

高产酒精酵母 Co- 158 发酵工艺优化研究

朱会霞^{1,2} 张 伟² 孙金旭^{1,2} 李英军² 李长文²

(1.衡水学院生命科学系,河北 衡水 053000; 2.河北农业大学食品科技学院,河北 保定 071001)

摘要: 对⁶⁰Co诱变后得到的高产酒精酵母菌株 Co- 158 进行了发酵工艺优化研究。通过正交试验确定其适宜发酵工艺条件为:料水比 1 2,接种量 4.5%,发酵时间 84 h,初始 pH 值 4.5;对流加葡萄糖工艺进行优化,适宜工艺为:以玉米粉糖化醪为基质,发酵时间 84 h,发酵过程中间歇流加 6%的葡萄糖,其三角瓶发酵酒精产率为 19.20% (v/v),残还原糖为 0.685%;10 L 发酵罐小试酒精产率为 18.60% (v/v),残还原糖为 0.013%。

关键词: 微生物; 酵母 Co- 158; 酒精生产; 浓醪发酵; 工艺优化

中图分类号:TS262.2;TQ920;TS261.4 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2006)06-0025-03

Study on the Optimization of Fermentation Technology of High-yield Alcohol Yeast Strain Co- 158

ZHU Hui-xia¹, ZHANG Wei² and SUN Jin-xu^{1,2} et al.

(1. Department of Biology, Hengshui College, Hengshui, Hebei 053000; 2 Agriculture University of Hebei, Baoding, Hebei 071001, China)

Abstract: The fermentation technology of high-yield alcohol yeast strain Co- 158 (produced by the mutagenesis of ⁶⁰Co) were optimized and the best technical conditions in fermentation were determined by orthogonal test as follows: the ratio of raw materials and water was 1 2, 4.5% inoculation quantity, 84 h fermentation time, and initial pH value was 4.5. Besides, glucose addition techniques were optimized as follows: corn flour sweet mash used as ground substance, 84 h fermentation time, addition of 6% glucose at intermittent flow in fermentation, alcohol yield by triangle flask fermentation was 19.20% (v/v) and the content of residual reducing sugar was 0.685%, and alcohol yield by 10 L fermenting pot fermentation was 18.60% (v/v) and the content of residual reducing sugar was 0.013%.

Key words: microbe; Co- 158 strain; alcohol fermentation; high gravity fermentation; technical optimization

酒精浓醪发酵具有设备利用率高、蒸馏能耗少、生产成本低及酒糟易处理等优点,是一种具有巨大应用价值的酒精发酵技术。然而,酒精浓醪发酵时,高底物浓度和高酒精度会限制酵母菌的生长繁殖,对酒精发酵产生强烈的抑制作用^[1-3]。因此,发酵工艺的改进和耐高浓度酒精酵母的选育是实现酒精浓醪发酵工业化生产的关键。我国一直将发酵工艺的改进和选育优良高产酒精酵母菌种作为重点研究课题,也是许多酒精研究专家努力的方向^[4]。本实验将选育出的高产酒精酵母菌株 Co- 158 以玉米粉糖化醪为基质进行发酵实验,采用正交试验确定适宜的工艺条件,发酵过程中采用流加糖液的方法,发酵 84 h 后,三角瓶发酵酒精产率为 19.20% (v/v),残还原糖为 0.685%;10 L 发酵罐小试酒精产率为 18.60% (v/v),残还原糖为 0.013%。

1 材料与方法

1.1 试验材料、仪器

1.1.1 试验菌种及来源

Co- 158: 来自诱变菌种。

1.1.2 培养基

普通 YPD: 蛋白胨 20 g, 葡萄糖 20 g, 酵母膏 10 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水定容至 1000 mL, 115 °C 灭菌 30 min。

分离培养基: 麦芽汁(10°Bx); YPD 培养基(葡萄糖 20 g, 蛋白胨 20 g, 酵母浸膏 10 g, 水 1000 mL)。

酵母菌保藏用培养基: 麦芽汁琼脂培养基, 将分离出的菌种保存在麦芽汁琼脂培养基试管斜面上, 每隔两个月转接一次。

1.1.3 其他试剂及材料

原麦汁: 购自保定市京苑啤酒有限公司; 原麦芽汁

基金项目: 河北省科技攻关项目(032201100)资助。

收稿日期: 2006-03-13

作者简介: 朱会霞(1977-), 女, 河北衡水人, 硕士研究生, 主要从事食品微生物的研究。

浓度 13°Bx。

酒精发酵原料:市售玉米粉;淀粉含量 76%。

其他试剂:硫酸铜(CuSO₄·5H₂O)、酒石酸钾钠、次甲基蓝、亚铁氰化钾、葡萄糖、乙酸锌、氢氧化钠、盐酸等均为分析纯。

酶制剂: α-淀粉酶:酶活力 3000 u/g,北京双旋微生物培养基制品厂;糖化酶:酶活力 17400 u/g,无锡杰能科技有限公司。

1.1.4 主要仪器设备

LRH-250A型生化培养箱,广东省医疗器械厂; BioF-2000型10L发酵罐,上海高机实业总公司; HZQ-QX全温振荡器,哈尔滨东联电子技术开发公司; OLYMUPUS显微镜;酒精蒸馏设备、酒精比重计等。

1.2 实验方法

1.2.1 Co-158菌株发酵工艺正交实验

通过预试验、单因子试验,确定正交试验不同因素、水平。分别设料水比(A)、接种量(B)、发酵时间(C)和初始pH值(D)4个因子,每个因子取4个水平,进行酒精发酵,研究酒精发酵适宜的工艺条件(见表1)。

表1 试验因子水平对照

水	A	B	C	D
平	(料水比)	(接种量%)	(发酵时间h)	(初始pH值)
1	1:1.7	1.5	60	3.5
2	1:2.0	3.0	72	4.0
3	1:2.3	4.5	84	4.5
4	1:2.6	6.0	96	5.0

注:接种量1.5%,3.0%,4.5%和6.0%分别为接种后1mL糖化醪中的含菌数为 0.7×10^7 个/mL, 1.4×10^7 个/mL, 2.1×10^7 个/mL和 2.8×10^7 个/mL。

1.2.2 工艺优化实验

1.2.2.1 发酵前补糖^[5]

在适宜工艺条件下,在糖化醪中加入不同量的葡萄糖后接入种子液,比较补糖后各发酵醪酒精产率差异及与未补糖发酵醪酒精产率差异。

1.2.2.2 发酵中一次补糖

在最佳工艺条件下,发酵一定时间后,一次补入一定量的葡萄糖液,发酵结束后比较补糖与未补糖发酵醪酒精产率的差异。

1.2.2.3 发酵中间歇补糖

在适宜工艺条件下,发酵过程中分几次补入一定量的葡萄糖液,比较间歇补糖与一次补糖发酵醪酒精产率的差异。

1.2.3 10L发酵罐发酵实验

1.2.3.1 发酵工艺流程^[6]

斜面菌种
接种
YPD液体培养基 酒母培养
接种
玉米粉 搅拌 低温蒸煮液化、糖化 发酵 成熟醪液 蒸

馏 酒精

1.2.3.2 酵母的扩培

挑取斜面酵母菌,接入10mL麦芽汁培养基中,于30℃静止培养24h,转入盛有100mL麦芽汁的三角瓶中,于30℃,200r/min的恒温摇床上培养14h后倒入盛有1000mL麦芽汁的三角瓶中,静止扩大培养18h,酵母计数达到 4.5×10^8 个/mL以上即可接种。

1.2.3.3 发酵试验

在10L的发酵罐内,按一定接种量将种子接入糖化醪中,150r/min,30℃保温,发酵84h。

2 结果与分析

2.1 Co-158菌株发酵工艺正交实验

以玉米粉为原料采用4因素4水平正交试验,对Co-158菌株进行酒精发酵试验,发酵结束后分别测定各组处理的酒精浓度,其L₁₆(4)⁵正交试验结果见表2和图1。

表2 正交试验显著性分析

因子	平方和	自由度 df	均方差	F	显著性 水平
料水比 A	60.045	3	20.015	48.207*	0.000
接种量 B	18.792	3	6.264	15.087	0.000
发酵时间(h) C	16.455	3	5.485	13.211	0.000
初始pH值 D	6.403	3	2.134	5.141	0.005
总和	8756.560	48			
修正模型的 总平方和	116.227	47			

*代表差异显著性。

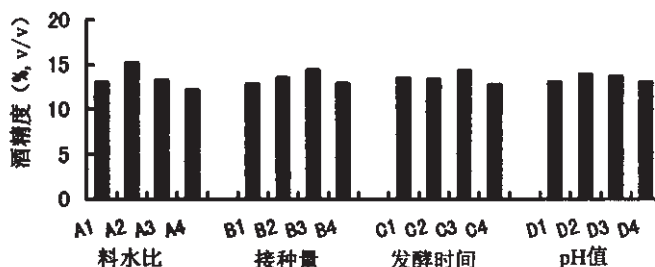


图1 试验因子对Co-158菌株酒精产量的影响

由表2可知,因素主次顺序为A B C D。料水比对菌株发酵的成熟醪酒精体积分数影响显著,其次为接种量和发酵时间,而pH值对酒精发酵的影响最小,这与生理特性的实验结果相符。由图1分析可知,发酵产酒精的理论适宜工艺条件组合为A₂B₃C₃D₂,料水比1:2,接种量为4.5% (v/v),初始pH值为4.5,发酵84h。

2.2 最佳条件验证

对最佳条件A₂B₃C₃D₂和正交试验表中产酒精最高处理(A₂B₃C₄D₁)进行二次平行试验。试验重复3次。用T检验法、平均数±SD表示。结果见表3。

表3中最佳条件验证结果表明,理论最佳条件A₂B₃C₃D₂高于正交试验表中产酒精最高的处理

表3 最佳条件验证结果

处理	酒精产率(%, v/v)
A ₂ B ₃ C ₃ D ₂	16.57±0.115
A ₂ B ₃ C ₄ D ₁	16.00±0.058

(A₂B₃C₄D₁), 说明发酵产酒精的最佳工艺条件组合为 A₂B₃C₃D₂, 料水比为 1 2, 接种量为 4.5%(v/v), 初始 pH 值为 4.5, 发酵 84 h。

2.3 工艺优化实验

糖化后的玉米醪按表 4 进行处理(对照不加葡萄糖), 在最佳工艺条件下发酵, 结束后测定各组处理酒精浓度。

表4 工艺优化实验结果

处理	酒精产率(%, v/v)	残还原糖(%)
1. 对照	16.13±0.208Ed	0.0031
2. 发酵前补 2% 葡萄糖	17.00±0.265Dc	0.715
3. 发酵前补 4% 葡萄糖	18.27±0.289Cb	0.853
4. 发酵前补 6% 葡萄糖	18.43±0.289BCb	2.147
5. 发酵中一次补 6% 葡萄糖	18.30±0.200Cb	1.548
6. 发酵中间歇补 6% 葡萄糖	19.20±0.103Aa	0.685
7. 发酵中间歇补 8% 葡萄糖	18.90±0.157ABa	3.651

由表 4 分析可知, 发酵中间歇补加 6% 葡萄糖的处理, 酒精产率明显高于其他, 说明此处理适宜于酒精产量的提高。

2.4 10 L 发酵罐小试

Co-158 菌株活化、扩培后接种于玉米粉糖化醪中(料水比 1 2), 接种量 4.5%(v/v), 初始 pH 值 4.5, 发酵 84 h, 发酵中间歇补 6% 的葡萄糖。接种后通气 4 h, 通气量 300 L/h, 每 8 h 取样测定酒精产率、还原糖量、菌数、pH 值。结果见图 2。

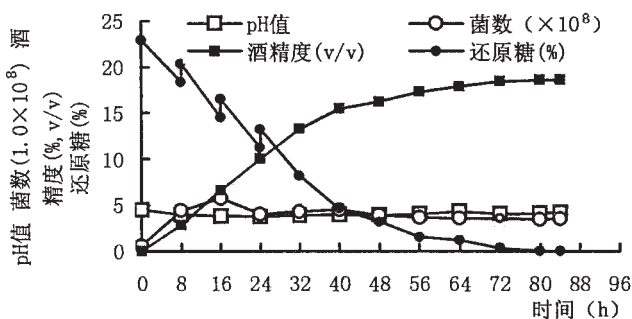


图2 10 L 发酵罐 Co-158 发酵小试

图 2 可知, 发酵至 40 h 时, 成熟醪酒精体积分数为 15.5%(v/v), 还原糖为 4.611%, 发酵至 72 h 时, 成熟醪酒精体积分数为 18.5%(v/v), 还原糖为 0.348%, 最终成熟醪酒精体积分数为 18.6%(v/v), 还原糖 0.013%; 菌数 40 h 时达到最高, 为 4.5×10^8 cfu/mL; 初始 pH 值 4.5, 发酵过程中 pH 值变化不大, 变化范围为 3.9~4.5。

3 结论

3.1 4 因素 4 水平正交试验确定了 Co-158 以玉米粉为原料的酒精发酵工艺。浓醪发酵最佳条件: 料水比 1 2, 接种量 4.5%(v/v), 初始 pH 值 4.5, 发酵 84 h。在此条件下, 200 mL 三角瓶发酵的最高酒精产量达到 19.20%(v/v), 残还原糖为 0.685%。

3.2 以玉米粉为原料进行 10 L 发酵罐小试, 酒精产率为 18.60%(v/v), 残还原糖含量为 0.013%。

4 讨论

章克昌教授在 1997 年的专利中描述了一种浓醪酒精发酵技术, 最终酒精浓度达到 13%~16%(v/v), 发酵时间在 50 h 以内; 赵华等人也报道, 浓醪发酵最终酒精产率一般为 13.2%(v/v), 发酵时间为 72 h; 黄宇彤等人研究了添加 Tween80 和麦角甾醇的高浓度酒精发酵, 最终酒精浓度可以达到 15.32%(v/v); 江南大学毛忠贵教授报道了玉米糖化清液补料发酵工艺, 最终酒精浓度可以达到 15%(v/v) 以上; 刘建军^[8]等人从土壤、酒醅等样品中分离选育、物理因子处理获得一株高产酒精酵母 NHY4-36, 以玉米淀粉为原料, 32 发酵 60~68 h, 可产酒精 17.5%(v/v) 以上, 耐酒精度 20%(v/v) 以上, 并适合边糖化边发酵工艺; 江南大学李永飞等人利用酵母耐高酒精度特性, 采用流加糖液的方法, 使酒精的体积分数在 20 时达到 15%(v/v) 以上。

本研究所得菌株 Co-158 以玉米粉糖化醪为基质发酵 84 h, 三角瓶发酵酒精产率为 19.20%(v/v), 10 L 发酵罐小试酒精产率为 18.60%(v/v)。

参考文献:

- [1] Casey. G. P., Magnus. C. A., Ingledew. W. M., High gravity brewing: nutrient enhanced production of high concentrations of ethanol by brewing yeast [J]. Biotechnology. Lett. 1983, (5): 429-434.
- [2] Thomas. K. C., Ingledew. W. M., Freely alcohol production effects of free aminonitrogen on fermentation of very-high-gravity wheat mashes [J]. Appl. Environ. Microbiol. 1990, (56): 2046-2050.
- [3] Thomas. K. C., Ingledew. W. M., Production of 21% (v/v) ethanol by fermentation of very high gravity (VHG) wheat mashes [J]. J. IND.
- [4] 吴国锋. 酒精浓醪发酵的计算与分析 [J]. 酿酒, 2003, 30(4): 70-72.
- [5] 池振明. 利用中温蒸煮工艺进行高浓度酒精发酵 [J]. 生物工程学报, 1995, 11(3): 228-232.
- [6] 毛忠贵. 高浓酒精补料发酵工艺的研究 [J]. 酿酒科技, 2003, 116(2): 89.
- [7] 李永飞. 清液补料酒精发酵工艺研究 [J]. 酿酒科技, 2003, 117(3): 104.
- [8] 刘建军, 姜鲁燕, 赵祥颖, 等. 高产酒精酵母菌种的选育 [J]. 酿酒, 2003, (1): 57-59.