

网络优先数字出版时间:2015-05-27

网络优先数字出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/45.1075.N.20150527.1525.001.html>

# 木薯酒精酵母菌种工程化选育的思路和方向<sup>\*</sup>

## Ideas and Orientation of Engineering Breeding of Yeast Strain for Cassava-ethanol

黎贞崇<sup>1,2\*\*</sup>, 梁雪强<sup>3</sup>

LI Zhen-chong<sup>1,2</sup>, LIANG Xue-qiang<sup>3</sup>

(1. 广西科学院, 广西南宁 530007; 2. 广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530005; 3. 广西研究生联合开发促进会, 广西南宁 530003)

(1. Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China; 2. College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530005, China; 3. Guangxi Graduate Association for Promotion of Joint Development, Nanning, Guangxi, 530003, China)

**摘要:**我国木薯酒精企业的发酵水平低,而国内酵母研究技术水平较高,但其选育的优良酵母菌种未能在企业得到推广应用,原因是高酒度等性能的酵母菌种需要改变现有工艺条件。因而,在不改变现有工艺条件下提高菌种的优良性能是木薯酒精酵母菌种选育的原则。本文在总结我国木薯酒精发酵技术现状的基础上,分析木薯酒精生产企业对酵母性能的要求,提出了现有工艺条件下酵母菌种工程化选育的思路和方向,为木薯酒精酵母菌种选育提供参考。

**关键词:**酵母 菌种 木薯酒精 选育 工艺条件

**中图分类号:**TK63, TQ926 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-7378(2015)02-0103-04

**Abstract:** There are advanced fermentation technology in research but not in cassava ethanol enterprises. However, the breeding yeast strain from research has not been applied in the enterprise because new bred strain requires the adjustment of existing process conditions. Therefore, the yeast strain improvement without changing the existing process conditions is the principle of strain breeding. Based on the analysis of the present situation of cassava ethanol fermentation technology in our country, the production enterprises of cassava ethanol fermentation characteristics were analyzed and some ideas of yeast strain breeding were put forward to provide reference for the breeding of cassava ethanol yeast under existing process conditions.

**Key words:** yeast, strain, cassava-ethanol, breeding, production process conditions

## 0 引言

广西是我国木薯最大产地,也是木薯酒精的主要加工地。木薯酒精产业自2007年以来,经历了原料上涨的巨大压力,企业一度面临着无利可图甚至亏损的局面。此外,木薯酒精企业技术水平普遍低下,其具体表现为发酵时间长、酒度低(9%~11%, V/V)、能耗仍然较高等。但也有个别企业的发酵技术水平先进,其酒度达13%(V/V)以上,能耗也有所降低。而导致大部分维持低发酵技术水平的企

收稿日期:2015-04-02

修回日期:2015-04-19

作者简介:黎贞崇(1970-),男,研究员,主要从事生物能源开发与利用研究。

<sup>\*</sup> 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科重14122004-4、桂科重1348004-4和桂科攻14124004-3-4)资助。

<sup>\*\*</sup> 通讯作者:梁雪强(1973-),男,硕士,高级工程师,主要从事环境工程研究。

业不积极引进高酒度、低能耗高发酵技术的原因,主要涉及木薯酒精酵母菌种的工程技术问题。本文在分析木薯酒精产业发酵技术现状的基础上,指出当前木薯酒精企业对酵母菌种优良性能的要求,提出在不改变现有工艺条件下木薯酒精酵母菌种工程化选育的思路和方向。

## 1 木薯酒精发酵技术现状

### 1.1 发酵时间长,压低了企业的产能

木薯淀粉必须经过液化和糖化后,才进入发酵阶段。发酵时间按接种和放料完毕为开始,泵送到蒸馏阶段为结束。连续发酵的成熟醪液产量通常按发酵有效容量除以流量来计算。根据此算法,现在木薯酒精的发酵时间为60~70 h,酒精企业设计生产线时,通常按70 h来设计。随着技术的进步和优良酵母菌种的选育成功,发酵时间大大缩短,这意味着发酵速度加快,企业产能提高。以5万t木薯酒精生产企业为例,发酵时间由70 h降为48 h,在蒸馏工艺允许的情况下,其产能可提高45.8%,年产木薯酒精达7.3万t。可见,根据现阶段的发酵时间来设计生产线,大大降低了企业的产能。

### 1.2 低酒度发酵导致能耗高,企业用水量

酒度是考核发酵的重要指标,低酒度发酵是指低于酒精企业清洁生产标准对发酵酒度要求的酒精发酵。根据清洁生产的要求,三级标准的发酵酒度要大于9%(V/V),一级标准要大于11%(V/V)。实际操作过程中,由于原料不同、技术工人水平不高、菌种不同等因素,部分企业通常达不到一级标准。发酵的酒度越低,每吨酒精的需水量越大,蒸馏需要的能源消耗越多。木薯干片的发酵酒度通常可达10%(V/V)以上,但鲜薯的发酵往往只能维持8%(V/V)的水平,导致企业的用水量加大,因此,在不改变发酵菌种和工艺的条件下,企业通常采用干片与鲜薯混合的方式维持发酵酒度在10%(V/V)左右。

### 1.3 高残糖的发酵水平导致企业污染物排放量大

成熟醪液中的酒度和残糖是企业的重要考核指标<sup>[1]</sup>。企业一般将残糖作为考核酵母发酵能力的重要指标。原料不同,其残糖的水平不同,但企业通常将残总糖水平定在2 g/100 mL以下,除非染菌,否则同样的酵母菌种,其发酵残糖基本稳定。按目前的技术水平和菌种的发酵能力,残总糖指标不应高于3 g/100 mL。过高的残糖说明糖份没有被充分利用,造成原料浪费,增加原料成本,此外,也会增加

废水的COD,进而增加企业排污物COD的总量。

### 1.4 菌种不稳定,需频繁换种,增加生产成本

木薯酒精发酵菌种的商品类型主要有活性干酵母、固定化酵母和游离酵母3种,大部分企业使用活性干酵母。固定化酵母换种花费时间长、成本高,对发酵过程的染菌控制要求极为严格,因而固定化酵母在市场的占用率不高。游离酵母发酵水平高、成本低,但对技术人员要求高,扩大培养所需时间长,故只有小部分企业采用游离酵母。活性干酵母换种、补种快,但发酵7~14 d后酵母易变形,导致发酵能力下降,需要及时补种或换种,频繁的换种将增加企业的生产成本。

## 2 木薯酒精酵母菌种选育的性能要求

目前,用于酒精发酵的菌种大多数属于酵母属的酿酒酵母、卡尔斯伯酵母及其变种<sup>[2]</sup>,由于传统的酵母存在上节提出的问题,因此,选育的木薯酒精酵母菌种应具备以下性能。

### 2.1 耐受性强,适合复杂的发酵环境

酵母菌的耐受性主要指耐高酒度、耐高糖和耐高温等性状。耐高酒度和耐高糖是为了实现浓醪发酵,耐高糖性能与高酒度发酵性能相关。对酵母耐高酒度和耐高糖的要求主要考虑发酵前期糖浓度高、后期酒精浓度高,酵母菌的生长受到糖和酒精的抑制,导致发酵不彻底;耐高温发酵是为了常年生产酒精,木薯酒精主产区夏天的温度在30℃以上,而普通酵母在30℃表现最佳,37℃后无法正常生产,因此,对耐高温的酵母有较强烈的需求。国内学者对酵母菌的耐高酒度研究较多<sup>[3~5]</sup>,对耐高糖和耐温酵母也有深入的研究,对高温发酵的研究主要集中在耐温酵母的筛选和改造方面。Cakar等<sup>[6]</sup>利用适应性进化策略,使得酿酒酵母耐受温度和耐受酒度分别提高89倍和42倍。Shi等<sup>[7]</sup>通过基因工程手段获得的突变菌株可以在温度高达55℃的平板中培养,在45~48℃条件下发酵生产酒精,酒度达12.58%(V/V),且具有耐受31.6%(V/V)酒精胁迫的能力。潘静等<sup>[8]</sup>经过紫外诱变获得3株对温度、酒度和pH值耐受性提高的酿酒酵母突变株,并以此进行原生质体融合,最终构建的突变菌株对温度和酒度的耐受能力分别提高17.1%和58.3%。

### 2.2 发酵酒度高且残糖低,符合浓醪发酵要求

木薯酒精发酵的高酒度和低残糖是清洁生产和企业对发酵水平判断的主要指标。高酒度发酵势必要求菌株能耐受高糖,国外在浓醪发酵技术方面远

远走在国内前面。刘建军等<sup>[2]</sup>以絮凝性强的葡萄汁酵母和高产酒精酵母做亲本,通过原生质体融合技术选育出高产酒精且发酵残糖低的絮凝酵母,其酒精产率可达 17.5%~18.5%(V/V)。Thomas 等<sup>[9]</sup>以小麦粉为底物,不添加其他营养成分,而仅通过扩大接种量,于 20℃ 发酵 170 h,酒度可达 21%(V/V),同时还证明死亡的酵母细胞可以为发酵提供营养成分。Kondo 等<sup>[10]</sup>通过分子生物学手段,将带有葡萄糖糖化酶基因的表达质粒 pGA11 导入酵母菌宿主 YF207 中,得到的菌株 YF207/pGA11 可连续 300 h 发酵生产酒精,且酒度达 18.96%(V/V)。Thomas 等<sup>[11]</sup>研究发现,在高浓度发酵条件下,加入渗透压保护剂,可以提高酒精产量和糖利用率。张书祥等<sup>[12]</sup>以瓜干为原料,通过添加氮源及其复合物能改善酵母生长环境,缩短发酵周期,提高酒精产量。黄宇彤等<sup>[13]</sup>研究了添加 Tween-80 和麦角甾醇的高浓度酒精发酵,酒度可以达到 15.32%(V/V)。

### 2.3 生产性能稳定,不易变形

生产性能稳定是酵母选育和研究的方向之一。活性干酵母和游离酵母的生产周期在 7~14 d,超过时间后由圆形变椭圆形,并伴随着发酵能力下降。生产企业常常将酵母出现变形和菌种数低于  $1.5 \times 10^8$  个/mL 作为换种的时间节点。糖蜜发酵专用酵母在生产性能稳定方面进展较大,其发酵换种周期可达 60 d 以上,大大减少换种成本和工作量。木薯酒精酵母在生产性能稳定方面研究较少。

### 2.4 繁殖速度快,有快速发酵能力

酵母的繁殖速度快是指酵母出芽快,其对数生长期短,能短时间内进入稳定期。酵母的繁殖快速有利于迅速形成优势菌落,从而形成微酸环境,抵抗杂菌的生长和繁殖。可见,酵母繁殖速度快,不但可有效缩短发酵时间,而且带来生产成本下降和产能增加的双重效应,对企业的影响最大,是酵母菌种选育的一个主要方向,在确保合理残糖和酒度的前提下缩短发酵时间,可提高生产企业的综合效益。但国内外在繁殖速度方面研究也少见。

## 3 木薯酒精酵母菌种工程选育的思路和方向

### 3.1 工程技术选育思路

本文所说的工程技术问题指尊重企业生产设备和工艺条件下的选育问题。例如浓醪发酵,不但需要解决耐受高酒度的酵母选育问题,还要解决除杂、高浓度粉浆输送、高浓度废液的固液分离和处理等

问题<sup>[14]</sup>,这些问题不是仅仅通过酵母选育就能解决,还需要改变设备和工艺条件。而大部分企业不愿也不可能去改变设备和工艺条件,因为一处小的改动可能触动全套工艺,企业不愿承担这种生产风险。所以,工程技术选育的思路是在不改动企业现有生产设备和工艺条件的前提下,有针对性地选育出具有单个或多个优良性状的酵母菌株,从而达到提高企业生产效率、降低能耗、减少废物排放的目的。

### 3.2 工程技术选育的方向

(1)性能稳定是生产企业最迫切的需求。以安琪活性干酵母为例,以木薯为原料生产酒精,其换种周期为 7~14 d,时间稍长菌种就会变形和酵母数量下降,发酵性能随之下降,挥发酸增多。生产企业希望获得长期不需要换种的酵母,以减少时间成本和菌种成本。因此,在确保不染菌的情况下,提供能长期稳定发酵的酵母菌种是研究工作者的一个主要研究方向,也是企业最迫切的要求。

(2)快速发酵是生产企业对酵母性能的重要需求。快速发酵菌株在生产中的优点,一是有利于酵母迅速形成优势菌群,抵抗杂菌的滋生,减少糖的不必要消耗,有利提高原料的转化;二是发酵时间缩短,提高设置的利用率,间接提高企业的产能;三是减少耗能,降低人力成本,提高生产效率和企业效益;四是减少硫酸的用量。由于能快速形成优质菌群,从而营造酸性环境,减少硫酸的用量。因而,具有快速发酵性能的酵母选育,将是研究工作者研究的热点。

(3)高耐受是生产企业对酵母性能较重要的需求。高耐受性的酵母菌种是科研工作者的研究热点,在耐高温、耐高酒度和耐酸方面有了较大的提高,但这些菌种并未能进入生产线。究其原因,一是企业大多已在发酵罐安装了冷凝装置,实现了温度的有效控制,对耐高温菌种的要求不高;二是绝大多数企业的发酵水平不高,其成熟醪的酒度为 10%~13%(V/V),无需耐高酒度的酵母菌;三是木薯酒精企业现在很少做到发酵液回用,对酵母菌的耐酸也不作要求。所以,生产企业对高耐受的酵母菌种,除耐高温有些要求外,其它暂无强烈的要求。

(4)低残糖也是企业对酵母性能较重要的需求。低残糖意味着原料的利用率高,酵母最大程度地将糖转化为酒精。生产企业将发酵糖和非发酵糖统一作为残总糖,一般要求在 2 g/100 mL 以下,可发酵残糖在 0.6 g/100 mL 以下。首先,延长发酵时间有利于可发酵糖的利用,但同时也会消耗酒精,降低成

熟醪的酒度,因而,当残总糖达 1.5 g/100 mL 后企业便停止发酵;其次,废液的厌氧发酵需要碳源,残糖是厌氧发酵的碳源来源,因此企业不会无限降低残糖。再次,由于克雷布特效应的存在,残糖低于一定的阈值后也会停止发酵<sup>[21]</sup>。因此,在成熟醪酒度不降低的情况下,尽可能降低可发酵残糖是企业所接受的。

#### 4 结语

研究工作者在高酒度、高耐受酵母的选育方面取得了突出的成绩,但一直无法在企业得到有效应用,研究与生产脱节。其原因是生产企业不愿意也不可能通过大规模改动现有设备和工艺条件进行技术升级,因为其面临着较大的投资风险和生产风险。所以,必须在不改变现有生产设备和工艺条件的原则下进行酵母优良性能的改造和选育。在这个思路下,性能稳定是酵母选育最为重要的方向,它有利于长期稳定生产,减少成本;快速发酵是酵母选育的重要方向,它有利于节能、降耗、减排;高耐受和低残糖是酵母选育较为重要的方向,虽部分企业现在对该性能的需求已不迫切,但它可以降低企业的生产成本和节能降耗。总之,具有快速发酵特征、性能稳定的酵母菌种是工程选育的优先方向,在此基础上,提高发酵酒度和降低残糖,从而提高酵母菌种的推广应用,解决影响木薯酒精发展的共性关键技术问题,更直接地为我国的木薯酒精产业服务。

#### 参考文献:

- [1] 黎贞崇, 师德强, 黄纪民, 等. 生物乙醇生产发酵成熟醪考核指标的修正[J]. 酿酒科技, 2014(2): 32-34.  
Li Z C, Shi D Q, Huang J M, et al. Correction of the evaluation indexes of mature mash in bio-ethanol production[J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2014(2): 32-34.
- [2] 刘建军, 赵祥颖, 姜鲁燕. 高产酒精絮凝酵母 SY-130 菌株的选育[J]. 酿酒科技, 2003(3): 34-36.  
Liu J J, Zhao X Y, Jiang L Y. Breeding of high alcohol-producing flocculating yeast strain SY-130[J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2003(3): 34-36.
- [3] 陈兰兰, 童军茂, 单春会. 高产酒精酵母菌株的筛选[J]. 酿酒科技, 2008(7): 36-38.  
Chen L L, Dong J M, Shan C H. Screening of yeast strains with high alcohol yield[J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2008(7): 36-38.
- [4] 刘建军, 姜鲁燕, 赵祥颖, 等. 高产酒精酵母菌种的选育[J]. 酿酒, 2003, 30(1): 37-39.  
Liu J J, Jiang L Y, Zhao X Y, et al. Breeding of high alcohol producing yeast strain[J]. *Liquor Making*, 2003, 30(1): 37-39.
- [5] 吴婷婷, 吴雪昌. 高乙醇转化率酿酒酵母工程菌株构建研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(8): 88-91.  
Wu T T, Wu X C. Progress in recombinant construction of *Saccharomyces cerevisiae* for improving ethanol production [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2006, 32(8): 88-91.
- [6] Cakar Z P, Urartu O S S, Candan T, et al. Evolutionary engineering of multiple-stress resistant *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *EFMS Yeast Research*, 2005(3): 569-578.
- [7] Shi D J, Wang C L, Wang K M. Genome shuffling to improve thermotolerance, ethanol tolerance and ethanol productivity of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Journal Industrial Microbiology Biotechnology*, 2009, 36(1): 139-147.
- [8] 潘静, 王昌禄, 李凤娟, 等. 多抗性酒精酵母菌的选育及特性研究[J]. 中国酿造, 2011, 5: 113-115.  
Pan J, Wang C L, Li F J, et al. Breeding and characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* conferred multi-tolerances [J]. *China Brewing*, 2011, 5: 113-115.
- [9] Thomas K C, Ingledew W M. Production of 21% (V/V) ethanol by fermentation of very gravity (VHG) wheat mashes [J]. *Journal of Industrial Microbiology*, 1992(10): 61-68.
- [10] Kondo A, Shigechi H, Abe M, et al. High-level ethanol production from starch by a flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain displaying cell-surface glucoamylase [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 58(3): 291-296.
- [11] Thomas K C, Hynes S H, Ingledew W M. Effects of particulate materials and osmoprotectants on very-high-gravity ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60(5): 1519-1524.
- [12] 张书祥, 肖亚中, 任杰, 等. 添加营养盐对酒精酵母发酵的影响[J]. 生物学杂志, 1997, 14(1): 23-25.  
Zhang S X, Xiao Y Z, Ren J, et al. The influence of adding nutrient on yeast alcohol fermentation [J]. *Journal of Biology*, 1997, 14(1): 23-25.
- [13] 黄宇彤, 伍松陵, 杜连祥. 玉米酒精超高浓度发酵工艺条件的优化[J]. 食品工业科技, 2002, 23(8): 66-69.  
Huang Y T, Wu S L, Du L X. Optimization of fermentation condition for high concentration corn alcohol [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2002, 23(8): 66-69.
- [14] 柳树海, 严明奕, 杜金宝, 等. 木薯酒精浓醪发酵技术的研究[J]. 轻工科技, 2012(1): 7-8.  
Liu S H, Yan M Y, Du J B, et al. Research on high concentration mash fermentation techniques for cassava alcohol [J]. *Light Industry Science and Technology*, 2012(1): 7-8.