

亚硫酸氢钠对酵母 GJ2008 高质量浓度蔗糖乙醇发酵的影响

杨丽峰, 伍时华, 赵东玲, 张健*, 黄翠姬

(广西科技大学 生物与化学工程学院, 广西 柳州 545006)

摘要: 探索不同质量浓度亚硫酸氢钠对酵母 GJ2008 高质量浓度蔗糖乙醇发酵的影响, 旨在为甘蔗糖蜜高质量浓度乙醇发酵提供研究基础。用 YPS 培养基替代甘蔗糖蜜, 调节亚硫酸氢钠质量浓度为 0.00、0.16、0.49、1.14、1.63 g/L, 以初始酵母数为 5.15×10^7 个/mL 进行乙醇发酵, 采用曲线下面积等方法对发酵过程进行分析。结果表明: 亚硫酸氢钠抑制了酵母的活性, 使总糖消耗速率变慢和乙醇产率降低; 亚硫酸氢钠质量浓度越高, 影响越大。当亚硫酸氢钠质量浓度为 1.63 g/L 时, 与对照组相比最大总糖消耗速率降低了 53.49%, 发酵周期延长了 37.50%, 乙醇产率下降了 33.86%。与果糖代谢相比葡萄糖代谢更易受到亚硫酸氢钠的抑制, 且抑制程度随亚硫酸氢钠质量浓度的增大而增强。

关键词: 亚硫酸氢钠; 高浓度蔗糖乙醇发酵; 曲线下面积; 葡萄糖果糖利用差异性

中图分类号: Q 815 文章编号: 1673-1689(2019)12-0129-08 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.12.019

Influence of Sodium Bisulfite on Alcoholic Fermentation from High Gravity Sucrose by *Saccharomyces cerevisiae* GJ2008

YANG Lifeng, WU Shihua, ZHAO Dongling, ZHAN Jian*, HUANG Cuiji

(College of Biological and Chemical Engineering, Guangxi University of Science and Technology, Liuzhou 545006, China)

Abstract: To explore the impact of sodium bisulfite on alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* GJ2008 for acquiring basic information for alcoholic production from high gravity sugarcane molasses. Alcoholic fermentation was carried out by GJ2008 in YPS broth supplemented with sodium bisulfite of 0.00, 0.14, 0.49, 1.14, 1.63 g/L, respectively and with an initial yeast number of 5.15×10^7 cells/mL. Area under the curve (AUC) and other method was adopted to analyze the process of alcohol fermentation. The results showed that sodium bisulfite inhibited the vitality of yeast cell and slowed down the rate of sugar uptake with reduced the ethanol productivity. The higher concentration of sodium bisulfite was, the greater influence was. Compared to the control sample (no sodium bisulfite added), the total sugar uptake rate of the maximum decreased by 53.49%, fermentation time extended by 37.50% and ethanol productivity reduced by 33.86% when the concentration of sodium bisulfite increased up to about 1.63 g/L. The results also showed that

收稿日期: 2015-12-17

基金项目: 广西科技攻关项目(0782003-2)。

* 通信作者: 张健(1964.8—), 男, 理学学士, 讲师, 主要从事微生物发酵技术方面研究, E-mail: zhang_xifa@163.cn

引用本文: 杨丽峰, 伍时华, 赵东玲, 等. 亚硫酸氢钠对酵母 GJ2008 高质量浓度蔗糖乙醇发酵的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(12): 129-136.

glucose utilization was inhibited to a larger extent than fructose by sodium bisulfite, whose inhibition extent to sugars was gradually enhanced with the increase of the concentration of sodium bisulfite.

Keywords: sodium bisulfite, high gravity ethanol fermentation from sucrose, area under the curve, differences in the glucose and fructose consumption

甘蔗糖蜜是制糖工业的副产品, 主要含有 30~60 g/dL 的糖、5~10 g/dL 的胶体和 5~16 g/dL 的灰分等其它物质^[1], 以及许多酵母发酵所需的营养成分, 已经成为我国南方地区乙醇生产的主要原料^[2]。亚硫酸法制糖得到的糖蜜, 亚硫酸钠质量浓度为 200~700 mg/L, 亚硫酸盐是甘蔗糖蜜中影响酵母发酵的抑制物之一^[3]。然而亚硫酸盐抑制酵母代谢的机理并不完全清楚, 目前研究主要集中在细胞和分子水平上, 抑制酵母细胞膜的正常代谢, 影响酵母糖酵解过程, 与乙醛发生反应, 抑制乙醇脱氢酶的活性, 诱导胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 和 Ca^{2+} 升高, 引起酵母死亡^[4-7]。针对甘蔗糖蜜乙醇发酵生产存在的乙醇度低、发酵周期长问题, 开展亚硫酸盐对酵母细胞乙醇发酵能力影响的研究, 这对甘蔗糖蜜高质量浓度乙醇发酵工业生产具有重要的基础研究意义。

为了研究亚硫酸盐对蔗糖乙醇发酵的影响, 将 NaHSO_3 贮备液添加到 YPS (Yeast Extract Peptone Sucrose) 培养基进行乙醇发酵, 通过曲线下面积 (Area under the curve/AUC)^[8] 等方法研究发酵过程中 NaHSO_3 对蔗糖、果糖和葡萄糖的代谢、细胞生长及乙醇生成的影响, 旨在为实现甘蔗糖蜜高质量浓度乙醇发酵提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株 乙醇酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) GJ2008 为甘蔗汁乙醇发酵的高产菌株, 由广西科技大学发酵工程研究所保藏。

1.1.2 培养基 斜面活化培养基 (g/L): 酵母浸膏 10, 葡萄糖 20, 蛋白胨 20; 自然 pH。

一级种子培养基(g/L): 酵母浸膏 10, 葡萄糖 20, 蛋白胨 20; 自然 pH。

二级种子培养基(g/L): 酵母浸膏 10, 糖蜜 204, 蛋白胨 20; 自然 pH。

YPS 发酵培养基(g/L): 酵母浸膏 10, 蛋白胨 20,

蔗糖 274; 自然 pH。

以上培养基均于 115 °C 高压蒸汽灭菌 30 min。

1.1.3 发酵方法 将实验室保藏菌种接至一级种子培养基中, 摇床 120 r/min, 32 °C 培养 12 h 后以体积分数 10% 接种量转接至二级种子培养基中, 摇床 120 r/min, 32 °C 培养 12 h 后经 4 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液得湿酵母泥, 加入无菌水振荡混合制得 10 倍浓缩种子悬液。以体积分数 10% 接种量 (3 mL 浓缩种子液) 接种至 300 mL 的 YPS 发酵培养基中 (500 mL 三角瓶) 进行发酵, NaHSO_3 贮备液过滤除菌加入发酵液中, 调节浓度梯度 (g/L) 为 0.00、0.16、0.49、1.14、1.63, 以 0.00 g/L 为对照试验组。初始酵母数约 5.15×10^7 个/mL, 用透气膜封口, 摇床 120 r/min, 32 °C 条件下进行发酵, 每组 3 个平行。发酵开始 0、3 h 以后每隔 6 h 取样并测 CO_2 失重, CO_2 失重小于 0.3 g 时发酵结束。

1.2 分析方法

样品处理: 取 4 mL 发酵液, 12 000 r/min 冷冻离心 3 min, 用移液枪吸取上清液储存于 -60 °C 冰箱, 用于糖和乙醇浓度分析; 加入与吸取上清液等量无菌的 0.85 g/dL 生理盐水振荡混合成菌悬液储存于 4 °C 冰箱, 用于测定酵母细胞 OD 值和死亡率。

发酵参数测定: 使用 SGD-IV 全自动还原糖测定仪测定还原糖及酸解后的残总糖。使用 UV-1100 紫外可见分光光度计, 在 560 nm 波长下统一稀释 30 倍测量菌悬液的吸光度。采用美兰法^[9]测定酵母细胞存活率。采用生物传感分析仪 SBA-40C 测定葡萄糖和乙醇浓度, 标准品的葡萄糖质量浓度 1 g/L、乙醇体积分数 0.075%, 发酵上清液稀释至合适浓度进样分析。蔗糖质量浓度等于残总糖质量浓度减去还原糖质量浓度, 果糖质量浓度等于还原糖质量浓度减去葡萄糖质量浓度。

1.3 发酵过程曲线分析

蔗糖、果糖、葡萄糖、残总糖的代谢曲线以及 OD 值和乙醇度变化曲线运用 GraphPad Prism 6.0 软件进行绘制, 并分别获得蔗糖、果糖、葡萄糖、残总糖、OD 值

和乙醇度曲线下面积^[8],记作蔗糖 AUC、果糖 AUC、葡萄糖 AUC、残总糖 AUC、OD 值 AUC^[10]和乙醇度 AUC。

1.4 发酵参数计算

发酵参数按蒋凯描述方法进行计算^[11]。

2 结果与讨论

2.1 亚硫酸氢钠对细胞生长的影响

在不同亚硫酸氢钠质量浓度(g/L)0.00、0.16、0.49、1.14、1.63 条件下,酵母 GJ2008 生长趋势基本一致,0~12 h 为延滞期和对数生长期,12 h 以后达到稳定期,如图 1 所示。当 NaHSO₃ 质量浓度低于 1.14 g/L 时,酵母经过短暂的适应后开始快速、大量繁殖;当 NaHSO₃ 质量浓度为 1.63 g/L 时,发酵 0~3 h,细胞数明显没有增加,3 h 后细胞才开始呈对数增长。单位时间 OD 值 AUC(OD 值 AUC/发酵时间)可以简捷、直观地描述发酵过程中酵母细胞生物量的变化趋势,评估酵母的生长状况^[10]。细胞生长状况越好,细胞数目越多,单位时间 OD 值 AUC 越大,反之亦然^[12]。由表 1 可知,不同 NaHSO₃ 质量浓度梯度

下,对照组的单位时间 OD 值 AUC 最大(16.69),单位时间 OD 值 AUC 随 NaHSO₃ 质量浓度的增大而减小,当 NaHSO₃ 质量浓度为 1.63 g/L 时,单位时间 OD 值 AUC 最小(14.26)。表明亚硫酸氢钠的加入使酵母细胞生长缓慢,细胞数减少;且亚硫酸氢钠质量浓度越高,细胞总数越少。

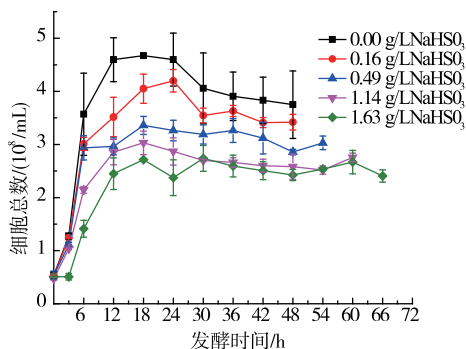


图 1 不同亚硫酸氢钠质量浓度条件下乙醇发酵过程细胞生长曲线

Fig. 1 Profiles of biomass growth during the alcohol fermentation process by *S.cerevisiae* GJ2008 at different sodium bisulfite concentrations

表 1 不同亚硫酸氢钠质量浓度条件下酵母细胞生长曲线下面积

Table 1 Area under the biomass production vs.time growth curves for fermentation by *S.cerevisiae* GJ2008 at different sodium bisulfite concentrations

NaHSO ₃ 质量浓度/(g/L)	单位时间 OD 值 AUC	T_n/T_0	酵母死亡率 AUC	D_n/D_0
0.00	16.69±0.84	1.00±0.000 0	1 484±72.1	1.00±0.000 0
0.16	16.13±0.23	0.97±0.013 9	1 807±29.0	1.22±0.078 8
0.49	15.23±0.20	0.91±0.012 1	1 978±12.7	1.33±0.056 2
1.14	14.81±0.36	0.89±0.021 6	2 004±21.9	1.35±0.050 9
1.63	14.26±0.23	0.85±0.013 6	2 386±7.8	1.61±0.083 3

注: T_0 和 D_0 表示未添加 NaHSO₃ 时的单位时间 OD 值 AUC 和酵母死亡率 AUC; T_n 和 D_n 表示 NaHSO₃ 质量浓度为 0.00、0.16、0.49、1.14、1.63 g/L 时的单位时间 OD 值 AUC 和酵母死亡率 AUC。

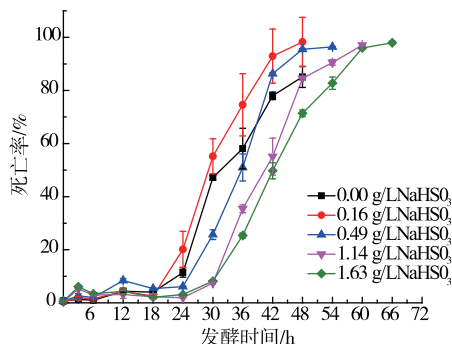


图 2 不同亚硫酸氢钠质量浓度条件下乙醇发酵过程细胞死亡率曲线

Fig. 2 Profiles of the death rate during the fermentation process by *S.cerevisiae* GJ2008 at different sodium bisulfite concentrations

由图 2 可知,发酵 0~18 h,不同 NaHSO₃ 质量浓度梯度的酵母细胞死亡率都较低,当 NaHSO₃ 质量浓度低于 0.16 g/L 时,酵母细胞在 18 h 以后开始大量死亡;当 NaHSO₃ 质量浓度超过 0.49 g/L 时,24 h 以后酵母细胞死亡率出现快速升高的现象。细胞死亡率越小则酵母死亡率 AUC 越小,细胞死亡率越大则酵母死亡率 AUC 越大。如表 1 所示,未添加 NaHSO₃ 对照组的酵母细胞死亡率 AUC 最小(1 484),酵母死亡率 AUC 随 NaHSO₃ 质量浓度的增大而增大,当 NaHSO₃ 质量浓度为 1.63 g/L 时,酵母死亡率 AUC 最大(2 386)。表明 NaHSO₃ 的加入抑制了酵母细胞的生长,使细胞生长迟缓、细胞数减少、细胞活性降低^[5],发酵时间延长。

2.2 亚硫酸氢钠对糖代谢的影响

不同亚硫酸氢钠质量浓度条件下,初始总糖为 274.00 g/L 的蔗糖乙醇发酵残总糖拟合曲线见图 3。由图 3 可知,未添加 NaHSO_3 时,酵母细胞耗糖发酵 48 h 结束; NaHSO_3 质量浓度越高,糖消耗越慢,发酵时间越长。曲线下面积法能够简单、准确地判断糖的利用情况^[8]。残糖量越高则残总糖代谢 AUC 越大,说明糖消耗越慢;残糖量越低则残总糖代谢 AUC 越小,说明糖消耗越快^[13]。由表 2 可知,不同 NaHSO_3 质量浓度条件下,蔗糖、葡萄糖和果糖的 AUC 均随着 NaHSO_3 质量浓度的增大而增大;未添加 NaHSO_3 的残总糖 AUC 最小(4 078),残总糖 AUC 随着 NaHSO_3 质量浓度的增大而增大,当 NaHSO_3 质量浓度为 1.63 g/L 时,残总糖 AUC 达到最大(6 609)。表明亚硫酸氢钠的加入抑制了酵母细

胞的糖消耗,糖利用抑制程度随亚硫酸氢钠质量浓度的增大而增强。

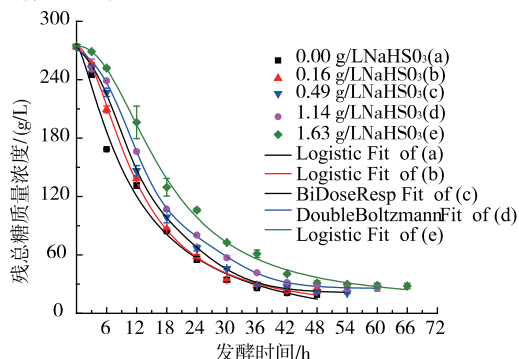


图 3 不同亚硫酸氢钠质量浓度下酵母细胞乙醇发酵残总糖代谢拟合曲线

Fig. 3 Fitted profiles of sucrose metabolism for alcohol fermentation by *S.cerevisiae* GJ2008 at different sodium bisulfite concentrations

表 2 不同亚硫酸氢钠质量浓度条件下蔗糖乙醇发酵残总糖曲线下面积

Table 2 Area under the sugar metabolism curves for ethanol fermentation by *S.cerevisiae* GJ2008 at different sodium bisulfite concentrations

NaHSO ₃ 质量浓度 /(g/L)	残糖曲线下面积(AUC)					S_r/S_0
	蔗糖	葡萄糖	果糖	总糖		
0.00	1 560±4.2	603.4±62.5	1 915±43.1	4 078±17.0		1.00
0.16	1 872±171.8	623.6±31.5	1 921±8.5	4 416±55.9		1.08±0.013 7
0.49	1 967±43.8	717.7±28.8	2 196±7.1	4 880±82.0		1.20±0.020 1
1.14	2 288±27.6	807.9±1.7	2 461±31.1	5 555±53.4		1.36±0.014 6
1.63	2 601±147.1	976.2±24.7	3 017±89.8	6 609±188.8		1.62±0.046 3

注: S_0 表示未添加 NaHSO_3 时的残总糖 AUC; S_r 表示在对应 NaHSO_3 质量浓度时的残总糖 AUC。

总糖消耗速率可以定量地表示单位时间糖消耗的快慢^[1]。由图 4 所示,发酵 0~3 h,对照组总糖消耗速率为 9.52 g/(L·h); NaHSO_3 质量浓度为 0.16 g/L 和 1.63 g/L 时,总糖消耗速率分别降低了 36.97%和

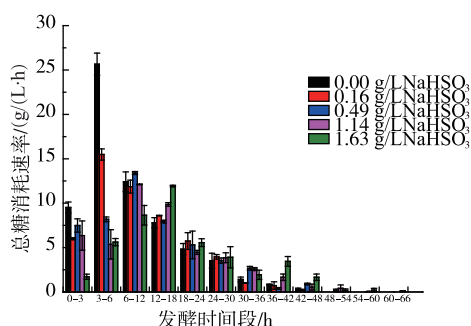


图 4 不同亚硫酸氢钠质量浓度下乙醇发酵过程总糖消耗速率
Fig. 4 Profiles of total sugar uptake rate during the fermentation process at different sodium bisulfite concentrations

81.96%。发酵 3~6 h,对照组总糖消耗速率达到最大 25.65 g/(L·h),当 NaHSO_3 质量浓度为 0.16 g/L 和 1.63 g/L 时,总糖消耗速率分别下降 39.65%和 78.09%。发酵 6 h 后,试验组酵母细胞糖耗变快,原因是由于开始时细胞生长受到 NaHSO_3 抑制,经过延滞期后细胞糖利用速率变快。发酵 18 h 后,乙醇度不断升高,对酵母细胞有一定的毒害作用,此时细胞生长达到稳定期,总糖消耗速率出现下降的趋势。说明 NaHSO_3 使总糖消耗速率变慢;且 NaHSO_3 质量浓度越高,总糖消耗速率越慢。

比总糖消耗速率能够准确地表示单位时间内细胞与糖消耗之间的关系^[1]。由图 5 可知,发酵 3~6 h,对照组比总糖消耗速率为 10.71 g 糖/(1 011 个活细胞·L·h),当 NaHSO_3 质量浓度为 0.16 g/L 和 1.63 g/L 时,与对照组相比比总糖消耗速率分别下降了 30.81%和 43.14%。0~3 h 和 3~6 h 未添加 NaHSO_3

的对照组比总糖消耗速率远高于试验组的比总糖消耗速率,说明 NaHSO_3 的加入使单位数量的酵母细胞消耗糖的能力降低,发酵周期延长。

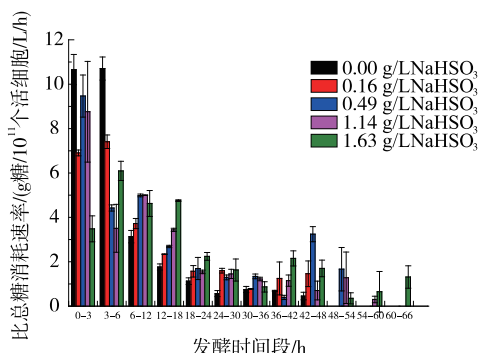


图 5 不同亚硫酸氢钠质量浓度下乙醇发酵过程比总糖消耗速率

Fig. 5 Profiles of special total sugar uptake rate during the fermentation process at different sodium bisulfite concentrations

2.3 亚硫酸氢钠对葡萄糖和果糖利用差异性的影响

蔗糖在转化酶的作用下,一分子蔗糖水解为一分子葡萄糖和一分子果糖。葡萄糖与果糖共用一套

膜运输和酶催化体系,但由于膜运输和酶亲和力的差异,酵母优先利用葡萄糖,后利用果糖^[14-15]。相同初总糖质量浓度条件下,葡萄糖 AUC/果糖 AUC 的值小于 1 表示酵母优先利用葡萄糖,葡萄糖利用速率比果糖利用速率快。由表 3 可知,同一 NaHSO_3 质量浓度梯度下,葡萄糖 AUC/果糖 AUC 总是随发酵时间的延长而依次减小。发酵 6 h 到发酵结束时对照组的葡萄糖 AUC/果糖 AUC 由 0.65 依次下降至 0.32,且葡萄糖 AUC/果糖 AUC 总是小于 1,表明酵母优先利用葡萄糖,证实了酵母对葡萄糖的嗜好性^[6]。不同 NaHSO_3 质量浓度梯度下,同一发酵时间段葡萄糖 AUC/果糖 AUC 的值随 NaHSO_3 质量浓度的增大而增大。发酵 12 h 时,对照组的葡萄糖 AUC/果糖 AUC 的值为 0.55,当 NaHSO_3 质量浓度为 1.63 g/L 时,与对照组相比葡萄糖 AUC/果糖 AUC 的值增大了 27.27%。表明随着亚硫酸氢钠质量浓度的增大,葡萄糖消耗速率变慢,葡萄糖代谢更易受到亚硫酸氢钠的影响,且抑制程度随亚硫酸氢钠质量浓度的增大而增强。

表 3 不同亚硫酸氢钠质量浓度条件下酵母细胞不同发酵时间点的葡萄糖与果糖代谢面积比值

Table 3 Ratio of glucose AUC to fructose AUC during fermentation by *S.cerevisiae* GJ2008 in YPS media containing different sodium bisulfite concentrations at different fermentation times

发酵时间(h)	NaHSO ₃ 质量浓度/(g/L)				
	0.00	0.16	0.49	1.14	1.63
6	0.65±0.10	0.70±0.06	0.73±0.02	0.74±0.01	0.78±0.01
12	0.55±0.07	0.60±0.05	0.63±0.03	0.64±0.02	0.70±0.06
18	0.49±0.06	0.53±0.04	0.56±0.02	0.58±0.01	0.61±0.06
24	0.44±0.06	0.46±0.03	0.50±0.02	0.53±0.00	0.55±0.05
30	0.39±0.05	0.41±0.03	0.44±0.02	0.48±0.00	0.50±0.05
36	0.36±0.05	0.37±0.02	0.40±0.02	0.43±0.00	0.45±0.04
42	0.33±0.04	0.35±0.02	0.37±0.01	0.40±0.00	0.42±0.04
48	0.32±0.04	0.32±0.01	0.34±0.01	0.37±0.00	0.39±0.03
54	—	—	0.33±0.01	0.35±0.00	0.37±0.03
60	—	—	—	0.33±0.00	0.35±0.03
66	—	—	—	—	0.33±0.03

注:“—”表示此时发酵已结束。

2.4 亚硫酸氢钠对乙醇生成的影响

不同亚硫酸氢钠质量浓度条件下,蔗糖乙醇发酵的乙醇生成曲线见图 6。未添加 NaHSO_3 对照组的乙醇度最高达到 15.45 % (体积分数),随 NaHSO_3 质量浓度的增大,最终乙醇度呈现逐渐下降的趋势。乙醇的生成与细胞数量和糖消耗有密切的关系^[11],比较图 4 和图 7 发现总糖消耗速率和乙醇生成速率总

体趋势基本一致。发酵 3~6 h,对照组酵母细胞处于对数生长期,乙醇生成速率为 8.86 g/(L·h),当 NaHSO_3 质量浓度为 0.16 g/L 和 1.63 g/L 时,与对照组相比乙醇生成速率分别下降了 11.51% 和 70.32%。由图 8 可知,发酵 3~6 h,对照组的比乙醇生成速率为 4.03 g 乙醇/(10¹¹ 个活细胞·L·h),当 NaHSO_3 质量浓度为 0.16 g/L 和 1.63 g/L 时,与对照组相比比乙醇

生成速率分别下降了 7.44% 和 29.28%。结果表明:亚硫酸氢钠质量浓度越高,糖消耗速率越慢,最终酒精度越低,且亚硫酸氢钠的加入使单位数量的酵母细胞生成乙醇的能力降低。

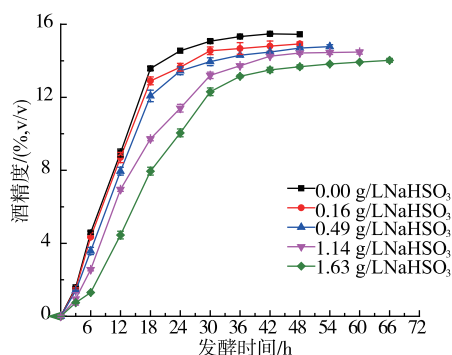


图 6 不同亚硫酸氢钠质量浓度下乙醇发酵过程酒精生成曲线
Fig. 6 Profiles of alcohol production during the fermentation process at different sodium bisulfite concentrations

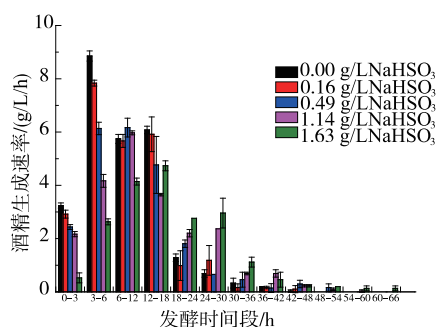


图 7 不同亚硫酸氢钠质量浓度下乙醇发酵过程酒精生成速率
Fig. 7 Profiles of alcohol production rate during the fermentation process at different sodium bisulfite concentrations

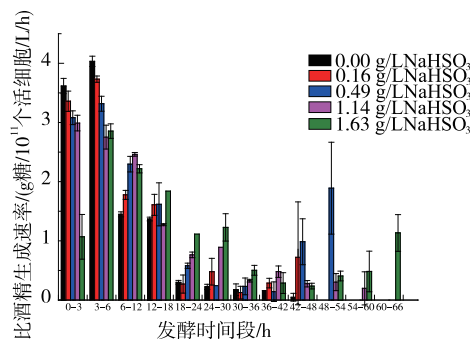


图 8 不同亚硫酸氢钠质量浓度下乙醇发酵过程比乙醇生成速率

Fig. 8 Profiles of special alcohol production rate during the fermentation process at different sodium bisulfite concentrations

2.5 不同亚硫酸氢钠质量浓度条件下乙醇发酵参数比较分析

不同 NaHSO_3 质量浓度条件下, 酒精酵母 GJ2008 蔗糖酒精发酵的主要参数见表 4。不同 NaHSO_3 质量浓度梯度下, 当 NaHSO_3 质量浓度为 0.16 g/L 和 1.63 g/L, 与对照组相比, 细胞生长变慢, 细胞数减少, 耗糖变慢, 残总糖分别增大了 21.32% 和 47.37%; 发酵周期分别延长了 0.00% 和 37.50%; 酒精度分别降低了 3.37% 和 9.19%; 乙醇产率分别降低了 3.54% 和 33.86%; 总糖发酵效率分别降低了 3.39% 和 9.21%。耗糖发酵效率随 NaHSO_3 质量浓度的增大而降低, 但差别不大; 试验组酒精度 AUC 与对照组酒精度 AUC 的比值随 NaHSO_3 质量浓度的增大而变小。当 NaHSO_3 质量浓度为 0.16 g/L 和

表 4 不同亚硫酸氢钠质量浓度条件下酵母 GJ2008 蔗糖乙醇发酵参数

Table 4 Parameters of ethanol fermentation by *S.cerevisiae* GJ2008 in YPS media at different sodium bisulfite concentrations

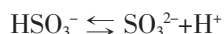
发酵参数	NaHSO ₃ 质量浓度/(g/L)				
	0.00	0.16	0.49	1.14	1.63
初总糖质量浓度/(g/L)	274.00±1.22	274.00±1.22	274.00±1.22	274.00±1.22	274.00±1.22
残总糖质量浓度/(g/L)	19.00±0.00	23.05±2.62	20.95±0.78	25.55±2.76	28.00±2.83
发酵周期/h	48	48	54	60	66
乙醇度/(%,v/v)	15.45±0.21	14.93±0.11	14.78±0.11	14.48±0.11	14.03±0.11
乙醇产率/(g/(L·h))	2.54±0.03	2.45±0.02	2.16±0.02	1.90±0.01	1.68±0.01
总糖发酵效率/%	87.06±0.008 1	84.11±0.002 3	83.27±0.009 6	81.57±0.009 6	79.04±0.002 5
耗糖发酵效率/%	93.55±0.008 4	91.82±0.011 7	90.15±0.008 0	89.96±0.001 1	88.05±0.012 1
E_d/E_0 %	1.00	95.06±0.008 7	91.28±0.014 0	83.06±0.006 6	72.98±0.0071

注: 发酵时间按 48 h 计算乙醇度 AUC, E_0 表示未添加 NaHSO_3 时的乙醇度 AUC; E_n 表示在对应 NaHSO_3 质量浓度时的乙醇度 AUC。

1.63 g/L, 与对照组相比试验组乙醇度 AUC 与对照组乙醇度 AUC 的比值分别降低了 4.94% 和 27.02%。表明添加亚硫酸氢钠后酵母细胞的生长受到抑制,细胞生长变慢,总糖消耗速率变慢,发酵周期延长,残总糖略高,乙醇度稍低,乙醇产率、总糖发酵效率和耗糖发酵效率降低;且抑制程度随亚硫酸氢钠质量浓度的增大而增强^[6,17]。

3 结 语

甘蔗制糖工艺中的亚硫酸法是用石灰和二氧化硫作为澄清剂的蔗汁澄清方法。硫磺燃烧生成二氧化硫,经过硫熏中和除去蔗汁中的胶体、色素等不利于蔗汁澄清的杂质^[18]。SO₂ 易溶于水,水溶液中含有分子 SO₂ (SO₂·H₂O),HSO₃⁻(亚硫酸氢盐),SO₃²⁻(亚硫酸盐)。甘蔗制糖的副产物糖蜜中含有少量的亚硫酸盐^[3],亚硫酸盐溶液中存在下面的反应:



其解离常数(pK 值)分别为 pK₁=6.91, pK₂=1.81^[4]。亚硫酸盐溶液中离子或分子的存在形式与溶液的 pH 有明显的关系。由于酵母的胞内 pH 约为 5.5~6.5,亚硫酸盐主要以 HSO₃⁻的形式存在,同时发酵液中还含有微量的游离 SO₂ 分子^[4,6]。

由图 1 和表 4 可知,当 NaHSO₃ 质量浓度为 0.16 g/L 时,与对照组相比细胞数和发酵效率都有所降低,此结果与 Alves^[17]研究类似。不同 NaHSO₃ 质量浓度条件下,与对照组相比试验组酵母细胞生长受到抑制,糖消耗变慢,单位数量酵母细胞的糖消耗、乙醇生成的能力下降,发酵周期延长。亚硫酸盐以游离 SO₂ 的形式抑制酵母细胞的生长^[19-20]。Schimz 等^[19]研究亚硫酸盐对酵母细胞生长的影响发

现:pH 低于 4.0,Na₂SO₃ 的浓度超过 1 mmol/L 时,酵母细胞生长受到抑制,ATP 消耗程度与 Na₂SO₃ 浓度、温度、pH 等有关。Pilkington 等^[20]研究亚硫酸盐对酵母生长的影响,细胞生长的亚硫酸盐抑制浓度为 1.0 mmol/L~2.0 mmol/L,同时伴随着乙醛和甘油产量的增加。亚硫酸盐抑制细胞的生长主要表现在 3 个方面:①游离 SO₂ 分子进入酵母细胞后影响细胞膜的正常功能^[6],与特定的受体结合使细胞膜受到伤害,抑制 3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸(PAPS)还原酶活性,使 NADPH 氧化为 NADP⁺受阻^[4],引起胞内 pH 下降和跨质膜运输动力消耗,使细胞生长受到抑制^[5,20];②游离 SO₂ 分子进入酵母细胞后使细胞内代谢产物渗漏^[4];③游离 SO₂ 分子激活了细胞内的 ATP 水解酶系统,使细胞内 ATP 含量快速下降,细胞代谢所需 ATP 不足^[6,19],最终导致酵母细胞丧失活性^[5]。此外,游离 SO₂ 分子进入酵母细胞后影响糖酵解过程,使葡萄糖或果糖转化为丙酮酸受阻;游离 SO₂ 分子与乙醛反应,抑制乙醇脱氢酶的活性,致使生成乙醇的能力降低^[4]。

本试验研究了以 274 g/L 蔗糖为底物的高质量浓度乙醇发酵过程中,不同亚硫酸氢钠质量浓度条件对酵母 GJ2008 细胞生长、糖代谢和乙醇生成等参数的影响。结果表明:亚硫酸氢钠的加入抑制了酵母细胞的活力,使糖消耗速率变慢,乙醇产率降低;与果糖代谢相比葡萄糖代谢更易受到亚硫酸氢钠的影响,且抑制程度随亚硫酸氢钠质量浓度的增大而增强。研究亚硫酸氢钠对蔗糖乙醇发酵的影响,以 AUC 等指标可以从整体上反应亚硫酸盐对糖代谢、细胞生长及乙醇生成的抑制程度,从而为实现甘蔗糖蜜高浓度乙醇发酵工业生产提供研究基础。

参考文献:

- [1] OLBRICH H. The molasses[M]. Berlin (Germany): Institut für Zuckerindustrie, 1963: 6-8, 21-30.
- [2] ZHANG Suisheng, LU Qi, CHENG Dong, et al. Studies on alcohol fermentation features of a high-yield *Saccharomyces cerevisiae* using sugarcane molasses as feedstock[J]. Guangxi Science, 2010, 17(4): 363-367. (in Chinese)
- [3] OLIVA-NETO P, DORTA C, CARVALHO A F A, et al. The Brazilian technology of fuel ethanol fermentation-yeast inhibition factors and new perspectives to improve the technology[J]. **Materials and Processes for Energy: Communicating Current Research and Technological Developments**, 2013, 1: 371-379.
- [4] DIVOL B, DU TOIT M, DUCKITT E. Surviving in the presence of sulphur dioxide: strategies developed by wine yeasts[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2012, 95(3): 601-613.
- [5] ANACLETO J, VAN UDEN N. Kinetics and activation energetics of death in *Saccharomyces cerevisiae* induced by sulfur dioxide

- [J]. **Biotechnology and bioengineering**, 1982, 24(11):2477-2486.
- [6] SCHIMZ K L. The effect of sulfite on the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Archives of microbiology**, 1980, 125(1-2):89-95.
- [7] QIAO Ruifang, YI Huilan. Investigation of the signaling pathways involved in sulfur dioxide induced cell death in yeast[J]. **Journal of Shanxi University(Nat.Sci.Ed.)**, 2012, 35(4):722-725.(in Chinese)
- [8] LICCIOLI T, CHAMBERS P J, JIRANEK V. A novel methodology independent of fermentation rate for assessment of the fructophilic character of wine yeast strains[J]. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, 2011, 38(7):833-843.
- [9] PAINTING K, KIRSOP B. A quick method for estimating the percentage of viable cells in a yeast population, using methylene blue staining[J]. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 1990, 6(3):346-347.
- [10] ARROYO-LÓPEZ F N, QUEROL A, BARRIO E. Application of a substrate inhibition model to estimate the effect of fructose concentration on the growth of diverse *Saccharomyces cerevisiae* strains[J]. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, 2009, 36(5):663-669.
- [11] JIANG Kai, WU Shihua, ZHAO Dongling, et al. Effect of aeration on very high gravity ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* GGSF16[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2015, 41(56):35-40.(in Chinese)
- [12] ARROYO-LÓPEZ F N, BAUTISTA-GALLEGO J, DURÁN-QUINTANA M C, et al. Modelling the inhibition of sorbic and benzoic acids on a native yeast cocktail from table olives[J]. **Food microbiology**, 2008, 25(4):566-574.
- [13] WU Wenqiang, WU Shihua, ZHAO Dongling, et al. Evaluation of yeast vitality during the stationary phase of very high gravity ethanol fermentation based on area under the curve of sugar secondary fermentation[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2015, 41(3):53-57.(in Chinese)
- [14] BERTHELS N J, OTERO R R C, BAUER F F, et al. Correlation between glucose/fructose discrepancy and hexokinase kinetic properties in different *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains[J]. **Applied microbiology and biotechnology**, 2008, 77(5):1083-1091.
- [15] ZUO Song, WU Shihua, ZHANG Jian, et al. Influence of external ethanol additions on fructose and glucose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2014, 33(9):971-975. (in Chinese)
- [16] ZUO Song, WU Shihua, ZHANG Jian, et al. Influence of external factors on fructose and glucose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* GJ2008[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2015, 34(7):764-771.(in Chinese)
- [17] ALVES D M G. Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica[D]. Piracicaba(Brazil):ESALQ, 1994.
- [18] 无锡轻工业学院, 华南工学院. 甘蔗制糖工艺学[M]. 北京:轻工业出版社, 1983:142-155.
- [19] SCHIMZ K L, HOLZER H. Rapid decrease of ATP content in intact cells of *Saccharomyces cerevisiae* after incubation with low concentrations of sulfite[J]. **Archives of microbiology**, 1979, 121(3):225-229.
- [20] PILKINGTON B J, ROSE A H. Reactions of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii* to sulphite[J]. **Journal of general microbiology**, 1988, 134(10):2823-2830.

科技信息

澳新拟批准一种糖化酶作为加工助剂

2019年10月23日, 澳新食品标准局(FSANZ)发布99-19通知, 其中A1184号申请请求允许一种糖化酶(Glucoamylase)作为加工助剂。

据了解, 这种糖化酶是由黑曲霉(*GM Aspergillus niger*)深层发酵产生的, 含有瓣环栓菌(*Trametes cingulata*)的基因。该酶制剂是液体制剂, 作为淀粉加工和饮用乙醇生产的加工助剂使用。

[信息来源]食品伙伴网. 澳新拟批准一种糖化酶作为加工助剂 [EB/OL]. (2019-10-23). <http://news.foodmate.net/2019/10/537822.html>