

氮源与无机盐对高浓度酒精发酵的影响^{*}

吕 欣, 段作营, 毛忠贵

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

[摘 要] 在完全合成培养基条件下, 就尿素、硫酸铵 2 种氮源和硫酸镁、磷酸二氢钾、氯化钙 3 种无机盐对 1 株产高浓度酒精的酿酒酵母的间歇发酵影响进行了初步研究。结果表明, 与尿素相比硫酸铵是较好的无机氮源, 发酵终了酒精浓度可达 119.9 g/L; 并初步得到该株酵母发酵所需各无机盐的临界浓度分别为: 硫酸镁 5 g/L, 磷酸二氢钾 5 g/L (或 < 5 g/L), 氯化钙 5 g/L。

[关键词] 酿酒酵母; 无机盐; 氮源; 酒精发酵

[中图分类号] TS261.4⁺3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)04-0159-04

始于 20 世纪 70 年代的“能源危机”使人们开始认识到, 廉价的原油是会用完的, 利用可再生资源(如粮食或植物纤维)发酵生产酒精, 作为生物能源来代替或部分代替汽油被提上了议事日程^[1~3]。利用发酵法生产酒精, 获得高酒精含量一直是大家所追求的目标。目前, 以淀粉质原料作为发酵底物, 美国的酒精厂生产的酒精最终浓度可以达到 95 g/L 左右, 而我国大部分的酒精厂则只有 60~80 g/L^[2]。由于高浓度酒精发酵具有设备利用率高、节约能耗、成本低等优点^[4~8], 所以成为各国研究者研究的重点领域。本试验通过菌种筛选, 选出 1 株可进行高浓度酒精发酵的酿酒酵母, 发酵酒精浓度可达 118 g/L 以上, 高于目前国内外酒精工厂的实际生产水平, 具有在生产中应用的潜力。研究该株酿酒酵母的基本营养需求、发酵特性以及各种发酵方式等, 能为其进行工业化应用提供理论和实践上的指导。为此, 本研究探讨在完全合成培养基条件下, 该株酿酒酵母所需的基本营养元素(氮源和无机盐)以及这些营养元素对高浓度酒精发酵的影响, 以便为生产实践以及后续研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

菌种 酿酒酵母 S-2002 (江南大学生物工程学院生物加工实验室保藏)。

培养基 (1) 种子培养基。葡萄糖 10 g/L, 酵母膏 8.5 g/L, NH_4Cl 1.3 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/L, CaCl_2 0.06 g/L, 0.08 MPa 条件下灭菌 15

min。(2) 发酵培养基 1 (研究不同氮源的影响)。葡萄糖 250 g/L, CaCl_2 2.8 g/L, KCl 1.2 g/L, MgSO_4 0.65 g/L, KH_2PO_4 1.5 g/L, 0.08 MPa 条件下灭菌 15 min (糖液与营养液分开灭菌)。(3) 发酵培养基 2 (研究无机盐的影响)。葡萄糖 250 g/L, KCl 1.2 g/L, 尿素 10 g/L, 0.08 MPa 条件下灭菌 15 min (糖液与营养液分开灭菌)。所用试剂均为国产分析纯。

1.2 培养方法^[9]

种子培养 接一环生长良好的斜面酵母至 200 mL 种子培养基中, 28℃, 100 r/min 培养 24 h。

间歇发酵 以体积分数 10% 接种量将种子接入发酵培养基中, 置于 30℃ 培养箱中静态发酵。

1.3 试验方法

在研究氮源对高浓度酒精发酵的影响时, 按照试验设计分别对所研究的氮源, 取 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 和 10 g/L 5 个浓度, 其他营养元素同发酵培养基 1。研究无机盐浓度对高浓度酒精发酵的影响时在发酵培养基 2 中, 根据所研究的无机盐的不同, 按照试验设计对所研究的无机盐取 0.1~10 g/L 5 个浓度, 同时固定其他营养元素的浓度。

1.4 酒精浓度的测定^[10]

准确量取 100 mL 发酵液加入圆底烧瓶中, 再加入 50 mL 水后置于蒸馏装置上用 100 mL 容量瓶收集馏出液, 定容至 100 mL, 混匀后倒入 100 mL 量筒中, 用酒精计 (标温 20℃) 测酒精度 (下缘为准), 同时测定温度, 然后换算成 20℃ 时的酒精度。

^{*} [收稿日期] 2003-03-07

[基金项目] 科技部科技型中小企业技术创新基金无偿资助项目 (01C26213200325)

[作者简介] 吕 欣 (1975-), 男, 上海市人, 在读博士, 主要从事发酵工程研究。

发酵时间以两次取样间隔(间隔为 12 h)的酒精浓度之差小于 0.8 g/L 为准。

2 结果与分析

2.1 酿酒酵母 S-2002 的基本特性

酿酒酵母 S-2002 与其他酿酒酵母相比,在琼脂平板培养基中生长缓慢,菌落较小,表面有环状皱

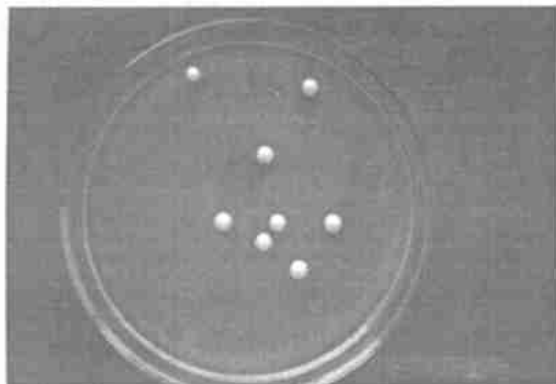


图 1 酵母 S-2002 菌落形态照片

Fig 1 The colony of *Saccharomyces cerevisiae*-2002

2.2 氮源对高浓度酒精发酵的影响

氮源是构成菌体物质和一些代谢产物的必需营养元素,一般氮源分为无机氮源和有机氮源两类,由于有机氮源的成分复杂,对研究酵母的基本营养需求不利,因而选择无机氮源作为发酵培养基的氮源,其中尿素和硫酸铵是最常用的两种无机氮源,所以选择这两种氮源作为研究对象。

2.2.1 尿素对高浓度酒精发酵的影响 除尿素外其他营养元素的浓度分别为 CaCl_2 2.8 g/L , KCl 1.2 g/L , MgSO_4 0.65 g/L , KH_2PO_4 1.5 g/L 。由表 1 可知,尿素浓度 $< 1 \text{ g/L}$ 时,随着尿素浓度的增加,发酵终了酒精浓度也逐渐上升,尿素浓度与酒精浓度之间呈正相关关系,相关系数 0.941 ;在尿素浓度为 0.1 g/L 时,所提供的氮源不能完全支持酵母的生长及发酵,当菌体生长到一定阶段,由于氮源耗尽,菌体不能继续生长,导致发酵时间延长和最终酒精浓度较低;而当尿素浓度 $> 1 \text{ g/L}$ 时,酒精浓度逐渐趋于一定值,约为 117 g/L ,而且发酵时间随着尿素浓度的升高而逐渐下降,也就是说,当提供充足的尿素($> 1 \text{ g/L}$)时,酵母接种进入发酵培养基后能很快适应环境,缩短延迟期,使氮源(尿素)浓度不成为限制酵母生长的因素,从而使酵母数量很快上升,缩短了发酵时间。

褶,菌落颜色为乳白色发亮。培养 7 d 后的菌落形态如照片图 1,直径约 5.2 mm ;从该株酵母(对数生长期)的电镜照片可以看出(图 2),与其他酿酒酵母相比,该株酵母体积较小,呈圆形,表面有多个凹面,直径约为 $3.5 \mu\text{m}$ 。

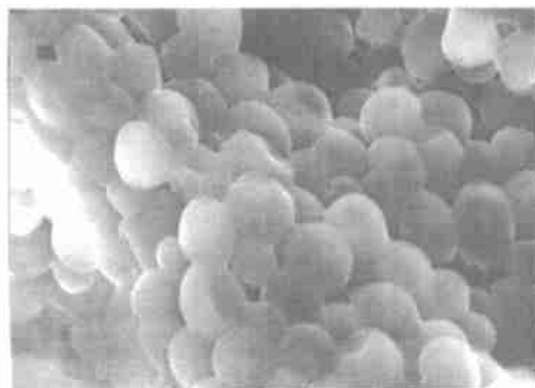


图 2 酵母 S-2002 的电镜照片

Fig 2 The electron micrograph of *Saccharomyces cerevisiae*-2002

2.2.2 硫酸铵氮源对高浓度酒精发酵的影响 除硫酸铵外,其他营养元素的浓度分别为 CaCl_2 2.8 g/L , KCl 1.2 g/L , MgSO_4 0.65 g/L , KH_2PO_4 1.5 g/L 。由表 2 可以看出,硫酸铵浓度 $< 1 \text{ g/L}$ 时,随着硫酸铵浓度的增加,发酵终了酒精浓度也逐渐上升,硫酸铵浓度与酒精浓度之间呈正相关关系,相关系数 0.930 ;而当硫酸铵浓度 $> 1 \text{ g/L}$ 时,酒精浓度逐渐趋于一定值,约为 119 g/L ,而发酵时间随着硫酸铵浓度的增加逐渐缩短。由于硫酸铵也是氮源,因而与对尿素的分析基本一样,但是可以看到,当硫酸铵浓度为 1.0 g/L 时,发酵终了的酒精浓度为 119.9 g/L ,优于同等尿素水平下的最终酒精浓度 117.5 g/L 。

表 1 尿素浓度对酒精发酵的影响

Table 1 The effect of urea concentration on ethanol fermentation

处理 Treatment	尿素浓度/ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) Urea concentration	酒精浓度/ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) Ethanol concentration	发酵时间/h Time
1	0.1	92.3	216
2	0.5	111.2	144
3	1	117.5	144
4	5	114.4	132
5	10	118.3	120

表 2 硫酸铵浓度对酒精发酵的影响

Table 2 The effect of ammonium sulfate concentration on ethanol fermentation

处理 Treatment	硫酸铵浓度/ (g · L ⁻¹) Ammonium sulfate concentration	酒精浓度/ (g · L ⁻¹) Ethanol concen- tration	发酵时间/h Time
1	0.1	76.9	192
2	0.5	110.4	192
3	1	119.9	192
4	5	115.1	144
5	10	118.3	120

2.3 无机盐对高浓度酒精发酵的影响

无机盐类是微生物生命活动不可缺少的物质,其主要功能是参与构成菌体成分、作为酶的组成部分,或维持酶的活性、调节渗透压等。其中MgSO₄,KH₂PO₄和CaCl₂对微生物的生长和发酵影响最大。

2.3.1 硫酸镁对高浓度酒精发酵的影响 除硫酸镁外,其他营养元素的浓度为CaCl₂ 2.8 g/L,KCl 1.2 g/L,尿素 10 g/L,KH₂PO₄ 1.5 g/L。硫酸镁中的镁离子参与酵母代谢过程中的许多反应,并且提供酵母中含硫氨基酸的成分等。由表 3 可知,硫酸镁浓度< 5 g/L 时,随着硫酸镁浓度的增加,发酵终了酒精浓度也逐渐上升,硫酸镁浓度与酒精浓度之间呈正相关关系,相关系数 0.951。当硫酸镁缺乏时,可以看到最终酒精浓度较低;而当硫酸镁浓度> 5 g/L 时,酒精浓度反而逐渐下降,最终低至 112 g/L,这一抑制机制还有待进一步的研究。而发酵时间除在硫酸镁浓度较低时较长外,在研究的其余硫酸镁浓度范围内,发酵时间相同。

表 3 硫酸镁浓度对酒精发酵的影响

Table 3 The effect of magnesium sulfate concentration on ethanol fermentation

处理 Treatment	硫酸镁浓度/ (g · L ⁻¹) Magnesium sulfate	酒精浓度/ (g · L ⁻¹) Ethanol concen- tration	发酵时间/h Time
1	0.1	104.1	144
2	0.5	114.4	144
3	1	118.3	120
4	5	122.2	120
5	10	112.0	120

2.3.2 磷酸二氢钾对高浓度酒精发酵的影响 除磷酸二氢钾外,其他营养元素的浓度为CaCl₂ 2.8 g/L,KCl 1.2 g/L,尿素 10 g/L,MgSO₄ 0.65 g/L。磷酸二氢钾是酵母代谢中一些关键酶的辅助因子(如果糖激酶等),同时也是维持电位差和渗透压的重要物质。从表 4 可以看到,只要维持较低浓度水平

的磷酸二氢钾,就基本可以满足酵母生长和发酵的需要,当磷酸二氢钾浓度< 5 g/L 时,随着磷酸二氢钾浓度的增加,发酵终了酒精浓度也逐渐上升,但上升幅度不大,磷酸二氢钾浓度与酒精浓度之间呈现正相关关系,相关系数为 0.922;而当磷酸二氢钾浓度> 5 g/L 时,酒精浓度逐渐趋于一定值,约 122 g/L,发酵时间也基本恒定在 144 h,这说明过量的磷酸二氢钾对酵母并无毒害作用。

表 4 磷酸二氢钾浓度对酒精发酵的影响

Table 4 The effect of potassium biphosphate concentration on ethanol fermentation

处理 Treatment	磷酸二氢钾浓度/ (g · L ⁻¹) Potassium biphosphate concentration	酒精浓度/ (g · L ⁻¹) Ethanol concentration	发酵时间/h Time
1	0.1	115.9	156
2	0.5	119.1	144
3	1	119.9	144
4	5	122.2	144
5	10	123.0	144

2.3.3 氯化钙对高浓度酒精发酵的影响 除氯化钙外,其他营养元素的浓度为KCl 1.2 g/L,尿素 10 g/L,MgSO₄ 0.65 g/L,KH₂PO₄ 1.5 g/L。钙离子是一些酶的稳定剂和激活剂(如蛋白酶等)。由表 5 可知,当氯化钙浓度< 5 g/L 时,随着氯化钙浓度的增加,发酵终了酒精浓度也逐渐上升,氯化钙浓度与酒精浓度之间呈现正相关关系,相关系数 0.941,当钙离子缺乏时,最终酒精浓度也较低,发酵时间也较长;而当氯化钙浓度> 5 g/L 时,酒精浓度逐渐趋于一定值,约为 122 g/L,发酵时间也基本恒定在 156 h。

表 5 氯化钙浓度对酒精发酵的影响

Table 5 The effect of calcium chloride concentration on ethanol fermentation

处理 Treatment	氯化钙浓度/ (g · L ⁻¹) Calcium chloride concentration	酒精浓度/ (g · L ⁻¹) Ethanol concen- tration	发酵时间/h Time
1	0.1	110.4	156
2	0.5	115.1	156
3	1	116.7	156
4	5	122.6	156
5	10	121.5	156

3 结 论

对该株酿酒酵母间歇发酵的初步研究发现,该株酵母具有高浓度酒精的发酵潜力。在完全合成培养基条件下,比较了尿素和硫酸铵两种氮源对酒精发酵的影响,发现硫酸铵是较好的氮源,最终酒精浓

度可以达到 119.9 g/L。在对 3 种主要的生长与发酵无机盐氯化钙、硫酸镁和磷酸二氢钾的研究中,得到了不同无机盐浓度与最终酒精浓度之间的关系,初步找到了该株酵母所需无机盐的临界值,分别是硫酸镁 5 g/L,磷酸二氢钾为 5 g/L (或 < 5 g/L),氯

化钙为 5 g/L。

从试验中还可以看到,该株酵母仍然存在着发酵时间长,以及当硫酸镁浓度较高时对酵母发酵的抑制作用不清等问题,尚需进一步进行优化与研究。

[参考文献]

- [1] 赵 华,赵树欣,才向东,等. 玉米酒精浓醪发酵技术的研究[J]. 酿酒科技, 1998, (5): 30- 40
- [2] 章克昌. 发展燃料酒精的建议[J]. 中国工程科学, 2000, 2(6): 89- 93
- [3] 谢 林,张 禾. 美国考察漫谈[J]. 酿酒科技, 2000, (1): 85- 89
- [4] Mccaig R M, Pfister E A, Ingledew W M, et al. Very high gravity brewing-laboratory and pilot plant trials[J]. J of Am Soc Brew Chem, 1992, 50: 18- 26
- [5] Thomas K C, Ingledew W M. Fuel alcohol production: effects of free amino nitrogen on fermentation of very-high-gravity wheat mashes[J]. Appl Environ Microbiol, 1990, 56: 2046- 2050
- [6] Jones A M, Ingledew W M. Fuel alcohol production: appraisal of nitrogenous yeast foods for very high gravity wheat mash fermentation[J]. Process Biochem, 1994, 29: 483- 488
- [7] Groat M, Ough C S. Effects of insoluble solids added to clarified musts on fermentation rate: wine composition and wine quality[J]. Am J Enol Vitic, 1978, 29: 112- 119
- [8] Thomas K C. Effects of particulate materials and osmoprotectants on very high gravity ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Appl Environ Microbiol, 1994, 60: 1519- 1524
- [9] 诸葛健,王正祥. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994
- [10] 蔡定域. 酿酒工业分析手册[M]. 北京: 轻工业出版社, 1988

Study on the effects of nitrogen sources and inorganic salts on ethanol fermentation

LU Xin, DUAN Zuo-ying, MAO Zhong-gui

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi, Jiangsu 214036, China)

Abstract: The effects of nitrogen sources and inorganic salt on high ethanol fermentation in synthetic medium were studied in this paper: Ammonium sulfate was the better nitrogen source between urea and ammonium sulfate, the ultimate ethanol concentration was 119.9 g/L when we used ammonium sulfate as nitrogen source. Moreover, the effects of calcium chloride, magnesium sulfate and potassium biphosphate on high ethanol fermentation were analyzed, the critical concentrations of these inorganic salt the *Saccharomyces cerevisiae* needed were gained.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*; inorganic salt; nitrogen source; ethanol fermentation