

# 杀菌剂对蔗汁乙醇酵母生长和发酵性能的影响\*

## Influence of Bactericides for *Saccharomyces cerevisiae* Growth and Fermentation Performance from Sugar-cane Juice

关妮, 杨登峰, 米慧芝, 陆琦

GUAN Ni, YANG Deng-feng, MI Hui-zhi, LU Qi

(广西科学院国家非粮生物质能源工程技术研究中心, 广西南宁 530007)

(National Engineering Research Center for Non-food Biorefinery, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China)

**摘要:**为了解决以甘蔗为原料发酵生产燃料乙醇中出现的肠膜明串株菌 (*Leuconostoc mesenteroides*) 污染问题,在酵母的不同生长期添加不同浓度的专用杀菌剂 T-9001 糖菌净,研究 T-9001 糖菌净对酵母生长和发酵性能的影响。结果表明,在生长初期,T-9001 糖菌净明显抑制酵母生长;在对数生长期,T-9001 糖菌净浓度为 0.001%、0.010% 时,对酵母生长影响较小,浓度为 0.100% 时才明显抑制酵母生长。T-9001 糖菌净的浓度不影响发酵液中的酒精浓度,但是随着 T-9001 糖菌净浓度的增加和发酵时间的延长,酵母死亡率增高。

**关键词:**葡聚糖 杀菌剂 发酵 酿酒酵母

**中图分类号:**Q591, TQ926 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-7378(2011)04-0355-03

**Abstract:** In order to solve the problem of dextran occurred in fuel ethanol industrial production from sugarcane juice, the *Saccharomyces cerevisiae* growth and fermentation were studied by adding different concentration of bactericides into different growth stage of *S. cerevisiae*. The results indicates that the bactericides can significant inhibit the early stage of *S. cerevisiae* growth. However, in logarithmic growth phase, slight effect of bactericides are detected in the concentration of 0.001% and 0.010%. When the concentration of bactericides reaches 0.100%, the *S. cerevisiae* growth was significantly affected. The bactericides will not affect the ethanol production. With the increase of bactericide concentration and fermentation time, the rate of *S. cerevisiae* death increases.

**Key words:** dextran, bactericides, fermentation, *S. cerevisiae*

随着石油资源的日益枯竭和环境问题的日趋严重,能源和环境问题已经成为全球关注的焦点。由于生物质能源具有绿色性和可再生性,它将成为未来持续能源的重要部分。目前,燃料乙醇生产与使用在国际上已实行多年<sup>[1]</sup>,已经成为世界各国发展再生能源的潮流,其发展空间巨大。

以高光效碳四植物甘蔗为原料发酵生产燃料乙醇是国家研究开发绿色能源的重要方向。在将甘蔗

压榨成甘蔗汁的车间里,会大量繁殖肠膜明串株菌 (*Leuconostoc mesenteroides*),这种菌产生一种粘性多糖——葡聚糖,导致甘蔗汁中形成如饭团一样的东西,俗称“蔗饭”。葡聚糖的产生会造成糖分严重损失和粘度增大等问题,严重时堵塞压榨机和管道<sup>[2]</sup>,影响正常的发酵生产和发酵成熟醪的酒精浓度。

葡聚糖是困扰甘蔗糖厂的常见问题,国内外大部分糖厂均使用压榨专用杀菌剂消毒,效果良好<sup>[2]</sup>。但是糖厂榨糖工艺与以甘蔗为原料发酵生产燃料乙醇的工艺有所不同。发酵的最关键要素是酿酒酵母,因此杀菌剂的添加是否影响酵母的生长,从而导致发酵结果的改变有待研究。国内以蔗汁为原料发酵燃料乙醇的研究多为对酿酒酵母的选育<sup>[3~5]</sup>,对

收稿日期:2011-07-12

修回日期:2011-09-24

作者简介:关妮(1981-),女,助理研究员,硕士,主要从事微生物技术方面的研究。

\* 国际科技合作项目(2009DFA30820),广西科技攻关项目(桂科自0991077),广西科学院基金项目(10YJ25SW14)资助。

工业化生产的研究很少。我们在进行蔗汁发酵的中试生产中,常出现明串株菌污染问题。因此本实验拟研究专用杀菌剂 T-9001 糖菌净对酵母的生长及发酵性能的影响,为未来实际生产应用提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 供试菌株

酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) gxa02 为本课题组筛选获得。

#### 1.1.2 培养基

液体培养基:葡萄糖 2%、蛋白胨 2%、酵母提取物 1%,自然 pH 值;固体培养基:液体培养基中添加 2% 琼脂粉,自然 pH 值;发酵培养基:葡萄糖 15%、蛋白胨 2%、酵母提取物 1%。

#### 1.1.3 试剂

T-9001 糖菌净是一种由硫化物和有机胺合成而得的糖厂压榨杀菌剂,杀菌对象主要是细菌、霉菌和藻类。本试验使用的 T-9001 糖菌净由广西南宁市火炬新产品开发中心和多维化工研究所共同研制,在国内约 60 家糖厂的几个榨季中连续使用,使用浓度为 0.001% (*m/m*)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 菌种活化与扩大培养

保藏的菌种经固体培养基和液体培养基活化 2 次后,以 1% 接种量转接到液体培养基中,30℃,160r/min 振荡培养约 12h,以此菌液作为种子液。

#### 1.2.2 糖菌净对酵母生长的影响

将种子液以 1% 的接种量分别接入标记为 1、2、3、1'、2'、3' 和空白的 7 瓶液体培养基中,向 1、2、3 号瓶分别加入浓度为 0.001% (规定值)、0.010%、0.100% 的糖菌净,全部在 30℃,160r/min 振荡培养,每隔 4h 取样一次,用细胞计数法测定酵母数。等到 1'、2'、3' 号酵母数生长到约为  $1 \times 10^8$ /ml 时,分别加入浓度为 0.001%、0.010%、0.100% 的糖菌净,继续培养,每隔 4h 取样 1 次,测定酵母数。培养 24h 后,停止计数,继续培养到 48h,取样并用无菌水梯度稀释涂板,30℃ 培养 2d,计算酵母数。对比在不同生长阶段添加糖菌净对酵母生长的影响。

#### 1.2.3 糖菌净对发酵的影响

将种子液以 2% 的接种量分别接入标记为 1<sup>#</sup>、2<sup>#</sup>、3<sup>#</sup>、4<sup>#</sup> 和空白的 5 瓶发酵培养基中(100ml/250ml 装量),30℃,160r/min 振荡培养 10h,向 1<sup>#</sup>、

2<sup>#</sup>、3<sup>#</sup>、4<sup>#</sup> 号中分别加入浓度为 0.0001%、0.0010%、0.0100%、0.1000% 的糖菌净,每隔 4h 取样一次,12000r/min 离心 5min,取上清,与 10% 乙腈溶液 1:1 混合,用气相色谱内标法测定酒度,并用细胞计数法测定酵母数。发酵完毕后,用无菌水梯度稀释涂板,30℃ 培养 2d,计算酵母数。对比不同浓度糖菌净对发酵过程中的酵母生长和酒精浓度的影响。

## 2 结果与分析

### 2.1 糖菌净对酵母生长的影响

样品 1~3 在接种时添加糖菌净后培养,酵母无明显生长,说明在生长初期,糖菌净抑制酵母生长。样品 1' 和 2' 与空白样对比发现,在对数生长期添加一定浓度的糖菌净,对酵母生长影响较小;样品 3' 中糖菌净浓度高于标准浓度 100 倍,使酵母生长受到明显抑制(图 1)。

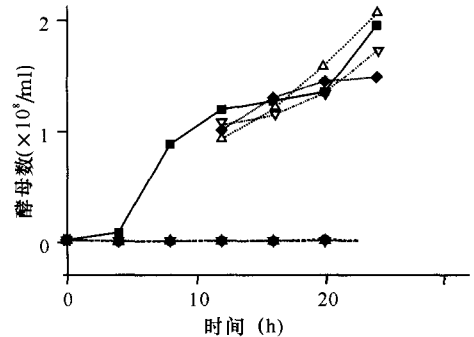


图 1 酵母的生长曲线

■:空白,●:1,▲:2,▼:3,△:1',□:2',◆:3'.

表 1 也表明,糖菌净对生长初期酵母生长影响很大,抑制酵母生长;对进入对数生长期的酵母生长有一定影响,糖菌净浓度较高时,酵母生长受到明显抑制。

表 1 培养 48h 后酵母存活数

样品编号	添加时间	添加浓度 ( <i>m/m</i> , %)	酵母存活数 ( $\times 10^8$ /ml)
空白		0	0.435 ± 0.010
1	生长初期	0.001	$1.45 \times 10^{-6} \pm 0.050$
2	生长初期	0.010	0
3	生长初期	0.100	0
1'	对数生长期	0.001	0.252 ± 0.033
2'	对数生长期	0.010	0.214 ± 0.036
3'	对数生长期	0.100	0.020 ± 0.019

### 2.2 糖菌净对发酵的影响

为了考察糖菌净对发酵的影响,在酵母的对数生长期加入不同浓度的糖菌净。发现空白、1<sup>#</sup>、2<sup>#</sup>、3<sup>#</sup> 和 4<sup>#</sup> 的生长曲线变化趋势基本一致,说明在对数生长期添加糖菌净,对酵母增长影响较小。只是

添加高于标准浓度 100 倍的糖菌净后,4# 的生长速度略低于其他样品,但不影响总体生长趋势。

表 2 数据表明,糖菌净的浓度不影响发酵液中的酒精浓度,但随着糖菌净浓度的增加和发酵时间的延长,酵母死亡率增高。

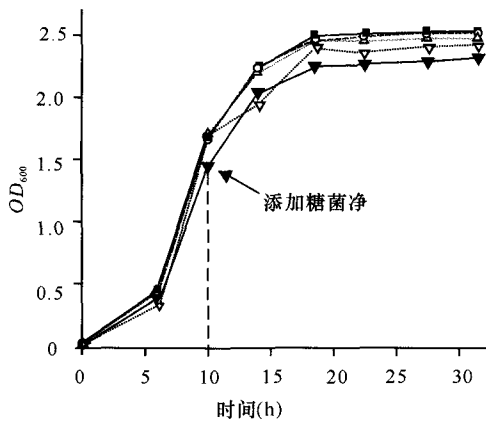


图 2 发酵过程中酵母的生长曲线

■: 1# (0.0001%), □: 2# (0.0010%), △: 3# (0.0100%), ▽: 4# (0.1000%), ▾: 空白。

表 2 发酵得到的最高酒度和最后发酵液中的酵母存活数

样品编号	添加浓度 (m/m, %)	最高酒度 (%)	达到最高酒度时间(h)	酵母存活数 ( $\times 10^8/\text{ml}$ )
空白	0	7.77 $\pm$ 0.15	22.5	4.45 $\pm$ 0.30
1#	0.0001	7.73 $\pm$ 0.21	27.5	4.25 $\pm$ 0.25
2#	0.0010	7.83 $\pm$ 0.23	31.5	3.50 $\pm$ 0.33
3#	0.0100	7.65 $\pm$ 0.17	31.5	2.60 $\pm$ 0.18
4#	0.1000	7.69 $\pm$ 0.20	31.5	1.75 $\pm$ 0.12

### 3 讨论

本文通过考察糖菌净对酵母生长及发酵生产乙醇的影响,为以蔗汁为原料发酵生产乙醇的实际生产提供理论依据。

处于生长初期的酵母,由于刚接种到新的培养基中,为了适应新的生长环境要经历一个迟缓期,此时酵母数量很少,增殖缓慢,加入糖菌净使酵母的生长受到抑制并且大量死亡(图 1、表 1),死亡率跟糖菌净浓度成正比(表 1),这说明糖菌净对酵母生长初期影响极大。在发酵生产中,要避免在酵母生长初期加入糖菌净,否则酵母将大量死亡,从而导致整个生产的停滞。

酵母进入对数生长期后,数量急剧增加,已经形成生长优势。加入糖菌净,虽然对酵母具有抑制作用,但是酵母此时以级数增长,新生的酵母远多于受损或死亡的酵母,酵母的生长暂时放缓(图 1),酵母部分死亡,死亡率跟糖菌净浓度成正比(表 1)。添加 0.001% (m/m) (规定浓度)和 0.010% (m/m) 的糖菌净时,酵母生长受到的抑制不明显,存活酵母

没有显著减少,说明添加一定浓度的糖菌净,对处于对数生长期的酵母影响较小;添加 0.100% (m/m) 的糖菌净时,酵母生长速度明显变慢,存活数显著减少,仅为空白样的 4.6%,说明糖菌净浓度过高时,对处于对数生长期的酵母具有明显影响。在发酵生产中,为了既防止葡聚糖的产生,又不影响酵母生长,可以在酵母进入对数期后添加适当浓度的糖菌净,用来抑制明串珠菌等微生物。

发酵过程中,在酵母进入对数生长期时向发酵培养基中添加适当浓度的糖菌净,对酵母生长的影响不明显,与空白相比生长曲线趋势基本一致;加入高浓度的糖菌净,酵母生长速度暂时变缓,但总体生长趋势不变(图 2)。加入糖菌净,酵母死亡率增高,导致发酵时间延长,但并不影响糖的消耗,故发酵成熟醪中的酒精浓度没有明显变化(表 2)。

在以蔗汁发酵生产燃料乙醇的工业化过程中,通过上述结论对发酵工艺有以下几点建议:(1)生产初期,种子罐里少量用来扩大培养种子液的蔗汁中不能或应该少量添加糖菌净,以免抑制酵母的生长而导致整个生产的停滞。投种后待酵母数达到  $10^8/\text{ml}$  左右,添加糖菌净用来抑制明串珠菌等微生物。(2)由于压榨工艺及气候的影响,明串珠菌会很快在甘蔗的断口处大量繁殖,伤裂和霜冻甘蔗的情况更为严重,故种子罐中最开始用来扩大培养种子的蔗汁,最好选用健康新鲜的甘蔗制备,避免选用受伤和霜冻的甘蔗,以尽量减少明串珠菌的污染。(3)运送蔗汁的管道或车辆要注意严格的除菌。

综上所述,糖菌净虽然对酵母具有杀伤力,但只要在发酵生产的开始阶段,对发酵罐体和蔗汁运输途径进行清洗消毒,对甘蔗的来源严格把关,做到尽量不加或少加糖菌净,就能将糖菌净对发酵生产的影响降到最低。

#### 参考文献:

- [1] 王素雅. 世界燃料乙醇产业发展探析[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(20): 9658-9661.
- [2] 陈俊佳, 黄玉南, 温木盛. 甘蔗糖厂的“蔗饭”问题及杀菌剂[J]. 甘蔗糖业, 1996, 6: 34-40.
- [3] 李丹, 于淑娟, 刘冬梅. 蔗汁乙醇酵母发酵性能及陶瓷固定化发酵条件初步研究[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(9): 116-118.
- [4] 杨登峰, 关妮, 米慧芝, 等. 乙醇生产酵母菌的选育[J]. 现代食品科技, 2008, 24(6): 506-508.
- [5] 范元发, 江贤章, 陈由强, 等. 适合甘蔗汁发酵高产酒精酵母的选育[J]. 生物技术, 2008, 18(1): 29-32.

(责任编辑:陈小玲)