

高产酵母菌 Co- 158 生理特性研究

朱会霞¹, 孙金旭¹, 张 伟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: 对经⁶⁰Co诱变筛选得到的高产酒精酵母 Co- 158 菌株的耐酒精性、耐糖性、耐酸性、耐盐性进行研究, 结果表明, Co- 158 菌株耐酒精能力强, 在含乙醇 19 %vol 的麦芽汁培养基中 10 h 可发酵; 耐糖能力高, 在葡萄糖浓度达到 55 % (w/v) 时可发酵; 耐酸碱能力强, 在 pH 值为 2.5~13.0 范围内可发酵; 耐盐能力强, 在 11 % (w/v) 盐溶液中仍然可发酵。

关键词: 微生物; 酵母菌 Co- 158; 耐酒精度; 耐酸碱度; 耐盐度

中图分类号: TS261.1; Q93- 3 文献标识码: A 文章编号: 1001- 9286(2007) 05- 0020- 04

Study on the Physiological Characteristics of High- yield Saccharomyces Strain Co- 158

ZHU Hui-xia¹, SUN Jin-xu¹, ZHANG Wei² and LI Chang-wen²

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

Abstract: The alcohol-endurance, acid-alkali resistance and salt tolerance of high-yield Saccharomyces strain Co-158 (produced by ⁶⁰Co mutation) were investigated. The results suggested that Co- 158 strain had strong alcohol-endurance (it could ferment in the wort culture medium containing 19 %vol ethanol), high sugar tolerance (it could ferment in the wort culture medium containing grape sugar 55 % (w/v)), high acid-alkali resistance (it could ferment in the condition of pH 2.5~13.0) and high salt tolerance (it could ferment in the wort culture medium containing salt 11 % (w/v)).

Key words: microbe; Saccharomyces strain Co- 158; alcohol-endurance; acid-alkali resistance; salt tolerance

始于 20 世纪 70 年代的“能源危机”, 使利用可再生资源(如粮食或植物纤维)发酵生产酒精作为生物能源来代替或部分代替汽油被提到了议事日程上^[1]。另外, 酒精是一种清洁燃料和可再生燃料, 并可解决城市严重的空气污染问题。因此, 世界上很多国家都积极发展燃料酒精的生产。目前, 燃料酒精的生产占世界酒精总产量的 66 %, 并且还有进一步增加的趋势^[2]。2001 年中国酒精产量为 250 万 t, 预计到 2005 年将达到 400 万 t, 到 2015 年可达到 600 万 t (其中燃料酒精 300 万 t)。这样涉及能源的重大社会需求必将促进发酵酒精工艺的重大进步, 而酒精浓醪发酵又将是发酵酒精工艺的重大技术进步之一^[3-4]。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^[5-7]。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研究的方向^[8]。

本试验以 SP- 48、ADY 为对照菌株, 对高产酒精酵母菌株 Co- 158 的生理耐性进行了研究, 研究表明, 高产酒精酵母菌株 Co- 158 耐酒精、耐酸、耐碱、耐糖及耐盐特性均优于菌株 SP- 48、ADY。

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。

基金项目: 河北省科技攻关项目 032201100 资助。

收稿日期: 2007- 02- 06

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。

通讯作者: 张伟。

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

再生 YPD: 在 YPD 固体中添加 KCl 至 0.7 mol/L, 115 °C 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: 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 酵母细胞的耐酒精特性

盛有麦芽汁(10°Brix)的试管中加入倒置杜氏小管。灭菌后加入不等量的无水乙醇, 制成不同的浓度梯度, 接种待测菌株于 30 °C 的条件下培养。10 h 后镜检计数, 并观察产气情况。

1.2.2 酵母细胞的耐酸耐碱特性

在盛有不同 pH 值麦芽汁(10°Brix)的试管中加入倒置杜氏小管。灭菌后接种待测菌株于最适生长温度下恒温培养 24 h, 镜检计数, 依据菌数确定在不同 pH 值下的生长情况, 并观察产气情况。

1.2.3 酵母细胞的耐糖特性

将待测菌株种子液接入含不同葡萄糖浓度的 YPD 液体培养基中, 于最适生长温度下恒温培养 24 h, 并分别在 10 h、24 h 时镜检计数, 依据菌数确定在不同糖浓度下的生长情况, 并观察产气情况。

1.2.4 酵母细胞的耐盐特性

将待测菌株种子液接入含不同食盐浓度的麦芽汁培养基中, 于最适生长温度下恒温培养 24 h, 并分别在 10 h、24 h 时镜检计数, 依据菌数确定在含不同盐浓度下的生长情况, 并观察产气情况。

1.2.5 酵母细胞耐发酵副产物的特性

将待测菌株种子液分别接入含不同乙酸、乳酸和甘油浓度的麦芽汁(10°Brix)中, 于最适生长温度下恒温培养 10 h, 镜检计数确定在不同副产物浓度下的生长, 并观察产气情况。

1.2.6 酵母细胞耐高温发酵的特性

将酵母种子液接入玉米粉糖化醪中, 在 42 °C 下恒温静置培养 72 h, 用蒸馏法测定其成熟醪酒精体积分数。

2 结果与分析

2.1 Co-158 与 SP-48、ADY 耐酒精能力比较

配制不同酒精浓度麦芽汁培养基, 酒精浓度依次为 5 %vol、10 %vol、15 %vol、16 %vol、17 %vol、18 %vol、19 %vol、20 %vol 和 25 %vol, 装入含杜氏小管的无菌试管, 分别用不同酵母菌(SP-48、Co-158、ADY)接入含不同酒精浓度的麦芽汁中培养, 接种后的培养基中菌数为 1×10^7 cfu/mL, 30 °C 下培养 10 h 后, 测定各菌株的菌数及产气结果。结果见图 1 和表 1。

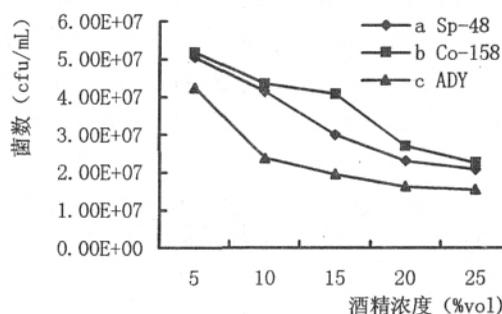


图 1 Co-158、SP-48、ADY 耐酒精特征比较

由图 1 可知, 不同酵母对酒精的耐受性不同, Co-158 在不同酒精浓度的麦芽汁培养基中的菌数均最高, 说明 Co-158 更耐高浓度的酒精。

表 1 不同酒精度下 SP-48、Co-158、ADY 的产气结果

酒精浓度 (%vol)	SP-48	Co-158	ADY
5	+++	+++	+++
10	+++	+++	+++
15	+++	+++	+++
16	+++	+++	+++
17	++	++	++
18	+	++	+
19	-	+	-
20	-	-	-
25	-	-	-

注: “-” 不产气; “+” 产 1/4 气体; “+++” 气体满。

由表 1 可知, Co-158 在含 19 %vol 的酒精浓度下 10 h 后仍可发酵产气; 而 SP-48 的产气最高酒精浓度为 18 %vol, ADY 仅为 17 %vol。这与图 1 所示的结果

一致。

2.2 Co-158、SP-48、ADY 的耐酸、耐碱能力比较

分别将活化后的 Co-158、SP-48 和 ADY 3 菌株接种于 YPD 液体培养基中, 接种后的培养基中的菌数为 1×10^7 cfu/mL, 在不同 pH 值 (1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0、11.5、12.0、12.5 和 13.0) 条件下, 30 培养 24 h 后, 测定各试管中的菌数和产气量。结果见图 2 和表 2。

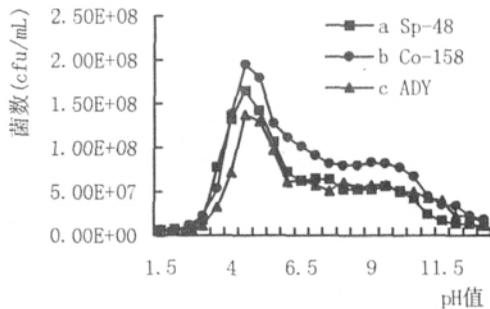


图 2 不同 pH 值条件下 SP-48、Co-158 和 ADY 生长情况

由图 2 可知, pH 值为 4.5 时, 三者的菌量均达到最大, 其中 Co-158 菌量最多。pH 小于 4.5 时, 菌数均迅速下降; pH 大于 4.5 时, 菌数下降较缓。在 pH7~11 之间菌数变化不大; pH 大于 11 时, 菌数缓慢下降。可以得出结论, pH 值为 4.5 时, 为 Co-158、SP-48 和 ADY 的适宜生长 pH 值。

表 2 不同 pH 值下 SP-48、Co-158、ADY 产气结果比较

pH 值	SP-48	Co-158	ADY	pH 值	SP-48	Co-158	ADY
1.5	-	-	-	7.5	++++	++++	++++
2.0	-	-	-	8.0	++++	++++	++++
2.5	-	++	-	8.5	++++	++++	++++
3.0	+++	++++	+++	9.0	++++	++++	++++
3.5	++++	++++	++++	9.5	++++	++++	++++
4.0	++++	++++	++++	10.0	++++	++++	++++
4.5	++++	++++	++++	10.5	++++	++++	++++
5.0	++++	++++	++++	11.0	++++	++++	++++
5.5	++++	++++	++++	11.5	++++	++++	++++
6.0	++++	++++	++++	12.0	+++	++++	++++
6.5	++++	++++	++++	12.5	+++	++++	++++
7.0	++++	++++	++++	13.0	++	++++	+++

注: “-” 不产气; “+” 产 1/4 气体; “++++” 气体满。

由表 2 中的产气结果可知, 3 菌株在 pH 值较低时, 发酵受到抑制; pH 值较高对发酵影响不大。3 菌株相比较, Co-158 耐酸能力最好。

2.3 SP-48、Co-158、ADY 的耐糖能力比较

分别将活化后的 SP-48、Co-158 和 ADY 3 菌株接种于含不同糖浓度 (20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60% 和 65% (w/v)) 的 YPD 培养基中, 接种后培养基中的菌数为 1×10^7 cfu/mL, pH 值 4.5, 30 培养 24 h 后测定各试管的产气量和菌数。结

果见图 3、图 4 和表 3。

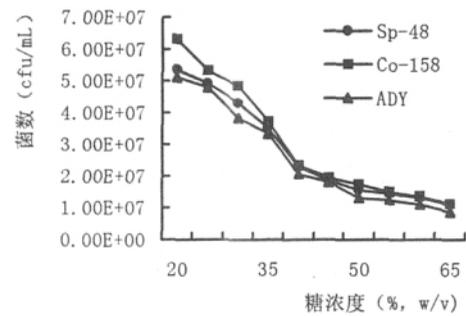


图 3 耐糖性实验(10 h 培养)

由图 3 可知, 将 3 菌株接入培养基培养 10 h 后, 菌数均随葡萄糖浓度的增大而降低。当葡萄糖浓度低于 35% 时, Co-158 菌数最高, SP-48 次之, ADY 最低, 说明此时 Co-158 耐糖性最好, 当葡萄糖浓度高于 35% 时, 3 菌株的菌数相差无几, 其中 SP-48 和 Co-158 菌数几乎一致。

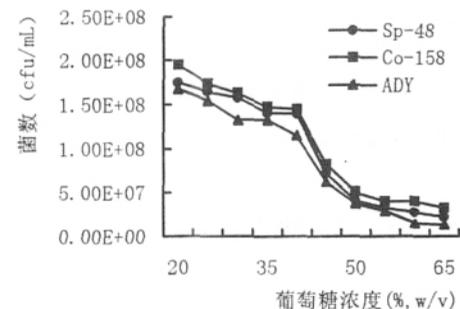


图 4 耐糖性实验(24 h 培养)

由图 4 可知, 将 3 菌株接入培养基培养 24 h 时, 葡萄糖浓度小于等于 40%, 菌数均高于 10^8 cfu/mL; 葡萄糖浓度大于 40% 时, 菌数均低于 10^8 cfu/mL。在各浓度下, Co-158 菌数均高于 SP-48 和 ADY, 说明 Co-158 耐糖性稍高于 SP-48 和 ADY。

表 3 不同糖度下 SP-48、Co-158、ADY 的产气结果(24 h)

葡萄糖浓度 (%) (w/v)	SP-48	Co-158	ADY
20	++++	++++	++++
25	++++	++++	++++
30	++++	++++	++++
35	++++	++++	++++
40	++++	++++	++++
45	++++	++++	++++
50	++	+++	+
55	-	+	-
60	-	-	-
65	-	-	-

注: “-” 不产气; “+” 产 1/4 气体; “++++” 气体满。

由表 3 中可知, 当葡萄糖浓度低于 45% (w/v) 时, 对 Co-158、SP-48 和 ADY 的发酵都没有明显的影响。当浓度高于 45% (w/v), 发酵明显受到抑制, 葡萄糖浓

度达到 50 % (w/v) 时, SP-48 和 ADY 两株菌的产气量都减少; 葡萄糖浓度达到 55 % (w/v) 时, SP-48 和 ADY 均不发酵; Co-158 在葡萄糖浓度达到 55 % (w/v) 时, 发酵受到抑制, 葡萄糖浓度达到 60 % (w/v) 时 Co-158 不发酵。从高浓度葡萄糖对 3 株菌的影响结果比较看, Co-158 比 SP-48 和 ADY 更耐高浓度的葡萄糖浓度。说明 Co-158 更适合于高浓度酒精发酵。

2.4 SP-48、Co-158、ADY 的耐盐能力比较

分别将活化后的 SP-48、Co-158 和 ADY 3 菌株接种于含不同 NaCl 浓度 (1 %、3 %、5 %、7 %、9 %、11 %、13 %、15 % 和 17 % (w/v)) 的 YPD 液体培养基中, 接种后培养基中的菌数为 1×10^7 cfu/mL, pH 值 4.5, 30 培养 24 h, 测定各试管的产气量和菌数。结果见图 5、图 6 和表 4。

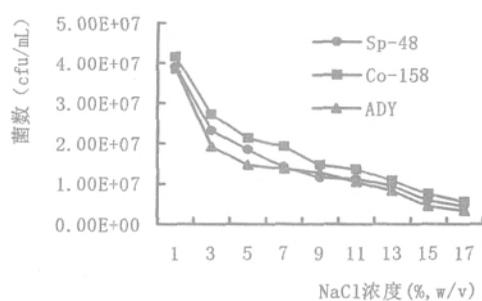


图 5 耐盐性实验(10 h)

酵母菌对盐和糖的忍耐有本质的不同。高浓度的盐会引起酵母代谢途径的改变。培养基中无机盐浓度的变化可影响酵母的耗氧量、生长率和发酵率等方面的生理功能。随盐浓度的增长, 3 株酵母菌都受到不同程度的抑制。由图 5 可知, 10 h 后, 随盐浓度的逐渐增加, 3 菌株的菌数均逐渐降低, Co-158 在各浓度下的菌数均比 SP-48 和 ADY 高。

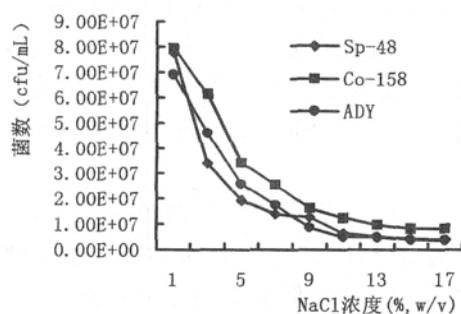


图 6 耐盐性实验(24 h)

由图 6 可知, 24 h 后, 随盐浓度的逐渐增加, Co-158 在各盐浓度下的菌数仍比 SP-48 和 ADY 的高。这说明, 在此浓度下 Co-158 比 SP-48 和 ADY 耐盐能力好。

由表 4 可知, 低浓度的 NaCl 对三者的发酵均没有明显影响。NaCl 浓度低于 9 % (w/v) 时, 3 菌株的发酵没

表 4 不同 NaCl 下 SP-48、Co-158、ADY 的产气结果(24 h)

NaCl 浓度 (% w/v)	SP-48	Co-158	ADY
1	+++	+++	+++
3	+++	+++	+++
5	+++	+++	+++
7	+++	+++	+++
9	+++	+++	+
11	-	++	-
13	-	-	-
15	-	-	-
17	-	-	-

注: “-” 不产气; “+” 产 1/4 气体; “+++” 气体满。

有明显影响; 当 NaCl 浓度高于 9 % (w/v) 时, SP-48 和 ADY 的发酵明显受抑制, 而 Co-158 在 NaCl 浓度达到 11 % (w/v) 时发酵才受抑制; NaCl 浓度达到 13 % (w/v) 时, 3 菌株都不发酵。从发酵结果看, Co-158 耐渗透压的能力略高于 SP-48 和 ADY。

3 结论

3.1 Co-158 菌株耐酒精能力强, 在含乙醇 19 % vol 的麦芽汁培养基中 10 h 后仍然可发酵。

3.2 Co-158 菌株耐糖能力高, 在葡萄糖浓度达到 55 % (w/v) 时仍然可发酵。

3.3 Co-158 菌株耐酸碱能力强, 在 pH 值为 2.5 ~ 13.0 范围内仍然可发酵。

3.4 Co-158 菌株耐盐能力强, 在 11 % (w/v) 盐溶液中仍然可发酵。

参考文献:

- [1] 吕欣, 毛忠贵. 高浓度酒精发酵研究进展[J]. 酿酒科技, 2003, 119(5): 58-59.
- [2] 黄宇彤, 杜连祥. 玉米原料酒精高浓度发酵中间试验的研究[J]. 天津轻工业学院学报, 2002, 40(1): 6-8.
- [3] 李志军, 王敏, 李家颀. 安琪耐高温酿酒高活性干酵母在酒精浓醪发酵中的应用[J]. 酿酒科技, 2004, 121(1): 91-93.
- [4] 吴国峰, 赵辉, 李盛贤, 等. 酒精浓醪发酵的计算与分析[J]. 酿酒, 2003, (4): 70-72.
- [5] Casey, G.P., Magnus, C.A., Ingledew, W.M., High gravity brewing: nutrient enhanced production of high concentrations of ethanol by brewing yeast[J]. Biotechnol. Lett. 1983, (5): 429-434.
- [6] Thomas, K.C., Ingledew, W.M., Fuel alcohol production: effects of free amino nitrogen on fermentation of very-high-gravity wheatmashes[J]. Appl. Environ. Microbiol. 1990, (56): 2046-2050.
- [7] Thomas, K.C., Ingledew, W.M., Production of 21%(v/v) ethanol by fermentation of very high gravity(VHG) wheat mashes[J]. J. IND. 1990, 56(1): 2046-2050.
- [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.