

文章编号 :1009-038X(2003)05-0076-04

耐酸性运动发酵单胞菌的筛选和 酒精发酵条件的优化

陶飞^{1,2}, 石贵阳¹, 徐良玉¹, 章克昌¹

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214036; 2. 杭州娃哈哈集团有限公司 杭州 310018)

摘要:通过酸性平板筛选,在作者所在实验室保藏的运动发酵单胞菌中,得到一株能在 pH 4.5 时进行酒精发酵的菌株,其酒精产量为 66.7 g/L,与原菌株在 pH 6.5 时的相同。通过单因素实验和正交实验,对该菌在酸性条件下的酒精发酵条件进行了优化。结果表明,在发酵温度为 30~35 ℃,pH 4.5,初糖质量浓度 150 g/L,酵母膏质量浓度 4 g/L,蛋白胨质量浓度为 2 g/L 时,该菌的酒精产量达到最大,为 71.7 g/L。

关键词:运动发酵单胞菌;酒精发酵;耐酸性

中图分类号:TQ 920

文献标识码:A

Optimization of Ethanol Fermentation by A New Acid-Resistant Mutant of *Zymomonas mobilis*

TAO Fei^{1,2}, SHI Gui-yang¹, XU Liang-yu¹, ZHANG Ke-chang¹

(1. The Key Laboratory of Industry Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. Hangzhou Wahaha Group Co., Ltd, Hangzhou 310018, China)

Abstract: An acid-resistant strain of *Zymomonas mobilis* with ethanol yield of 71.7 g/L was selected from the acid flat. It could produce the same amount of ethanol as the original strain did in the acid condition of pH 4.5. Fermentation conditions such as substrate concentration, temperature, pH were optimized in this paper. Based on the orthogonal experiment, the optimum fermentation media was found as the followings: 150 g/L gluculose, 4 g/L yeast extraction, 2 g/L peptone, and pH 4.5.

Key words: *Zymomonas mobilis*; ethanol fermentation; acid-resistant

运动发酵单胞菌(*Z. mobilis*)是 20 世纪 70 年代以来作为可能代替酵母进行酒精发酵的菌种而广泛进行研究的对象。该菌与广泛采用的酵母菌相比有较强的优势:发酵温度比酵母菌要高,对糖的发酵速度及利用率均高于酵母,这可以缩短生产周

期和提高原料的利用率。而且发酵过程中不需要通气,工艺设备比较简单^[1]。有利于采用连续发酵、无载体固定化等先进的工艺控制^[6]来降低酒精的生产成本。

在工业扩大化过程中,染菌是影响正常细菌酒

收稿日期 2003-03-21; 修回日期 2003-05-06.

基金项目 江苏省科委基金项目(BQ98039)资助课题.

作者简介 陶飞(1977-),男,江苏张家港人,发酵工程硕士研究生.

精发酵的主要因素. 由于运动发酵单胞菌要求的发酵 pH 较高, 在 6.5 左右^[2~5]. 因而一旦染菌(主要为厌氧产酸菌), 罐内 pH 迅速下降, 严重影响酒精发酵, 这一问题在夏秋季节尤为突出. 如果菌株具有耐酸性, 就可以避免这种情况的发生. 同时在工业酒精发酵中, 糖化醪最终 pH 为 4.5 左右^[7]. 采用耐酸性菌株可以在糖化醪制备完成后, 直接用于发酵, 而无需调节 pH. 既降低了成本又简化了工艺.

作者对运动发酵单胞菌进行了酸性筛选, 得到一株有较强耐酸性的菌株 Z. M-NS7, 并对该菌在酸性条件下的酒精生产条件进行了优化.

1 材料与方法

1.1 菌种

原始菌种: *Zymomonas mobilis* ATCC 31821, 由江南大学生物工程学院生物资源研究室保藏.

1.2 培养基

1.2.1 种子培养基 组分(g/L): 葡萄糖 100, 蛋白胨 10, 酵母膏 15. pH 6.0.

1.2.2 筛选平板培养基 组分(g/L): 葡萄糖 100, 蛋白胨 5, 酵母膏 5, 琼脂 20. pH 4.5.

1.2.3 发酵培养基 组分(g/L): 葡萄糖 150, 蛋白胨 25, 酵母膏 25. pH 4.5.

1.3 培养条件

冰箱保藏的菌种接入种子培养基中, 培养 12 h 后, 以体积分数 10% 的接种量接入发酵培养基中, 进行静止厌氧酒精发酵.

发酵三角瓶 250 mL, 装液量为 100 mL, 发酵 pH 4.5, 温度 35 °C, 发酵时间 48 h.

1.4 分析方法

酒精质量浓度、菌体浓度、还原糖质量浓度按文献[5]测定. pH 用 PHS-3TC 精密数显酸度计测定.

2 结果与讨论

2.1 耐酸性运动发酵单胞菌的筛选

吸取适量的菌悬液于筛选培养基平板上, 使用双层平板法进行厌氧静止培养. 挑取较大的乳白色菌落, 进行发酵实验, 选取酒精产量高并且残糖质量浓度低的菌株. 最后一批菌种复筛的结果见图 1. 由图 1 可知, 7 号菌株在酸性环境中产酒精质量浓度为 66.7 g/L, 与原菌种在 pH 6.5 时(图 1 中的 1 号实验)的酒精质量浓度相同, 定义该菌株为 Z. M-NS7. 万方数据

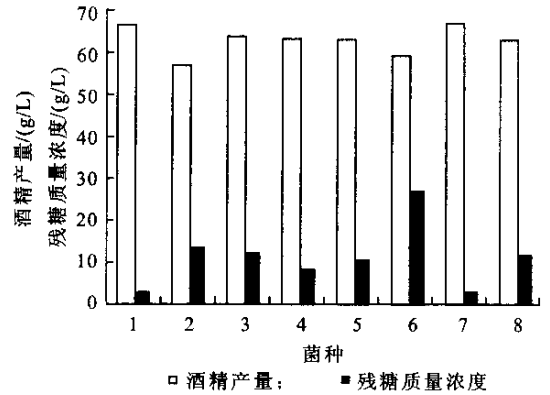


图 1 酸性条件下菌种酒精发酵的比较

Fig. 1 Ethanol fermentation under acid condition by different mutants

2.2 温度对酒精发酵的影响

在 100 mL 的发酵培养基中, 接种量为体积分数 10%, 分别在 20、25、30、35、40 °C 下进行发酵 48 h 后测定酒精产量, 结果见图 2. 由图 2 可见, 随着发酵温度的升高, 酒精产量逐渐增加, 但是当温度升到 40 °C 时, 酒精产量减少了. 因此合适的发酵温度为 30~35 °C, 过高或过低的温度均不利于细菌在酸性条件下的酒精发酵.

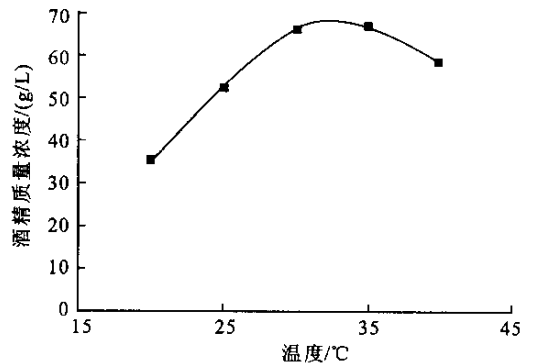


图 2 温度对酒精发酵的影响

Fig. 2 Effect of temperature on ethanol fermentation

2.3 培养基组分的正交实验

2.3.1 因素水平表 根据文献[6]和本实验的筛选结果, 碳源选择葡萄糖, 氮源选择酵母浸膏、蛋白胨, pH 选择酸性条件对培养基组分进行优化. 各因素和水平的对应关系见表 1.

2.3.2 正交试验结果 糖利用率为实际的酒精产量和理论酒精产量的比值, 是细菌利用基质和积累产物的一个综合指标, 反映细菌的发酵效率. 而酒精产量则是细菌发酵能力的体现. 以两者为指标能体现酒精工艺对发酵的要求, 即残糖质量浓度应尽

可能的低,酒精质量浓度应尽可能的高.因此以糖利用率和酒精产量为指标,考察 Z. M-NS7 的发酵培养基的营养组合.

发酵条件为:接种体积分数 10%(体积比),种龄为 12 h,发酵温度 35 ℃,发酵时间 48 h.正交实验结果见表 2,极差分析结果和单因素分析趋势见表 3.

表 1 实验的因素和水平

Tab.1 The table of factor and level in $L_9(3^4)$ orthogonal experiment

水平	因素			D pH
	A 葡萄糖 质量浓度/ (g/L)	B 酵母膏 质量浓度/ (g/L)	C 蛋白胨 质量浓度/ (g/L)	
1	100	2	2	4.5
2	150	4	4	5.0
3	200	6	6	5.5

表 2 培养基组分 $L_9(3^4)$ 正交实验的方案和结果

Tab.2 Orthogonal experiments for composition of culture media

水平	因素				糖利用率/ %	酒精产量/ (g/L)
	A	B	C	D		
1	1	1	1	1	86.2	43.8
2	1	2	2	2	88.6	44.7
3	1	3	3	3	68.2	34.1
4	2	1	2	3	90.1	64.1
5	2	2	3	1	90.8	67.8
6	2	3	1	2	93.4	69.6
7	3	1	3	2	67.8	65.5
8	3	2	1	3	74.3	69.2
9	3	3	2	1	67.4	60.0

表 3 正交实验结果的极差分析

Tab.3 Extreme value analysis of orthogonal experiment

	糖利用率/%				酒精产量/(g/L)			
	A	B	C	D	A	B	C	D
k1	82.3	82.7	86.0	82.8	40.9	57.8	60.9	58.1
k2	92.9	96.0	83.4	84.6	67.2	60.6	56.3	57.9
k3	71.0	77.6	76.8	78.8	64.9	54.6	55.8	55.8
R	21.9	8.4	9.2	5.8	26.3	6.0	5.1	2.3

2.3.3 结果分析 从表 3 和图 3 可以看出,在葡萄糖质量浓度为 150 g/L、酵母膏质量浓度为 4 g/L、

蛋白胨质量浓度为 2 g/L、pH 为 4.5 的条件下,酒精产量最高.对于酒精产量 A、B、C、D 的极差分别为 26.3、6.0、5.067、2.297. A 的极差最大,D 的极差最小,B、C 的极差介于中间.对于糖利用率的极差分析也是如此.所以四因素的主次关系如下:

主要因素 $\xrightarrow{\quad}$ 次要因素
A (B C) D

各因素对于酒精产量和糖利用率的影响有如下的规律:(1)随着葡萄糖质量浓度的升高,酒精产量也增加了,但是当葡萄糖质量浓度升高至 200 g/L 后,酒精产量和糖利用率并没有升高.这证明在高糖质量浓度下,基质对细菌的发酵产生了抑制^[4,6].因此合适的葡萄糖质量浓度选为 150 g/L.(2)酵母膏、蛋白胨为细菌的生长提供了有机氮源和营养因子.但是,浓度过高也不利于 Z. M-NS7 酒精的发酵.而且该菌对两者的吸收利用差别不大.(3)由于该菌种具有较好的耐酸性,故在实验所选的 pH 范围内,指标的变化不大.在 pH 为 4.5 时,酒精产量达到最大值,糖利用率也与最大值相接近.

综合表 3 和图 3 的数据,最佳的发酵培养基组合为 $A_2B_2C_1D_1$,即当葡萄糖质量浓度为 150 g/L,酵母膏质量浓度为 4 g/L,蛋白胨质量浓度为 2 g/L,pH 4.5 时,有最大的酒精产量和较高的糖利用率.表 4 的结果表明,在最佳发酵培养基中,耐酸性细菌酒精发酵的酒精产量为 71.7 g/L,与原来发酵初始 pH 为 6.5 的酒精产量 67.6 g/L 相比,略有提高.

表 4 正交实验结果的验证

Tab.4 Examination of the orthogonal experiment result

培养基	实验次数			平均酒精 产量/(g/L)
	1	2	3	
A	67.3	68.2	67.1	67.6
B	71.9	71.6	71.4	71.7

A. pH 为 6.5 的原发酵培养基;B. pH 为 4.5 优化后的发酵培养基

3 结论

1)通过筛选得到的 Z. M-NS7 具有较好的耐酸特性,pH 4.5 时的酒精产量为 71.7 g/L,比原来 pH 为 6.5 时的 67.6 g/L 略有提高.

2)该菌的合适发酵温度为 30~35 ℃.

3)通过正交实验优化了发酵培养基,得到了在酸性条件下适合细菌酒精发酵的培养基.其组成为:初糖质量浓度为 150 g/L,酵母膏质量浓度为 4

g/L,蛋白胨质量浓度为 2 g/L,pH 4.5,此时酒精产 量为 71.7 g/L.

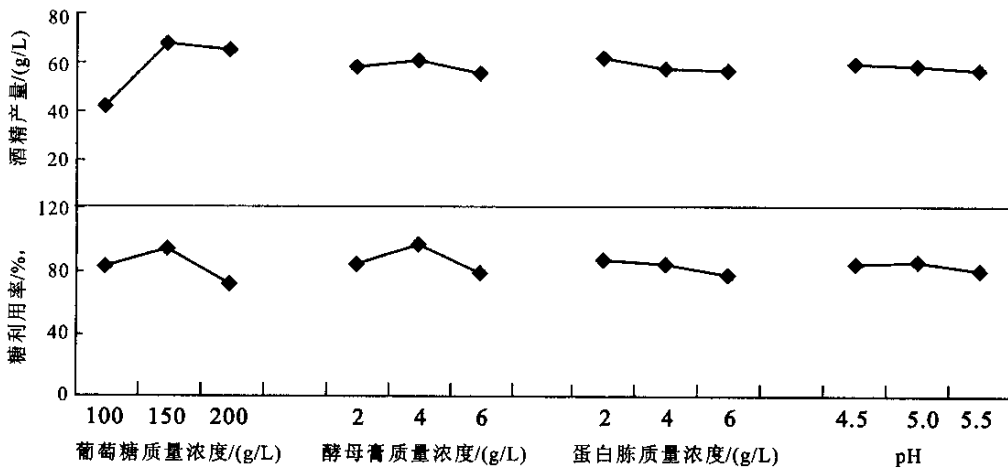


图 3 工艺条件单因素分析趋势图

Fig.3 The trend of single factor analysis

参考文献：

[1]Doelle H , Kirk L , Crittenden R , et al . *Zymomonas mobilis*-science and industrial application[J] . **Critical Reviews in Biotechnology** ,1993 ,13 57 - 62 .

[2]Ingram L O , Aldrich H C , Borges A C C , et al . Enteric bacterial catalysts for fuel ethanol production[J] . **Biotechnology Progress** ,1999 ,15 855 - 866 .

[3]Kannan T R , Sangiliyandi G , Gunasekaran P . Influence of intra- and extracellular sucrases of *Zymomonas mobilison* the ethanol production and by-product formatior[J] . **Biotechnology Letters** ,1997 ,19 661 - 664 .

[4]Jeon Y J , Svenson J C , Joachimsthal E L , et al . Kinetic analysis of ethanol production by an acetate-resistant strain of recombinant *Zymomonas mobilis*[J] . **Biotechnology Letters** 2002 24 819 - 824 .

[5]Ingram L O , Gomez P F , Lai X , et al . Metabolic engineering of bacteria for ethanol production[J] . **Biotechnology and Bioengineering** , 1998 ,58 204 - 212 .

[6]石贵阳. 运动发酵单胞菌酒精发酵研究[D]. 无锡:无锡轻工大学,1995.

[7]黄敏,熊明飞. 糖蜜酒精废液治理新技术[J]. 广西轻工业, 2000 ,1 :41 - 44 .

(责任编辑 李春丽)