

提高酵母菌耐酒精能力的方法

池振明

(山东大学微生物学系, 济南 250100)

利用酵母菌发酵糖生产乙醇虽有数千年的历史^[1], 但是, 这项技术目前也面临许多新的问题。问题之一便是大多数酵母菌对高浓度酒精敏感。当发酵液中酒精浓度达到 10–11%(V/V) 时, 这些酵母菌发酵产生酒精的能力便受到抑制, 因为过高的酒精浓度会抑制细胞生长、存活和发酵^[2]。如果有一些比较经济的方法, 能使酵母菌提高耐酒精能力, 使之具有高发酵力和有效地转化糖生产乙醇, 这无疑对酒精发酵工业有重要的经济意义。

本文就提高酵母菌耐酒精的方法做一些简单介绍。

(一) 从自然界中直接筛选耐高浓度酒精的酵母菌

日本国立九州大学 Hayashida 教授等人在 80 年代初期从发酵过的米酒中分离一株在广泛温度范围内能耐高浓度酒精的酵母菌 *Saccharomyces uvarum inulyticus* var.nov., W-Y-2^[3,4]。这株酵母菌在 30℃ 下, 于人工合成培养基中, 以蔗糖或生淀粉糖化液为底物, 在 3 天之内可以产生 18.6%(V/V) 以上的乙醇。

Ernandes 等^[5] 从粗循环酵母菌样品 (Crude recycled yeast samples) 中分离到 900 株酵母菌。其中两株酵母菌 Et-2 和 Et-4 能利用 35% 的蔗糖浆发酵生产乙醇。所产生的乙醇浓度分别为 18.4%(V/V) 和 18.5%(V/V)。在加有 2% 大豆粉的培养液中, 这两株酵母菌分别可以产生 19.7%(V/V) 和 20.8%(V/V) 的乙醇。

从自然界直接分离耐高浓度酒精酵母菌是目前获得产高浓度酒精酵母菌一种最经济有效的方法。经过在自然界中长期进化, 这些酵母菌在遗传性能和产高浓度酒精能力方面相当稳定。近年来, 日本森永酿造株式会社利用 W-Y-2 菌株作为清酒酿造过程中的乙醇生产

菌, 结果大大地提高了发酵速度和缩短了发酵周期。笔者最近利用 W-Y-2 与国内酒精厂常用的一些酵母菌, 如酒精酵母菌 1300(*Saccharomyces* sp., 1300) 进行比较, 发现 W-Y-2 在耐酒精能力和产酒精速度方面明显地超过 1300 菌株。所以 W-Y-2 在我国有重要的应用开发价值。

(二) 原生质体融合技术

利用原生质体融合技术对工业酵母菌株进行遗传改造引起了人们的高度重视^[2]。Stewart 等^[6] 获得了融合体酵母菌株 1400, 这一菌株在含有葡萄糖的化学合成培养基中产酒精能力和产酒精速度明显地比亲本菌株高, 并且融合体菌株在耐高温和耐渗透压能力方面也有明显改善。所用的两个亲本菌株分别为 *Saccharomyces uvarum* 21 和 *S. diastaticus* 1384。Legmann 等^[12] 研究了 *Saccharomyces cerevisiae* 和 *Saccharomyces mellis* 细胞的融合作用。所得到的融合体酵母菌株在 35% 葡萄糖培养基中可以产生 13.6%(W/W) 的乙醇, 而 *S. cerevisiae* 和 *S. mellis* 仅分别产生 9.0%(W/W) 和 4.0%(W/W) 的乙醇。

池振明等^[7] 利用原生质体融合技术使酵母菌株 W-Y-2 和 *Saccharomyces* sp. 1200 的细胞融合, 得到的四倍体菌株之一 4C₁ 在发酵速度方面有一定提高。但另外两个菌株 F₅ 和 F₉ 在发酵速度方面并没有改善。与两个亲本菌株相比, 这些四倍体菌株在耐酒精能力方面没有改进。这可能与所用的两个亲本菌株均为耐高浓度酒精酵母菌株有关。这一结果说明使耐高浓度酒精酵母菌进一步提高耐酒精能力困难是较大的。

原生质体融合技术是遗传工程手段之一。但融合后的多倍体细胞在遗传稳定性方面值得人们认真研究。笔者在日本九州大学构建的四

倍体菌株在耐酒精能力方面仅保持其亲本之一 W-Y-2 的性状。最近利用多次传代的四倍体菌株作为玉米淀粉酒精发酵的乙醇生产菌,发现这些四倍体酵母菌株生产酒精能力的性状基本稳定。

(三) 酵母杂交技术

当二倍体的酵母细胞处在营养饥饿状态下,它们经过减数分裂就形成含有四个子囊孢子的子囊。每一个子囊孢子为单倍体细胞。根据它们接合型的不同,可以把这些单倍体孢子分为两类:即 α - 细胞和 a - 细胞。当这些不同接合型的细胞生长在合适培养基上时,它们之间便发生接合作用。接合的结果发生细胞和核融合,最后产生二倍体细胞^[8]。根据上述原理,我们可以把来自于具有不同性状(这里是指不同的耐酒精能力)的,接合型相反的单倍体细胞放在一起,经接合后得到杂交细胞。这些杂交细胞有可能会获得耐高浓度酒精的性状。Castillo 利用酵母细胞杂交技术获得一株酵母菌 LS5.6C,该株酵母菌可产生 14.11%(V/V) 的乙醇^[9]。他所用的亲本菌株之一为 LS2,这一菌株对 7%(V/V) 的乙醇敏感。另一亲本菌株为 LA1,它为耐酒精酵母菌,可以在 12%(V/V) 乙醇中生长。经过杂交后得 LS5 菌株。然后利用显微操纵器从 LS5 子囊中分离得到许多子囊孢子,其中一孢子萌发后为 LS5.6C 菌株。

与原生质体融合技术一样,通过杂交获得的杂交细胞也可保持其两个亲本细胞的优良性状。并且通过这项技术获得杂交细胞的效率很高。由于是利用单倍体子囊孢子进行杂交,获得的杂交细胞为二倍体细胞,二倍体细胞性能比较稳定。总的来说,原生质体融合技术和杂交技术是获得耐高浓度酒精酵母菌的有效方法之一。

(四) 连续培养技术

通过把酵母细胞置于酒精浓度连续不断增加的连续培养反应器中,有可能选择出耐高浓度酒精的酵母菌。最近, Brown 等^[11]设计了一种连续选择反馈系统来分离耐高浓度酒精的酵母菌。所用的酵母菌为 *Saccharomyces uvarum*, 试验始期,加到培养物中的酒精浓度

为 2%(w/V)。约一个月后,加到培养物中的酒精浓度逐渐增加到 4.7%(w/V)。经过选择,有些酵母菌株在含有 10%(w/V) 乙醇的培养基中发酵生产酒精的速率比亲本增加了两倍。

Jones 等^[20]发现,当把 *S. cerevisiae* UQM 70Y 的培养物置于含有 7%(w/V) 乙醇的恒化器中,在 30℃下,经过恒温培养 16 代时后,把洗涤过的细胞置于 12%(w/V) 乙醇的培养基中,继续培养三天。能适应这一环境的细胞与亲本细胞相比,对酒精的耐性增加了 40 倍。

与酵母菌耐高浓度酒精能力有关的基因是很多的,所以通过这一技术很难获得在遗传性能方面稳定的耐高浓度酒精酵母菌株。至今还未见有这些菌株在生产上应用的报道。

(五) 其它方法

1. 通过在培养基中加入脂蛋白和真菌菌丝来提高酵母菌耐酒精能力。Hayashida 等^[10]发现米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 细胞中的脂蛋白 (PL) 对于提高酵母菌耐酒精能力有明显的作用。当培养基中含有 1.5%(w/V) PL 时, *S. sake kyokai* No 7 可以产生 20.4%(V/V) 乙醇,而在不含有 PL 的培养基中,这株酵母菌仅产生 17.1%(V/V) 乙醇。Hayashida 等^[4]还发现, *Aspergillus awamori* var. *kawachi* 的菌丝也可以提高 W-Y-2 的产酒精能力。在含有这种真菌菌丝的培养基中,这株酵母菌可以产生 20.1%(V/V) 乙醇。

Hayashida 的上述发现对了解酵母菌耐酒精机制方面有重要的意义。在利用淀粉作为原料生产酒精的过程中,糖化酶制剂的霉菌菌丝对于酵母菌耐酒精能力有一定的作用。如果利用从霉菌细胞中提取出来的脂蛋白来提高酵母菌耐酒精能力,从经济效益方面来看,是不现实的。

2. Vacuform 工艺: Vacuform 发酵是指在真空条件下,利用酵母菌对糖进行连续发酵。在酵母菌产生乙醇的过程中,乙醇通过真空作用不断地被蒸发掉,从而解除了乙醇对酵母细胞生长和发酵的抑制作用。例如,在 35℃下,于 50mmHg 真空条件下,酵母菌每小时可以产生

40g/l 的乙醇。而在无真空条件下,同样的酵母菌每小时仅产生 2.2g/l 的乙醇^[13,21]。

虽然利用这一工艺可以把酵母菌产生的乙醇及时蒸发掉,从而解除了乙醇对酵母的不利作用,但是这一工艺需要增加抽真空设备,增加动力消耗。

3. 萃取发酵工艺:在发酵过程中,利用非极性溶剂有选择性地萃取乙醇,也可以解除乙醇对酵母菌发酵的抑制作用。例如,利用十二烷醇作为萃取剂萃取发酵液中的乙醇时, *S. cerevisiae* UG5 产酒精能力可以增加 5 倍^[14,15]。可作为这类萃取剂的化合物还有各种酮类化合物,酯类化合物、高级醇、胺和氯代碳氢化合物。

Sioumis^[24] 报道某些羧酸和它们的内酯化合物很容易与液体中的乙醇结合,结合后的产物为不溶性的化合物,从而与水分离。这些产物经加热可以释放出乙醇。利用这种方法也可以提高酵母菌耐酒精能力。比较理想的化合物有:二羟基香豆素 (Dihydrocoumarin)、 δ -苯- δ -戊内酯和 δ -内酯。

能作为这类萃取剂的化合物必须对乙醇具有特异性、对酵母细胞无毒。萃取剂的回收率高、对环境不会造成污染和无毒无味等。

4. 选择吸附:在发酵过程中,利用固体物选择性地吸附发酵液中的乙醇,是克服乙醇对酵母菌毒性的另一方法。所用的吸附剂有:丁二烯苯 (Divinyl benzene)、交联聚苯乙烯树脂 (Crossed-linked polystyrene resin) 和 IRC-50-活性碳树脂。这些固体吸附剂对乙醇的选择吸附力比水大。吸附到固体物上的乙醇可以用 N_2 洗脱^[16]。

5. 特殊滤器:利用一些特殊的微孔滤器,使含有乙醇的液体通过滤器,而保留酵母细胞。这种方法也可以克服乙醇对酵母细胞的毒性。对过滤后的液体进行蒸馏。在蒸馏后的培养基中添加适当成分之后,重新被送回到含有酵母细胞的发酵反应器中^[17,22]。

过滤法、萃取法、真空发酵法和选择吸附法存在一个共同的缺点,就是可以导致对酵母细胞有毒的一些代谢产物在培养基中大量累积,

从而导致酵母细胞死亡,发酵停止。

6. Ex-Ferm 工艺:这一工艺首先被 Rolz 和 Cabrera 用于酒精发酵。他们把酵母菌培养在旋转的圆筒发酵器中进行直接发酵粉碎过的甘蔗。在甘蔗所含的蔗糖溶解于水的过程中,被酵母细胞发酵成乙醇。此工艺可以使 *Saccharomyces* sp. 不同菌株产生高浓度的乙醇^[18,23]。

7. 固定化细胞:与游离细胞相比,把酵母细胞固定在合适的的不溶性载体上之后,可以大大地增加酵母细胞对乙醇的抗性。Holcberg 和 Margalith 发现,把 *S. cerevisiae* ATCC7754 细胞固定在 K-角叉菜胶中,然后把这些固定化细胞应用于含有 30%(w/V) 葡萄糖的分批发酵培养基中。这时,固定化酵母细胞可以产生 12.1%(w/V) 乙醇,而无固定化酵母细胞只能产生 9.6%(w/V) 乙醇^[19]。张淑蕙等^[25],居乃琥等^[26]和陈家任等^[27]都发现,固定化酵母用于酒精生产具有速度快,周期短和产量高等优点。

虽然固定化酵母细胞可以提高酵母菌耐酒精能力,但是固定化细胞这一技术存在许多问题,如用于固定化细胞的材料价格高和固定化细胞的使用寿命短等。

总之,提高酵母菌耐酒精能力的方法是很多,但是可行性的方法并不多,许多方法需要增加设备,使工艺更复杂,需增加动力消耗。如果能使酵母菌本身具有耐高浓度酒精的能力,那么把这些酵母菌株用于酒精发酵就不需要增加任何设备,并可使发酵液中的乙醇浓度增加,这样可以减少蒸馏过程中的能量消耗,提高设备利用率。从我国目前实际情况来看,最可取的方法是从自然界或某些天然发酵液中直接筛选发酵速度快、能产高浓度酒精的酵母菌。另一方法便是通过原生质体融合技术和酵母菌杂交技术构建发酵速度快和能产高浓度酒精的酵母菌株。

参 考 文 献

- Gregory P Casey et al.: *CRC Critical Reviews In Microbiology*, 13:219 - 280,1986.
- Tony D'amore et al.: *Enzyme. Micro. Technol.*, 9:322 - 330,1987.

(下转第 179 页)

3. Flor P Q and S Hayashida: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **16**:148 — 152,1983.
4. Hayashida S et al.: *Agri. Biol. Chem.*, **46**:1947 — 1950,1982.
5. Ernandes J R et al.: *Biotechnology Letter*, **12**:463 — 468,1990.
6. Stewart G G et al.: *Brew. Distil. Inst.*, **16**:119 — 222,1982.
7. Chi Zhengmin et al.: *Annual Report of ICBiotech*, **14**:1991.
8. Herskowitz IRA: *Microbiological Reviews*, **52**:536 — 553,1988.
9. Castillo Agudo L et al.: *Current Microbiology*, **12**:41 — 44,1985.
10. Hayashida S et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **38**:2001 — 2006,1974.
11. Brown S W et al.: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **16**:119,1982.
12. Legmann R et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**: 198 — 202,1986.
13. Cysewski G R et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, **19**: 1125,1977.
14. Minier M et al.: *Biotechnol. Lett.*, **3**:405,1981.
15. Minier M et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, **24**:1565,1982.
16. Pitt W W et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, **25**:123,1983.
17. Kyang K et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, **26**:252,1984.
18. Rolz C et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **40**: 466, 1980.
19. Holcberg I B et al.: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **13**:133,1981.
20. Jones R P et al.: *Biotechnol. Lett.*, **6**:471,1984.
21. Cysewski G R et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, **20**: 1421,1978.
22. Toledo R T et al.: *Food. Technol.*, **36**:92,1984.
23. Er-el Z et al.: *Biotechnol. Lett.*, **3**:385,1981.
24. Anthony A Sioumis: *Trends in Biotechnology*, **5**: 215 — 217,1986.
25. 张淑惠等: 食品与发酵工业, **3**:1 — 5,1985。
26. 居乃晓等: 食品与发酵工业, **2**:17 — 29,1986。
27. 陈家任等: 生物工程学报, **3**(2):146 — 151,1987。

(1991-12-27 收稿)