

# 乙醇生产酵母菌的选育

杨登峰, 关妮, 米慧芝, 陆崎, 肖代俊, 黄日波

(广西科学院工业微生物技术研究中心, 广西 南宁 530003)

**摘要:** 巴西燃料乙醇取得巨大成功, 原油价格的不断攀升, 以及糖价的下跌, 以甘蔗为原料的燃料乙醇已经向世人展现出良好的市场潜力。但目前我国国内还尚未见到甘蔗汁乙醇的研究, 作为一项储备技术, 对甘蔗汁乙醇技术的研究具有十分重要的意义。本文对商业化和实验室筛选的多株酵母发酵甘蔗汁能力进行了研究。结果表明: sy 酵母生长速度较快, gw2 酵母产酒率较高, gw2 酵母死亡率较低。综上, sy 酵母和 gw2 酵母更适合于甘蔗汁发酵酒精的生产。

**关键词:** 乙醇; 酵母; 甘蔗汁; 发酵

中图分类号: TQ926; 文献标识码: A; 文章篇号: 1673-9078(2008)06-0506-03

## Breeding of a High ethanol-producing Yeast Strain

YANG Deng-feng, GUAN Ni, MI Hui-zhi, LU Qi, XIAO Dai-jun, HUANG Ri-bo

(Industrial Biotechnology Research Center, GuangXi Academy of Sciences, Nanning 530003, China)

**Abstract:** The production of ethanol by sugarcane juice fermentation had great meaning to the development of our economy due to the rising oil price and lower sugar price. In this paper, a high ethanol-producing strain was screened from several yeasts. Two yeast (gw2 and sy) were found to be suitable for the ethanol production via sugarcane juice fermentation for their higher ethanol-producing capabilities and lower mortality rate.

**Key words:** ethanol; yeast; sugarcane juice; fermentation

国际油价飞速上涨, 屡创新高, 这对以石油为主要能源进行生产消费的各个国家无疑带来巨大的影响。引发油价上涨有许多种原因, 然而这种情况导致国际社会对能源问题更加关注、重视, 并积极开展替代能源、可再生能源的研究和开发, 已经是迫在眉睫的当务之急。

燃料乙醇的生产与使用在国际上已有多年, 巴西是世界上最大的燃料乙醇生产国和消费国之一。到 2006 年, 巴西的燃料乙醇产量已达到 170 亿升, 其主要原料为甘蔗及其副产物, 占甘蔗总产量的 50%<sup>[1]</sup>。美国则是近年来燃料乙醇发展速度最快的国家。从 2000 年到 2006 年的 7 年里, 燃料乙醇产量从 16 亿加仑增加到 49 亿加仑, 增加幅度超过 3 倍。随着世界能源危机的日益突出, 美、巴、英、日、加、澳、印等国家都制定发展本国的燃料乙醇计划。燃料乙醇已成为世界各国发展再生能源的潮流, 其发展空间巨大。

我国在 2000 年启动燃料乙醇计划。2001 年 4 月 2 日, 《变性燃料乙醇》和《车用乙醇汽油》两项国家标

收稿日期: 2008-01-16

基金项目: 国家科技支撑计划资助项目(2007BAD75B05); 桂科攻(0630003A2)

作者简介: 杨登峰(1979-), 男, 助理研究员, 硕士, 主要研究方向: 微生物技术

准正式公布。2003 年, 我国燃料乙醇年产仅有 7 万吨, 至 2006 年, 已达到年产 100 多万吨, 专家预计 2010 年乙醇产能有望达到 700 万吨, 我国已迅速成为仅次于巴西和美国的全球第三大燃料乙醇生产国<sup>[2]</sup>。

以糖质原料生产燃料乙醇, 一直由于高昂的原料成本, 而被人们所忽视。广西作为全国最大的蔗糖生产基地, 年产蔗糖占全国总量的 60% 以上, 甘蔗的种植面积达 83.84 万公顷, 甘蔗产量 5925 万 t。然而, 在广西乃至国内尚未见以甘蔗汁为原料发酵生产燃料乙醇的研究报道。甘蔗乙醇作为一项储备技术, 非常有必要进行研究。

本实验以目前商品化的高温活性干酵母、市面上常用的酿酒酵母和本实验室自行筛选的高温酵母为出发菌株, 以甘蔗汁为原料进行单批次的酒精发酵。在发酵过程中, 研究了酒精发酵和酵母生长的各种参数, 其中包括酵母的生长速率、产酒率和死亡率等。通过这些参数的综合比较, 优选出适合甘蔗汁发酵的酵母, 为我们今后利用基因工程手段改造酵母提供优良的出发菌株, 同时为利用甘蔗汁发酵生产燃料乙醇提供相关的信息和技术支持。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料及菌种

新鲜甘蔗汁由广西农垦集团思源酒业和广西农业科学院甘蔗研究所惠赠。葡萄糖、硫酸、尿素、磷酸、次甲基蓝均购于上海国药集团化学试剂有限公司，分析纯。Yeast extract, tryptone 购于 Oxoid 公司。

安琪酿酒高活性干酵母购于食品添加剂市场，gw2 为本实验室保藏，酿酒酵母 sy 由广西农垦集团思源酒业惠赠，酿酒酵母 As 2.116 和 As 2.1189 购于中国普通微生物菌种保藏中心。

### 1.2 主要仪器

摇床, pH 计, 气相色谱, 紫外-可见分光光度计, 显微镜。

### 1.3 培养基及培养条件

种子培养基: YPD (Yeast extract 10%, tryptone 20%, 葡萄糖 20%)。

发酵培养基: 新鲜甘蔗汁。

种子液培养条件 (一般酵母): 28 °C, 160 r/min; 发酵液培养条件 (一般酵母): 30 °C, 120 r/min, 8 h 后, 静止。

种子液培养条件 (高温酵母): 30 °C, 160 r/min; 发酵液培养条件 (高温酵母): 34 °C, 120 r/min, 8 h 后, 静止。

### 1.4 发酵实验

从平板上挑取单菌落, 接入含有 3~5 mL YPD 的指形瓶中, 过夜培养。再以 1% 的接种量, 转接到含 100 mL 发酵培养基的 250 mL 的锥形瓶中, 每隔 4 h 取样 1 次, 发酵 24 h 后停止取样。

### 1.5 菌体 OD 值的测定方法

开启 Beckman DU800 紫外-可见分光光度计, 以未接种的 YPD 培养基为空白对照, 4 h 后取样品测其 OD<sub>600</sub> 值, 为确保其准确性, 将数值维持在 0.2~0.8 之间。以后每隔 4 h 测 1 次 OD<sub>600</sub> 值, 并记下读数。

### 1.6 菌体细胞直接计数的测定方法

菌体细胞数用血球计数板直接计数并计算<sup>[3]</sup>。

### 1.7 酒精含量的测定方法

使用 Agilent 6890 的气相色谱仪进行测定, 测定方法为内标法<sup>[4]</sup>。

### 1.8 死亡率的测定方法

采用美蓝染色法进行测定。取 0.1% 美蓝溶液 1 滴置载玻片中央, 再取稀释后样液 1 滴混合, 静止染色 3~5 min, 加盖玻片, 在显微镜下 (400×) 观察并计数被染色的酵母细胞数和总细胞数, 连续观察 5~6 个视野进行计算。

死亡率 = 被染色细胞数 / 总细胞数

## 2 结果与分析

### 2.1 酵母不同时期的生长速度

酒精发酵是一个群体的结果, 酵母数高必然导致高的发酵速度。因此, 酵母的生长速度快慢直接关系到发酵速度的快慢。

酵母的生长速度分为在酵母种子液中的生长速度和在酵母发酵液中的生长速度。酵母的种子液培养基为 YPD 培养基, 因而可以用菌体浓度反映酵母生长速度, 菌体浓度的测定方法见 1.5。通过测定, 结果如图 1 所示, 在 5 株酵母中, sy 酵母的菌体浓度在各个时期基本都是最高的, 其余 4 株酵母基本差别不大。在发酵 24 h 后, 5 株酵母基本达到同一个水平的浓度。所以, 酵母生长速度最快的是 sy 酵母。酵母发酵培养基为甘蔗汁, 由于在甘蔗汁中培养酵母, 无法用分光光度计法测定菌体浓度。因此, 采用直接计数的方法—用细胞数来衡量酵母的生长情况。结果表明, 在甘蔗汁中的生长情况基本和在 YPD 中相同, sy 酵母的生长仍是略快于其它酵母, 如图 2 所示。

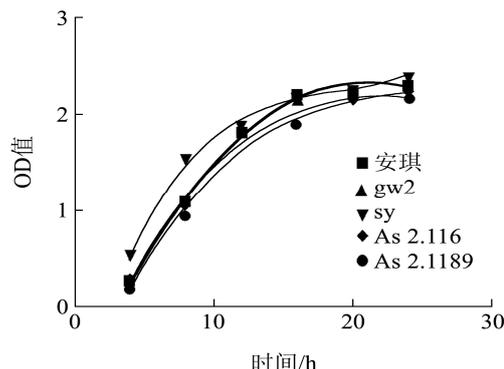


图 1 5 株酵母在 YPD 中不同时间的 OD<sub>600</sub> 值

Fig.1 Time course of the OD value of five yeasts in YPD

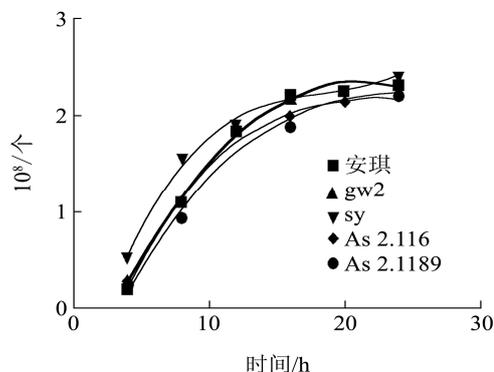


图 2 5 株酵母在甘蔗汁中不同时间的细胞数

Fig.2 Time course of cell numbers of five yeasts in sugarcane juice

### 2.2 产酒率

产酒率是酵母发酵能力的主要指标之一, 酒度

高说明酵母发酵能力强,糖的利用能力强。

由图3可以看到, gw2 酵母的酒精产量最高, 同时, 几株酵母均表现出良好的发酵蔗糖能力。约在 20~23 h 时, 达到酒精的最大产量; 在发酵到 25 h 后, 酒度开始回落, 说明酵母已利用完蔗糖发酵酒精。在无碳源时, 酵母利用酒精为碳源进行自身的营养供给。

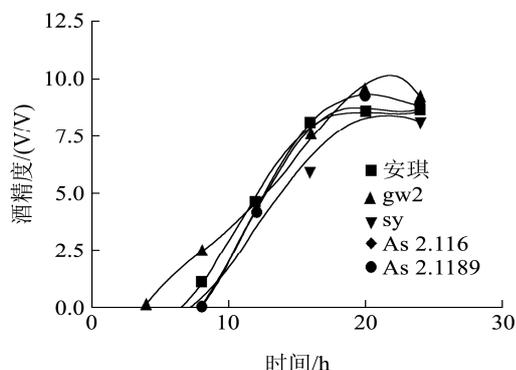


图3 5株酵母不同时间的酒度

Fig.3 Time course of alcohol degree of the fermented broth by five yeasts

### 2.3 死亡率

酵母的生长过程中,死亡是不可以避免的。但是,在正常的生产过程中,死亡率过高势必影响到酵母正常的酒精发酵。因此,对死亡率必须进行控制。对5株酵母发酵后期的死亡率进行了测定,主要是在20h

和24h时。如表1所示, gw2 酵母的死亡率较低, 同样是高温酵母的安琪酵母也表现出较低的死亡率, 这可能与本实验采取了较低的温度有关。

表1 5株酵母不同时间的死亡率

| 菌株 Strain | 安琪  | gw2  | sy   | As2.116 | As2.1189 |       |
|-----------|-----|------|------|---------|----------|-------|
| 死亡率/%     | 20h | 0.50 | 0.00 | 1.81    | 0.52     | 2.50  |
|           | 24h | 1.60 | 1.44 | 5.60    | 33.82    | 28.21 |

### 3 结论

综合以上这些因素, sy 酵母和 gw2 酵母比较适合发酵甘蔗汁生产酒精。

### 参考文献

[1] Andrietta M.G.S., Andrietta S.R., Steckelberg C., et al. Bioethanol-Brazil, 30 years of Proalcoo[J]. Intern Sugar, 2007,109 (1299): 195-200

[2] 夏芸,徐萍,江洪波,等.巴西生物燃料政策及对我国的启示[J].生命科学,2007,19(5):482-485

[3] 沈萍,范秀容,李广武.微生物学实验[M].高等教育出版社, 1998:90-92

[4] 张龙翔.生化实验方法和技术[M].北京:人民教育出版社, 1980

[5] Lin Pei-Ying, Whang Liang-Ming, Wu Yi-Ru, et al. Biological hydrogen production of the genus Clostridium: Metabolic study and mathematical model simulation[J]. International Journal of Hydrogen Energy,2007,32(12):1728-1735

[6] Altiook Duygu Tokatli, Figen Harsa, Sebnem. Kinetic modeling of lactic acid production from whey by Lactobacillus casei (NRRL B-441) [J]. Chemical Technology and Biotechnology, 2006,81 (7):1190-1197

[7] Carine Bideaux, Sandrine Alfenore, Xavier Cameleyre, et al. Minimization of Glycerol Production during the High-Performance Fed-Batch Ethanolic Fermentation Process in Saccharomyces cerevisiae Using a Metabolic Model as a Prediction Tool[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006,72(3): 2134-2140

[8] 黄红兵,朱品业,黄远芬.高效液相色谱法测定脾胃康胶囊中尿苷的含量[J].中国中药杂志,2003,28(1),35-36

(上接第534页)

通过对尿苷产生菌Tc142的5 L罐分批发酵数据进行分析,建立了菌体生长、基质消耗、产物形成的动力学模型。利用MATLAB软件对菌体浓度、残糖量、产物浓度数据进行非线性拟合,求解出动力学模型的参数,通过对所建立模型进行F检验,结果显示拟合效果显著,此模型和参数可以较好的反映菌株Tc142的菌体生长、底物消耗和产物生成的变化规律。

### 参考文献

[1] 姚志湘,伍时华,陈宁,等.L-亮氨酸分批发酵动力学研究[J].广西工学院学报,2003,14(3),5-11

[2] 程远超,刘康乐,徐庆阳.尿苷产生菌的选育[J].现代食品科技,2007,23(1),20-22

[3] 杜连祥.工业微生物实验技术[M].天津科技技术出版社, 1992

[4] Pratima Bajpai, Argyrios Margaritis. Kinetics of ethanol production by immobilized Kluyveromyces marxianus cells at varying sugar concentrations of Jerusalem artichoke juice [J].Applied Microbiology and Biotechnology, 1987,26(5):