC酶制剂,那必会大幅度降低工业用重组 α -ALDC酶制剂

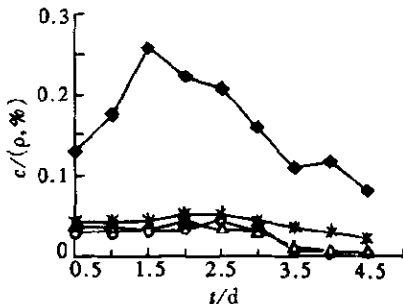


图1 提纯和粗制的重组 α -ALDC在啤酒生产中降低双乙酰的作用

—◆— 1号, —○— 2号, —△— 3号, —*— 4号

的生产成本并且提高酶制剂的生产产量。

2.2 添加粗制重组 α -ALDC-B的时间对双乙酰的作用

用3罐2L麦芽汁,加酶量100u/L。1号罐为对照,不加酶,2号罐加入粗制 α -ALDC-B,3号罐在发酵开始时不加酶,发酵36h后,待双乙酰含量达到最高时再加入粗制的 α -ALDC-B。从图2可见,在发酵中途添加粗制的 α -ALDC-B,双乙酰含量虽然较一开始就加入重组酶的略有提高,但是最终仍然降低到0.1mg/L以下,并且不影响发酵过程。

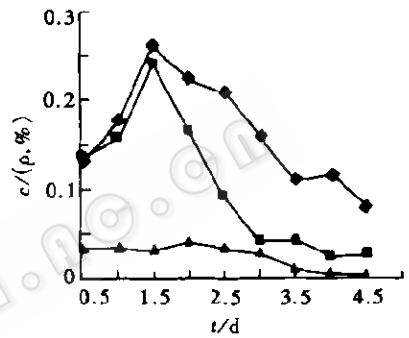


图2 添加粗制重组 α -ALDC-B的时间在啤酒生产中降低双乙酰的作用

—◆— 1号, —▲— 2号, —■— 3号

以上结果表明,我们制备的2种重组酶制剂,不管是粗制的,还是提纯的,不管是发酵一开始加入,还是发酵中途加入,都具有显著降低啤酒发酵过程中双乙酰含量的作用。如何使这2种重组 α -ALDC在啤酒工业中更有效的发挥作用,还有待进一步的中试研究。

参 考 文 献

- [1] Yamano S, Tanaka J, Inoue T. *J Biotech*, 1994, 32: 165~171.
- [2] Diderichsen B, Wedsted U, Hedegaard L *et al.* *J Bacteriol*, 1990, 127:4315~4321.
- [3] Sone H, Fujii T, Kondo K. *Appl Environ Microbiol*, 1988, 54:38~47.
- [4] Phalip V, Monnet C, Schmitt P *et al.* *FEBS Lett*, 1994, 351:95~99.
- [5] Goelling D, Stahl U. *Appl Environ Microbiol*, 1988, 54:1889~1891.
- [6] 陈炜,何秉旺,张建华等. *微生物学报*, 1997, 37(4):

270~275.

133~137.

[7] 尹东, 卢大宁, 黄百渠等. 生物化学与生物物理学报, 1998, 30(4): 325~329.

[9] 管敦仪主编. 啤酒工业手册(中册). 北京: 轻工业出版社, 1985, 234.

[8] Loken J P, Stormer F C. Eur J Biochem, 1970, 14: