

甘蔗糖蜜酒精高产酵母的发酵特性研究*

Studies on Alcohol Fermentation Features of a High-yield *Saccharomyces cerevisiae* Using Sugarcane Molasses as Feedstock

张穗生¹, 陆琦¹, 陈东^{1,2}, 黄日波¹

ZHANG Sui-sheng¹, LU Qi¹, CHEN Dong^{1,2}, HUANG Ri-bo¹

(1. 广西科学院非粮生物质酶解国家重点实验室, 国家非粮生物质能源工程技术研究中心, 广西生物炼制重点实验室, 广西南宁 530007; 2. 广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530003)
(1. State Key Laboratory of Non-food Biomass Enzyme Technology, National Engineering Research Center for Non-food Biorefinery, Guangxi Key Laboratory of Biorefinery, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China; 2. Life Science and Technology College, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530003, China)

摘要:采用 20L 三联装发酵罐进行甘蔗糖蜜高浓度酒精发酵研究高产酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) MF1001 菌株的甘蔗糖蜜酒精发酵特性。结果表明, 锤度为 20°Bx 的糖蜜对菌株生长和发酵均没影响, 发酵的适宜温度为 30℃, pH 值 4.0 的发酵效果明显优于 pH 值 3.80, 传代培养 16 代及不同的接种量对菌株的发酵没有影响。按目前甘蔗糖蜜酒精生产的发酵工艺, 用锤度为 20°Bx 糖蜜培养基培养菌株, 制备种子液, 然后将种子液与锤度为 55°Bx 的糖蜜培养基 1:1 混合进行发酵, 发酵 50h 的醪液酒精含量达到了 13.2%(V/V), 60h 达 13.8%(V/V), 72h 达 14.3%(V/V)。发酵结束时醪液可发酵残糖含量低至 0.44%, 发酵效率分别为理论值 88.6%(50h)、94.3%(60h) 和 98.6%(72h)。该菌株有望用于甘蔗糖蜜酒精发酵生产, 提高甘蔗糖蜜酒精发酵的醪液酒精含量。

关键词:酵母菌株 发酵特性 酒精 糖蜜

中图分类号:Q591, TQ926 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-9164(2010)04-0363-05

Abstract: The alcohol fermentation features of a high-alcohol-yield *Saccharomyces cerevisiae* strain MF001 was investigated using sugarcane molasses as feedstock. The results showed that 20°Bx sugarcane molasses did not defect the cell growth and fermentation of the strain, the optimum temperature for fermentation by strain MF001 was 30℃ and the alcohol fermentation at pH4.0 was better than that at pH3.8. Successive subcultures (16 times) and inoculation amount had a minor influence on the strain's alcohol fermentation. By using the industrial process of alcohol fermentation from sugarcane molasses, i. e., the strain was grown in medium of 20°Bx sugarcane molasses first for preparing the seed culture, followed by mixing the seed culture with medium of 55°Bx sugarcane molasses at 1:1 ratio to proceed fermentation, the alcohol concentration reached 13.2%(V/V), 13.8%(V/V) and 14.3%(V/V) after 50, 60 and 72h of fermentation, respectively. The residual fermentable sugar was low to 0.44% at the end of fermentation (72h). The conversion efficiency was 88.6%(50h), 94.3%(60h) and 98.6%(72h) of the theoretical alcohol yield. These results implied that it was potential for enhancing significantly the alcohol concentration of fermentation with sugarcane molasses as feedstock by using MF1001 in industry.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae* strain, fermentation features, alcohol, molasses

收稿日期: 2010-09-28

作者简介: 张穗生(1972-), 女, 博士, 主要从事微生物学研究。

* 科技部科技人员服务企业行动项目(2009GJE10002), 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科合 10100019-21, 桂科攻 1099071, 桂科转 10123005-17), 广西科学院科技攻关项目(桂科院研 0708), 广西科学院基本科研业务费项目(10YJ25SW15)资助。

糖蜜是蔗糖生产的副产物,在我国广西、云南和广东等主要蔗糖产区已经成为酒精生产的主要原料。我国甘蔗糖蜜酒精发酵的醪液酒精含量仍然较低,一般为10%(V/V)左右^[1,2],而且污染环境严重,生产每容积酒精会产生12~14倍容积,含COD 8~12×10⁴ mg/L, BOD₅ 4~6×10⁴ mg/L的蒸馏废液^[3,4]。对这些废液目前我国尚无可行的处理方法^[3]。提高甘蔗糖蜜酒精生产发酵醪液的酒精浓度,不仅可以提高设备的生产效率和劳动生产率,而且降低能耗和减少废液排放,对显著提高酒精生产的经济效益,具有重要意义^[5]。提高甘蔗糖蜜酒精生产发酵醪液的酒精浓度时,发酵液中的高浓度底物和酒精对酵母的生长和发酵均产生抑制作用^[6]。因此,提高甘蔗糖蜜酒精生产发酵醪液酒精浓度的关键是获得高性能的生产菌株。近年来,Gu等^[6]报道了1株酿酒酵母菌株1912,进行甘蔗糖蜜酒精发酵的醪液酒精含量达到了13%(V/V)以上,但是其发酵需要对糖蜜进行高温灭菌预处理,并不符合目前国内生产工艺的要求。我们从甘蔗糖厂的废弃物中筛选到多株甘蔗糖蜜酒精发酵高产菌株^[7],本文对其中MF1001菌株的糖蜜酒精发酵特性进行研究,为该菌株的产业化应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 酵母菌株

菌株由本中心保存,从甘蔗糖厂的废弃物中分离得到,命名为MF1001,经ITS序列同源比对鉴定为酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。

1.2 甘蔗糖蜜

甘蔗糖蜜来自广西凭祥市丰浩酒精有限公司,锤度83.5°Bx,总糖含量49.5%(W/V),非发酵糖含量4.29%(W/V)。

1.3 YPD培养基

将蛋白胨20g/L,酵母粉10g/L,葡萄糖20g/L,固体培养基添加20g/L琼脂粉,自然pH值,121℃灭菌20min制成YPD培养基。

1.4 糖蜜培养基

将糖蜜稀释至一定锤度,添加0.2%(W/W)尿素和0.02%(W/W)磷酸,用浓H₂SO₄调节pH值至3.6~3.8制成糖蜜培养基。甘蔗糖蜜培养基现配现用。

1.5 发酵条件试验

菌株用YPD培养基于30℃,180rpm下培养过夜活化2次,再培养至对数期菌龄,菌数10⁸/ml,接种不同锤度的甘蔗糖蜜培养基,进行不同条件的发酵

试验,发酵前24h,180rpm摇动后静置。期间定时取发酵液样品测定菌数、酒精浓度、总糖含量、还原糖含量等指标,考察不同条件对菌株糖蜜酒精发酵的影响。

1.6 甘蔗糖蜜高浓度酒精发酵

采用20L三联装发酵罐进行甘蔗糖蜜高浓度酒精发酵。菌株先用YPD培养基活化后培养至菌数10⁸/ml,接种A罐8L的20°Bx糖蜜培养基,接种量5%,30℃,60rpm搅拌,76L/min充气,培养16h。然后将A罐的培养液与B罐55°Bx的糖蜜培养基等量混合入C罐,开始连续发酵,二罐流出流量均为9.5ml/min,14h混合完成。发酵前24h搅拌、充气同A罐,24h后静置至发酵结束。从发酵开始定时抽样检测酒精含量、总糖含量和还原糖含量。

1.7 菌数计数

将菌液稀释10倍,用血球计数板计数菌株。

1.8 糖含量测定

取发酵醪液或培养基0.2ml于2ml离心管中,加入1.8ml蒸馏水,5mg碱性醋酸铅,反复倒置摇匀,12000rpm×5min离心,取上清100μl用DNS法测定还原糖。另取上清液1.0ml,加100μl 6mol/L盐酸,摇匀,70℃水解15min,冰水浴冷却,加120μl 20%的NaOH溶液中和,离心,取上清液100μl用DNS法测定总糖。DNS法测定还原糖按美国能源部的方法^[8]进行。可发酵糖含量由总糖含量减去非发酵糖含量求得。

1.9 酒精含量测定

以乙腈为内标,采用气相色谱法测定酒精含量。发酵液12000rpm×5min离心,取上清液0.6ml,加入等量10%乙腈,补蒸馏水至2.0ml体积,上气相色谱仪测定,根据乙醇和乙腈的峰面积计算酒精含量(% ,V/V)。

酒精含量(% ,V/V)=(乙醇峰面积/乙腈峰面积)×0.9936

式中:0.9936为换算常数,根据同一条件下测定乙醇和乙腈的标准曲线回归方程求得。

气相色谱条件:FID检测器,加热口温度250℃,柱箱温度100℃,检测器温度325℃,以氮气为载气,进样口分流比50:1,氮气总流量70.5ml/min,检测器氢气流量40ml/min,空气流量450ml/min。

1.10 发酵效率计算

按1g葡萄糖可发酵产生0.51g酒精,酒精的密度为0.789g/ml等参数,根据发酵的酒精产量和发酵开始时培养基的可发酵糖含量计算发酵效率,以理论值的百分数表示。

2 结果与分析

2.1 菌株在甘蔗糖蜜中的生长情况

MF1001 菌株于 YPD 培养基活化培养至对数期菌龄后接种至不同锤度的甘蔗糖蜜培养基培养,培养条件为 30℃,180rpm,菌株生长情况如图 1 所示。从图 1 可以看出,在锤度为 10°Bx 和 20°Bx 的甘蔗糖蜜培养基中培养 16h 时,菌数达最大值,分别为 2.31×10^8 /ml 和 5.49×10^8 /ml;在锤度为 30°Bx 的甘蔗糖蜜培养基中,培养前期菌株生长略受抑制,培养 16h 后生长正常,培养 24h 菌数最高,为 7.24×10^8 /ml。在锤度为 40°Bx 的甘蔗糖蜜培养基中,培养前期菌株生长明显受到抑制,培养 16h 菌株才开始生长,培养 56h 菌数达到最大值,为 4.26×10^8 /ml,表明 MF1001 经过一段时间的适应性培养后才能够 在锤度为 40°Bx 的甘蔗糖蜜中生长,但是生长速率较慢。

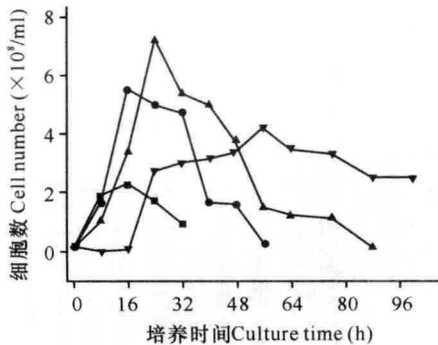


图 1 不同锤度甘蔗糖蜜对 MF1001 菌株生长的影响(二次实验的平均值)

Fig. 1 Effect of different Bx molasses medium on the cell growth of MF1001(Average of duplicate experiments)

■:10°Bx, ●:20°Bx, ▲:30°Bx, ▼:40°Bx.

2.2 不同锤度甘蔗糖蜜对菌株酒精发酵的影响

MF1001 菌株于 YPD 培养基活化培养至对数期菌龄后接种至不同锤度的甘蔗糖蜜培养基进行酒精发酵,发酵条件为 30℃,180rpm 发酵 24h,随后 30℃ 静置发酵至终止。结果(图 2)显示,随着糖蜜锤度增高,菌株产酒精的时间后延。锤度为 10°Bx 和 20°Bx 时,发酵 24h 醪液酒精含量达到最大值。锤度为 30°Bx 时,发酵 40h 醪液酒精含量达到最大值。而锤度为 40°Bx 时,发酵 88h 醪液酒精含量才达到最大值。醪液酒精含量也随着糖蜜锤度的增高而增高,说明 MF1001 菌株对高浓度甘蔗糖蜜也具有很强的酒精发酵能力,只是需要一定的适应时间。将菌株直接接种 20°Bx 的甘蔗糖蜜对酒精发酵几乎没有影响。比较图 1 和图 2 发现,糖蜜锤度对 MF1001 的生长和酒精发酵影响的趋势完全相同。

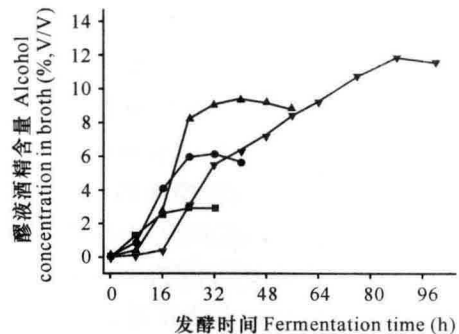


图 2 不同锤度甘蔗糖蜜对 MF1001 菌株酒精发酵的影响(二次实验的平均值)

Fig. 2 Effect of different Bx molasses medium on the alcohol fermentation of MF1001(Average of duplicate experiments)

■:10°Bx, ●:20°Bx, ▲:30°Bx, ▼:40°Bx.

2.3 温度对菌株糖蜜酒精发酵的影响

将 MF1001 菌株用 YPD 培养基培养过夜活化培养后接种于锤度为 20°Bx 的糖蜜培养基培养 8~10h 至菌数达 2×10^8 /ml,制备发酵种子液,然后与锤度为 55°Bx 的糖蜜培养基 1:1 混合,于 27℃,30℃,34℃,37℃和 40℃共 5 个不同温度下进行酒精发酵。结果(图 3)显示,前 24h,37℃发酵的醪液酒精含量最高,34℃次之,27℃和 30℃发酵的醪液酒精含量最低,但是二者没有显著差异($P > 0.05$)。发酵至 32~40h,27℃,30℃,34℃和 37℃共 4 个温度发酵的醪液酒精含量基本相同。发酵 40h 以后,27℃和 30℃发酵的醪液酒精含量继续上升,最高分别达到 $(12.59 \pm 0.25)\%$ (V/V)和 $(12.75 \pm 0.12)\%$ (V/V),而 34℃和 37℃发酵的醪液酒精含量则成下降趋势。40℃发酵的醪液酒精含量在前 16h 高于 27℃和 30℃,发酵 24h 后醪液酒精含量明显低于其它温度,而且在发酵 40h 后含量逐步降低。检测发酵醪液的可发酵残糖含量显示,5 个不同温度下发酵 60h 醪液仍含有 1%以上的可发酵残糖,说明 34~40℃下发酵 40h 后醪液酒精含量下降并不是糖分供应不足所致。因此,从整个发酵过程看,菌株糖蜜酒精发酵的最适温度为 30℃,发酵初期适当提高温度至 34~37℃可以加快发酵速率,40℃下菌株的酒精发酵受到明显抑制。

2.4 pH 值对菌株糖蜜酒精发酵的影响

根据目前工业上甘蔗糖蜜酒精生产通常采用酸性发酵工艺的发酵培养基初始 pH 值为 3.8~4.0,将 MF1001 菌株用 YPD 培养基培养过夜活化后接种至锤度为 20°Bx 的糖蜜培养基培养 8~10h,制备发酵种子液,再与锤度为 55°Bx 糖蜜 1:1 混合进行发酵,比较 MF1001 菌株在初始 pH 值 3.8 和 pH 值

4.0 的糖蜜酒精发酵效果。发酵条件为 30℃, 180rpm 发酵 24h, 随后 30℃ 静置发酵至终止。结果(图 4)显示, pH 值为 4.0 的酒精发酵效果明显优于 pH 值为 3.8 的酒精发酵效果, 二者具有显著的统计学差异 ($P < 0.01$)。跟踪监测醪液的 pH 值变化显示, 发酵过程醪液的 pH 值逐步上升, 发酵 48h 终结时的醪液 pH 值分别上升至 4.22 和 4.26(图 5)。

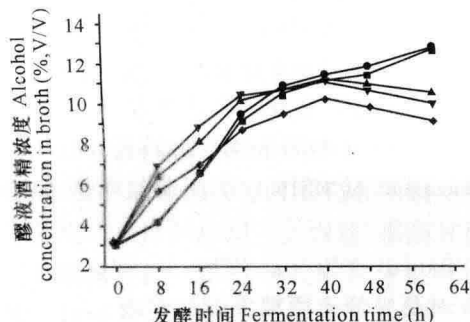


图 3 温度对 MF1001 菌株糖蜜酒精发酵的影响(二次实验的平均值)

Fig. 3 Effect of temperature on the alcohol yield of fermentation by MF1001 with sugarcane molasses as substrate (Average of duplicate experiments)

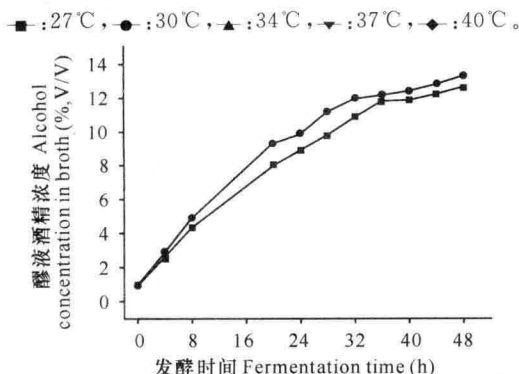


图 4 pH 值对 MF1001 菌株糖蜜酒精发酵的影响(二次实验的平均值)

Fig. 4 Effect of pH value on the alcohol fermentation of MF1001 with sugarcane molasses as substrate (Average of duplicate experiments)

■: pH 值 3.8, ●: pH 值 4.0。

2.5 传代和接种量对菌株糖蜜酒精发酵的影响

将 MF1001 菌株在 YPD 培养基传代培养 16 代, 每天 1 代, 然后以不同的接种量接种至锤度为 20°Bx 糖蜜培养基培养 8~10h, 至菌数为 2×10^8 /ml 后与锤度为 45°Bx 的糖蜜培养基 1:1 混合, 于不同温度下进行酒精发酵。发酵时间为 40h。结果(图 6)显示, 温度为 40℃ 的醪液酒精含量明显低于其余 3 个温度 (30℃, 34℃, 37℃), 与图 3 结果完全一致。菌株经 16 天传代培养后, 在 30℃, 34℃, 37℃ 和 40℃ 共 4 个温度下发酵的醪液酒精含量几乎没有变化, 与 0 代菌株相比没有显著差异 ($P > 0.05$), 说明 MF1001 菌株的甘蔗糖蜜酒精发酵性能比较稳定。4 个温度下,

不同接种量的醪液酒精含量也没有显著差异 ($P > 0.05$), 说明只要保证发酵种子液的菌数, 最初的接种量对菌株的糖蜜酒精发酵几乎没有影响。图 6 的醪液酒精含量最高只有 11% 以上, 不到 12%, 明显低于图 3 和图 4, 这主要是发酵的糖蜜锤度较小, 培养基的含糖量较低所致。

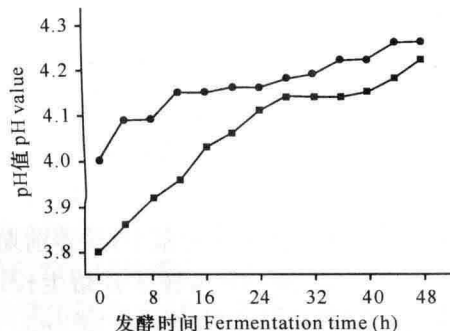


图 5 糖蜜酒精发酵过程的 pH 值变化(二次实验的平均值)

Fig. 5 Change in pH value during alcohol fermentation of MF1001 (Average of duplicate experiments)

■: pH 值 3.8, ●: pH 值 4.0。

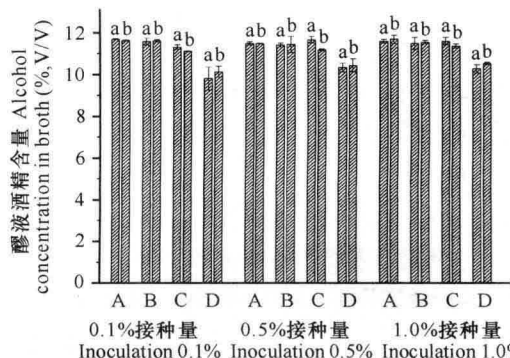


图 6 传代和接种量对 MF1001 菌株糖蜜酒精发酵的影响(二次实验的平均值和标准差)

Fig. 6 Effect of subculture and inoculation amount on alcohol fermentation of MF1001 with sugarcane molasses as feedstock (Average and standard deviation of duplicate experiments)

a: 0 代菌株, b: 传代培养 16 代菌株, A: 30℃ 发酵, B: 34℃ 发酵, C: 37℃ 发酵, D: 40℃ 发酵。

a: 0 generation, b: the strain that successive subcultured to 16 generations, A: fermentation at 30℃, B: fermentation at 34℃, C: fermentation at 37℃, D: fermentation at 40℃.

2.6 甘蔗糖蜜酒精高产发酵

根据上述实验结果, MF1001 菌株用 YPD 培养基活化并培养至对数期菌龄(菌数 2×10^8 /ml)后接种至 pH 值 3.7~3.8 锤度为 20°Bx 的糖蜜培养基, 培养 8h 至菌数为 10^8 /ml, 制备种子液, 将种子液与 pH 值 3.8~4.0 锤度为 55°Bx 的高浓度甘蔗糖蜜 1:1 混合, 进行酒精发酵。发酵条件为 30℃, 180rpm 发酵 24h, 随后 30℃ 静置发酵至终止。结果(图 7)显示, 醪液的残留总糖和残留还原糖含量随发酵进程逐

步减少,发酵前 40h 残留总糖含量下降速率较快,而残留还原糖含量下降速率相对平缓,此后二者的下降速率基本平行,说明醪液含有足够的糖分供菌株生长和乙醇发酵。发酵 72h 醪液的可发酵残糖含量为 0.44%(醪液残留总糖减去非发酵糖),说明菌株具有很强的利用糖分进行酒精发酵的能力。从酒精的变化情况看,发酵前 4h 醪液酒精含量增长缓慢,显示低锤度和高锤度的糖蜜混合后菌株存在一定的适应期。发酵 4h 至 40h 醪液的酒精含量快速增长,属菌株快速发酵期,此后酒精含量增长变慢。发酵 50h 的醪液酒精含量达 13.19%(V/V),60h 达 13.82%(V/V),72h 达 14.29%(V/V),其发酵效率分别为理论值的 88.6%(50h)、94.5%(60h)和 98.6%(72h)。我国的甘蔗糖蜜酒精发酵醪液的酒精含量一般只有 10%,最高为 11%^[1,2],发酵时间 45~50h。MF1001 的甘蔗糖蜜酒精发酵性能显著优于目前的生产菌种。

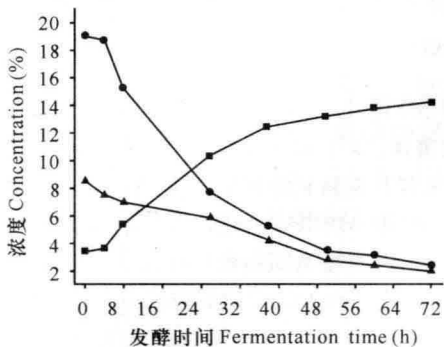


图 7 高产酵母高浓度甘蔗糖蜜酒精发酵参数变化(酒精、总糖、还原糖)

Fig. 7 Parameter changes of sugarcane molasses alcohol fermentation by the high yield yeast strain

■: 醪液酒精含量(% V/V), ●: 残留总糖含量(%), ▲: 残留还原糖含量(%).

■: Alcohol concentration in broth, ●: Residual total sugar in broth, ▲: Residual reduced sugar in broth.

3 结论

锤度为 20°Bx 的甘蔗糖蜜对高产酿酒酵母

(责任编辑:邓大玉)

法国科学家从理论上证明超流光可能性

超流液体很神奇,因没有摩擦力,它能以零阻力通过微管,而且会沿着容器壁向上流,甚至在表面形成一层液体薄膜。人们据此推测,神奇的超流光也可能存在,只是至今未能得到证实。据美国物理学家组织网最近报道,法国一个科学研究小组提出了一项实验,从理论上证明了光也能实现超流性传播。

法国科研人员在其设计的实验中观察到超流光,并认为光在非线性介质中存在超流临界速度。从动力学的观点来看,光通过非线性介质传播时,在纵向方向能直接沿着波导传播,而在横向方向能透过相邻波导传播,这在形式上就相当于一种玻色气体。当一束光脉冲以不同的速率通过光导阵列时,在空节处如果光被散射,就意味着产生了阻力,如果光通过了空节而没有改变形状,就没有阻力,也就是说光在做超流运动。通过计算,他们证实了在一定的低速率下,光的横向运动是零阻力超流动。当速率提高时,阻力过程就发生了,破坏了光波的一体性,超流现象也就随之消失。法国科研人员在光子与纳米结构实验室(LPN)实施他们提出的试验,并计划进一步研究超流光和基本的光量子理论之间的关系以及超流光与玻色-爱因斯坦凝聚间的关系。他们预测,超流性是光的普遍属性,并不限于实验设计的波导阵列中。

(据科学网)

MF1001 菌株的生长和酒精发酵几乎没有影响。菌株的最适发酵温度为 30℃,pH 值 4.0 的酒精发酵情况明显优于 pH 值 3.8,接种量和菌种传代对酒精发酵没有显著影响。MF1001 菌株用于甘蔗糖蜜酒精发酵的条件为:菌株先于锤度为 20°Bx 的甘蔗糖蜜中培养,制备种子液,然后与锤度为 55°Bx 的糖蜜混合进行发酵。发酵温度控制在 30℃,发酵前 24h 宜搅拌、充气,此后应静置发酵。按此条件,发酵 50h 的醪液酒精含量达到了 13%(V/V)以上,发酵结束的发酵效率达到了理论值的 98.6%。MF1001 菌株的发酵条件与现在有的工业生产基本相同,可以用于规模生产,以提高甘蔗糖蜜酒精的发酵水平。

参考文献:

- [1] 熊子书. 甘蔗糖蜜酒精酵母菌的筛选与应用[J]. 酿酒科技,1996,73(1),11-13.
- [2] 熊子书. 中国酿酒酵母菌的研究——不同酒类酵母菌筛选与应用纪实:上册[J]. 酿酒科技,2002,112(4),23-27.
- [3] 陆浩湘,朱涤荃,谢文化. 高浓度糖蜜发酵酒精废液浓缩焚烧技术[J]. 甘蔗糖业,2007(4):47-51.
- [4] 周桂,邓光辉,何子平. 糖蜜酒精废液综合利用进展[J]. 广西民族学院学报:自然科学版,2000,6(2),111-114.
- [5] 侯保朝,杜风光,郭永豪,等. 高浓度酒精发酵[J]. 酿酒科技,2005,130(4),93-96.
- [6] Gu Yansong, Qiao Min, Zhou Quan, et al. Hyperproduction of Alcohol Using Yeast Fermentation in Highly Concentrated Molasses Medium [J]. Tsinghua Science and Technology, 2001, 6(3): 225-230.
- [7] 陆琦,张德生,吴仁智,等. 三株甘蔗糖蜜酒精发酵高产酵母菌株的筛选[J]. 广西科学,2010,17(4):368~372.
- [8] National Renewable Energy Laboratory (NREL). Measurement of cellulose activities [M]// Laboratory analytical procedure, Lap-006 NREL, Golden Co, 1996.