

# 高产酒精酵母 Co- 158 发酵条件的研究

朱会霞<sup>1</sup>, 孙金旭<sup>1</sup>, 王 敏<sup>1</sup>, 张 伟<sup>2</sup>, 李长文<sup>2</sup>

(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:** 对经<sup>60</sup>Co诱变筛选得到的高产酒精酵母 Co- 158 菌株发酵条件进行研究。实验结果表明, 适接种量为接种后发酵液的含菌数为  $2 \times 10^7$  cfu/mL。菌株适宜发酵温度为 36 ℃、适宜生长 pH 为 4.5, 温度和接种量对发酵影响较大, 而 pH 影响较小。

**关键词:** 微生物; 酵母 Co- 158; 发酵; 酒精

中图分类号: TS261.1; TS262.2; Q93- 3 文献标识码: A 文章编号: 1001- 9286(2007) 08- 0021- 03

## Study on the Fermenting Conditions of High- yield Alcohol Yeast Strain Co- 158

ZHU Hui-xia<sup>1</sup>, SUN Jin-xu<sup>1</sup>, WANG Min<sup>1</sup>, ZHANG Wei<sup>2</sup> and LI CHANG Wen<sup>2</sup>

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

**Abstract:** The fermenting conditions of high-yield alcohol yeast strain Co-158 (screened by <sup>60</sup>Co mutation) were studied. The results showed that the optimum fermentation temperature of such strain was at 36 ℃, the optimum pH value was 4.5 and the best inoculation quantity followed the rules (bacteria number as  $2 \times 10^7$  cfu/mL in fermenting liquid after the inoculation). Temperature and inoculation quantity had great effects on the fermentation and pH value had fewer effects.

**Key words:** microbe; yeast strain Co-158; fermentation; alcohol

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<sup>[1-3]</sup>。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。我国一直将选育优良的高产酒精酵母菌种作为重点研究课题,也是许多研究酒精的专家努力的方向<sup>[4]</sup>。

本研究对经<sup>60</sup>Co诱变筛选的高产酒精酵母菌株 Co- 158 发酵条件进行试验, 经过试验得出高产酒精酵母菌株 Co- 158 的适宜发酵条件。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

##### 1.1.1 试验菌种

出发菌株: 河北农业大学食品科技学院生物工程实验室保存(SP- 48)。

Co- 158: 来自诱变菌种。

酒精生产用 ADY: 购于广东丹宝利公司。

##### 1.1.2 培养基

缓冲液: pH6.8 的磷酸氢二钠- 柠檬酸缓冲液。

高渗液: pH6.8 的磷酸氢二钠- 柠檬酸缓冲液中添加 KCl 至 0.7 mol/L。

普通 YPD<sup>[2]</sup>。

再生 YPD: 在 YPD 固体中添加 KCl 至 0.7 mol/L, 115 ℃ 灭菌 30 min。

初筛培养基: TTC 上层培养基:TTC 0.05 g, 葡萄糖 0.5 g, 琼脂 1.5 g, 水 100 mL; TTC 下层培养基: YPD 琼脂。

复筛培养基: 麦芽汁培养基。

酵母菌保藏用培养基<sup>[3]</sup>: 麦芽汁琼脂培养基, 分离出的菌种保存在麦芽汁琼脂培养基试管斜面上, 每隔 2 个月转接 1 次。

##### 1.1.3 其他试剂

原麦汁: 购自保定市京苑啤酒有限公司。

酒精发酵原料: 市售玉米粉(淀粉含量 76%)。

- 淀粉酶: 酶活力 3000 IU/g, 北京双旋微生物培养基制品厂。

糖化酶: 酶活力 17400 IU/g, 无锡杰能科技有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 温度对发酵曲线的影响

基金项目: 河北省科技攻关项目 032201100 资助。

收稿日期: 2007- 03- 29

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。

将酵母种子液接入玉米粉糖化醪中,在不同温度下恒温静置培养 72 h,每 8 h 称量 1 次,计算二氧化碳失重,依据失重的大小确定最适发酵温度。

### 1.2.2 pH 对发酵曲线的影响

将酵母种子液接入不同 pH 值的玉米粉糖化醪中,于最适发酵温度下恒温培养 72 h,每 8 h 称量 1 次,计算二氧化碳失重,依据失重的大小确定最适发酵 pH。

### 1.2.3 接种量对发酵曲线的影响

将不同量酵母种子液接入玉米粉糖化醪中,于最适发酵温度下恒温培养 72 h,每 8 h 称量 1 次,计算二氧化碳失重,依据失重的大小确定最适发酵接种量。

## 2 结果与分析

### 2.1 温度对发酵曲线的影响

分别在不同发酵温度下(22、26、30、34、38、42、46),将 Co-158 菌株接入玉米粉糖化醪中,接种后发酵醪中菌数为  $1 \times 10^7$  cfu/mL, pH 值 4.5, 发酵 72 h 测  $\text{CO}_2$  失重量,结果见图 1。

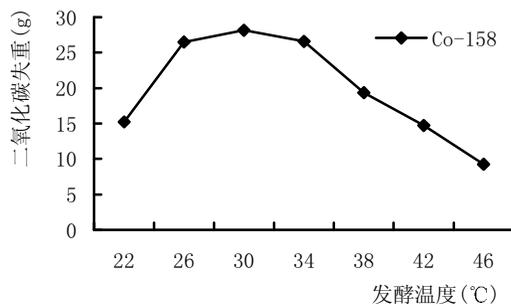


图 1 Co-158 菌株最适发酵温度的确定

由图 1 可知,在相同液量下,30 时,  $\text{CO}_2$  失重最大为 28.16 g,说明此温度下,Co-158 的发酵力最强;当温度升高时,发酵力呈下降趋势,温度为 46 时,  $\text{CO}_2$  失重为 9.26 g,比最高值下降了 67.12%;温度低于 30 时发酵力也呈下降趋势,温度下降至 22 时,  $\text{CO}_2$  失重为 15.23 g,比最高值下降了 45.92%。

图 1 还表明,当温度较高时,高温对酵母细胞有伤害作用,Co-158 菌株在温度高于适宜发酵温度时,发酵力开始下降;温度较低时,发酵力也下降,说明低温对发酵也有抑制作用,可能是因为温度过低,细胞中酶活力没有达到最适温度,不利于细胞生长。

分别在不同发酵温度下(22、26、30、34、38、42),将 Co-158 菌株接入玉米粉糖化醪中,接种后的发酵醪中菌数为  $1 \times 10^7$  cfu/mL, pH 值 4.5, 发酵 72 h,每 8 h 测  $\text{CO}_2$  失重量,结果见图 2。

由图 2 可知,在 22、26、30、34、38 和 42 时,整个发酵周期总  $\text{CO}_2$  失重分别为 15.74 g、26.70 g、28.40 g、26.79 g、19.00 g 和 14.23 g。其中 30 下,发酵力最高,即 30 为最适发酵温度。

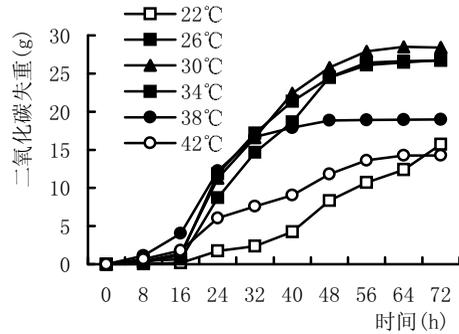


图 2 温度对发酵曲线的影响

发酵初始阶段,38 发酵速度最快,可能是因为温度高,菌体新陈代谢旺盛所致,在发酵后期,菌体很快衰老,发酵速度减缓;在 22 和 42 时,因温度过低和过高,对发酵抑制明显,导致发酵力很低。

### 2.2 pH 值对发酵曲线的影响

分别在不同 pH 值(pH3、pH3.5、pH4、pH4.5、pH5、pH5.5、pH6)下,将 Co-158 菌株接入玉米粉糖化醪中,接种后的发酵醪中菌数为  $1 \times 10^7$  cfu/mL,于 30 下培养 72 h 后测定各个 pH 下  $\text{CO}_2$  失重量,结果见图 3。

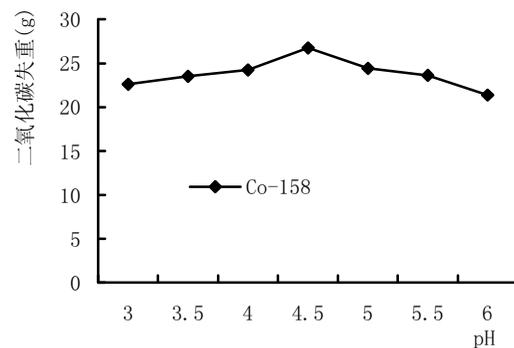


图 3 Co-158 菌株最适发酵 pH 值的确定

由图 3 可知,pH 值为 4.5 时,二氧化碳失重最大,为 26.74 g, pH 值高于或低于此 pH 值发酵力都有所下降。pH 值为 6.0 时,二氧化碳失重为 21.39 g,与最高值相比,发酵力下降 20%;pH 值为 3.0 时,二氧化碳失重为 22.61 g,发酵力下降了 15.45%。从总的趋势看,pH 值对发酵的影响不如温度对它的影响那样剧烈,呈现一个平稳的变化。

分别在不同的 pH 值(pH3、pH3.5、pH4、pH4.5、pH5、pH5.5、pH6)下,将 Co-158 菌株接入玉米粉糖化醪,接种后发酵醪中菌数为  $1 \times 10^7$  cfu/mL,30 下发酵 72 h,每 8 h 测  $\text{CO}_2$  失重量,结果见图 4。

由图 4 可知,Co-158 菌株在前 40 h 发酵速度最快,培养前 40 h, pH 值分别在 pH3、pH3.5、pH4、pH4.5、pH5、pH5.5 和 pH6 时,平均  $\text{CO}_2$  失重分别为 0.44 g/h、0.52 g/h、0.56 g/h、0.56 g/h、0.55 g/h、0.53 g/h 和 0.52 g/h。发酵结束后 pH 值为 4.5 时,  $\text{CO}_2$  失重最大,为 26.04 g。

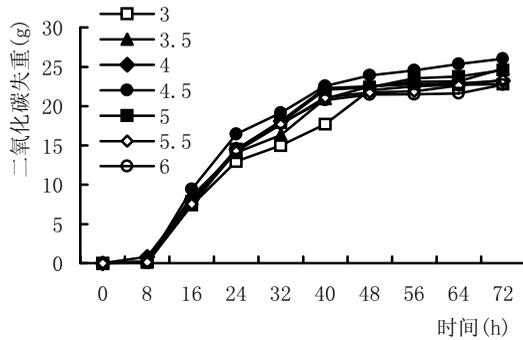


图4 pH值对Co-158菌株发酵曲线的影响

72 h 各 pH 值平均  $\text{CO}_2$  失重分别为 0.32 g/h、0.34 g/h、0.32 g/h、0.36 g/h、0.34 g/h、0.32 g/h 和 0.32 g/h。pH 值高于 4.5 或低于 4.5 对发酵的影响并不明显, 最多相差 3.34 g。从总的趋势看, pH 值对发酵曲线的影响不如温度对它的影响剧烈, 呈现一个平稳的变化趋势。这与前面试验的结果相符。

### 2.3 接种量对发酵曲线的影响

分别在不同的接种量(接种后发酵醪中菌数分别为  $0.1 \times 10^7$  cfu / mL、 $1 \times 10^7$  cfu / mL、 $2 \times 10^7$  cfu / mL、 $3 \times 10^7$  cfu / mL、 $4 \times 10^7$  cfu / mL)下, 将 Co-158 菌株接入玉米粉糖化醪, 30 ℃ 下发酵培养 72 h, pH 值 4.5, 每 8 h 测  $\text{CO}_2$  失重量, 结果见图 5。

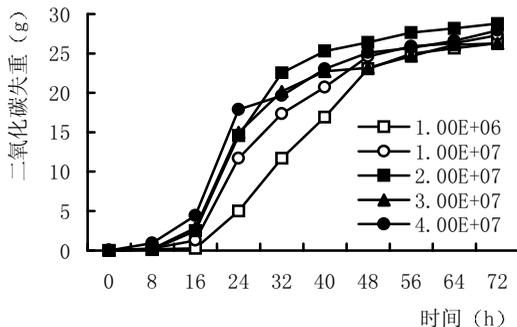


图5 接种量对Co-158菌株发酵曲线的影响

由图 5 可知, 接种量不同, 发酵力有所不同, 接种量为  $2 \times 10^7$  cfu / mL 时的发酵力要好于其他接种量时。前 40 h 各接种量条件下发酵速度较快, 在整个发酵周期接种量由低到高, 其  $\text{CO}_2$  失重分别为 26.32 g、27.35 g、29.59 g、26.28 g 和 27.95 g。接种量为  $2 \times 10^7$  cfu / mL 时  $\text{CO}_2$  失重最大, 因此  $2 \times 10^7$  cfu / mL 为最佳发酵接种量, 过大或过小对发酵力都有影响。

## 3 讨论

3.1 一般酵母的最适发酵温度和最适生长温度往往不一致。钟娅玲<sup>[5]</sup>对耐温絮凝酵母菌株 KF-7 生理特性进行研究表明, KF-7 在 30 ℃ 时可以获得最大的酵母活细胞数, 而在 35 ℃ 时可以获得最大的酒精产率。寇运同<sup>[6]</sup>

对一株克斯特假丝酵母(*Kandida krusei*) 研究表明, 其最适生长温度为 45 ℃, 而最适发酵温度是 42 ℃。Co-158 菌株生长的最适温度是 36 ℃, 发酵的最适温度是 30 ℃。在 27~34 ℃ 时都表现较好的代谢活性, 超过 34 ℃ 活性急剧降低; 温度过低影响酵母活力, 因此, 发酵温度宜控制在 28~32 ℃, 过高则生成的酒精易挥发, 过低则酒精产率急剧降低。

3.2 pH 值在 2~8 的范围内, 酵母菌都能保持生命活动, 但大部分酵母生长的最适 pH 在 4.5~5.0。对 K 字酵母和高温酵母的研究表明, K 字酵母可在 pH 为 2.2~8.0 的范围内生长<sup>[7]</sup>。李剑芳<sup>[8]</sup>从猕猴桃中分离得到一株酵母可在 pH 值为 1.6~9.5 的范围内生长, 最适生长的 pH 值为 5.4。在 pH 值低于 4.2 时仍可生长, 而霉菌和大部分细菌均已停止生长, 酵母这种耐酸特性可抑制和消除培养基中杂菌的生长。Co-158 菌株在 pH3.0~6.0 范围内都能发酵, 在 pH3.0~13.0 的范围内能生长, 最适生长和发酵的 pH 值为 4.5。

3.3 酒精是酵母菌生长代谢的产物。一般情况下, 发酵醪液中酵母菌细胞的密度越高, 单位时间、单位容积产生的酒精就越多, 效率就越高。但是一般在间歇发酵工艺中, 受发酵醪液中营养物质的含量、酒精代谢产物浓度及酵母菌自身生理和遗传等因素的影响, 醪液中的酵母菌细胞密度会有一个极限值。对于酒精浓醪发酵来说, 由于发酵醪液中的葡萄糖的浓度比一般的发酵醪液中高出很多, 此时加入酵母菌的数量也应该比一般的间歇发酵醪液中要多, 但是考虑到生产成本以及酵母菌个体间的相互影响, 酵母菌细胞的密度应该增加到一个合理的范围内, 从而防止酵母菌因为过量增殖而消耗多余的原料糖, 同时又能保证酵母菌细胞正常生理代谢所需要的糖, 实现良性发酵代谢。实验后 Co-158 菌株的适宜接种量为接种后发酵液的含菌数为  $2 \times 10^7$  cfu / mL。

### 参考文献:

- [1] 白凤武. 酒精发酵工业结构调整关键技术及发展燃料酒精的可行性[J]. 化工科技市场, 2001, (2): 14-15.
- [2] 苏毅译. 巴西的无水酒精生产[J]. 广西轻工业, 1994, (3): 45.
- [3] 苏毅译. 澳大利亚制糖业的副产品利用[J]. 广西轻工业, 1997, (3): 11.
- [4] 章克昌. 酒精与蒸馏酒工艺学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1995: 6-7.
- [5] 钟娅玲, 汤岳琴, 森树茂. 耐温絮凝酵母 *Saccharomyces cerevisiae* KF-7 的细胞活性及发酵特征研究[J]. 食品与发酵工业, 1998, (4): 3-6.
- [6] 寇运同, 胡永松, 王忠彦, 等. 高温酵母发酵特性及功能的研究[J]. 酿酒科技, 1995, (3): 70-72.
- [7] 王梅, 张澎湃, 帅桂兰, 等. TTC 在黄酒酵母选育中的应用[J]. 酿酒, 2001, 28(5): 62-64.
- [8] 李剑芳, 张灏. 发酵猕猴桃汁中产香酵母的分离、鉴定及生长特性的研究[J]. 食品科学, 2001, 22(9): 19-22.