

酵母小菌落突变株酒精发酵的研究

II. sb724 菌株发酵条件及产量稳定性试验

楼纯菊 白沂涛 焦瑞身

(中国科学院上海植物生理研究所)

张欣乔 林兰英 沈克强

(上海酒精二厂)

前文报道酵母小菌落突变株的诱变育种及其有关生理特性^[1],本文报道突变株 sb724 发酵条件和扩大试验结果。

材 料 和 方 法

1. 菌种和培养条件及酒精分析方法见前文^[1]。

2. 糖纸层析方法基本参照文献^[2],发酵終了后过滤,取滤液用 1 号新华滤纸定量层析,以正丙醇:醋酸乙酯:水(6:3:1)作展开剂,25℃上行 16—17 小时,取出晾干,用对氨基苯甲酸显色,在 60℃ 下烘干。

结 果 和 讨 论

一、sb724 的生理生化特性

该菌株对温度不太敏感,在 40℃ 下尚有一定的生长能力,能耐较高的渗透压,在 30% 糖浓度下仍生长较好,能同化和发酵的糖类有葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、D(+)-半乳糖、棉子糖;可利用的氮源有硫酸铵、柠檬酸铵、氯化铵、醋酸铵。不能同化的醇类有甘油、乙醇、山梨醇、甘露醇、柳醇、赤藓醇、卫茅醇。对 TTC (氯代新四氮唑)反应呈微红色,可能呼吸链的一些酶系尚未全部阻断。

二、sb724 菌株的稳定性试验

为了适应生产的需要,对 sb724 菌株进行了耐糖、耐酒精以及提高酒精产率的稳定性试验。结果表明, sb724 菌株在 19—22Brix 糖浓度下耗糖和产酒精均属正常(表1),而一般生产中使用的糖浓度均不超过 18Brix。

表 1 sb724 菌株高糖发酵试验*

始糖浓度 (Brix)	残糖 (mg/ml)	耗糖 (%)	酒精含量 (%)
19.00	0.36	99.64	9.9
19.10	0.26	99.74	10.10
19.50	0.25	99.75	10.44
21.94	0.40	99.60	10.90
22.00	0.67	99.33	11.56
22.16	0.60	99.40	10.88
22.50	0.75	99.85	12.12
23.00	0.93	99.07	12.35
30.00	1.08	89.20	11.60

* 发酵时间为 72 小时。

三、发酵条件

1. 不同氮源的影响

所试验的四种氮源中,氯化铵、柠檬酸铵比硫酸铵好。其中一次试验的数据如下:浓度均为 0.2% 的硫酸铵、蛋白胨、氯化铵、柠檬酸铵

王惠凤参加技术工作。

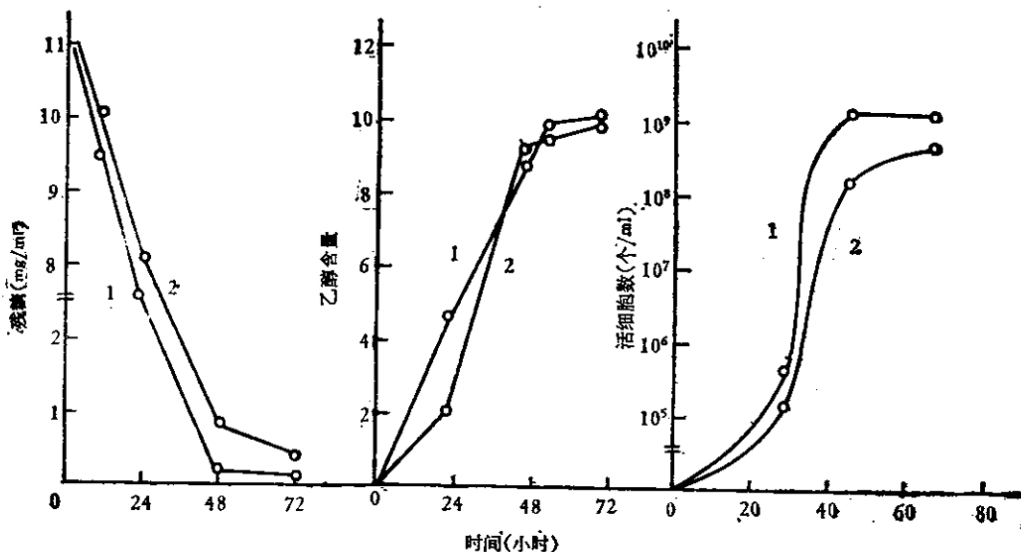


图1 微量蛋白胨、酵母膏对 sb724 发酵的促进作用
1.加蛋白胨、酵母膏, 2.对照

的酒精含量分别为: 8.30、8.40、8.55 和 8.50;
残糖分别为(mg/ml): 0.36、0.32、0.275、0.30。

2. 起始 pH 对产酒精量的影响

试验结果表明: 所试的 5 种 pH 值(3、4、5、6 和自然 pH4.5), pH3—5,对酒精形成和糖的利用差别不大, pH6 时,即影响产酒精量和糖的利用。

3. 微量酵母膏和蛋白胨的作用

前文所述,小菌落突变株生长最高点延迟到达。为了使之更快生长,在小试管及小三角瓶种子内分别加入 0.1% 蛋白胨和 0.05% 酵母膏,可以明显看出对 sb724 菌株在糖的利用、酒精的形成和活细胞数都有促进作用(图 1,图中的乙醇含量为 100ml 蒸馏液中的度数)。

4. 添加硫酸铵试验

在 sb724 的酒精发酵过程中,增加硫酸铵的量,可以缩短发酵周期和提高酒精产量。试验表明,采用 0.2% 的硫酸铵,发酵周期仅 45 小时即到达终点,产量也有提高(表 2)。

四、sb724 菌株对糖类的利用

1. sb724 菌株糖利用的层析结果

分别将 sb724 和生产用 K 菌株,在同样发酵条件下培养 72 小时,定量点样,层析结果如图 2。

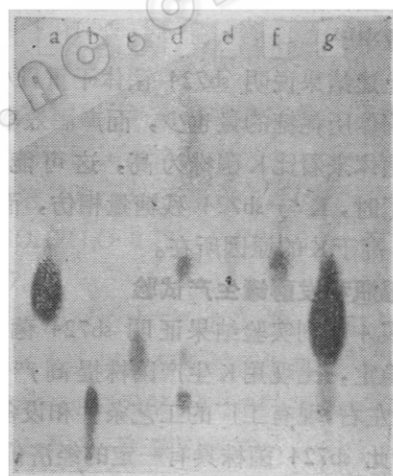


图2 sb724 和 K 菌株对糖的利用层析图谱

a. 葡萄糖, b. 棉子糖, c. 麦芽糖, d. 葡萄糖+棉子糖+麦芽糖, e. sb724 发酵终了滤液, f. K 菌发酵终了滤液, g. 未发酵糖化滤液

表 2 硫酸铵浓度与发酵周期和产量的关系

结果 分析项目	硫酸铵加入量 0.06%				0.2%			
	22	45	62	85	22	45	62	85
发酵时间(小时)	22	45	62	85	22	45	62	85
含酒精量(%)	6.0	8.44	9.12	9.27	6.4	9.32	9.5	9.48
残糖(%)	5.8	1.73	0.16	0	5.76	0.2	0	0

上述层析结果表明,该层析系统基本上能把葡萄糖、棉子糖、麦芽糖分开,而山芋糖化原液中主要是葡萄糖,有极少量棉子糖及麦芽糖,经发酵后山芋醪中残糖不多, sb724 残糖更

少于 K 菌株。

2. 从物料平衡分析 sb724 酒精发酵效率在最低培养基中加入一定克分子量的葡萄糖、经过发酵观察 CO₂ 的形成,酒精产生以及

表 3 sb724 菌株每克菌体蛋白产酒效率分析

菌 株 分析项目	试验批号		试 验 一		试 验 二		试 验 三	
			sb724	K	sb724	K	sb724	K
加入葡萄糖克分子数			0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
放出 CO ₂ 克分子数			0.188	0.188	0.17	0.165	0.19	0.138
形成乙醇克分子数			0.147	0.146	0.14	0.14	0.14	0.14
残糖克分子数			0.012	0.003	0.006	0.0025	0.002	0.016
干菌体重量 (g)			0.48	0.51	0.33	0.36	0.36	0.51
形成菌体所耗糖(克分子)			0.0043	0.0135	0.0165	0.0202	0.0155	0.0164
每克干菌体产酒率			0.30	0.28	0.42	0.38	0.38	0.27
菌体计数 (个/ml)			1.52亿	1.8 亿	—	—	—	—

残糖和菌体蛋白的含量,进而分析两个菌株的产酒效率^[3]。

上述结果说明 sb724 菌体干重量小,因而形成菌体所耗糖的量也少,而产酒效率从每克干重菌体来看比 K 菌株为高,这可能是在发酵终了时, K 与 sb724 残糖量相仿,而出酒率 sb724 高于 K 的原因所在。

五、摇瓶和发酵罐生产试验

表 4 所列实验结果证明 sb724 菌株生物活性稳定,比现用 K 生产菌株提高产酒 1.0—1.5% 左右,现有工厂的工艺条件和设备可以套用,因此 sb724 菌株具有一定的经济价值。

表 4 sb724 发酵稳定性扩大试验

规模和容量	批 数	平均提高产酒率*
250ml 三角瓶	12	2.0
5 升三角瓶	6	1.6
3 吨罐	9	1.2
75 吨罐	3	2.0
130 吨罐	56 (罐次)	1.5±

* 鉴于大生产的连续性,故用每生成 1 度酒所耗糖的度数(即用多少度糖转化成 1 度酒的平均提高数)计算。

参 考 文 献

- [1] 楼纯菊等:微生物学通报,11(2): 58—61,1984。
- [2] Zweig, G. and J. Sherma: *Handbook Chromatography*, 1: 364—365, 1972.
- [3] © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>