

酵母菌产酒精能力的葡萄糖消耗检测法

张新军¹, 岳海梅²

(1. 西藏农牧学院高原生态研究所, 西藏 林芝 860000; 2. 西藏农牧学院植物科学学院, 西藏 林芝 860000)

摘要: 研究了 1 种检测酵母菌产酒精能力的新方法。利用酒精发酵液体培养基在厌氧条件下对产酒精酵母菌株 YE-1、YE-2、YE-3 进行酒精发酵培养, 同时利用菌体发酵培养基在有氧条件下进行菌体培养实验作为对照。通过分光光度法检测培养基中葡萄糖的消耗量, 根据所消耗的葡萄糖中用于酒精发酵的量, 推算出 3 株酵母菌株在酒精发酵培养基中酒精含量分别为 4.03 mg/mL、3.50 mg/mL 和 3.77 mg/mL, 进而比较出各菌株产酒精能力的大小。

关键词: 酵母菌; 酒精发酵; 葡萄糖消耗检测法

中图分类号: TS261.1; TS262.2; TS261.7; TQ920

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2011)08-0117-04

Glucose Consumption Assay for the Evaluation of Ethanol-producing Capability of Microzyme

ZHANG Xinjun¹ and YUE Haimei²

(1. Tibet Plateau Ecology Research Institute, Tibet Agricultural and Animal Husbandry College, Linzhi, Xizang 860000;

2. College of Plant Science, Tibet Agricultural and Animal Husbandry College, Linzhi, Xizang 860000, China)

Abstract: A new method for the evaluation of ethanol-producing capability of microzyme had been developed. In the experiments, while microzyme cells were cultured in cell culture mediums under aerobic conditions, ethanol-producing microzyme strains YE-1, YE-2 and YE-3 were cultured for alcohol fermentation in liquid culture mediums under anaerobic conditions. The amount of glucose consumption in alcohol fermentation liquid mediums was detected by spectrophotometric assay. Then alcohol concentration was calculated according to the amount of glucose consumption for alcohol fermentation. The alcohol concentration in these three alcohol fermentation alcohol mediums were 4.03 mg / mL, 3.50 mg / mL and 3.77 mg / mL respectively, and then ethanol-producing capability of each strain was revealed.

Key words: microzyme; alcohol fermentation; glucose consumption assay

近年来, 国际石油价格一直维持在高位, 这不仅对世界经济产生了巨大影响, 甚至还影响着人们的生活方式。酒精是可再生的清洁能源, 是石油的理想替代品。世界上的汽车生产大国纷纷研发酒精和汽油的混合燃料汽车、纯酒精燃料汽车等新能源汽车, 以减少对石油的依赖, 适应未来的市场, 期望能够在竞争中取得主动。酒精作为一种可再生的新型能源, 它同时又是较理想的清洁能源, 其燃烧后的产物是二氧化碳和水, 不会对空气造成污染^[1-2]。酵母菌是一类单细胞的真核微生物, 很多种类的酵母菌具有将有机物在厌氧条件下转化为酒精的能力^[2-4]。酵母菌产酒精能力的大小, 是衡量该菌株能否用于酒精发酵工业的一个重要指标, 因此, 酵母菌产酒精能力的检测手段显得尤为重要。酒精浓度测定的常用方法主要有密度瓶法、折光率法、酒精计法、分光光度法、化学氧化法、荧光光度法等 10 多种检测法^[5]。但这些方法均有不足, 或是操作复杂、或不够精确、或仪器价格较为

昂贵^[5-7], 而且这些方法只适用于检测成分较为单一的酒精水溶液中酒精的含量。由于发酵液中成分过于复杂, 这些检测法都不能直接用于检测发酵液中的酒精含量, 因此, 不适于筛选酒精高产酵母菌株。本文从葡萄糖消耗的角度对酵母菌产酒精的能力进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 供试酵母菌菌株

以作者分别从葡萄、醪糟、菜园土中筛选到的产酒精酵母菌株 YE-1、YE-2、YE-3 作为实验用酵母菌株。

1.2 培养基和试剂

1.2.1 酵母分离培养基

葡萄糖 1 g, KCl 1.8 g, KH₂PO₄ 1 g, 酵母汁 0.5 g, 麦芽糖 0.5 g 溶于 1000 mL 蒸馏水中, 再加入 12.5 g 琼脂粉, pH 值调至 4.0, 121 °C 灭菌 15 min, 待冷却至 50 °C 左右时, 于超净工作台倒平板, 用于菌种的活化。

收稿日期: 2011-04-13

作者简介: 张新军(1973-), 男, 山东省济宁市人, 讲师, 硕士。

1.2.2 菌体发酵培养基(用于酵母菌菌体培养)

葡萄糖 1 g, KCl 1.8 g, KH_2PO_4 1 g, 酵母汁 0.5 g, 溶于 1000 mL 蒸馏水中, pH 值调至 4.0, 分装于三角瓶(100 mL), 15 mL/瓶, 121 °C 灭菌 15 min。

1.2.3 酒精发酵培养基

葡萄糖 10 g, KCl 1.8 g, KH_2PO_4 1 g, 酵母汁 0.5 g, 溶于 1000 mL 蒸馏水中, pH 值调至 4.0, 分装于发酵瓶(250 mL)中, 50 mL/瓶, 加橡胶塞密封, 121 °C 灭菌 15 min。

1.2.4 铁氰化钾($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$)标准显色液(1.8 mg/mL)的配制^[8]

分别准确称取 1.8000 g 干燥的铁氰化钾和 30.000 g 无水碳酸钠, 用蒸馏水溶解后, 移入 1000 mL 容量瓶中, 加水至标线, 摇匀, 贮藏在棕色瓶中作为显色剂, 备用。

1.2.5 葡萄糖标准溶液的配制^[8]

准确称取干燥葡萄糖(取 1 g 葡萄糖于烘箱内烘干至重量不再减少即可)0.1000 g, 用蒸馏水溶解后移入 100 mL 容量瓶中, 稀释到标线, 摇匀即为 1.0 mg/mL 的葡萄糖标准溶液。用时按要求稀释。

1.3 葡萄糖标准曲线的绘制

根据文献^[8]所述方法, 加入葡萄糖标准液、蒸馏水和铁氰化钾($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$)标准显色剂, 其数量见表 1。测量 $\text{OD}_{420\text{nm}}$ 吸光度值后绘制葡萄糖标准曲线。

表 1 葡萄糖浓度与测定结果

管号	葡萄糖标准液 (mL)	蒸馏水 (mL)	显色剂 (mL)	葡萄糖含量 (mg)	吸光度值 ($\text{OD}_{420\text{nm}}$)
0	0	2	3	0	
1	0.2	1.8	3	0.2	
2	0.4	1.6	3	0.4	
3	0.6	1.4	3	0.6	
4	0.8	1.2	3	0.8	
5	1.0	1.0	3	1.0	
6	1.2	0.8	3	1.2	

1.4 酵母菌菌体浓度的测定^[9]

将酵母菌活化后转接入菌体发酵培养基中, 放入 30 °C 摇床, 100 r/min 培养 18 h, 用比浊法测定酵母菌菌体的浓度, 用可见光分光光度计检测, 使其 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 光密度值保持在 0.5。如果浓度过大, 可将菌液进行稀释, 如果浓度过低, 则延长培养时间。

1.5 酒精发酵

将酵母菌接入发酵瓶并加橡胶塞密封, 然后把发酵瓶放入到 30 °C 的培养箱中进行酒精发酵阶段的培养, 无氧条件下培养 7 d 后, 取出测酒精浓度。

1.6 葡萄糖消耗法测定酒精浓度

1.6.1 测定原理

作为酵母菌最易利用的碳源葡萄糖, 在厌氧条件下,

pH3.5~4.5 时, 进行同型酒精发酵^[10]。因此, 当培养基中的碳源只有葡萄糖时, 葡萄糖的消耗量主要是用于酵母菌菌体的生长(作为主要的能源物质和碳架前体物质)和产生酒精(厌氧状态下获得能量时产生的副产物), 可以通过将用于菌体生长的葡萄糖的量除去后, 所消耗的葡萄糖的量可通过下式来折算成酒精的量, 1 mol 葡萄糖生成 2 mol 的乙醇, 1 mg 葡萄糖约生成 0.5 mg 乙醇, 从而可以推知发酵液中酒精的浓度。葡萄糖的浓度用铁氰化钾法进行检测。



1.6.2 测定步骤

①把产酒精酵母菌株接入到分离培养基液体培养基, 于 30 °C 摇床培养 18 h, 用移液枪各吸取 1 mL 菌液, 分别接入到盛有发酵培养基的发酵瓶和三角瓶中, 放入 30 °C 摇床培养 24 h, 其中, 三角瓶内为有氧状态, 瓶内营养的消耗以菌体的生长为主, 取 5 mL 菌液, 并用蒸馏水稀释至其光密度值 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 为 0.5, 重新测定其体积, 然后 6000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 测其葡萄糖浓度, 计算所消耗葡萄糖的量, 此处所消耗的葡萄糖主要用于酵母菌体的生长。

②发酵瓶加橡胶塞密封, 在开始培养的阶段发酵瓶内存在氧气, 酵母菌进行有氧呼吸, 同时菌体生长。然后把发酵瓶放到 30 °C 的培养箱中进行酒精发酵阶段的培养, 此阶段产生酒精获取少量能量, 酵母菌生长缓慢甚至停止生长, 菌体数量增加不明显, 此酒精发酵阶段为 7 d。取 5 mL 发酵液, 并用蒸馏水稀释至其光密度值 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 为 0.5, 重新测其体积, 然后 6000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 测其葡萄糖浓度, 计算所消耗的葡萄糖的量, 此阶段所消耗的葡萄糖用于酵母菌体的生长和酒精的产生。

③将②中消耗的葡萄糖的量减去①中所消耗的葡萄糖的量等于用于产生酒精所消耗葡萄糖的量, 进而折算成生成酒精的量, 再除以体积就得到酒精的浓度。

2 结果与分析

2.1 葡萄糖标准曲线

根据表 1 浓度及其测定结果, 所作葡萄糖标准曲线见图 1。

葡萄糖标准曲线的回归方程 $y=0.75589-0.66963x$, $r=0.99815$, 其中, y 为 $\text{OD}_{420\text{nm}}$ 吸光值, x 为葡萄糖浓度。

2.2 菌体发酵培养基 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 调至 0.5 时的稀释度

对照组(菌体培养)3 株酵母菌在有氧条件下培养 18 h 后, 用比浊法来测定酵母菌菌体的浓度, 用可见光比色计检测, 使其 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 光密度值保持在 0.5, 培养基的稀释度见表 2。

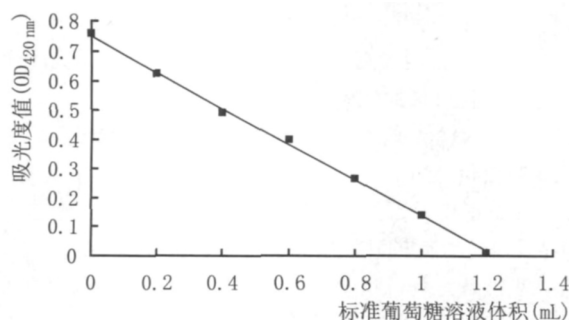


图1 葡萄糖标准曲线

表2 菌体发酵培养基 OD_{600 nm} 调至 0.5 时的稀释度

菌株编号	菌体发酵液体积 (mL)	加入蒸馏水体积 (mL)	液体浓度稀释倍数
YE-1	20	12	0.62
YE-2	20	9	0.68
YE-3	20	13	0.61

在菌体发酵培养过程中,要保证氧的充分供应,尽量减少其酒精发酵作用,否则在计算其菌体生长所消耗葡萄糖时会引起较大误差。通过增加摇床的转速可以增加发酵培养基中的含氧量,但是转速过快会因为培养基起泡而降低其含氧量,因此,转速不宜过快,可采用降低装瓶量以保证含氧量。

2.3 酒精发酵培养基 OD_{600 nm} 调至 0.5 时的稀释度

3 株酵母菌发酵 7 d 后的发酵液中菌体的浓度比较大,此时培养基还有较浓郁的酒香味,用比浊法来测定酵母菌菌体的浓度,用可见分光光度计检测菌体的 OD_{600 nm} 光密度值,通过加入蒸馏水使其保持在 0.5 时,3 株酵母菌的菌体 OD_{600 nm} 光密度值在 0.5 时的稀释度见表3。

表3 酒精发酵培养基 OD_{600 nm} 调至 0.5 时的稀释度

菌株编号	菌体发酵液体积 (mL)	加入蒸馏水体积 (mL)	液体浓度稀释倍数
YE-1	50	30	0.75
YE-2	50	43	0.54
YE-3	50	38	0.57

2.2 和 2.3 中将菌体的光密度值 OD_{600 nm} 调为 0.5,使菌体处于同一浓度,取相同体积的菌液时,菌体的数量也一样,目的是便于比较生成等量菌体时所消耗葡萄糖的量。

2.4 菌体培养基中菌体生长所消耗葡萄糖的浓度计算

用铁氰化钾法检测培养基中菌体的 OD_{600 nm} 光密度值为 0.5 时, YE-1 菌株、YE-2 菌株和 YE-3 菌株的发酵培养基上清液中葡萄糖的浓度,结果见表 4。

2.5 酒精发酵培养基中所产生酒精浓度的计算

培养基中菌体的 OD_{600 nm} 光密度值为 0.5 时,用铁氰化钾法测发酵培养基中所剩的葡萄糖浓度,并对照葡

表4 培养基中菌体 OD_{600 nm} 光密度值为 0.5 时所

消耗的葡萄糖的量 (mg/mL)

菌株编号	菌体发酵液葡萄糖浓度	培养基中葡萄糖的浓度	所消耗葡萄糖的浓度
YE-1	0.40	0.62	0.22
YE-2	0.48	0.68	0.20
YE-3	0.36	0.61	0.25

注:培养基中葡萄糖的浓度=培养基原始浓度×稀释系数;
所消耗葡萄糖的浓度=培养基中葡萄糖的浓度-菌体发酵液葡萄糖浓度。

糖标准曲线,得出发酵培养基中葡萄糖的含量,用最初的葡萄糖浓度减去所剩葡萄糖的浓度就得到了总的葡萄糖消耗量,再参照表 4 中的数据,除去菌体生长所消耗的葡萄糖的量,就是转化为酒精的葡萄糖的量,从而可以算出酒精的含量。

由于发酵培养基中所使用的葡萄糖是过量的,如果直接测其浓度,它与铁氰化钾反应时,就会远远超过铁氰化钾的当量,就不能测出葡萄糖的浓度,也超出了葡萄糖标准曲线所界定的浓度范围,也就不能准确得出培养基中葡萄糖的浓度。因此,在检测葡萄糖浓度时,首先要对所测的培养基进行稀释,稀释的方法是将其未接菌培养前的培养基中葡萄糖的浓度稀释到葡萄糖标准曲线所能指示的最高浓度(即 1 mg/mL 葡萄糖),也就是将培养基稀释到原来的 1/10。YE-1、YE-2 和 YE-3 酵母菌的发酵培养基上清液经 10 倍稀释后,酒精的浓度见表 5。

表5 酒精发酵液中菌体 OD_{600 nm} 光密度值为 0.5 时所消耗

葡萄糖的量及所产生的酒精的量 (mg/mL)

菌株编号	A	B	C	D	E	F	G
YE-1	0.135	0.750	0.615	0.022	0.593	0.302	0.403
YE-2	0.150	0.540	0.390	0.020	0.370	0.189	0.350
YE-3	0.124	0.570	0.446	0.025	0.421	0.215	0.377

注:A.发酵液葡萄糖浓度 mg/mL; B.培养基中葡萄糖的浓度(原始浓度×稀释系数) mg/mL; C.所消耗葡萄糖的浓度 mg/mL (用于菌体生长和酒精发酵); D.菌体生长所消耗葡萄糖的浓度 mg/mL; E.酒精发酵所消耗葡萄糖的浓度 mg/mL; F.酒精浓度 mg/mL; G.发酵液中的酒精浓度 mg/mL。

原发酵液上清液中的浓度为表 5 中 G 组数据的 10 倍,因此, YE-1 菌株、YE-2 菌株和 YE-3 菌株酒精发酵培养基中酒精实际含量分别为 4.03 mg/mL、3.50 mg/mL 和 3.77 mg/mL。YE-1 菌株产生酒精的能力最强,达到了 4.03 mg/mL。如果从单位菌体单位时间发酵考虑, YE-2 菌株因为消耗较少的葡萄糖就能产生大量酒精,更符合节能减排。

3 结论

3.1 本文所研究的酵母菌产酒精能力的葡萄糖消耗检测法是从新的角度对酒精发酵培养基中的酒精含量进行测定的新方法。解决了由于发酵液中成分过于复杂,酒精

含量的常用检测法不能直接用于检测发酵液中的酒精含量的难题,该方法对于筛选酒精高产酵母菌株作出了有益的探索。

3.2 常用乙醇检测法包括常量法和微量法,适用于乙醇浓度为1%vol以上的酒液,且检测方法较繁琐,笔者所述乙醇检测法能够检测出酒精浓度在1%vol以下的乙醇含量^[6]。

3.3 酵母菌株YE-1、YE-2、YE-3于30℃酒精发酵7d后的发酵上清液,用葡萄糖消耗检测法检测其酒精含量分别为4.03 mg/mL、3.50 mg/mL和3.77 mg/mL。

3.4 事实上,当酵母菌发酵液糖浓度较高时,即使大量供氧,也会生成少量酒精,估算用于菌体生长的葡萄糖的量偏高,因此葡萄糖消耗检测法所检测的酒精产量会比实际情况略偏低。所以,配制的菌体发酵培养基中葡萄糖的量要低至酒精发酵培养的十分之一,可减少误差。

参考文献:

[1] 钟振声,徐小艳,田兴国.提纯异麦芽低聚糖的酵母菌株筛选及

发酵条件[J].无锡轻工大学学报,2004,23(2):45-49.

[2] 汤斌,陈中碧,张庆庆,等.酒精发酵产燃料乙醇的研究[J].食品与发酵工业,2008,34(12):69-71.

[3] [美]M.J.小佩尔扎著.陈漱员译.微生物学[M].北京:科学出版社,1987:249-256.

[4] 陈叶福,王正祥,王晨霞,等.耐高温酵母菌株的分离、鉴定及其酒精发酵初步研究[J].微生物学通报,2003(5):24-27.

[5] 虞精明,谢勤美,杨凤华.酒中乙醇含量检测方法[J].中国卫生检验杂志,2008,18(9):1930-1932.

[6] 姜燕萍,付海波,周华林.快速氧化法测定米醋生产中乙醇含量的研究[J].中国酿造,2008(23):97-99.

[7] 马美范,张印贞.化学氧化法测定白酒中乙醇含量的研究[J].酿酒科技,2007(2):93-94.

[8] 黄伟干,虞建梅.铁氰化钾分光光度法测定白砂糖中的还原糖分[J].甘蔗糖业,1991(3):41-49.

[9] 周德庆.微生物学实验手册[M].上海:上海科学技术出版社,1986:16-17.

[10] 黄秀梨,辛明秀.微生物学[M].3版.北京:高等教育出版社,2009:141.

科技文化创新与中国白酒发展高端论坛在筑举行

本刊讯 科技文化创新与中国白酒发展高端论坛于2011年6月26日在贵州贵阳举行。论坛由国家酒类及加工食品质量监督检验中心和贵州省经济和信息化委员会主办,国台酒业集团有限公司承办。中国酿酒工业协会秘书长王琦、贵州省政协副主席班程农、贵州省政府副秘书长周建琨、贵州省经信委主任王江平及贵州省委、省政府相关部门领导,天津市委、市政府领导,天津市北辰区等各级领导,以及全国工商联、国家酒检中心的领导出席了会议。全国著名白酒专家曾祖训、胡永松、徐占成、李大和、钟杰等专业人士和全国经销商共计400余人参加了论坛。参与本次报道的媒体有以糖酒快讯、新食品杂志、糖烟酒周刊、华夏酒报、酿酒科技等为代表的行业媒体,以及人民网、新浪、天津晚报等大众媒体。天士力集团董事长闫希军先生、天士力集团总裁吴廷峰女士、金士力佳友执行董事叶军先生、金士力佳友营销部总监李风雷先生等出席了论坛。

中国酿酒工业协会秘书长王琦致辞,贵州省政府副秘书长周建琨、全国工商联副主席孙晓华、国家酒类及加工食品质量监督检验中心副主任刘青、贵州省经信委主任王江平、天士力集团董事长闫希军、全国著名白酒专家曾祖训、胡永松、天士力集团食品与保健品研究所所长李长文等分别在论坛上发表了真知灼见。

中国酿酒工业协会副理事长兼秘书长王琦就中国白酒未来发展作了重要讲话,他认为,在“十二五”期间,中国白酒行业将迎来较大的挑战,食品行业的安全问题层出不穷,特别食品添加剂事件,给中国白酒行业也带来极大的警示。王琦表示,食品安全大于天,白酒行业要高度重视这个问题。中国白酒行业作为一个历史悠久的传统产业,面对新时期新消费群体的崛起、进口洋酒的冲击和消费结构的调整,必须在传承的基础上进行技术创新和文化创新,有意识地引导消费趋势。

贵州省政府副秘书长周建琨表示:“2011年,贵州省委省政府进一步提出加快实施工业强省战略、培养百亿集团、打造千亿产业的要求,推进支柱产业和特色优势产业快速发展,特别要重点支持白酒产业做大做强。贵州白酒产业迎来了难得的发展机遇。如何进一步发挥优势,通过科技创新和文化创新,推进贵州白酒产业的特色化、集群化跨越发展,从而促进贵州经济的腾飞,是一个非常值得深入研究的课题”。

天士力集团董事长闫希军认为:中国白酒文化的核心内涵是“通”,即:酒通自然、酒通政和、酒通友情、酒通身心。倡导科学饮酒、健康饮酒、文明饮酒的新风尚。

据介绍,国台酒目前年产量2000多吨,于2004年荣获了第五届“布鲁塞尔国际金奖”。2007年6月,在广东国际酒饮博览会上再获金奖。闫希军表示,“十二五”期间,集团将投资30亿元扩大产能,力争实现2万吨的生产能力,窖藏酒超过5万吨,销售目标达到60亿元。

论坛上,贵州省经信委主任王江平向国台酒业集团销售公司总经理张春新授予国台酒业集团技术中心为“贵州省工业园区公共技术服务中心”和“仁怀市名酒工业园区公共技术服务中心”。与会专家还对国台酒进行了感官鉴评,并给予了高度评价。(小雨)



高端论坛会场一隅