

高产酒精酵母菌株及甘薯品种筛选

聂世现¹, 王 钰^{1,*}, 黄文静¹, 季必霞¹, 叶亚峰¹, 刘小平²

(1.安徽大学生命科学学院, 安徽省生态工程与生物技术重点实验室, 安徽合肥 230039 ;
2.安徽省农科院作物研究所, 安徽合肥 230031)

摘 要 :以酒曲中筛选到的酵母菌 A4 为出发菌株,用紫外线对其原生质体进行物理诱变,经过三级筛选得到突变高产菌株 A4-20。以麦芽汁为基质发酵 72h 后,酒精度为 4.93% ,较出发菌株提高了 28.7%。经过连续转接 10 代, A4-20 的发酵性能表现稳定。用其对 6 种高淀粉品种甘薯淀粉进行发酵实验,得出 3 个品种的酒精产量均达 14% 以上,其中徐薯 22 酒精产量达到最高 14.87% ,出酒率为 38.1%。经比较,徐薯 22、皖薯 3 号和 199031-1 更适合应用于酒精产业。
关键词 :原生质体,紫外线诱变,甘薯,酒精,发酵

Screening of high yield alcohol yeast and sweet potato varieties

NIE Shi-xian¹, WANG Yu^{1,*}, HUANG Wen-jing¹, JI Bi-xia¹, YE Ya-feng¹, LIU Xiao-ping²

(1.Provincial Key Laboratory of Eco-engineering and Bio-technique, College of Life Science, Anhui University, Hefei 230039, China 2.Crop Research Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031, China)

Abstract :The current study was to select A4 from distillers yeast as original strain. Strain A4-20 was screened as a high-alcohol-yield strain by UV-mutation of protoplast and three steps screening method. Through wort fermentation for 72h, the alcohol content reached 4.93%, which was 28.7% higher than the original stain. After switched over 10 generations, and the fermentation by A4-20 was not significant difference. Using A4-20 fermented the starch of 6 high starch varieties of sweet potato, the results showed that the alcohol concentration of three varieties reached more than 14%. The highest alcohol concentration and yield of liquor in Xushu 22 was 14.87% and 38.1%, respectively. Xushu 22, Wanshu 3 and 199031-1 were comparatively suitable for alcohol industry.

Key words :protoplast, UV-mutation, sweet potato, alcohol, fermentation

中图分类号 :TS262.2

文献标识码 :A

文章编号 :1002-0306(2011)02-0159-04

石油是当今世界上主要的能源之一,其储备有限。20 世纪 70 年代世界范围发生石油危机,使利用可再生的资源(如高淀粉作物)发酵生产酒精作为生物能源的研究成为人们关注的焦点。生物能源与石油相比具有可再生、污染率小、减少温室效应等优点,能部分或全部代替汽油。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^[1]。发酵法是酒精生产的重要方法,发酵法生产酒精的关键是酵母菌株,酒精酵母的优劣不仅直接影响发酵率的高低,而且会影响酒精的产量和质量。我国酒精生产行业中普遍存在亟待解决的问题是发酵强度低,生产成本低,能耗大^[2]。因此,高产酒精酵母的选育是提高酒精产率,节约生产能源的关键。我国是世界上最大的甘薯生产国并有着丰富的甘薯种质资源,甘薯作为燃料酒精的原材料必将在我国拥有广阔的市场前景。高淀粉型甘薯品种不一定是高产燃料乙醇型品种。本文探讨了酵母菌 A4 原生

质体紫外线诱变筛选方法,旨在筛选出发酵力强、酒精产量高的优良酵母菌株,并用此菌株对不同高淀粉品种甘薯淀粉进行发酵实验,比较各品种间差异,找出更适合应用于酒精产业的燃料乙醇型甘薯品种,从而促进我国甘薯生产燃料酒精的推广应用。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

酵母菌(A4) 本实验室保藏菌种;麦芽汁 合肥市华润雪花啤酒厂;YPD 培养基 参考文献[3];原生质体再生培养基 在 YPD 固体培养基中添加 KCl 至 0.7mol/L;TTC 上、下层培养基 参考文献[4];预处理剂 0.1% β-巯基乙醇,其中含 0.1mol/L 的 EDTA-2Na;KCl 高渗缓冲液 在缓冲液中添加 KCl 至 0.7mol/L;蜗牛酶液 将 1.5% 的蜗牛酶溶于高渗缓冲液中,微孔滤膜过滤除菌;α-淀粉酶(最适温度 50~70℃,酶活 3700U/g)、糖化酶(酶活 10 万 U/g) 北京博奥星生物技术有限公司;高淀粉甘薯品种 徐薯 18、徐薯 22、青农 2 号、199031-1、栗子香,本实验室种植,皖薯 3 号 安徽省农科院提供。

SCV 系列 Streamline 垂直流超净工作台 新加坡艺思高科技有限公司;MLS-3750 全自动高压蒸汽

收稿日期 2010-02-04 * 通讯联系人

作者简介 聂世现(1984-)男,硕士研究生,研究方向 细胞工程。

基金项目 安徽省教育厅重点项目(KJ2008A077)。

表1 诱变后的再生菌经 TTC 筛选的结果

处理时间(s)	10	20	30	40	50	60	70
存活率(%)	95.65	94.57	71.74	45.65	47.83	15.22	9.78
正突变率(%)	12.5	10.34	16.67	23.81	11.36	14.29	11.11

表2 10%酒精度下各菌株的产气情况

菌株	时间(h)				菌株	时间(h)			
	12	24	36	48		12	24	36	48
A4-1	-	+	++	++++	A4-17	-	-	-	-
A4-2	-	+	++	++++	A4-18	-	++	++++	++++
A4-3	-	+	++	++++	A4-19	++	++++	++++	++++
A4-4	-	-	++	+++	A4-20	+++	++++	++++	++++
A4-5	++	+++	++++	++++	A4-21	-	-	-	-
A4-6	-	-	++	++++	A4-22	-	-	++	++++
A4-7	-	-	+	++++	A4-23	+	+++	++++	++++
A4-8	+	++	++++	++++	A4-24	++	++++	++++	++++
A4-9	++	++++	++++	++++	A4-25	-	+++	++++	++++
A4-10	-	++++	++++	++++	A4-26	-	-	++	++++
A4-11	+	+	++	+++	A4-27	+	+	++	++++
A4-12	-	-	-	++	A4-28	-	-	-	++
A4-13	-	-	++	++++	A4-29	-	-	+++	++++
A4-14	-	-	++	++++	A4-30	-	-	++	++++
A4-15	+	+	++	++++	A4-31	+	+	++	++++
A4-16	-	-	-	+	A4-32	-	-	-	-

注：“-”表示无气泡；“+”表示产气泡；“+”的多少表示不同的产气量；“++++”表示气泡满管。

灭菌锅 日本三洋公司;SP-721E 型可见光分光光度计 上海光谱仪器有限公司;微孔滤膜 上海生物工程技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 出发菌株的原生质体制备^[5-6] 将活化好的菌种接种于盛有 50mL YPD 液体培养基的锥形瓶中, 28℃ 200r/min 摇床培养 10h, 取 5mL 菌液 3500r/min 离心 5min, 用磷酸-柠檬酸缓冲液洗 2 次, 无菌加入 0.1% β-巯基乙醇, 28℃ 静置 10min, 用高渗缓冲液洗涤 3 次, 取 1mL 菌液离心弃上清液, 加入 1.5% 的蜗牛酶液, 30℃ 水浴 1.5h, 2000r/min 离心 10min, 高渗缓冲液洗涤 2 次后稀释至 10⁻⁴ 待用。

1.2.2 原生质体紫外诱变 取稀释至 10⁻⁴ 后的原生质体悬液 5mL 于无菌平皿中, 置于 20W 紫外灯下距离 30cm 照射不同时间后涂布于高渗平板和普通平板, 同时作对照组, 于 28℃ 避光培养 72h, 待长出菌落后计算其存活率^[7]。

1.2.3 酵母菌的筛选 参考文献[8]。一级筛选: TTC 平板法; 二级筛选: 耐酒精性测定; 三级筛选: 麦芽汁发酵法。

1.2.4 遗传稳定性实验^[7] 鉴于诱变菌株的性状常不稳定, 连续继代培养时可能出现退化现象。为了检测正突变菌株遗传性状是否稳定, 将正突变菌株传代培养 10 代, 测定其酒精产量。

1.2.5 甘薯淀粉提取方法 取鲜甘薯洗净, 切成小块放于匀浆机中加水打成匀浆, 用 4 层纱布过滤浆液并加水反复揉洗, 静置使过滤液中淀粉沉淀, 取沉淀淀粉烘干待用。

1.2.6 甘薯淀粉发酵实验 取 200mL 料液(甘薯淀粉: 水 = 1:3) 于锥形瓶中, 以 10~40U/g 的量加入 α-淀粉酶 65℃ 水浴 1h, 沸水浴 10min 使其液化完

全, 以 300U/g 的量加入糖化酶 60℃ 水浴 1h, 调 pH 为 4.5, 加入 1% 的酵母提取物和 5% 的菌种于 30℃ 条件下发酵 96h, 每 24h 测其失重量, 发酵结束后检测发酵液各指标, 本实验重复 3 次。

1.2.7 发酵液的检测方法 酒精浓度测定: 蒸馏法^[9]; 还原糖、总糖测定: DNS 法^[10]; CO₂ 失重的测定: 直接称重法; 原料出酒率计算: 原料出酒率(%) = 酒精产量(95%) / 原料耗用量 × 100%。

2 结果与讨论

2.1 酵母菌的筛选

2.1.1 一级筛选 原生质体悬液经紫外灯(20W)不同时间(7 个梯度)照射诱变处理后, 涂布于再生培养基培养。将诱变后的再生菌落用 TTC 平板法进行一级筛选。产酒精能力强的酵母菌落呈深红色, 次之为粉红色、微红色或不显色^[11]。以出发菌株为对照, 显色后颜色比出发菌株深者为正突变, 结果(见表 1)可看出, 经 30s 和 40s 照射处理的效果较好, 共得到 32 株酵母菌, 随机编号为 A4-1~A4-32, 转斜面保存作为二级筛选的出发菌株。

2.1.2 二级筛选 在酒精发酵时, 产物酒精的浓度过高会对酵母造成一定的毒害作用, 抑制酵母的生长及发酵活性。所以, 酵母的发酵能力在很大程度上取决于它们自身酒精耐受力的大小。本实验通过杜氏管发酵, 测定酵母菌在外加 10% 酒精的发酵液中的产气速度和产气量。若无气泡产生表示无发酵现象, 说明菌株不耐 10% 的酒精; 若有气泡产生表示有发酵现象, 气泡产生的早晚、产气速度和产气量多少反映菌株耐酒精的程度。对不同酵母菌株的酒精耐性进行比较, 结果见表 2。

由表 2 可看出, A4-5、A4-8、A4-9、A4-10、A4-

表3 突变菌株麦芽汁培养基发酵结果

诱变菌株	出发菌株	A4-5	A4-8	A4-9	A4-10	A4-18	A4-19	A4-20	A4-23	A4-24	A4-25
酒精度(%)	3.83	4.13	4.13	4.53	3.83	4.63	4.63	4.93	3.73	4.53	3.83
残糖(mg/mL)	6.33	6.52	6.15	6.37	5.91	6.57	6.26	5.81	5.77	5.83	6.39
CO ₂ 失重(g)	7.3	7.7	7.7	8.1	6.8	8.3	8.7	9.6	7.4	8.6	7.4

注:表中各数据均为三次重复的平均值。

表4 不同品种甘薯淀粉发酵结果

甘薯品种	酒精度(%)	淀粉率(%)	残还原糖(mg/mL)	残总糖(mg/mL)	CO ₂ 失重(g)	出酒率(%)
徐薯18	13.8 ± 0.346ab	24.17	3.94	10.76	26	35.36
徐薯22	14.87 ± 0.208d	21.22	5.83	12.93	27.5	38.1
皖薯3号	14.13 ± 0.306bc	24.35	8.33	17.63	26.3	36.21
青农2号	13.9 ± 0.265abc	22.78	7.04	14.21	25.7	35.62
199031-1	14.27 ± 0.115c	19.48	3.55	10.64	26.8	36.57
栗子香	13.6 ± 0a	23.91	1.9	7.31	25.2	34.85

注:酒精度为平均值 ± 标准差,显著性水平设为0.05。

18、A4-19、A4-20、A4-23、A4-24 和 A4-25,产气时间较早,速度较快,产气量较多,将其选出作为三级筛选的出发菌株。

2.1.3 三级筛选 将二级筛选出的10株突变菌株活化后接种于麦芽汁发酵培养基中,在30℃进行发酵实验(重复3次),发酵终止时测酒精产量和发酵液的残糖量,结果见表3。

由表3可看出,A4-9、A4-18、A4-19、A4-20、A4-24突变菌株酒精产量明显增加,A4-20尤为明显,酒精产量达到4.93%,残糖量较低,CO₂失重量最大。CO₂释放量与产酒精率有很大关系,总失重值愈大,产酒精量愈多^[12]。表3中A4-10、A4-23和A4-25突变株酒精产量没有增加,甚至降低。这可能是不同酵母菌株的生长代谢过程有差异,对可发酵性糖的利用方式有区别,这3株菌可能更多的是利用发酵性糖进行细胞的生长繁殖,从而减少发酵性糖转化为酒精的量。另外,这3株酵母菌发酵糖产酒精的稳定性较差。

2.1.4 遗传稳定性实验 将A4-20连续传代10次,测定其发酵酒精产率,并与初代进行比较。经测定,初代酒精度为4.9%,第10代酒精度为4.8%。结果表明,A4-20的发酵性能无明显变化,表现稳定,酒精产率稳定在4.9%左右。

2.2 燃料乙醇型甘薯品种筛选

为了测定A4-20在高淀粉品种甘薯发酵中的酒精产量,将A4-20接种于发酵液中,其发酵结果见表4。

由表4可知,徐薯22、皖薯3号、199031-1酒精产量均达14%以上,其中徐薯22酒精产量达到最高14.87%,出酒率为38.1%。SPSS17.0单因素方差分析结果显示,6个甘薯品种酒精度差异显著(P < 0.05),进一步Duncan检验结果表明,徐薯22酒精度与其它品种相比差异显著(P < 0.05)。但徐薯22和皖薯3号残还原糖和残总糖相对较高,说明A4-20对其可发酵性糖利用不彻底。淀粉率是评价淀粉型甘薯的重要指标,淀粉率越高甘薯中淀粉含量越高,高淀粉品种甘薯在酒精产业中更具有市场前景。由表4可知,皖薯3号淀粉率最高达24.35%,而199031-1只有19.48%。虽然徐薯18和栗子香淀粉

率达到24.17%和23.91%,但是其酒精产量仅达13.8%和13.6%,与其它品种相比产量相对较低。尽管栗子香酒精产量和出酒率在6个品种中最低,但是其残还原糖和残总糖量最低,由此可知A4-20对栗子香的可发酵性糖利用最彻底。青农2号在6个供试品种中各方面指标均处于中等水平。SPSS17.0软件Pearson相关性分析可知发酵酒精度和淀粉率无显著相关性(r = -0.621, P = 0.189)。

3 结论

本实验对酵母菌A4原生质体进行了紫外线诱变并通过三级筛选得到发酵性能稳定的突变菌株A4-20,发酵麦芽汁72h,酒精产率4.93%,比出发菌株的酒精产率提高了28.7%。用其对6种高淀粉品种甘薯淀粉进行发酵实验,得出3个品种酒精产量均达14%以上,其中徐薯22酒精产量最高,综合比较酒精产量和淀粉率两个指标,在6个燃料乙醇型高淀粉品种甘薯中徐薯22、皖薯3号和199031-1更适合应用于酒精产业。但是本实验也存在一定不足,如A4-20对徐薯22和皖薯3号的可发酵性糖利用不彻底造成了原料的浪费。为进一步提高酒精产量和原料利用率,我们将进一步改进发酵条件。

参考文献

- [1] 黄宇彤,杜连祥.玉米原料酒精高浓度发酵中间实验的研究[J].天津轻工业学院学报,2002(1):6-8.
- [2] 李艾,郝玉翠,郝斌.耐高温高产酒精酵母的筛选及生理特性的初步研究[J].唐山学院学报,2009,22(3):74-76.
- [3] 赵悦茗,杜跃超,罗晨.安琪超级酿酒酵母原生质体制备与再生条件研究[J].酿酒科技,2008(1):17-20.
- [4] 张晓霞,王莹,刘长江.甜高粱茎秆汁液酒精发酵高产菌株的选育[J].研究与实验,2006(2):32-37.
- [5] 孙金旭.乳酒酵母紫外诱变原生质体制备研究[J].酿酒科技,2008(6):65-71.
- [6] 俞志敏,栾静,徐鹏,等.耐高糖酿酒酵母原生质体制备与再生过程研究[J].酿酒科技,2008(4):45-48.
- [7] 张春红,贾茹珍.甜高粱秆汁高产酒精酵母原生质体的诱变选育[J].中国酿造,2007(12):25-28.
- [8] 张伟,朱会霞,李英军,等.Co⁶⁰诱变原生质体选育高产酒

(下转第235页)

$$1.09340x_1x_3 - 2.86771x_2x_3$$

其中 y 为乳糖水解度(%)。

2.2 pH、酶添加量及水解温度对响应值的影响

为得到乳糖水解度最大值时各因素的最佳条件,分别将各因素固定在中心点,利用 Design-Expert 软件作出其他两个因素对响应值作用的响应面图,如图 1~图 3 所示。

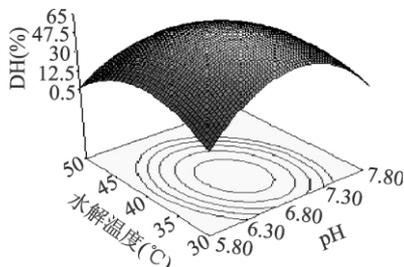


图 1 pH 和水解温度对水解度的影响
注 固定因素 酶添加量 = 1.00g/kg。

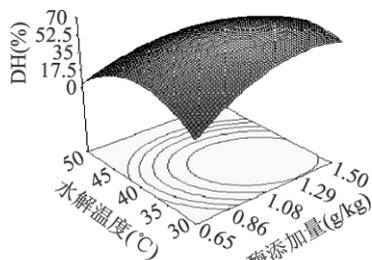


图 2 水解温度和酶添加量对水解度的影响
注 固定因素 pH = 6.80。

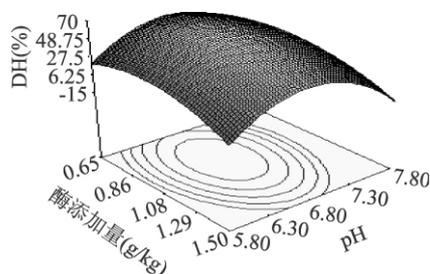


图 3 酶添加量和 pH 对水解度的影响
注 固定因素 水解温度 = 40℃。

由图 1 可以看出,将乳糖酶添加量固定在 0 水平时,乳糖水解度先是随着 pH 和水解温度的升高而增加,到达最优点后则开始降低,在二者的交互作用中,温度和 pH 对响应值的影响作用都很明显。当温度高于 45℃ 和 pH 低于 6.2 时,酶基本失活,水解度迅速降低,同理,在低温和高 pH 条件下,酶活性也不很稳定。

当把 pH 固定在 0 水平时,响应值可以达到的最大值为 69.25%,如图 2 所示,在水解温度和酶添加量

的交互作用中,水解温度是影响水解度的主要因素,在适当的水解温度条件下,增加酶添加量,可获得较高的水解度。

同样,图 3 显示的是当水解温度固定在 0 水平时,pH 和酶添加量对乳糖水解度的影响,可见 pH 对响应值的影响较大,在适当的 pH 条件下,随着酶添加量的增加,水解度呈增大趋势。

2.3 最优水解条件的确定

综合 2.2 中的分析,兼顾考虑乳糖酶的使用量和节约能源,将酶添加量控制在 0.8~1.2g/kg,水解温度定为 30~40℃,再利用 Design-Expert 软件分析,得到最佳点处 pH6.73,酶添加量 1.03g/kg,水解温度 37.26℃,此条件下水解 3h,乳糖的水解度可达到 66.02%,但比徐宁等人得到的结论^[7]偏低,可能是由于乳糖酶存放时间过长,酶活力降低所致。

3 结论

本实验利用响应面方法确定了 β-半乳糖苷酶水解乳清中乳糖的最佳水解条件,当乳清 pH 为 6.73,酶添加量 1.03g/kg,水解温度 37.26℃ 时,水解 3h 后可获得乳糖最大水解度为 66.02%,而且此时得到的水解液略带奶香,口感香甜,可以作为进一步发酵生产低乳糖乳清饮料的基液。本实验结果不仅为乳糖酶在乳清中的应用提供了理论依据,而且为国内低乳糖乳清饮料的开发开辟了新的途径。

参考文献

- [1] Djuric M, Caric M, Spasenija M, et al. Development of whey-based beverages[J]. Eur Food Res Technol, 2004, 219(4): 321-328.
- [2] 赵少华. Maxilact 乳品酵母乳糖酶在牛奶和乳清中的应用[J]. 食品工业科技, 2007, 28(5): 44-46.
- [3] Vasiljevic T, Jelen P. Production of β-galactosidase for lactose hydrolysis in milk and dairy products[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2001, 2(2): 75-85.
- [4] Panesar P S. Application of response surface methodology in the permeabilization of yeast cells for lactose hydrolysis[J]. Biochemical Engineering Journal, 2008, 39: 91-96.
- [5] Guo Y X, Pan D D. Optimization of hydrolysis conditions for the production of the angiotensin-I converting enzyme(ACE) inhibitory peptides from whey protein using response surface methodology[J]. Food Chemistry, 2009, 114: 328-333.
- [6] 王辉. 低乳糖牛奶生产工艺及乳糖水解率测定方法的研究[D]. 东北农业大学, 2003.
- [7] 徐宁, 孙波, 迟玉杰. 以乳清为原料酶法水解乳糖条件的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(12): 286-290.

(上接第 161 页)

精酵母[J]. 酿酒科技, 2006(1): 23-26.

[9] 吴帅, 肖冬光, 原通磊, 等. 高耐性酿酒酵母菌种的筛选[J]. 酿酒科技, 2006(9): 37-40.

[10] 李进华, 周忠泽. 基础生物学实验[M]. 合肥: 安徽大学出版社, 2005: 256-268.

[11] 王梅, 张澎湃, 帅桂兰. TTC 在黄酒酵母选育中的应用[J]. 酿酒, 2001, 28(5): 62-64.

[12] 刘小平, 胡建勋, 王钰, 等. 甘薯品种内涵品质与发酵酒精产量关系的初步研究[J]. 安徽农业科学, 1997, 25(3): 203-204.