

酿酒酵母 X330 高浓度发酵时耐酒精性能的初步研究

Study on Ethanol Tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* X330 under Very High Gravity Medium

薛颖敏¹, 江 宁^{2*}

XUE Ying-Min¹ and JIANG Ning^{2*}

1 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083

2 中国科学院微生物研究所, 北京 100080

1 College of Food Science and Nutrition Engineering, China Agriculture University, Beijing 100083, China

2 Institute of Microbiology of Chinese Academy of Science, Beijing 100080, China

摘 要 在完全合成培养基条件下,就渗透压保护剂和营养物质对一株产高浓度酒精的酿酒酵母 X330 高浓度发酵时耐酒精性能的影响进行了初步研究。结果表明,与渗透压相比,营养缺乏对酿酒酵母高浓度发酵时酒精耐受性能可能起着更为关键和重要的作用。发酵培养基中各营养元素对耐酒精性能的影响不同,由高到低的顺序是酵母抽提物 > 蛋白胨 > 硫酸镁 > 维生素 C = 磷酸二氢钾 > 氯化钙 = 硫酸铵。渗透压保护剂(甘氨酸和脯氨酸)能有效提高菌体酒精耐受性能。当甘氨酸添加浓度为 20mmol/L 或脯氨酸添加浓度为 10mmol/L 时,发酵终点酒精浓度最高,菌体于 30 °C 在 18% (V/V) 酒精冲击下的存活率最大,且均高于对照组(未添加甘氨酸且未添加脯氨酸)水平,但甘氨酸的促进作用强于脯氨酸。

关键词 酿酒酵母, 高浓度发酵, 渗透压保护剂, 营养缺乏, 酒精耐受性

中图分类号 R392.11 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)03-0508-06

Abstract The impacts of osmoprotectants and nutrient components on both ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* X330 and its ethanol fermentability were investigated when high gravity synthetic medium were used. The results indicate that nutrient limitation plays important role in the ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. When the nutritional requirements of *Saccharomyces cerevisiae* are satisfied, its ethanol tolerance increases, especially at high sugar concentrations. The effect of the individual nutrient component in the PYN medium on ethanol tolerance is different, which is yeast extract > peptone > magnesium sulfate > vitamin C = potassium phosphate > calcium chloride = ammonium sulfate. Osmoprotectants (such as glycine and proline) are effective in improving the ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* X330, and the optimum concentrations of 20 mmol/L glycine and 10 mmol/L proline were obtained experimentally while glycine exerted a stronger enhancing effect than proline. After 3 h of exposure to 18% (V/V) ethanol at 30 °C, 57.1% and 50.0% remained viable for the cells grown in glycine-added and proline-added medium respectively.

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, very high gravity, osmoprotectant, nutrient limitation, ethanol tolerance

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^[1,2]。由

Received: December 19, 2005; Accepted: March 7, 2006.

* Corresponding author. Tel: 86-10-62553081; E-mail: jiangn@sun.im.ac.cn

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,多年来人们一直对其很感兴趣,成为各国研究者研究的重点领域。

Casey^[3]发现如果满足氮类或脂类的需要,酿酒酵母会更好地产酒精。张书祥^[4]等人证实,选择适量添加营养盐及其复合物,能改善酵母菌生长环境,提高发酵产物酒精浓度,缩短发酵周期。最近,通过使用含有酵母膏和蛋白胨的发酵培养液,Thomas 和 Ingledew^[5]证实,在高浓度酒精发酵中,主要是由于营养缺乏,而不是积累的酒精导致发酵活性降低的。Thomas 和 Hynes^[6]等人发现,在高浓度发酵条件下,加入渗透压保护剂,有助于增加酒精产量,提高糖利用率。

虽然一些研究表明营养因子有助于增加酵母耐酒精性能,然而,目前对各种营养因子发挥这种作用的程度差异尚不清楚。本研究用 1 株可进行高浓度酒精发酵的酿酒酵母为材料,研究其在高浓度发酵时基本营养需求以及各营养元素对酿酒酵母耐酒精性能的影响,为工业化应用提供理论和实践上的指导。此外,本研究通过添加外源氨基酸,对甘氨酸和脯氨酸等渗透压保护剂影响酿酒酵母 X330 抵抗酒精毒害的作用方面进行了探索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种:酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) X330(本实验室分离并保存)。

1.1.2 培养基:

YPD 培养基(种子培养基):每 L 培养基含 10g 酵母抽提物(Oxoid)、20g 葡萄糖、20g 蛋白胨(Oxoid),0.08MPa 条件下灭菌 30min。

PYN 培养基(发酵培养基):每 L 培养基含 3g 酵母抽提物(Oxoid)、3g 蛋白胨(Oxoid)、1g 硫酸铵、0.5g 磷酸二氢钾、3mmol/L 硫酸镁、2.5 mmol/L 氯化钙、100~400g 葡萄糖,0.08MPa 条件下灭菌 30min。

用盐酸将 pH 值调至 5.0。除酵母抽提物与蛋白胨为 Oxoid 的产品外,其余试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

S. cerevisia X330 接于 YPD 斜面培养基活化 24h。接一环生长良好的斜面酵母至 100mL 种子培养基中,在旋转式摇床(转速:150r/min)上于 30℃ 培养 18h。以体积分数(V/V)10%接种量将种子接入发酵培养基中,在旋转式摇床(转速:150r/min)上,于 30℃ 继续发酵。每隔一定时间于无菌条件下取发酵

液 0.5mL,离心,得上清液,供测定用。

在评价酵母的酒精耐受性中,本实验采用最广泛使用的三个方法:根据细胞在有酒精的培养基中生长时受到的抑制来定义;把酒精耐性与发酵产生的酒精的量进行关联;在一定浓度的无水乙醇冲击下测定细胞的存活率。

1.2.1 生长的测定:将菌液适当稀释,用 UV-754 分光光度计测定 OD 值($\lambda = 660\text{nm}$)。生物量的测定采用干重法^[7]($1\text{OD} = 0.33\text{g/L}$)。

1.2.2 发酵酒精浓度的测定:利用 SBA 生物传感分析仪(山东省科学院生物研究所研制)定量测定酒精的含量。

1.2.3 高浓度酒精冲击下菌体存活率的测定:取适量发酵液,离心,无菌水洗涤,转移至含体积分数 15% 无水乙醇的 10mL YNB 无葡萄糖培养基中,于 30℃,150r/min 恒温振荡培养,进行冲击实验,定期取样检测残余活细胞数目。活细胞计数采用常规稀释平板涂布法由单菌落计数。同时做一不加酒精的作为对照。菌体存活率(Viability)由下式计算, $\text{Viability} = (V_t/V_0) \times 100\%$, V_t 和 V_0 分别表示冲击时间为 t 和 0h 的残余活细胞数目。

2 结果与分析

2.1 渗透压对酒精耐受性的影响

在发酵培养基中添加不同浓度的糖,按照“1.2.2”方法考察其对酿酒酵母 X330 发酵酒精能力的影响,结果见图 1。由图 1A 可知,葡萄糖浓度从 10% 增加到 40% 导致了发酵率的降低。实验进一步使培养基中的葡萄糖浓度保持 10% 恒定不变,通过分别添加 0% 至 30% 山梨醇来形成渗透压梯度,并同样检测酒精发酵效率。结果如图 1B 所示,发酵率的降低系由高浓度发酵时,培养基中渗透压增加所致。

随着培养基底物浓度的增加,酿酒酵母细胞的生长也受到抑制(图 2)。由图 3 可见,发酵 24h 的菌体在 15%(V/V)无水酒精冲击 2h 时,随着发酵培养基中渗透压的增加,存活率变低。

2.2 营养物质对酒精耐受性的影响

如表 1 结果所示,随着发酵培养基中营养物质的增加,单批加入 200g/L、300g/L、400g/L 葡萄糖浓度的发酵培养基均可以使酒精产量分别由 45g/L 提高至 80g/L、由 50g/L 提高至 110g/L、由 50g/L 提高至 110g/L^[12]。发酵 24h 的菌体在 15%(V/V)无水酒精冲击 2h 时,存活率分别由一倍营养物质的 68.2%、

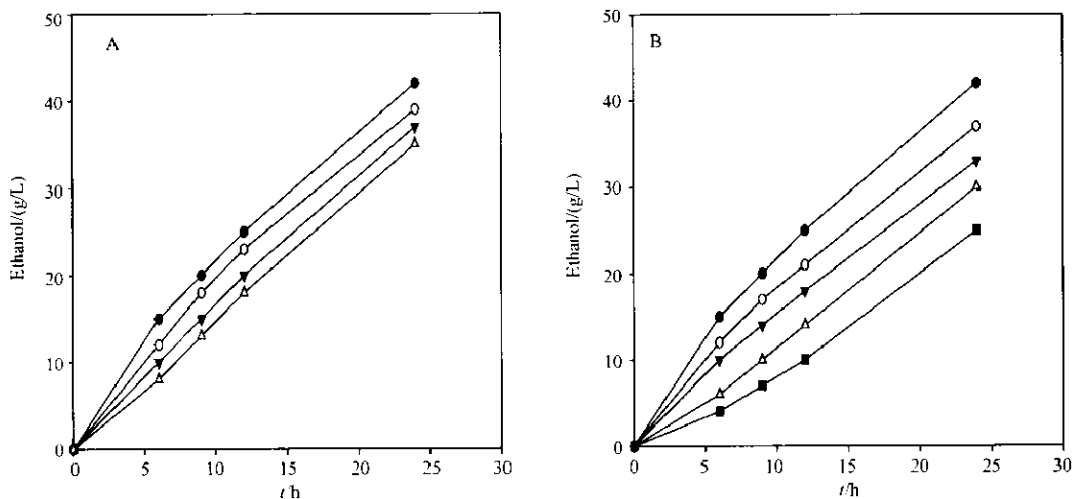


图1 底物浓度对酿酒酵母 X330 发酵酒精能力的影响

Fig.1 Effect of increasing sugar concentration on ethanol production

S. cerevisia X330 was grown on (A) 10% (●), 20% (○), 30% (▼) and 40% (△) glucose, and (B) 10% glucose in the presence of 0% (●), 10% (○), 20% (▼), 30% (△), 40% (■) sorbitol.

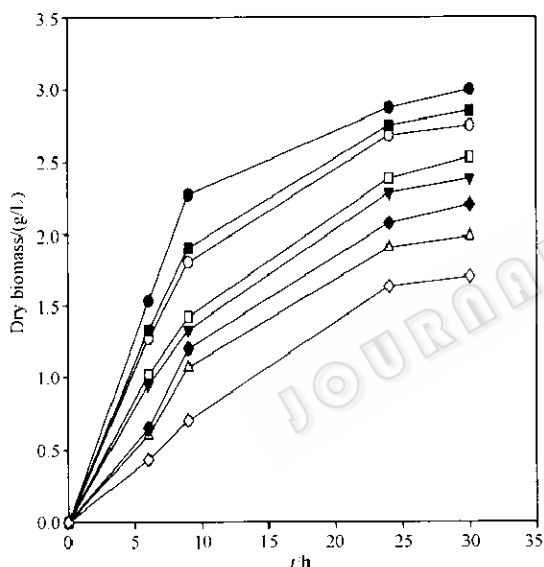


图2 底物浓度对酿酒酵母 X330 细胞生长的影响

Fig.2 Effect of increasing sugar concentration on cell growth

S. cerevisia X330 was grown on 10% (●), 20% (○), 30% (▼), 40% (△) glucose, and 10% glucose in the presence of 10% (■), 20% (□), 30% (◆), 40% (◇) sorbitol.

45.1%、25.1% 提高至 3 倍营养物质的 85.9%、78.4%、70.2% 和五倍营养物质的 86.1%、83.4%、78.6%。而且,每克细胞干重所产酒精量也随着发酵培养基中营养物质的增加而增加,直至酿酒酵母的营养要求完全被满足。由表 1 可见,在高浓度发酵时,如果酿酒酵母的营养要求被满足就可以提高

其酒精耐受性。但如果酿酒酵母的营养要求完全被满足时,营养物质对酿酒酵母的酒精耐受性影响不大。因此,在高浓度发酵时,营养物质对酿酒酵母酒精耐受性可能起着更为关键的作用。

图 4 显示 PYN 培养基中各营养元素对菌体耐酒精性能的影响。为确定营养元素的影响力度,培养基中的营养元素浓度分别被单独增加至三倍。结果表明,适当浓度的各个营养元素均能有效提高菌体耐酒精性能,发酵酒精浓度均高于对照组 1(含 1 倍营养物质的 PYN 培养基),低于对照组 2(含 3 倍营养物质的 PYN 培养基)。而且,各个营养元素对菌体耐酒精性能的影响不同,由高到低的顺序是酵母抽提物 > 蛋白胨 > 硫酸镁 > 维生素 C = 磷酸二氢钾 > 氯化钙 = 硫酸铵。

2.3 渗透压保护剂对酒精耐受性的影响

由图 5、图 6 可见,渗透压保护剂(甘氨酸和脯氨酸)能有效提高菌体酒精耐受性能。当甘氨酸添加浓度为 20mmol/L 或脯氨酸添加浓度为 10mmol/L 时,发酵终点酒精浓度最高,分别为 115g/L 和 110g/L;菌体于 30℃ 在 18% (V/V) 无水酒精冲击 3h 下的存活率最大,分别为 57.1% 和 50%;且均高于对照组(未添加甘氨酸且未添加脯氨酸)水平,其发酵终点酒精浓度为 100g/L,存活率仅为 14.3%。但甘氨酸的促进作用强于脯氨酸。而当甘氨酸和脯氨酸添加浓度分别偏离 20mmol/L 和 10mmol/L 时,菌体酒精耐受性能降低。

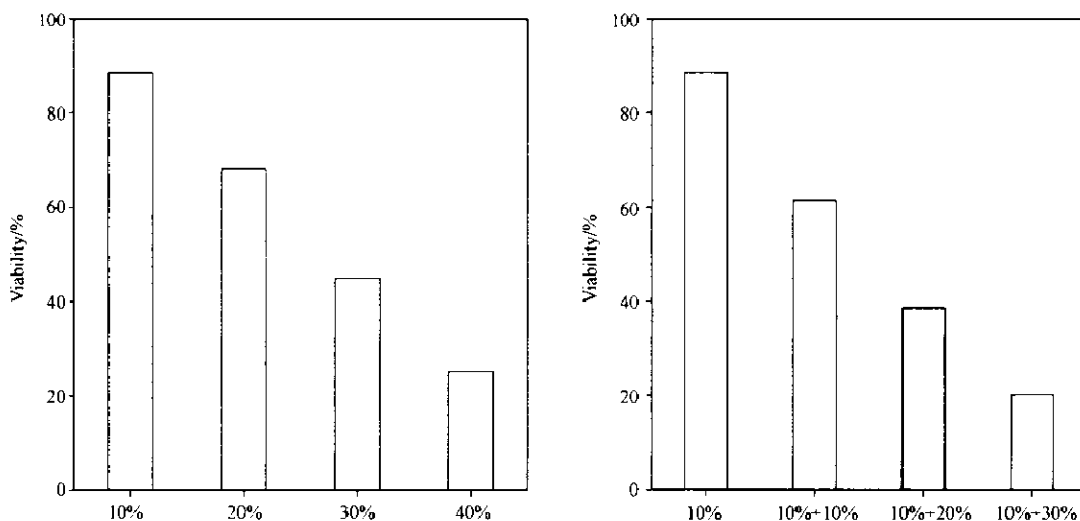


图3 发酵24h的菌体在15%(V/V)无水酒精冲击2h时存活率

Fig.3 Viability of *S. cerevisia* X330 exposed to 15% (V/V) ethanol lasting 2 hours

S. cerevisia X330 was grown on 10% - 40% glucose, and 10% glucose in the presence of 0% - 30% sorbitol. Viability was determined at the end of 24 hours of fermentation.

表1 增加发酵培养基中营养物质对酿酒酵母 X330 酒精耐受性的影响

Table 1 Effect of increasing PYN media components on ethanol tolerance of *S. cerevisia* X330

		Dry biomass ^a l (g/L)	Ethanol l (g/L)	Ethanol/dry biomass l (g/g)	Viability ^b %	Time /h
20% glucose	1 × PYN	3.54	45	12.7	68.2	48
	3 × PYN	5.80	80	13.8	85.9	
	5 × PYN	6.60	80	12.1	86.1	
30% glucose	1 × PYN	3.10	50	16.1	45.1	60
	3 × PYN	5.40	90	16.7	78.4	
	5 × PYN	6.21	110	17.7	83.4	
40% glucose	1 × PYN	3.08	50	16.3	25.1	72
	3 × PYN	5.32	90	16.9	70.2	
	5 × PYN	6.15	110	17.9	78.6	

a Cell dry weight calculated from OD_{660nm} (0.33 g dry weight per liter at 1.0 OD)

b Viability was determined at the end of 24 hours of fermentation. *S. cerevisia* X330 was exposed to 15% (V/V) ethanol lasting 2 hours.

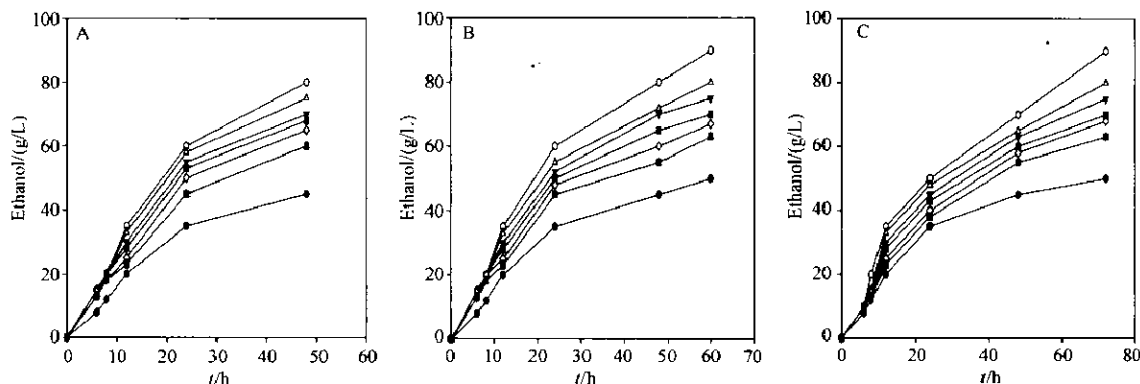


图4 增加 PYN 培养基中单个营养元素含量对酿酒酵母 X330 发酵酒精能力的影响

Fig.4 Effect of increasing individual PYN media components on ethanol production from (A) 200 (g/L), (B) 300 (g/L) and (C) 400 (g/L) glucose

Cultures were cultivated under different culture conditions: with 1 × PYN (●), 3 × PYN (○), 3 × peptone (▼), 3 × yeast exact (△), 3 × $MgSO_4$ (■), 3 × $CaCl_2$ (□), 3 × Vc (◆), 3 × KH_2PO_4 (◇), 3 × $(NH_4)_2SO_4$ (▲).

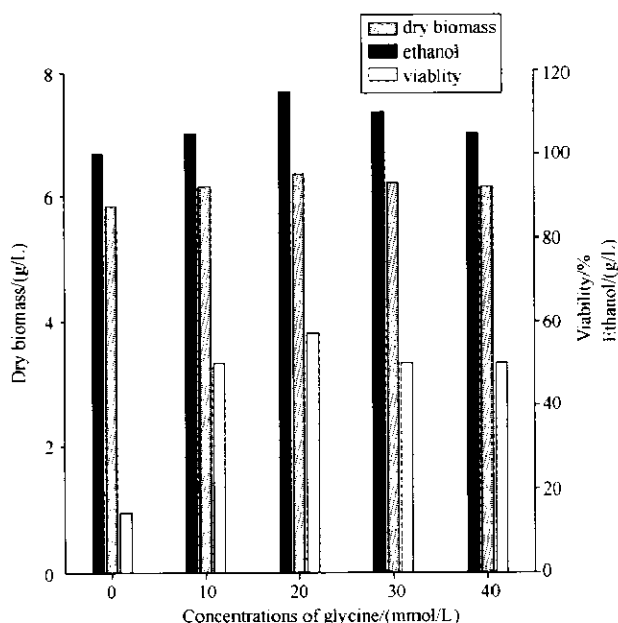


图5 甘氨酸浓度对酒精耐受性的影响

Fig.5 Effect of various concentrations of glycine on ethanol tolerance of *S. cerevisia* X330

a: *S. cerevisia* X330 was grown at 30°C in 4 × PYN medium which initially contained 30% (W/V) glucose. Dry biomass was determined at the end of 60 hours of fermentation; b: Viability was determined at the end of 60 hours of fermentation. *S. cerevisia* X330 was exposed to 18% (V/V) ethanol lasting 3 hours.

3 讨论

本试验初步研究了 *S. cerevisia* X330 高浓度发酵时的酒精耐受性。结果表明,渗透压的增加降低了酵母酒精耐受性,然而,有关其确切的作用机制目前尚不清楚。可能是因为,发酵培养基中高浓度的糖对酵母有抑制作用——葡萄糖阻遏和葡萄糖抑制作用。而且,高渗透压会导致低水活性,酵母细胞内的水分流向环境,同时一些浓度过高对细胞有害的溶质进入细胞内,细胞质膜上的离子梯度受到破坏,细胞的生存能力下降^[8]。此外,作为代谢终产物的 CO₂ 对酵母生长和发酵也有抑制作用,当培养基中糖浓度较高时,系统粘度较高,CO₂ 释放慢。酵母酒精耐受性的降低可能是 CO₂ 的毒性所致。

营养缺乏对酿酒酵母高浓度发酵时酒精耐受性能起着重要的作用。适当浓度的各个营养元素均能有效缓解渗透压和酒精毒性对菌体的不良影响,提高菌体耐酒精性能。而且,各个营养元素对菌体耐酒精性能的影响不同,由高到低的顺序是酵母抽提物 > 蛋白胨 > 硫酸镁 > 维生素 C = 磷酸二氢钾 >

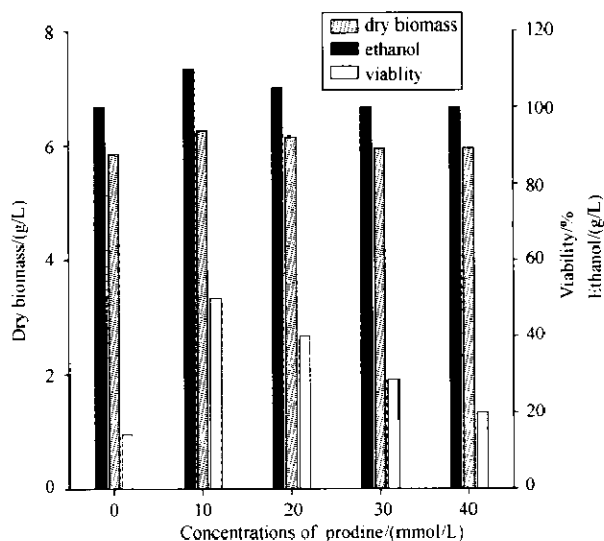


图6 脯氨酸浓度对酒精耐受性的影响

Fig.6 Effect of various concentrations of proline on ethanol tolerance of *S. cerevisia* X330

a: *S. cerevisia* X330 was grown at 30°C in 4 × PYN medium which initially contained 30% (W/V) glucose. Dry biomass was determined at the end of 60 hours of fermentation; b: viability was determined at the end of 60 hours of fermentation. *S. cerevisia* X330 was exposed to 18% (V/V) ethanol lasting 3 hours.

氯化钙 = 硫酸铵,但是其确切的作用机制目前尚不清楚。酵母抽提物、蛋白胨、硫酸镁除能促进酵母细胞生长和发酵外,还能有效防止发酵过程中菌体存活率的下降;氯化钙可以防止发酵过程中菌体存活率的下降,但效果不明显;而维生素 C、磷酸二氢钾和硫酸铵对菌体存活率没有影响,并不能防止其降低(数据没显示出来)。研究结果表明,在高浓度发酵时,酵母抽提物、蛋白胨、硫酸镁、氯化钙对发酵的促进作用有两个方面:提供营养促进酵母细胞生长和保护酵母细胞免受胁迫伤害(高渗透压)。而维生素 C、磷酸二氢钾和硫酸铵可能只提供营养。

酵母抽提物和蛋白胨对菌体耐酒精能力的显著促进作用可能与各自含有保护酵母细胞的活性成分有关^[6]。例如,甘氨酸三甲铵乙内酯是酵母抽提物的一种成分,其对保护酵母细胞免受胁迫伤害(高渗透压)有一定作用。硫酸镁和氯化钙对菌体耐酒精能力的促进作用可能与各自降低受冲击菌体的细胞膜透性密切相关^[9]。

本试验研究结果表明,外源添加甘氨酸和脯氨酸能有效提高酵母酒精耐受性能。甘氨酸和脯氨酸

被广泛用作细菌的渗透压保护剂,然而,关于其对酿酒酵母的渗透压保护作用方面的研究见诸报道的颇为罕见。甘氨酸和脯氨酸不能被酿酒酵母作为氮源利用,但它们可能有其它的生物作用,例如很容易被直接利用作为生物合成的前体物质。我们认为这些作用之一就是直接或间接的作为渗透压保护剂。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Zhang KC (章克昌). Fuel ethanol: recommendations and suggestions. *Engineering Science* (中国工程科学), 2000, 2(6): 89-93
- [2] Xie L (谢林), Zhang H (张禾). Some views on the investigations in USA. *Liquor-making Science & Technology* (酿酒科技), 2000, (1): 85-89
- [3] Casey GP, Magnus CA, Ingledew WM. Influence of media composition on fermentation. *Biotechnol Lett*, 1983, 5: 429-434
- [4] Zhang SX (张书祥), Xiao YZ (肖亚中), Ren J (任杰). The influence on alcohol fermentation by adding the inorganic salts. *Journal of Biology* (生物学杂志), 1997, 14(1): 23-25
- [5] Thomas KC, Ingledew WM. Production of 21% (V/V) ethanol by fermentation of very high gravity what mashes. *Journal of Industrial Microbiology*, 1992, 10, 61-68
- [6] Thomas KC, Hynes SH, Ingledew WM. Effect of particulate materials and osmoprotectants on very high gravity ethanolic fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 1519-1524
- [7] Zhong WH (钟卫鸿), Cen PL (岑沛霖), Ma J (马骏). Study on kinetic models for batch fermentation and synthesis of alkaline pectinase by *Spirillospora* sp ZG9901. *J Chem Eng Chinese Univ* (高校化学工程学报), 2002, 16(3): 311-315
- [8] Yu BQ (余秉琦), Zhuge J (诸葛健). Hyperosmoadaptation of yeast cells and intracellular accumulation of glycerol. *China Biotechnology* (中国生物工程杂志), 2003, 23(2): 25-28
- [9] Hu CK (胡纯铿), Bai FW (白凤武), An LJ (安利佳). Comparison of ethanol tolerance in a self-flocculating fusant of *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* employing Mg^{2+} or Ca^{2+} as supplement. *J Chem Eng Chinese Univ* (高校化学工程学报), 2004, 18(2): 179-184