

外源乙醇对果糖与葡萄糖酒精发酵的影响

左松, 伍时华, 张健, 赵东玲*, 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: 研究了不同体积分数外源乙醇对酵母 GJ2008 利用等量果糖与葡萄糖混合发酵过程的影响,旨在为高浓度甘蔗汁酒精发酵提供参考和依据。用 YPDF 培养基模拟甘蔗汁,并调节乙醇体积分数为 0%、6%、9%和 12%,以初始酵母数为 1.12×10^8 个/mL 进行酒精发酵,高效液相色谱法测定发酵过程中果糖与葡萄糖含量,并采用曲线下面积法对果糖与葡萄糖代谢曲线进行分析。在外源乙醇体积分数为 0%~9%时,酵母 GJ2008 可以快速利用果糖和葡萄糖进行酒精发酵,但对葡萄糖有着明显的偏好;在外源乙醇体积分数为 12%时,果糖和葡萄糖消耗缓慢,生物量得不到有效增加。等质量浓度果糖与葡萄糖混合发酵表明:外源乙醇对果糖代谢的影响明显大于对葡萄糖代谢的影响,外源乙醇体积分数达 6%以上时,糖转化乙醇的产量减少了 19%~27%。

关键词: 外源乙醇;果糖;葡萄糖;酒精发酵;酵母

中图分类号: Q 815 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2014)09—0971—05

Influence of External Ethanol Additions on Fructose and Glucose Fermentations by *Saccharomyces cerevisiae*

ZUO Song, WU Shihua, ZHANG Jian, ZHAO Dongling*, HUANG Cuiji

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

Abstract: To provide basic information for high gravity sugarcane fermentation, external ethanol was added to evaluate its impact on fructose and glucose fermentations by *S. cerevisiae* GJ2008. YPDF medium was used to simulate sugarcane juice to carry out ethanol fermentation at four different external ethanol concentrations ranging from 0% to 12% with an initial yeast number of 1.12×10^8 cells/mL, and the contents of fructose and glucose were determined by HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Area under the curve (AUC) of fermentation of fructose and glucose was obtained using GraphPad Prism 5 software to analyze the discrepancy in fructose and glucose consumption. External ethanol addition had an important impact on fructose and glucose consumption, *S. cerevisiae* GJ2008 could utilize both sugars rapidly at the external ethanol concentration of less than 9% but with an obvious preference for glucose. Consumption of both sugars was severely inhibited when the external ethanol concentration increased up to about 12%, and the biomass could not be effectively produced. Fructose utilization was inhibited to a larger

收稿日期: 2014-01-08

基金项目: 广西科技攻关项目(0782003-2); 广西科技大学科学基金资助项目(1307105)。

* 通信作者: 赵东玲(1965—), 男, 湖南衡阳人, 工程师, 主要从事微生物发酵研究。E-mail: dlzhao168@126.com

extent than glucose by external ethanol addition. The ethanol production was reduced by 19%~27% after the addition of external ethanol higher than 6%.

Keywords: external ethanol, fructose, glucose, ethanol fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*

在全球能源危机的影响下,原本用于生产白糖的甘蔗被巴西等国大规模应用于酒精生产^[1]。甘蔗汁中可发酵性糖主要为蔗糖,在酒精发酵过程中,一分子蔗糖被水解为一分子果糖和一分子葡萄糖,果糖和葡萄糖共用一套膜运输和酶催化体系^[2],但葡萄糖对膜运输和酶的亲和力均大于果糖,因而酵母往往优先利用葡萄糖,使得果糖成为发酵后期主要残糖,此时发酵液中营养物质缺乏和乙醇含量高使得果糖代谢缓慢甚至停滞,导致发酵时间延长。然而,上述现象并不固定,果糖和葡萄糖利用的差异性除了与菌种的基因背景有关^[2],还易受外部因素如温度^[3]、果糖与葡萄糖比例^[4]和可同化氮源^[5]等的影响。目前,甘蔗汁发酵过程中果糖和葡萄糖利用的差异性受外源乙醇影响的研究还未见报道,因此针对此问题开展研究很有必要。

为了避免蔗糖水解过程对研究进程和结果的影响,故以 YPDF (Yeast Extract Peptone Dextrose Fructose) 培养基模拟甘蔗汁进行酵母 GJ2008 等浓度果糖与葡萄糖混合发酵,研究过程中果糖与葡萄糖利用及其酒精发酵过程受外源乙醇的影响,从而为甘蔗汁酒精发酵工业提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株

酒精酵母 GJ2008 (*Saccharomyces cerevisiae*), 为甘蔗汁酒精发酵高产菌株,由广西科技大学生物与化学工程学院发酵工程研究所提供。

1.2 培养基

斜面活化培养基:葡萄糖 20 g/L,蛋白胨 20 g/L,酵母浸膏 10 g/L,琼脂 20 g/L。一级种子培养基:葡萄糖 20 g/L,蛋白胨 20 g/L,酵母浸膏 10 g/L;自然 pH。二级种子培养基:葡萄糖 100 g/L,蛋白胨 20 g/L,酵母浸膏 10 g/L;自然 pH。YEP 溶液:蛋白胨 40 g/dL,酵母浸膏 20 g/dL。以上培养基和溶液均在 115 °C 下高压蒸汽灭菌 30 min。

YPDF 培养基: 无菌水配制乙醇溶液体积分数

分别为 0%、6%、9%和 12%,取 180 mL 加入 500 mL 的锥形瓶中,后加入 YEP 溶液 10 mL,加入食品级果糖与葡萄糖调节果糖与葡萄糖质量浓度分别为 (47.36±1.29) g/L 和 (44.15±1.11) g/L。

1.3 发酵方法

将实验室保存菌种接至斜面活化培养基上,30 °C 条件活化培养 1~2 d,待其斜面上长出白色菌落,即菌种培养成熟。将已活化的斜面种子转接至一级种子培养基中,32 °C,摇床 120 r/min,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,32 °C,摇床 120 r/min,培养 10 h 后离心弃上清液,湿酵母泥备用。将湿酵母泥(以体积分数 50%接种量)转接至 200 mL YPDF 发酵培养基中(500 mL 的锥形瓶)进行果糖与葡萄糖混合发酵,初始酵母数为 1.12×10^8 个/mL,28 °C,摇床 120 r/min 培养,每份 2 个平行,测定结果取平均值。发酵过程中每隔 4 h 取样并测 CO₂ 失重,至 CO₂ 失重小于 0.2 g 时,即发酵结束。培养条件为非严格厌氧,用透气封口膜和牛皮纸包扎批式发酵。

1.4 分析方法

果糖和葡萄糖的测定采用高效液相色谱法,其色谱参数为:流动相为 V(色谱纯乙腈):V(二次蒸馏水)=80:20,体积流量 1 mL/min,柱温 30 °C。蒸发光散射检测器 (evaporative light scattering detector, ELSD)参数:漂移管温度 95 °C,空气体积流量 2.0 L/min。生物量的测定:取发酵液 1 mL,12 000 r/min 离心 2 min,上清液-60 °C 冷冻(用以测糖质量浓度和乙醇体积分数),无菌水洗涤酵母泥并离心弃上清液,酵母泥在 80 °C 烘箱烘干至恒质量;酒精度采用生物传感分析仪 SBA-40C 测定:标准乙醇体积分数 0.075%,发酵上清液稀释至合适浓度进样分析。

1.5 糖代谢曲线分析

果糖和葡萄糖的代谢曲线运用 GraphPad Prism 5 软件进行绘制,并分别获得果糖与葡萄糖代谢曲线下面积(Area under the fermentation curve/AUC),记做果糖 AUC 和葡萄糖 AUC。

2 结果与讨论

2.1 外源乙醇对糖代谢的影响

外源乙醇对酵母 GJ2008 葡萄糖和果糖利用有较大的影响。在不同体积分数外源乙醇条件下,酵母 GJ2008 果糖和葡萄糖代谢曲线见图 1,由图 1(a)(b)可知,酵母 GJ2008 均对葡萄糖优先利用,果糖的利用一直滞后于葡萄糖。外源乙醇加入后,酵母的活力受到了抑制,果糖和葡萄糖的利用速率均有所降低。在外源乙醇体积分数为 6% 时,葡萄糖消耗几乎不受其影响,而果糖消耗完全时间明显延长。Berthels 等指出,乙醇会使得果糖的构型由 β -吡喃型向 β -呋喃型转变,吡喃型的果糖能被酵母所直接运输并利用,而呋喃型则不可以^[5],因此上述现象的出现可能与乙醇对果糖构型的转变有关。在外源乙醇体积分数达 12% 时,果糖和葡萄糖的利用均明显放缓,酵母 GJ2008 在时间段 12~24 h 明显偏向葡萄糖进行发酵,当葡萄糖含量降至 0 g/L 时,果糖由降解缓慢变为明显加快,可解释为葡萄糖的膜运输体系和膜竞争性抑制得到解除(单糖发酵表明 GJ2008 果糖和葡萄糖利用速率相当),酵母周围环境果糖较多,果糖运输的机会增加,从而果糖的利用加快。

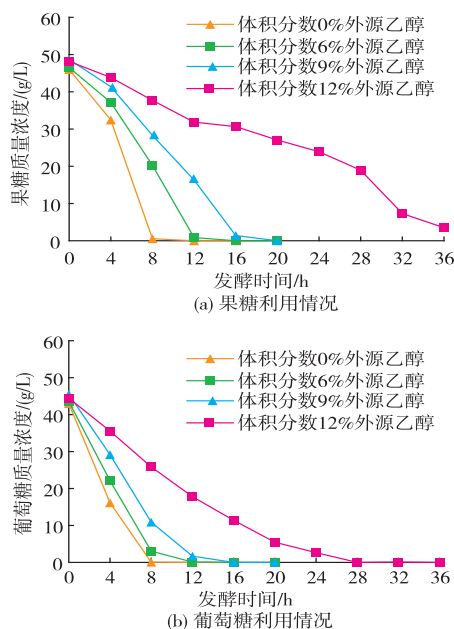


图 1 外源乙醇条件下酵母 GJ2008 果糖与葡萄糖消耗曲线
Fig. 1 Profiles of fructose and glucose concentrations during the ethanol fermentation from YPDF media by *S.cerevisiae* GJ2008 at different external ethanol contents ranging from 0%~12%

Liccioli 用 YPF(Yeast Extract Peptone Fructose)培养基成功筛选出具有较高果糖发酵能力的酵母菌,但酵母菌回至果糖与葡萄糖混合发酵时,果糖的利用速率并不比一般的酿酒酵母快。表明混合发酵时葡萄糖代谢调控作用很大程度上影响了果糖的代谢^[6]。因此,外源乙醇添加组与对照组相比,外源乙醇的加入使得葡萄糖的利用速率降低,葡萄糖代谢调控作用得不到及时解除,进而可能间接地影响了果糖的代谢。

2.2 外源乙醇对糖利用面积的影响

曲线下面积法可以整体地评价发酵的好坏^[7],这些数据可以直接从 GraphPad Prism 5 软件数据分析中获得。从表 1 可知,在不同体积分数外源乙醇条件下,葡萄糖 AUC 总是小于果糖 AUC,表明酵母 GJ2008 对葡萄糖有着明显的偏好,证实了酒精酵母对葡萄糖的嗜好性。在外源乙醇体积分数为 6% 和 9% 时,果糖 AUC 和葡萄糖 AUC 的比值相同,说明酵母 GJ2008 可耐受较高体积分数的外源乙醇。表 2 中外源乙醇体积分数梯度下果糖 AUC/果糖 AUC 和葡萄糖 AUC/葡萄糖 AUC 的比较表明了酵母 GJ2008 利用果糖和葡萄糖受到外源乙醇梯度影响的程度,前者均大于后者,可以说明果糖的代谢更易受到外源乙醇的影响。

表 1 外源乙醇条件下酵母 GJ2008 果糖与葡萄糖代谢曲线面积

Table 1 Area under the fructose and glucose utilization curves for fermentations by *S.cerevisiae* GJ2008 of media containing equal glucose and fructose to total concentration of 90 g/L

外源乙醇体积分数/%	果糖与葡萄糖代谢曲线面积		
	果糖	葡萄糖	果糖/葡萄糖
0	224±4	151±3	1.49
6	326±2	188±4	1.73
9	447±2	259±3	1.73
12	989±39	484±28	2.04

Zinnia 等以葡萄糖和果糖进行单糖酒精发酵,探讨了外源乙醇的添加对葡萄糖和果糖消耗的影响。结果表明:未添加外源乙醇时,果糖和葡萄糖消耗过程几乎没有差别;添加外源乙醇后,发酵后期果糖和葡萄糖利用均停滞,但果糖消耗受抑制程度明显高于葡萄糖的^[8]。单糖发酵实验也表明,酵母 GJ2008 果糖与葡萄糖利用速率相当(结果未给出),因此不论是单糖发酵还是混合糖发酵,与葡萄糖代

谢相比较,果糖代谢似乎均更易受到外源乙醇的影响。

表 2 外源乙醇条件下酵母 GJ2008 果糖与葡萄糖代谢面积比值

Table 2 Ratios between area parameters obtained for fructose and glucose consumption at 0% external ethanol content divided by those obtained at different external ethanol contents from 6% to 12%

添加乙醇/未添加乙醇	果糖与葡萄糖代谢曲线面积比值	
	果糖	葡萄糖
体积分数 6% 外源乙醇/ 0% 外源乙醇	1.45	1.25
体积分数 9% 外源乙醇/ 0% 外源乙醇	1.99	1.71
体积分数 12% 外源乙醇/ 0% 外源乙醇	4.41	3.20

2.3 外源乙醇对 d_{GF}/d_G 值的影响

$d_{GF}/d_G = [(d_G - d_F) / d_G]$ 即[单位时间内葡萄糖消耗量(d_G)-单位时间内果糖消耗量(d_F)]/单位时间内葡萄糖消耗量(d_G), d_{GF}/d_G 值作为衡量果糖与葡萄糖利用差异性的指标^[9], 该值在发酵过程的变化情况见图2。

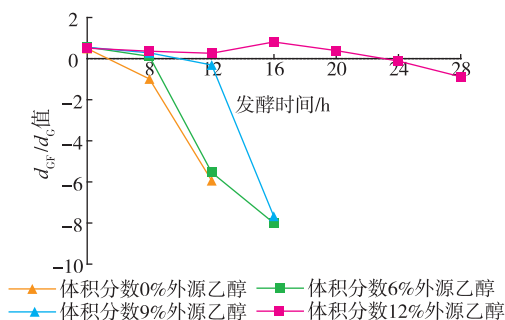


图 2 外源乙醇条件下酵母 GJ2008 果糖与葡萄糖混合发酵 d_{GF}/d_G 值变化曲线

Fig. 2 Profiles of d_{GF}/d_G value during the ethanol fermentation from YPDF media by *S.cerevisiae* GJ2008 at different external ethanol contents ranging from 0%~12%

由图 2 可知,外源乙醇对果糖与葡萄糖利用差异性影响明显,随着外源乙醇体积分数的提高,果糖与葡萄糖利用差异性逐渐拉大,至外源乙醇体积分数为 12% 时, d_{GF}/d_G 值一直维持在较高水平,表明乙醇体积分数 12% 左右已经非常不利于果糖与葡萄糖利用差异性的缩小。

2.4 外源乙醇对细胞生成和乙醇合成的影响

在不同体积分数外源乙醇条件下,酵母 GJ2008 果糖与葡萄糖混合发酵酵母干质量和乙醇生成曲线见图 3,从图 3(a)(b)可以看出,外源乙醇体积分数为 6%~12%,与对照组相比,细胞生长和乙醇生成明显受到抑制,发酵时间明显延长,且最终酵母数维持值和乙醇合成量均有不同程度降低。结合图 1(a)(b)可知,虽然酵母对果糖与葡萄糖的利用量基本一致,但最终细胞生成量和乙醇合成量均明显减少,原因可能是在较高体积分数乙醇条件下,酵母消耗部分糖用以合成如海藻糖类的物质,从而抵御乙醇对细胞的毒害作用^[9]。

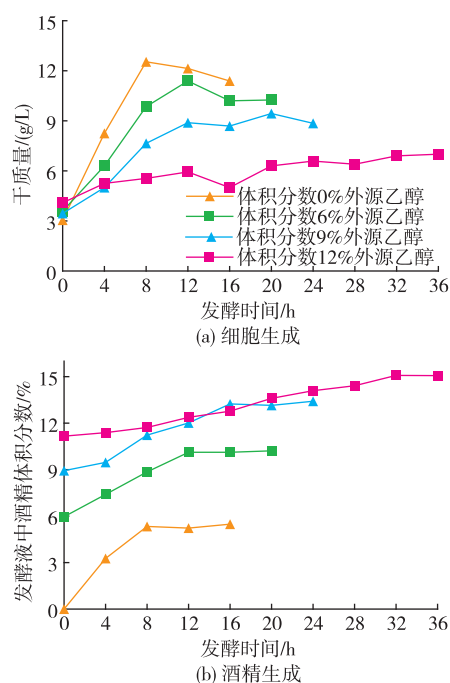


图 3 外源乙醇条件下酵母 GJ2008 果糖与葡萄糖混合发酵细胞生成和酒精生成曲线

Fig. 3 Profiles of biomass production and ethanol accumulation during the ethanol fermentation from YPDF media by *S.cerevisiae* GJ2008 at different external ethanol contents ranging from 0% to 12%

糖的利用与细胞的生成和乙醇的积累关系密切,结合图 1(a)(b)和图 3(a)可知,加入外源乙醇组与对照组对比表明,外源乙醇的加入不利于果糖与葡萄糖的消耗,且果糖利用受抑制程度较大,但不能得出乙醇的加入对果糖利用的抑制作用更强,因为乙醇加入后,生物量的合成和葡萄糖的利用均有

所抑制,此种抑制作用对果糖的代谢似乎有着消极的影响;体积分数 6%外源乙醇组与体积分数 9%外源乙醇组在 0~4 h 内生物量基本相同,后者果糖与葡萄糖利用受抑制程度分别要高于前者 4.99%和 13.23%,表明发酵初期葡萄糖的代谢较果糖更易受到外源乙醇的影响,结论与 Berthels 研究一致^[5];其它发酵时间段,由于生物量的不同,因而不能进行有效分析。

3 结 语

外源乙醇的加入影响了果糖与葡萄糖的利用、细胞的合成和乙醇的生成,果糖与葡萄糖的利用与细胞的合成以及乙醇的生成三者关系密切,三者彼

此影响和作用,干扰果糖与葡萄糖利用的差异性受外源乙醇的影响。本试验中用 YPDF 模拟甘蔗汁,以体积分数 50%酵母接种量避免细胞生长影响酒精发酵,并运用曲线下面积法从整体上评估外源乙醇的加入对果糖与葡萄糖的利用差异性的影响程度,结果可信度较高。

在不同体积分数外源乙醇条件下,酵母 GJ2008 等质量浓度果糖和葡萄糖混合发酵表明:发酵初期,外源乙醇对葡萄糖代谢的影响要大于对果糖代谢的影响,但就整个发酵周期而言,外源乙醇对果糖代谢的影响程度明显要高于对葡萄糖的,外源乙醇体积分数达 6%以上时,糖转化乙醇产量减少了 19%~27%。

参考文献:

- [1] 徐欣,陈如凯. 我国甘蔗燃料乙醇生产潜力与发展策略[J]. 林业经济,2009(3):55-58.
XU Xin, CHEN Rukai. Study on the production potential and development strategy of sugarcane ethanol in China [J]. **Forestry Economics**, 2009(3):55-58. (in Chinese)
- [2] Berthels N J, Cordero Otero R R, 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.
- [3] Tronchoni J, Gamero A, Arroyo-López F N, et al. Differences in the glucose and fructose consumption profiles in diverse *Saccharomyces* wine species and their hybrids during grape juice fermentation [J]. **Int J Food Microbiol**, 2009, 134 (3):237-243.
- [4] Díaz-Campillo M, Urtíz N, Soto O, et al. Effect of glucose concentration on the rate of fructose consumption in native strains isolated from the fermentation of *Agave duranguensis* [J]. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2012, 28(12): 3387-3391.
- [5] Berthels N J, Cordero Otero R R, Bauer F F, et al. Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains[J]. **FEMS Yeast Research**, 2004, 4(7):683-689.
- [6] Tommaso Liccioli. Improving fructose utilization in wine yeast using adaptive evolution [D]. Adelaide: University of Adelaide, 2010.
- [7] Liccioli T, Chambers P J, Jiranek V A. A novel methodology independent of fermentation rate for assessment of the fructophilic character of wine yeast strains[J]. **J Ind Microbiol Biotechnol**, 2011, 38(7):833-843.
- [8] Zinnai A, Venturi F, Sanmartin C. Kinetics of D-glucose and D-fructose conversion during the alcoholic fermentation promoted by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2013, 115(1):43-49.
- [9] Pradeep Puligundla, Daniela Smogrovicova, Vijaya Sarathi Reddy Obulam, et al. Very high gravity (VHG) ethanolic brewing and fermentation: A research update[J]. **J Ind Microbiol Biotechnol**, 2011, 38(9):1133-1144.