

固态发酵高产酒精酵母菌株的选育

王瑞明, 关凤梅, 马霞, 张继泉
(山东轻工业学院, 山东 济南 250100)

摘要: 从白酒酒醅中分离得到的目的菌株经初步分析测定属于酵母属酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*), 在 pH2.8 的液体培养基中可以正常发酵, 最适发酵温度 35~37 °C, 对乙酸和 酸最小敏感浓度分别为 400 mg/L 和 30 mg/L; 最小酒精致死浓度 (Minimal Inhibitory Concentration, Mic) 为 20% (v/v), 在含水量 65% 的固态基质上发酵酒精浓度达到 12.0% (v/w), 其淀粉利用率为 89%。

关键词: 微生物; 酵母; 耐酸; 选育

中图分类号: TS261.1; TQ926; Q93-33 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2002)01-0020-02

Selection of The Yeast for Highly Producing Alcohol with Solid State Fermentation

WANG Rui-ming, GUAN Feng-mei, MA Xia and ZHANG Ji-quan
(Shandong Institute of Light Industry, Jinan, Shandong 250100, China)

Abstract: The aim yeast from the fermented grains is *Saccharomyces cerevisiae* by accident analysis. This yeast could normally ferment in liquid medium at pH2.8, the optimum fermentation temperature is 35~37 °C, the least sensitivity concentration for acetic acid and butyric acid respectively is 400 mg/L and 30 mg/L, the Minimal Inhibitory Concentration is 20% (v/v). The alcohol concentration reached to 12% (v/w) by using yeast in solid state fermenting grains with 65% water concentration. The using ratio of starch reached to 89%.

Key word: microbe; yeast; acid-resistant; selection

利用固态发酵工艺 (SSF) 生产酒精技术在国内外已受到广泛的重视。固态发酵生产酒精工艺具有投资少, 酒精处理能耗低, 用水量少, 可实现酒精清洁生产, 同时在利用固态纤维素废物生产酒精方面有巨大的潜力^[1]。目前固态发酵生产酒精工艺还有许多问题需要解决, 其中淀粉利用率较低 (约为 80%) 是一个十分关键的问题。影响淀粉利用的因素很多, 淀粉的糖化、淀粉的浓度、固态基质的传质传热等, 而在发酵过程中, 尤其在发酵后期酒醅的酸度较高, 且含有一定数量的低分子脂肪酸对酵母的发酵形成一定的抑制作用, 使酒精的产率降低, 是造成淀粉利用率低的重要因素^[2~3]。

1 材料

1.1 酵母富集培养基 葡萄糖 2%, 酵母粉 1%, 蛋白胨 2%, 酒糟浸出液 20%, 用蒸馏水配制, pH 值 3.0, 0.05 MPa 灭菌 30 min。

1.2 酵母生长测定培养基 YPD 液体培养基。

1.3 菌种来源 浓香型白酒酒醅 (双轮底), 山东坊子酒厂提供。

1.4 产孢子培养基^[4] 醋酸钾 1.0%, 酵母粉 0.10%, 葡萄糖 0.05%, 琼脂 2%, 蒸馏水配制, 自然 pH。

1.5 同化 KNO₃ 培养基 葡萄糖 2%, 磷酸氢二钾 0.1%, KNO₃ 0.78%, MgSO₄·7H₂O 0.5%, 酵母粉 0.02%, 琼脂 2%。

2 实验方法

2.1 生长曲线的测定^[5] 将酵母接种在 YPD 液体培养基内, 在 28 °C、180 r/min 的恒温摇床上培养。利用 721 分光光度计, 波长 660 nm, 以灭菌的培养基为空白, 比色皿厚度为 0.5 cm, 测定培养

液的 OD 值。

2.2 酒精发酵试验 玉米粉与水按 1:2.5 混合后, 加入 α-淀粉酶 10 IU/g 原料在 100 °C 下蒸煮 60 min, 冷却至 65 °C 时加入糖化酶 (乳液) 200 IU/g 原料, 保温 40 min, 冷却并用硫酸调 pH 值。

2.3 酒精蒸馏 取发酵液 100 ml 或固态发酵料 100 g 于 500 ml 蒸馏瓶中, 补加蒸馏水 200 ml, 缓慢蒸馏, 取馏分 100 ml, 测酒精含量。

2.4 酒精测定 比重瓶法^[6]。

2.5 乙酸、酸浓度对酵母发酵的影响 在液体酒精发酵培养基中加入不同浓度的乙酸、丁酸, 测发酵液中的酒精浓度。

2.6 酵母发酵对酒精耐受能力测定 用杜氏发酵管注满培养基后倒置于盛满 YPD 培养基的试管中, 灭菌后加入不同量的酒精, 接种待测菌株于 28~29 °C 的条件下培养 24 h。

2.7 产孢子实验 将酵母菌株摇床培养 24 h, 离心收集酵母菌泥涂于产孢子培养基上, 28~29 °C 培养 48~72 h, 用显微镜观察。

2.8 硝酸盐同化实验 将酵母菌株从新鲜试管斜面上刮下, 用无菌水洗涤后, 接种于同化硝酸盐固体培养基上, 28 °C 培养 48~72 h, 观察菌落生长情况。

3 结果与讨论

3.1 酵母菌酒精发酵实验 将酵母富集培养之后, 经平板分离, 镜检初步确定为酵母菌后, 进一步分离纯化, 挑选在 YPD 平板上生长较快、菌落平滑的菌株为出发菌, 测其酒精发酵能力, 发酵培养基的 pH 为 3.5, 发酵期前 12 h 温度为 28~29 °C, 之后调至 35~37 °C, 发酵时间 64 h。实验结果见表 1。

收稿日期: 2001-10-15

作者简介: 王瑞明 (1962-), 男, 山东诸城人, 副教授, 在读博士, 硕士生导师。主要从事工业微生物教学与研究, 已发表学术论文 20 余篇, 完成山东省科委下达课题 3 项。

菌株	N 01	N 02	N 11	N 17	N 2	N 45	N 60	N 62
酒精产率(%)	8.00	13.10	8.80	9.70	12.80	13.04	12.90	13.82

将发酵酒精能力超过 12 0 % 的 N 02, N 42, N 45, N 60, N 62 菌株做进一步的实验, 其他菌株均遭淘汰。

3.2 酵母耐乙酸实验 将发酵培养基中加入不同浓度的乙酸, 在相同的条件下进行酒精发酵, 以出发菌株作对照, 测定菌株在乙酸存在下的酒精发酵能力, 确定菌株对乙酸的最小敏感浓度和最小抑制发酵浓度, 测定结果见表 2。

菌株	N 02	N 42	N 45	N 60	N 62
敏感浓度(mg/L)	300	350	300	300	400
抑制浓度(mg/L)	1800	1800	2000	1800	2000

3.3 酵母耐 酸实验 实验方法和步骤与“3.2”相同, 实验结果见表 3。

菌株	N 02	N 42	N 45	N 60	N 62
最小敏感浓度(mg/L)	20	20	20	30	30
最小抑制浓度(mg/L)	200	250	250	200	300

3.4 酵母发酵对酒精耐受能力比较 酒精酵母对酒精的耐受能力有所不同, 但产酒精率比较强的几株酵母对酒精的耐受力差别不大, 基本都能满足酒精发酵的要求。结果见表 4。

菌株	6	8	10	12	14	16	18	20	21
N 02	+	+	+	+	+	+	+	+	-
N 42	+	+	+	+	+	+	±	-	-
N 45	+	+	+	+	+	+	+	-	-
N 60	+	+	+	+	+	+	+	-	-
N 62	+	+	+	+	+	+	+	±	-

注: + 发酵, ±微弱发酵, - 不发酵。

通过上述酵母性能指标的测定, 确定 N 62 菌株为优先选用的菌株, 并进一步做生理生化测定。

3.5 N 62 的生理生化测定

3.5.1 生长曲线 (见图 1) N62 菌株在好氧培养条件下表现出典型的 Monod 生长曲线, 对数生长期在培养时间的第 3~ 9 h, 20 h 后细胞浓度开始下降。

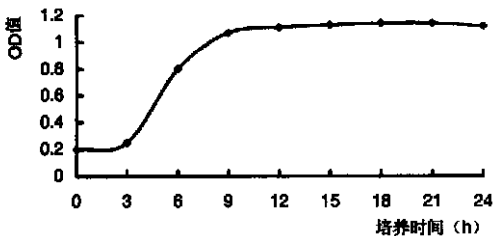


图 1 N 62 菌株生长曲线

3.5.2 N 62 菌株产子囊孢子情况 N 62 菌株在产孢子培养基上培养 3 天, 在显微镜下观察, 多数细胞可以形成孢子囊, 其子囊内一般为 4 个子囊孢子, 孢子呈圆形。如图 2, 具有酵母菌属啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。

3.5.3 N 62 对硝酸盐的作用 在以 KNO₃ 唯一氮源的固体培养基上 N 62 不能生长, 而在以 (NH₄)₂SO₄ 唯一氮源培养基上则可以正常生长, N 62 不能同化硝酸盐。

3.5.4 pH 值对 N 62 酒精发酵的影响 N 62 表现出耐低 pH 值

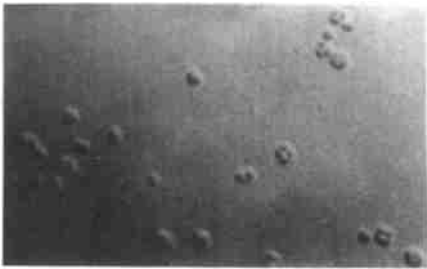


图 2 N 62 在产孢子培养基上形成子囊情况(16× 40)



图 3 N 62 营养细胞形态(16× 40)

的特性, 以乳酸或硫酸降低 pH 值至 2.5 时可以进行接近正常的酒精发酵。最适 pH4.2, 结果如图 4。

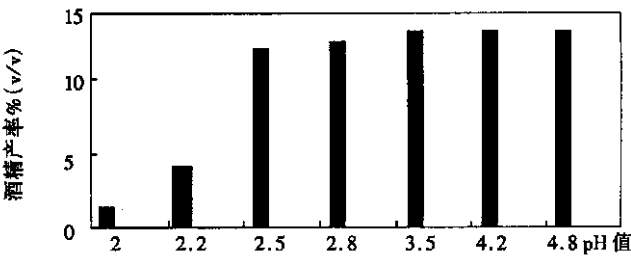


图 4 pH 值对 N62 酒精发酵的影响

3.5.5 固态发酵实验 将 35 % 玉米面(淀粉含量 58 %), 玉米芯粉 15 %, 水 55 %, 加冰醋酸 0.04 %, 乳酸 0.04 %, 丁酸 0.003 %, 混合均匀, 润料 1 h, 121 ℃ 灭菌 30 min。降温至 40 ℃, 加入糖化酶乳液(按 150 IU/g 淀粉加入)和培养 16 h 的 N62 菌株(按 5 % 接入), 35~ 37 ℃ 发酵 6 天。测酒醅中酒精含量为 12 % (v/w), 称取酒醅的总重量, 可以计算出淀粉利用率为 89 %。

因为只对 N 62 菌株做了部分生理生化测定, 还不能对 N 62 进行准确的命名和定义, 但从该菌株的细胞形态、产子囊情况、子囊孢子的数量及形状、不还原硝酸盐等因素分析, 菌株呈现出酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) 的特征, 其他生理生化测定将在今后的研究中完成。

参考文献:

[1] N. Kiran Sree. Ethanol production in solid substrate fermentation using the thermotolerant yeast[J]. Process Biochemistry, 1999, (34): 115- 119.
[2] 沈才洪, 等. 有机酸对大曲发酵影响实验[J]. 酿酒科技, 1994, (4): 32- 35.
[3] 庄名扬, 等. 耐温耐酸酵母菌在浓香型白酒糟挤回发酵中的应用[J]. 酿酒科技, 1994, (4): 36- 37.
[4] 周德庆. 微生物学实验[M]. 北京: 中国科学出版社, 1985. 38- 45.
[5] 王瑞明, 等. 己酸对酵母生理代谢的影响[J]. 酿酒科技, 1996, (3): 46- 49.
[6] 王福荣, 等. 工业发酵分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1980. 25- 27.