



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109486693 A

(43)申请公布日 2019.03.19

(21)申请号 201811453190.7

(22)申请日 2018.11.30

(83)生物保藏信息

CGMCC No.13507 2016.12.27

(71)申请人 吉林中粮生化有限公司

地址 130033 吉林省长春市经济技术开发区
仙台大街1717号

申请人 中粮生化能源(肇东)有限公司
中粮营养健康研究院有限公司

(72)发明人 佟毅 王康 武丽达 张俊奇
王泽兴 苏立国 梁春慧 陈凡荣
黄锦 李冬杰 李义 王金枝
刘辉 李凡

(74)专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理
有限责任公司 11290

代理人 王芬 张淑珍

(51)Int.Cl.

C12N 1/18(2006.01)

C12P 7/06(2006.01)

C12R 1/865(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页

(54)发明名称

一种酿酒酵母菌及其在乙醇发酵中的用途

(57)摘要

本发明涉及一种耐发酵抑制物、耐高温、耐乙醇的酿酒酵母及其在乙醇发酵领域的用途。

1. 一种酿酒酵母ZLNJ-1菌株,保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为CGMCC NO.13507。
2. 如权利要求1所述的酿酒酵母ZLNJ-1菌株的冻干菌粉。
3. 一种组合物,所述组合物含有如权利要求1所述的酿酒酵母ZLNJ-1菌株。
4. 使用如权利要求1所述的酿酒酵母ZLNJ-1菌株或如权利要求2所述的冻干菌粉生产乙醇的方法,所述方法包括:用所述酿酒酵母ZLNJ-1菌株或所述酿酒酵母ZLNJ-1菌株的冻干菌粉对生物质进行发酵以生产乙醇。
5. 根据权利要求4所述的方法,其中,所述生物质为淀粉质原料。
6. 根据权利要求5所述的方法,其中,所述淀粉质原料来源于玉米、小麦、高粱、水稻、木薯、甘薯、马铃薯、葛根或蕨根。
7. 如权利要求1所述的酿酒酵母ZLNJ-1菌株或如权利要求2所述的冻干菌粉在乙醇发酵中的用途。

一种酿酒酵母菌及其在乙醇发酵中的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及微生物领域,特别是耐发酵抑制物、耐高温且耐乙醇的酿酒酵母菌及其在乙醇发酵领域中的用途。

背景技术

[0002] 乙醇是食品和化工行业的重要原料,也是车用汽油的一种含氧添加剂。我国乙醇生产主要以玉米、木薯、小麦、水稻等淀粉质农作物作为原料,使用酵母进行发酵生产,整个生产过程分为原料粉碎、拌料、液化、糖化、发酵、蒸馏等主要工序。近二十年来,由于糖化酶生产性能不断进步,国内乙醇发酵生产工艺已由过去分步糖化发酵升级为同步糖化发酵。同时,工业酿酒酵母菌株以活性干酵母粉的形式大量应用于乙醇生产企业,省去逐级放大培养酵母的繁琐步骤,酵母干粉可直接投加到发酵罐中进行发酵,或经过活化罐和酒母罐扩培后接种发酵罐发酵。发酵过程是酵母在最适温度及厌氧条件下利用培养基中可发酵糖份产生酒精并释放二氧化碳的过程。目前国内主要工艺为间歇发酵和连续发酵两种发酵方式进行醪液的同步糖化发酵。发酵结束后,醪液经过蒸馏提纯产品乙醇,废糟液经过分离后得到的清液部分进行回配拌料,清液的剩余部分经过蒸发后和湿糟进行干燥用于生产酒糟饲料DDGS。

[0003] 工业酿酒酵母是经过长时间选育而获得的酵母品种,具有繁殖快,产酒率高,恶劣环境耐受力强的优点。不同乙醇生产企业采用的原料种类、拌料浓度、发酵方式、发酵条件、发酵废糟清液回配比例以及其它工艺条件的不同,因而发酵环境差异较大。对于乙醇生产企业而言,活性干酵母粉仅作为生产辅料一次性投入使用,而酵母菌株对不同乙醇生产企业特有的发酵环境适应能力有差异,特别是对发酵醪液中来自于原料和回配清液中的抑制物浓度耐受能力有限,影响酵母活性,继而影响乙醇耐受性和乙醇生产效率。在夏季高温季节,因为菌株对温度耐受性不够,还容易出现菌体死亡过快而发酵不彻底的隐患,需要大量冷却水进行降温。例如,国内性能较为优良的商业化酵母菌种安琪超级酿酒高活性干酵母,在国内不同生产厂家采用31-33℃发酵,发酵时间在60-80小时之间时,发酵终点的乙醇体积百分比在11-15% (v/v) 之间不定。也就是说,相同的酿酒酵母菌株在不同发酵环境下所展现的发酵性能存在较大差异。

[0004] 上述差异主要是由于乙醇生产企业之间的发酵环境差异较大。凭借微生物具有的快速繁殖和一定压力下突变进化的特性,利用工业发酵物料对商业化酵母进行模拟发酵条件下的驯化和筛选,可以针对企业特定的生产条件(特定的物料和发酵条件)对商业酿酒酵母菌株进行适应性驯化和筛选以获得具有环境耐受适应性和优良发酵性能的酵母菌株,从而在不改变发酵工艺路线和条件的前提下,提升企业乙醇发酵水平。

[0005] 专利CN103205368B公开了一种高温耐乙醇的生香酵母的驯化方法。其方法是从市售的生香酵母中筛选得到生香优良的酵母菌株,将对数期生香酵母菌液与海藻酸钠水溶液在室温无菌状态下混合均匀,再将混合液加入到氯化钙水溶液中制备成凝胶球颗粒,然后在2-4℃下固化4-5小时得固定化凝胶颗粒,对固定化生香酵母在乙醇驯化培养基中进行耐

高温耐乙醇的循环梯度驯化,循环驯化多次,最后得到耐高温耐乙醇的生香酵母。该方法虽然选用循环梯度驯化法,操作简单方便,但所使用的乙醇驯化培养基由外加乙醇与营养丰富的实验室YPD液体培养基混合组成,培养基中含糖分少,所得到的酵母虽然对于温度和乙醇的静态耐受性可能有所提高,但动态发酵性能如发酵速率和乙醇产率尚不可知。另外,对于工业化生产过程中酵母所面临的发酵抑制物,该发明也没有提供相应的提高耐受性的方法。因此,难以预期该发明中所优化的酵母在乙醇工业发酵实际采用的发酵物料以及发酵条件中所具有的表现。

[0006] 专利申请CN104450598A的发明公开了一种酿酒酵母的驯化方法,将所述活化后的酿酒酵母菌在玉米糖化醪和酶解糖液的混合物中进行培养,得到小酒母,所述玉米糖化醪和酶解糖液的质量比为(80~90):(10~20);将所述小酒母在玉米糖化醪和酶解糖液的混合物中进行8-12小时的扩大培养,得到大酒母,在以后的每一代大酒母的扩大培养中,逐渐提高酶解糖液的浓度,直至酶解糖液质量比达到85-95%,驯化后酵母菌种的酶解糖液耐受能力、五碳糖代谢能力和乙醇产率均有明显提高,最终酶解糖液中葡萄糖生产的乙醇浓度可达到62g/L(7.8%(v/v)),乙醇产率从驯化前的70%理论值提高到90%。该发明所采取的通过重复培养操作逐步提升目标发酵底物的浓度的方法,提高了酵母菌对于目标发酵底物中抑制物的耐受程度,但是由于酵母在混合物中驯化培养时间有限(仅8-12小时),驯化过程产生的乙醇浓度远远小于工业乙醇生产,无法提升酵母菌株对于发酵可能产生的高浓度乙醇(>12%(v/v))的耐受能力。

[0007] 另外,国内玉米乙醇生产技术发展停滞不前,急需对其进行改进以提高乙醇生产的效能。需要开发出同时耐受发酵底物抑制物、耐高温且耐受高浓度乙醇的酿酒酵母菌。

发明内容

[0008] 本发明的目的是克服现有技术的不足,提供一种能够耐受多种抑制物、耐高温且耐受高浓度乙醇的酿酒酵母菌及其在乙醇发酵中的用途。

[0009] 在第一方面,本发明提供了一种酿酒酵母ZLNJ-1菌株,其分类名称为酿酒酵母(*saccharomyces cerevisiae*),其保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所),CGMCC编号为CGMCC No.13507,保藏日期为2016年12月27日。

[0010] 在第二方面,本发明提供了第一方面所述的酿酒酵母ZLNJ-1菌株的冻干菌粉。

[0011] 在第三方面,本发明提供了含有所述酿酒酵母ZLNJ-1菌株的组合物。

[0012] 在第四方面,本发明提供了使用第一方面所述的酿酒酵母ZLNJ-1菌株或第二方面所述的冻干菌粉生产乙醇的方法,所述方法包括:用本发明所述的酿酒酵母ZLNJ-1菌株或其冻干菌粉对生物质进行发酵以生产乙醇。

[0013] 在第五方面,本发明提供了第一方面所述的酿酒酵母ZLNJ-1菌株或第二方面所述的冻干菌粉在乙醇发酵中的用途。

[0014] 本发明的酿酒酵母ZLNJ-1菌株在35℃的条件下也能够在乙醇发酵中实现发酵速率快、乙醇浓度高(14%(v/v)以上)、并且副产物少的优异效果。

具体实施方式

[0015] 乙醇发酵过程中除去生成乙醇和CO₂外,还会产生乙醛、甲酸、乙酸、乳酸、甘油、杂醇油等副产物。另外,在原料蒸煮糊化过程中,还原糖分解反应与美拉德反应也会产生糠醛、羟甲基糠醛和氨基糖等。这些副产物对酵母菌生长繁殖有一定抑制作用。

[0016] 本文中的高温是指是在33℃-36℃的温度范围。

[0017] 在本文中,术语“高浓度乙醇”是指:在乙醇工业生产中,发酵成熟的醪液中乙醇浓度达到14% (v/v) 以上。

[0018] 本发明的酿酒酵母ZLNJ-1菌株通过定向筛选(耐受多种发酵抑制物、耐高温且耐高浓度乙醇)获得。经实验证实,该酿酒酵母ZLNJ-1菌株在28℃-35℃的条件下能够在乙醇发酵中实现发酵速率快、乙醇浓度高、并且副产物少的优异效果。

[0019] 本发明所提供的菌株是通过以下的三级定向筛选而获得的:

[0020] 一级筛选:将安琪超级酿酒高活性干酵母(生产批号:cy80081)与玉米液化醪(干固为30wt%)和糖化酶混合后进行培养,得到成熟酒母;将成熟酒母按照20vol%的接种量接种至装有玉米液化醪(其中,补充有以下三种辅料:12.5万U/Kg(醪液)的糖化酶、0.35万U/Kg(醪液)的蛋白酶和3ppm的青霉素)的发酵罐中进行发酵,在发酵至乙醇的体积百分比达到13% (v/v) 后,用新鲜的玉米液化醪置换75vol%的发酵液(即,置换比例为75% (v/v),同时按照上述浓度补充辅料),随后以24小时的间隔进行相同的新鲜玉米液化醪置换,持续发酵1个月(一级筛选的发酵条件:发酵温度为32℃,pH不控制,搅拌速率150rpm);基于参比菌株(未经受筛选的安琪超级酿酒高活性干酵母),对一级筛选菌株进行乙醇发酵评价,以筛选出发酵结果优异的菌株;

[0021] 二级筛选:使一级筛选得到的菌株经过两级扩大培养,将培养液以32vol%的接种比例接种至装有玉米液化醪(其中,补充有以下三种辅料:12.5万U/Kg(醪液)的糖化酶、0.35万U/Kg(醪液)的蛋白酶和3ppm的青霉素)的发酵罐中,除了置换比例为60vol%以及搅拌速率为120rpm外,按照一级筛选的筛选方法持续发酵1个月;基于参比菌株(未经受筛选的安琪超级酿酒高活性干酵母),对二级筛选菌株进行乙醇发酵评价,以筛选出发酵结果优异的菌株;

[0022] 三级筛选:将二级筛选得到的菌株经过两级扩大培养,除了以33℃为起始温度并且每隔20天提高1℃外,以与二级筛选相同的方法发酵2个月(pH不控制,搅拌速率120rpm,60vol%的置换比例);基于参比菌株(未经受筛选的安琪超级酿酒高活性干酵母),对三级筛选菌株进行乙醇发酵评价,以筛选出发酵结果最优异的菌株,从而获得本发明的酿酒酵母ZLNJ-1菌株。

[0023] 在本发明中,乙醇发酵评价主要涉及表观表型指标检测(酵母数、出芽率、形态、死亡率、杂菌情况、残糖含量等)以及代谢数据分析。表观表型指标检测主要以镜检进行。代谢数据分析包括乙醇浓度,以及发酵醪液中的残总糖、残还原糖等的分析。选择相比参比菌株,乙醇浓度高,残总糖、残还原糖等含量低的发酵性能好的菌株。

[0024] 在本发明中,玉米液化醪中所补充的辅料包括糖化酶、蛋白酶和青霉素。糖化酶是一种淀粉外切酶,能从淀粉的非还原性末端逐一水解 α -1,4-葡萄糖苷键,产生葡萄糖,也能缓慢水解 α -1,6-葡萄糖苷键,转化成葡萄糖。蛋白酶可以水解玉米中的蛋白质,增加醪液中 α -氨基酸含量,为酵母细胞的生长、繁殖提供丰富的氮源。青霉素是抗菌素的一种,能破坏

细菌的细胞壁并在细菌细胞的繁殖期杀死细菌,在乙醇工业生产中起到抑制杂菌生长的作用。其中,糖化酶、蛋白酶和青霉素分别购自诺维信(中国)生物技术有限公司、山东隆大生物工程有限公司和河北制药股份有限公司。

[0025] 在本发明中,干固(也可称为干物)是指将测试样品在规定的温度和时间内进行干燥,当烘至恒重时,烘干后的质量占烘前的样品质量的百分数。

[0026] 液化醪是对淀粉质原料进行高温蒸煮或添加 α -淀粉酶进行作用,使淀粉颗粒从细胞中游离出来并发生一系列的物理化学及酶解反应,并水解为糊精及糖,得到的醪液即为液化醪。

[0027] 液化醪的制备方法通常可分为热处理液化和酶处理液化两种方法:热处理液化:对淀粉质原料进行高温(例如80-85 $^{\circ}$ C)蒸煮,受到热的作用植物细胞壁破裂,淀粉颗粒便从细胞中游离出来并发生系列的物理和化学变化,最后得以液化。酶处理液化:向淀粉质原料中添加 α -淀粉酶进行处理,淀粉分子受 α -淀粉酶作用水解为糊精、糖等从而液化。现如今很多企业采用喷射液化的方法,将蒸汽直接喷射入淀粉浆薄层,可瞬间达到淀粉液化所要求的温度,从而完成淀粉的糊化或液化。液化醪的组成可包括:残淀粉、残糊精、多糖、单糖、乳酸、甘油、蛋白质类杂质等。

[0028] 可利用酿酒酵母的标准培养方法制备本发明的菌株的种子液和种子发酵液。例如,对所述酵母培养基没有特别的限定,可为本领域中已知的能够用于培养酿酒酵母的培养基,例如YPD或YEPD培养基。所述培养的条件可为常规的酿酒酵母培养条件,优选情况下,所述培养的条件包括:培养温度为28-33.5 $^{\circ}$ C,培养时间为24-72小时。

[0029] 本发明的酿酒酵母ZLNJ-1菌株,可直接将其真空冷冻干燥,获得冻干菌粉。本发明的冻干菌粉可根据本领域常用的冻干方法进行。所述酿酒酵母ZLNJ-1菌株的冻干菌粉可包含冻干保护剂。

[0030] 另外,本发明提供了含有酿酒酵母ZLNJ-1菌株的组合物。本发明的组合物包含酿酒酵母ZLNJ-1菌株以及可用于工业生产的载体等,以用于工业乙醇生产。

[0031] 此外,本发明提供了一种生产乙醇的方法,所述方法包括:用本发明所述的酿酒酵母ZLNJ-1菌株或其冻干菌粉对生物质进行发酵以生产乙醇。

[0032] 在一些实施方式中,所述生物质为淀粉质原料。在本发明中,所述生物质可为乙醇发酵领域常规的选择(如含葡萄糖的培养液)。例如,所述淀粉质原料可来源于玉米、小麦、木薯和马铃薯等常规的可用于乙醇发酵的植物材料。例如,淀粉质原料主要来源于薯类如木薯、甘薯和马铃薯等;谷类如玉米、小麦、高粱、水稻等;野生植物如葛根、蕨根等。

[0033] 在本发明中,相对于所述生物质中每克的总糖,所述酵母菌剂的接种量可以为常规的数量,例如可以为 10^3 - 10^8 个酵母菌体,优选为 10^4 - 10^7 个酵母菌体。其中,所述酵母菌体的个数以菌落形成单位数计算。菌落形成单位数是在光学显微镜下,用血球计数板计数保温后的溶液中活菌的数目(使用台盼蓝染色法进行染色,死菌染色,活菌不染色)。

[0034] 本发明中,所述乙醇发酵的条件可为常规的乙醇发酵条件,例如发酵时间可为36-75小时,发酵温度可为30-35 $^{\circ}$ C,pH值可为4-5.5。

[0035] 本发明中,所述酵母菌剂可采用常规的方法接种,例如向生物质中加入5-15vol%的种子液。所述种子液可为所述酵母菌剂的水溶液或培养基溶液,也可为所述酵母菌剂的活化培养液。种子液的制备方法为本领域技术人员所熟知,在此不再赘述。

[0036] 根据本发明提供的生产乙醇的方法,可得到乙醇含量高的成熟发酵液。成熟发酵液中的乙醇可用常规的方法和步骤,根据不同工业产品的要求(比如燃料酒精要求乙醇的纯度达99%以上)分离并精制,比如蒸馏、浓缩、除水等步骤。

[0037] 本发明还提供了上述本发明所述的酿酒酵母ZLNJ-1菌株或其冻干菌粉在生产乙醇中的用途。

[0038] 实施例

[0039] 下面通过具体实施例,对本发明的技术方案作进一步的具体说明。但是应当理解,这些描述只是为进一步说明本发明的特征和优点,而不是对本发明权利要求的限制。

[0040] 本发明中,若非特指,所采用的原料和设备等均可从市场购得或是本领域常用的。下述实施例中的方法,如无特别说明,均为本领域的常规方法。YEPD及YPD培养基均为现有常规培养基。

[0041] 实施例1耐发酵抑制物、耐高温且耐高浓度乙醇的定向筛选

[0042] 安琪超级酿酒高活性干酵母(生产批号:cy80081)购自安琪酵母有限公司。驯化过程以及酒母培养所用的底物为玉米液化醪,干固为30wt%。驯化过程在总体积为3L的台式发酵罐(上海保兴,BIOTECH 2JG)中进行。

[0043] 玉米液化醪是将玉米粉和水(比例为1:2)调配成均一的粉浆并进行升温预煮(80℃预煮10分钟),使淀粉吸水膨胀,加热至 $85 \pm 1^\circ\text{C}$,停留20-30分钟,加入淀粉酶(购自诺维信(中国)生物技术有限公司)在温度80-85℃下液化3-4小时而获得。

[0044] 成熟酒母制备方法:将2.25g的安琪超级酿酒高活性干酵母置于装有250mL灭菌的一次水中在32℃活化30min;在1500mL的玉米粉液化醪(干固为30wt%)中添加0.52g的糖化酶(购自诺维信(中国)生物技术有限公司),然后将全部活化液加入酒母罐(规格为2000mL)中培养12小时(温度为32℃,搅拌速率为80rpm)得到成熟酒母。

[0045] 步骤1将500mL的成熟酒母($1.2-1.5 \times 10^8$ CFU/mL)和2000mL的玉米液化醪(所述玉米液化醪补充有:糖化酶(购自诺维信(中国)生物技术有限公司),12.5万U/Kg(醪液);蛋白酶(购自山东隆大生物工程有限公司),0.35万U/Kg(醪液);以及青霉素(华北制药股份有限公司),3ppm)加入发酵罐中,发酵反应总体积为2.5L;在不控制pH的情况下,以32℃的发酵温度和150rpm的搅拌速率进行发酵,发酵36小时后(其中,乙醇体积百分比达到13%(v/v)),用75vol%的新鲜玉米液化醪置换发酵罐中发酵液继续进行发酵,同时补充辅料至上述浓度;每隔24小时重复一次上述置换,连续发酵一个月;将所获得的菌株涂布YEPD平板进行分离纯化,并基于参比菌株(未经受筛选的安琪超级酿酒高活性干酵母),对一级筛选菌株进行乙醇发酵评价,以筛选得到发酵结果优异的一级筛选菌株ZLXH1-12。

[0046] 步骤2将一级筛选菌种ZLXH1-12在YEPD液体培养基中进行一级扩大培养(转速80rpm,温度32℃,时间8小时),然后将扩增后的发酵液以1:3的比例接种至含有玉米液化醪在1L摇瓶中进行二级扩大培养(扩大培养条件:转速80rpm,温度32℃,培养12小时,其中,细胞数达到2亿/mL以上);将800mL的上述酵母培养液和1700mL的玉米粉液化醪(其中辅料的添加浓度如步骤1)加入发酵罐中,发酵反应总体积为2.5L;在不控制pH的情况下,以32℃的发酵温度和120rpm的搅拌速率进行发酵至发酵液中的乙醇体积百分比达到13%(v/v),用60vol%的新鲜玉米液化醪置换发酵罐中发酵液继续进行发酵,同时补充辅料至上述浓度;每隔24小时重复一次上述置换,连续发酵一个月;将所获得的菌株涂布YEPD平板进行分离

纯化,并基于参比菌株(未进行筛选的安琪超级酿酒高活性干酵母),对二级筛选的菌株进行乙醇发酵评价,以筛选得到发酵结果优异的二级筛选菌株ZLXH2-36。

[0047] 步骤3将二级筛选菌种ZLXH2-36在YEPD液体培养基中进行一级扩大培养(转速80rpm,温度32℃,时间8小时),然后将扩增后的发酵液以1:3的比例接种至含有玉米液化醪在1L摇瓶中进行二级扩大培养(扩大培养条件:转速80rpm,温度32℃,培养12小时,其中,细胞数达到2亿/mL以上);将800mL的上述酵母培养液和1700mL的玉米粉液化醪(其中辅料的添加浓度如步骤1)加入发酵罐中,发酵反应总体积为2.5L;除了发酵温度由33℃以每20天升高1℃的速度直至发酵温度为35℃并在35℃下培养20天外,以与步骤2相同的方式进行驯化,驯化时间为2个月;将所获得的菌株涂布YEPD平板进行分离和纯化,并基于参比菌株(未经受筛选的安琪超级酿酒高活性干酵母),对三级筛选的菌株进行乙醇发酵评价,从而获得本发明的酿酒酵母ZLNJ-1菌株。

[0048] 发酵液中菌株的分离和纯化:取体积为0.5mL的含菌体的发酵醪液过滤液,涂在YEPD固定平板后,挑取较大菌落若干,编号后进行二次平板培养。

[0049] 乙醇发酵评价试验方法:分别用YEPD液体培养基对分离纯化后的酿酒酵母菌株进行一级扩大培养(扩大培养条件:转速80rpm,温度32℃,培养12小时)和二级扩大培养(扩大培养条件:转速80rpm,温度35℃,培养12小时);取一定量菌体离心洗涤,按0.15亿/mL的初始细胞数接种到装有350mL液化醪的1L摇瓶中进行72小时的厌氧发酵评价试验,其中,添加的辅料及其浓度与前述一致(发酵条件为转速80rpm,温度为35℃);同时,使用水活化的安琪超级酿酒高活性干酵母作为参比菌株进行相同的厌氧发酵(发酵条件为转速80rpm,温度分别为32℃和35℃)。

[0050] 每批发酵评价试验有三个平行样品。在发酵起始及时记录每个样品的重量。发酵期间每隔12小时称重一次,发酵时间72小时,发酵终点称重后取样,进行表观表型指标检测(酵母数、出芽率、形态、死亡率、杂菌情况、残糖含量等)以及代谢数据分析。

[0051] 表观表型指标检测主要以镜检进行。

[0052] 代谢数据分析包括乙醇浓度,以及发酵醪液中的残总糖、残还原糖的分析。

[0053] 乙醇浓度的测量:量取适量体积的发酵液,4000rpm离心20min后,使用0.22μm的水相过滤膜过滤,对滤液进行HPLC分析乙醇含量(v/v)。使用的高效液相色谱仪(Agilent 1200)购自安捷伦科技(中国)有限公司。HPLC条件:进样量为20μL;流动相为0.2μm滤膜过滤并且超声振荡脱气的HPLC的0.005mol/L硫酸水溶液;流速为0.6mL/min;柱温:65℃;检测器温度80-85℃;检测器为折光率检测器;运行时间为50min。

[0054] 同时参照GB5009.7-2016所述方法采用斐林试剂测定发酵成熟醪液中残还原糖、过滤残总糖以及残总糖含量。

[0055] 斐林试剂的校正:取斐林试剂甲、乙液各5mL,放入250mL三角瓶中,加水20mL,从滴定管中加入20-24mL0.25%的葡萄糖溶液混合均匀后置于石棉铁丝网上,用电炉加热沸腾,并保持2min,用滴定管逐滴滴入0.25%葡萄糖标准溶液,待试液蓝色消失时滴入2滴(0.1mL)1%次甲基蓝指示剂溶液复现蓝色,再缓慢滴入葡萄糖溶液至试液蓝色消失开始呈现红色时为终点,记录数据并换算结果。

[0056] 残还原糖测定:称取发酵成熟醪液10g,注入250mL容量瓶中,加水定容后混合均匀,用脱脂棉过滤,取滤液5mL按斐林试剂法测定。

[0057] 过滤残总糖的测定:取测还原糖的发酵醪液稀释过滤液100mL,加入20%盐酸10mL,在沸水浴中转化60min,冷却后用20%氢氧化钠溶液中中和至微酸性,定容到250mL,用脱脂棉过滤,取滤液10mL,按斐林试剂法测定过滤残总糖。

[0058] 残总糖的测定:量取发酵成熟醪液50mL倒入250mL的三角瓶中,加水40mL,加20%盐酸10mL,盖上塞口具有1.0m长玻璃管的橡胶塞,在沸水浴中转化60min,取出冷却,以20%氢氧化钠中和至微酸性,转移至250mL容量瓶中,加水至刻度,摇匀后用脱脂棉过滤。吸取滤液10mL加入盛有斐林试剂甲、乙液各5mL和水20mL的三角瓶中,以0.25%的葡萄糖溶液滴定,同时以0.25%葡萄糖溶液滴定10mL斐林试剂做空白。

[0059] 上述筛选得到的菌株均具有以下形态学特征:细胞呈椭圆形、卵形或圆形;大小在1.0-8.0 μm ×2.0-12 μm 之间;菌落颜色为乳白色到微黄色,边缘平滑,有隆起;液体静止培养,菌体沉于底部;在醋酸钠产孢培养基上能产生子囊,子囊内形成2-4个圆形子囊孢子。

[0060] 本发明前两级筛选得到的菌株(一级筛选得到编号ZLXH1-12的菌株,二级筛选得到编号ZLXH2-36的菌株)与参比菌株的发酵评价结果示于下表1中:

[0061] 表1

[0062]

菌株	发酵起始条件			发酵终点结果分析			
	温度(°C)	pH	转速(rp m)	残还原糖(g/g,%)	过滤残总糖(g/g,%)	残总糖(g/g,%)	乙醇浓度(v/v,%)
ZLXH1-12	32	不控制	80	0.20	0.67	2.76	14.98
参比酵母				0.20	0.72	2.88	14.91
ZLXH2-36				0.15	0.62	2.77	15.13
参比酵母				0.19	0.69	2.85	14.96

[0063] 与安琪超级酿酒高活性干酵母在35°C条件下的发酵结果相比,本发明的酿酒酵母ZLNJ-1菌株在35°C条件下发酵后,残还原糖减少了0.26左右,过滤残总糖减少了0.06左右,残总糖减少了0.53,乙醇体积百分比(v/v)由14.32%提高到了14.68%左右(发酵性能评价试验结果见表2)。经估算,表2中所示的酿酒酵母ZLNJ-1菌株的发酵结果当放大至年产几十万吨乙醇的工厂乙醇发酵生产线中,效益将会十分可观。

[0064] 表2

[0065]

菌株	发酵起始条件			发酵终点结果分析			
	温度(°C)	pH	转速(rp m)	残还原糖(g/g,%)	过滤残总糖(g/g,%)	残总糖(g/g,%)	乙醇浓度(v/v,%)
酿酒酵母 ZLNJ-1 菌株	35	不控制	80	0.27	0.97	2.36	14.68
安琪超级酿酒高	32			0.30	0.95	2.39	14.91
活性干酵母	35			0.53	1.03	2.89	14.32