

费文斌,雍晓雨,徐俊,等. 1 株耐热产乙醇酵母的分离、鉴定与性能测试[J]. 江苏农业科学,2015,43(3):319-322.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.03.104

1 株耐热产乙醇酵母的分离、鉴定与性能测试

费文斌,雍晓雨,徐俊,周俊,王舒雅,陈怡露,郑涛

(南京工业大学生物与制药工程学院,江苏南京 210009)

摘要:以江苏省灌南县汤沟酿酒厂的大曲、窖泥及发酵酒醅为样品,经富集、分离得到 18 株初筛酵母菌株,从中经复筛分离出 1 株能在 42 ℃ 下发酵产乙醇的酵母菌,命名为 NR11。经过形态观察、BIOLOG 微生物检定系统以及 18S rDNA 基因的分析,将该酵母菌鉴定为酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。对其特性及发酵性能的研究结果显示, NR11 可以在 12% 乙醇溶液及 55% 糖溶液下正常发酵,致死温度可达 60 ℃,在 30、38、40、42 ℃ 条件下,乙醇产量分别可以达到 109.0、93.2、73.8、44.0 g/L。

关键词:酿酒酵母;富集;分离;性能测试;菌株鉴定;耐热性;乙醇

中图分类号: TS261.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)03-0319-04

乙醇为一种可再生的清洁能源,可用作液体燃料替代或部分替代石油燃料,并且其生产工艺成熟,原料来源广泛^[1-3]。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是使用最广泛的乙醇发酵出发功能菌株,然而传统的酿酒酵母的最适发酵温度为 28~33 ℃,一般不超过 36 ℃,因此在气温较高地区和夏季会严重影响正常生产。研究显示,应用耐高温酵母生产乙醇具有节约能源、提高出酒率、缩短发酵周期、提高设备利用率及维持高温下正常生产等诸多优势^[4]。耐高温高产乙醇酵母菌的选育和发酵工艺的改进是实现浓醪发酵工业的关键,因此分离、筛选和应用耐高温高产乙醇酵母菌的研究已经受到广泛重视,成为当前国内外乙醇生产行业研究的热点^[5-7]。白酒的传统酿造过程是以含有复杂微生物种类的酒曲作为发酵剂,以淀粉质、糖质为原料,在窖池中完成乙醇发酵的过程。在发酵过程中,窖泥和发酵糟醅密封接触,大量微生物在两者间扩散、交换,最终使得作为发酵容器的窖泥中含有包括酵母菌在内的非常丰富的微生物种群。这些微生物在白酒生产后期,能利用含高浓度乙醇的酒醅进行发酵,并且发酵温度高,经过长期驯化可以具有比其他环境微生物更强的耐高温、耐乙醇能力^[8-9],因此白酒厂窖池中的窖泥、酒曲成为分离选育酵母菌及其他微生物的良好来源^[10]。本试验旨在通过初筛、复筛试验得到可以耐高温并且高产乙醇酵母,并对耐高温酵母的生理特性及发酵性能进行研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为大曲、窖泥、发酵酒醅,由江苏省灌南县汤沟

酿酒厂提供。

1.2 培养基

YPD 液体培养基:20.0 g/L 葡萄糖、20.0 g/L 酵母粉、20.0 g/L 蛋白胨;YPD 固体培养基:20.0 g/L 葡萄糖、20.0 g/L 酵母粉、20.0 g/L 蛋白胨、20.0 g/L 琼脂;酵母富集培养基:含 10% 乙醇的 6Be° 麦芽汁, pH 值自然;初筛培养基由上下 2 层培养基组成;下层培养基为 YEPD 固体培养基,上层培养基主要成分包括 0.3 g/L 红四氮唑(TTC)、30.0 g/L 葡萄糖、20.0 g/L 琼脂;乙醇发酵培养基:250.0 g/L 葡萄糖、4.0 g/L 蛋白胨、3.0 g/L 酵母粉、4.0 g/L (NH₄)₂SO₄、3.0 g/L KH₂PO₄、0.5 g/L MgSO₄、0.05 g/L ZnSO₄、0.05 g/L ZnSO₄、0.05 g/L FeSO₄。

1.3 筛选方法

酵母分离样品的采集:从酒厂窖泥、酒曲、酒醅中以随机取样原则收集样品,装入灭菌纸袋中,贮存于冰箱中备用。

样品的预处理:分别将 10.0 g 大曲、窖泥、酒醅样品加入 50 mL 装有灭菌玻璃珠的无菌水中,200 r/min 处理 30 min 以打碎样品。

酵母菌的富集:取 5.0 mL 各样品悬液接入酵母富集培养基中,于 30 ℃、180 r/min 条件下培养,以富集样品中的酵母;6 h 后转成 40 ℃、180 r/min 条件下培养 18 h,以富集其中的耐热酵母菌株。

一级筛选:将富集的菌液涂布于 YPD 固体培养基上,于 40 ℃ 培养 24 h,长出菌落后倒入 45 ℃ TTC 上层培养基中,于 40 ℃ 下避光保温 6 h。比较各菌株颜色,颜色呈深红色的即具有较高的产乙醇能力。挑取明显的酵母菌落,多次划线得到单菌落,镜检并观察记录菌体形状、大小、出芽情况、菌落大小等。

二级筛选:将一级筛选酵母菌分别接入带有杜氏小管的不同的 YEPD 液体试管中,在不同温度下培养,分别在 12、24、48 h 观察杜氏小管中的产气情况。

三级筛选:过夜培养各酵母菌株,按体积分数为 20% 的接种量接入到发酵培养基中,37 ℃ 厌氧培养 48 h,测定 $D_{600\text{ nm}}$ 值、残糖含量、乙醇含量。

收稿日期:2014-05-07

基金项目:国家“973”计划(编号:2013CB733904);国家“863”计划(编号:2012AA022106);江苏省自然科学基金(编号:BK20130932);江苏省高校自然科学基金(编号:13KJB530009)。

作者简介:费文斌(1989—),男,江苏无锡人,硕士研究生,主要从事燃料乙醇酵母育种研究。E-mail:582025593@qq.com。

通信作者:郑涛,教授,主要从事生物能源、生物材料的开发与应用。E-mail:zhentao@njtech.edu.cn。

1.4 酵母菌的鉴定

1.4.1 BIOLOG 鉴定 BIOLOG 代谢指纹分析:将菌株在 BIOLOG 专用酵母培养基上培养约 48 h,制备菌悬液,调整吸光度至合适范围,上样于 96 孔微鉴定板,于 30 ℃ 培养。分别在 24、48、72 h 使用 BIOLOG 微生物鉴定仪读取数据,将该菌株对 95 种碳源的利用率与数据库中的信息进行比对,得出鉴定结果^[11]。

1.4.2 18S rDNA 基因序列鉴定 18S rDNA 基因扩增和测序:使用 OMEGA 公司的 Yeast DNA Kit 试剂盒提取该菌株的基因组 DNA,利用通用引物(上游:5′ - TCCTCTAAATGAC-CAAGTTTG - 3′,下游:5′ - GGAAGGGATGTATTATTAG - 3′)进行 PCR 扩增^[12],PCR 产物经纯化后送南京金斯瑞生物科技有限公司测序,最后将测序结果进行 BLAST 比对。

1.5 酵母菌性能测试

耐热性能:将菌株按体积分数为 10% 的接种量接入到种子培养基中,在 37、40、43、45 ℃ 下培养 24 h,测定其生物量。

耐糖性能:分别制备初始葡萄糖质量分数为 10%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60% 的培养基,37 ℃ 培养 24 h,测定其生物量。

耐酸性能:制备初始 pH 值分别为 2、3、4、5、6 的 YEPD 培养基,37 ℃ 培养 24 h,测定其生物量。

耐醇性能:制备初始乙醇体积分数分别为 6%、8%、10%、12%、14%、16%、18% 的 YEPD 培养基,于 37 ℃ 培养 24 h,测定其生物量。

致死温度测定:将装有 1 mL 已培养菌液的试管,分别置于 52、54、56、58、60 ℃ 条件下维持 5 min 后马上冷却,取 0.1 mL 菌液涂布于 YEPD 平板上,观察菌落生长情况,如果没有菌落生长则表示该温度为该菌的致死温度。

1.6 分析方法

生物量的测定:采用比浊法,将发酵液混匀后稀释成一定倍数,测定其在波长 600 nm 下的吸光度($D_{600\text{ nm}}$)。

残糖、乙醇含量的测定:利用 SBA-40E 生物传感仪(山东省科学院生物研究所)进行测定。

2 结果与分析

2.1 耐高温酵母菌的初筛

TTC 是 1 种显色剂,它对酵母的代谢产物产生呈色反应,因此通过它可以判断酵母中呼吸酶的活力,即酵母产乙醇的能力。经过二级筛选和镜检,获得 18 株颜色最红且菌落较大的酵母菌落,杜氏管产气能力强的酵母菌株编号为 NR01 至 NR18,观察记录菌体形状、出芽情况、是否有裂殖现象、是否

形成假菌丝,同时测定其细胞大小,结果如表 1 所示。

表 1 酵母菌个体形态观察结果

菌株名	形状	生殖特征	平均直径 (mm)	光泽度	菌落颜色
NR01	柠檬形	2 端出芽	3.2	光泽	乳白
NR02	圆形	1 端出芽	2.9	光泽	乳白
NR03	椭圆形	1 端出芽,裂殖	2.7	不光泽	土黄
NR04	圆形	1 端出芽	3.8	光泽	红色
NR05	椭圆形	1 端出芽	2.5	光泽	乳白
NR06	柠檬形	1 端出芽,裂殖	2.7	光泽	乳白
NR07	圆形	2 端出芽	2.5	光泽	乳白
NR08	圆形	1 端出芽,裂殖	3.9	不光泽	红色
NR09	椭圆形	2 端出芽	3.1	光泽	乳白
NR10	椭圆形	1 端出芽	2.5	光泽	乳白
NR11	椭圆形	2 端出芽	2.4	光泽	乳白
NR12	圆形	1 端出芽	2.7	光泽	乳白
NR13	柠檬形	1 端出芽	2.4	光泽	乳白
NR14	椭圆形	1 端出芽	2.3	光泽	乳白
NR15	椭圆形	1 端出芽	2.2	光泽	土黄
NR16	圆形	1 端出芽	2.7	光泽	乳白
NR17	圆形	1 端出芽	3.2	光泽	橙黄
NR18	圆形	1 端出芽	3.2	光泽	乳白

2.2 耐高温酵母菌的复筛

将过夜培养的各酵母菌按体积分数 20% 接入到复筛培养基中,37 ℃ 厌氧培养 48 h。从图 1 可以看出,发酵 48 h 后,在 37 ℃ 培养条件下,菌株 NR11 的乙醇质量浓度最高,达到 98 g/L,残糖质量浓度为 11.2 g/L, $D_{600\text{ nm}}$ 达到 18.9,乙醇得率为 76.7%,各方面性能均是 18 株初筛酵母菌中性能最佳的。因此,选取 NR11 进行下一步鉴定及性能测试试验。

2.3 酵母菌的种属鉴定结果

2.3.1 BIOLOG 鉴定结果 与传统鉴定方法相比,BIOLOG 自动微生物鉴定系统快速、便捷、有效,在微生物鉴定技术上是一个很大的进步,由于其数据库范围广、包含全面,为广大的微生物工作者提供了方向性指导^[11]。此外,仪器在鉴定结束时给出与数据库最匹配的 4 个结果,根据 P 值从大到小排序,最佳试验结果见表 2。由表 2 可以看出,相似度 = $0.967 > 0.75$,距离 = $0.471 < 5.0$, P 值为 0.999。系统得到的 3 个重要参数比较理想,与数据库匹配良好,相似度越接近 1.00,说明鉴定结果的可靠性更高。在 ID 地址栏显示出 1 个最佳匹配名称,物种名为 *Saccharomyces cerevisiae* (酿酒酵母)。各种数据指标都表明,鉴定结果准确,与数据库有很好的匹配。

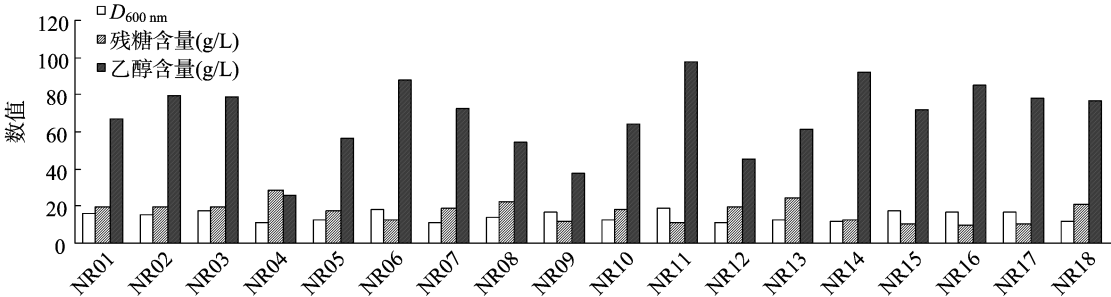


图 1 不同酵母乙醇菌株发酵能力测试

表 2 BIOLOG 鉴定结果

P 值	相似度	距离	生物类型	物种名
0.999	0.967	0.471	YT	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (酿酒酵母)

注:YT 为 yeast 缩写,表明该 BIOLOG 板是用于酵母鉴定的。

2.3.2 18S rDNA 菌株鉴定结果 18S rDNA 作为一种经典的鉴定方式在真菌的鉴定工作中占有重要作用,用于扩增 18S rDNA 基因片段的 PCR 引物是根据真菌 18S 的保守区域

设计的。通过 PCR 对酵母 18S rRNA 基因片段进行扩增并测序,再对测序结果进行多态性分析,从而将待测酵母正确分类^[12]。本试验将目标菌株的 18S rRNA 基因上传至 NCBI 数据库并进行 BLAST 比对,下载相关 18S 基因序列构建进化树,结果如图 2 所示。经比较可知,NR11 与酿酒酵母的同源性为 100%,因此,综合形态观察、BIOLOG 微生物检定系统以及 18S rDNA 基因的分析结果,将该酵母菌鉴定为 1 株酿酒酵母,并命名为酿酒酵母 NR11。

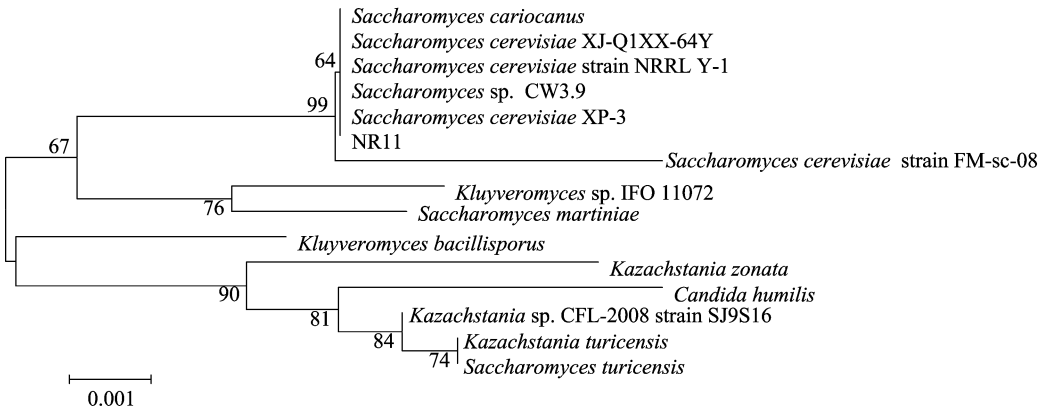


图2 基于菌株 NR11 18S rDNA 基因构建的系统进化树

2.4 酵母菌性能测试

2.4.1 温度对酵母菌生长影响 温度在酵母的生长及发酵过程中起至关重要的作用。在低温范围内,温度越高,酶促反应越快,酵母生长代谢越快,乙醇提前生成,产量也进一步提高;当温度超过最适温度后,高温抑制酵母细胞生长,表现出酵母易衰老、相关酶类易失活、细胞膜稳定性降低等,从而延长发酵周期,并影响发酵乙醇的产量^[10]。从图 3 可见,菌株 NR11 的最适生长温度为 37℃,此时 $D_{600\text{ nm}}$ 最高达到了 19.84;菌株 NR11 在 40℃ 下也有较好的长势, $D_{600\text{ nm}}$ 值最高达到了 17.14;随着温度的升高,温度对酵母生长的抑制作用明显增强, $D_{600\text{ nm}}$ 值逐渐降低,45℃ 条件下,酵母菌几乎没有生长。

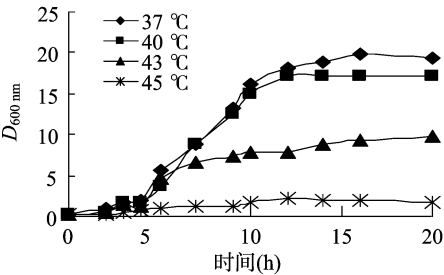


图3 不同温度下酵母菌的生长曲线

2.4.2 初始糖浓度对酵母菌的影响 初始碳源的浓度对发酵也会产生影响,在工业化生产中,糖浓度一般不超过 20%,若培养基中营养物质过于丰富,会导致酵母异常增殖,降低底物转化成产物的效率,对酵母发酵会产生不良影响^[13];另外,高糖浓度所产生的高渗透压也会影响菌体的正常生长、代谢以及发酵活性^[14]。

从图 4 可以看出,当初始糖浓度在 10% ~ 55% 的范围内, $D_{600\text{ nm}}$ 随着糖浓度的提高而提高;当初始糖浓度在 60% 时,就出现抑制作用。目前,从天然环境分离得到的菌株大多只能耐受 20% 左右的糖浓度,说明菌株 NR11 具有较强的耐

渗透压能力,可以耐受 60% 以上的糖浓度所产生的渗透压。

2.4.3 乙醇浓度对酵母菌生长的影响 乙醇发酵是利用酵母将糖类物质转化为乙醇和二氧化碳,随着发酵的进行,乙醇浓度不断增加,高浓度乙醇会抑制酵母生长及存活率,并影响一些运输系统,如葡萄糖和氨基酸的运输等,同时会改变细胞膜的流动性和膜上 H^+ - ATP 酶的活性,从而影响酵母细胞的生长和细胞的形态^[15]。

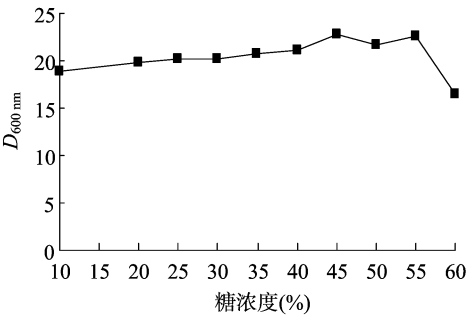


图4 初始糖浓度对酵母菌生长的影响

从图 5 可以看出,初始乙醇体积分数越高, $D_{600\text{ nm}}$ 值越小;当初始乙醇体积分数在 6% 以上时,对酵母开始有抑制作用;当初始乙醇体积分数在 10% 以上时,乙醇对酵母生长的抑制明显增强。这是因为在高温与高乙醇浓度共同作用下,酵母细胞膜通透性增强,流动性降低,各种酶促反应受到抑制,从而对酵母细胞的生长和代谢产生了胁迫作用。

2.4.4 培养基 pH 值对酵母菌生长的影响 酵母细胞的生长和胞内酶促反应都需要在一定的 pH 值环境中进行,pH 值过高或过低都会影响酵母细胞膜所带电荷状态,使酵母生长代谢受阻^[14]。由图 6 可以看出,该菌在初始 pH 值为 3 ~ 6 时, $D_{600\text{ nm}}$ 变化不大,因此该菌的最适初始 pH 值为 6.0,此时 $D_{600\text{ nm}}$ 最高可达到 19.02;初始 pH 值为 2 时仍可以存活生长,

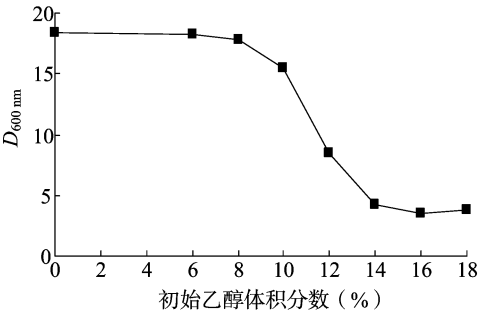


图5 初始乙醇体积分数对酵母菌生长的影响

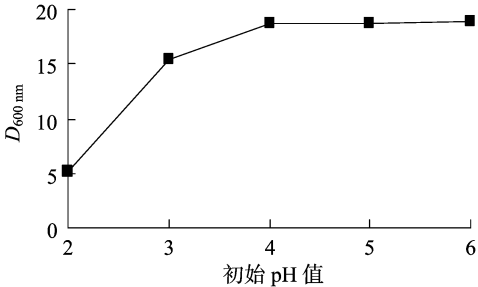


图6 初始 pH 值对酵母菌生长的影响

说明 NR11 有较强的耐酸能力,用于生产时可以有效避免杂菌污染,提高得率和设备利用率。

2.4.5 菌株 NR11 的致死温度 从菌株对短时高温冲击的耐受情况来看,NR11 的致死温度为 60 ℃,结果见表 3。

表 3 NR11 的高温耐受试验结果

温度(℃)	结果
52	+
54	+
56	+
58	+
60	-

注:“+”表示有菌生长;“-”表示无菌生长。

2.5 不同温度下菌株 NR11 的产乙醇能力

分别在 30、38、40、42 ℃ 下,以 20% 的接种量将 NR11 接入发酵培养基中进行厌氧发酵 48 h,试验结果如图 7 所示。由图 7 可以看出,在初始糖浓度 260.0 g/L 条件下发酵 48 h 后,30 ℃ 条件下的乙醇含量达到 109.0 g/L,残糖含量为 4.6 g/L,乙醇得率 83.6%;38 ℃ 条件下,乙醇含量达到 93.2 g/L,残糖含量为 10.4 g/L,乙醇得率 72.9%;40 ℃ 条件下,乙醇含量达到 73.8 g/L,残糖含量为 8.5 g/L,乙醇得率 67.0%;43 ℃ 条件下乙醇含量达到 44.0 g/L,残糖含量为 21.7 g/L,乙醇得率 34.4%。

3 结论

经过初筛和复筛,从采自于江苏省灌南县汤沟酿酒厂的酒曲样品中筛选出 1 株在 42 ℃ 下生长并产乙醇的酵母,命名为 NR11。经过 BIOLOG 和 18S rDNA 鉴定,NR11 为酿酒酵母。进一步研究结果表明,NR11 有较强的耐糖和耐热性,可以在初始糖浓度为 60% 和 42 ℃ 的高温下生长,致死温度也达到 60 ℃,在 30、38、40、42 ℃ 下的乙醇产量分别可以达到 109.0、93.2、73.8、44.0 g/L,在 42 ℃ 的高温下仍旧可以生产

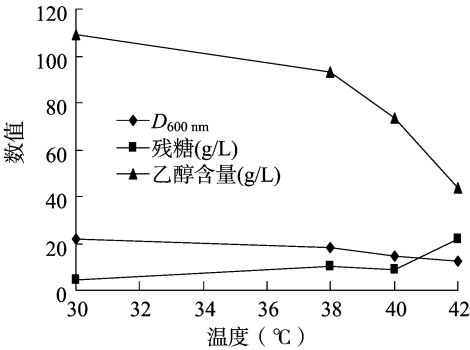


图7 不同温度下乙醇的发酵能力

乙醇,充分显示其在高温下发酵生产乙醇的潜力巨大。

综上所述,从酒曲样品中筛选出的 NR11 生长旺盛,发酵能力强,发酵所得生物量高,耐高温和高糖,在低 pH 值下也可以生长以避免杂菌污染,可见其是一株有工业生产应用价值的酵母菌株,具有广阔的应用前景。

参考文献:

[1] Farrell A E, Plevin R J, Turner B T, et al. Ethanol can contribute to energy and environmental goals [J]. Science, 2006, 311 (5760): 506 - 508.

[2] Service R F. Cellulosic ethanol. Biofuel researchers prepare to reap a new harvest [J]. Science, 2007, 315 (5818): 1488 - 1491.

[3] Blicek L, Toye G, Dumortier F, et al. Isolation and characterization of brewer's yeast variants with improved fermentation performance under high - gravity conditions [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73 (3): 815 - 824.

[4] 赵 群, 王红岩, 刘德勋, 等. 燃料乙醇发展现状及发展潜力 [J]. 广州化工, 2012, 40 (7): 72 - 73, 92.

[5] 吕超雷. 谈薯类酒精生产工艺的创新 [J]. 酿酒, 2010, 37 (1): 82 - 83.

[6] 刘海臣, 张敏楠, 阮时雷, 等. 多样品耐高温产乙醇酵母的筛选及生长特性研究 [J]. 食品科技, 2008, 33 (3): 17 - 21.

[7] 张 宁, 蒋剑春, 李翔宇, 等. 我国非粮燃料乙醇产业发展现状及前景展望 [J]. 生物质化学工程, 2011, 45 (4): 47 - 50.

[8] 张文彬, 蔡 葆, 徐艳丽. 我国生物燃料乙醇产业的发展 [J]. 中国糖料, 2010 (3): 58 - 62, 67.

[9] 刘从艾, 穆文斌, 徐怀玉, 等. 大曲酵母菌及窖泥生香菌耐酸能力的研究 [J]. 酿酒, 1999 (1): 35 - 39.

[10] 徐大鹏, 李云杰, 张 栩, 等. 耐高温酵母菌的筛选及特性 [J]. 生物加工过程, 2011, 9 (3): 17 - 21.

[11] 李金霞, 程 池, 姚 粟, 等. Biolog 微生物自动分析系统——酵母菌鉴定操作规程的研究 [J]. 食品与发酵工业, 2006, 32 (7): 50 - 53.

[12] 张晓娟, 王 柱, 周光燕, 等. 西南菌种站 20 株酵母菌种基于 26S rDNA D₁/D₂ 区序列分析研究 [J]. 四川食品与发酵, 2008, 44 (3): 1 - 4.

[13] 苑 伟, 王学锋, 刘延琳. 优选酿酒酵母菌株发酵性能研究 [J]. 中国酿造, 2010, 29 (9): 48 - 52.

[14] 程殿林. 微生物工程技术原理 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 114 - 124.

[15] 杨东升, 朱丽元, 谢晓红, 等. UV 处理筛选耐高浓度乙醇酿酒酵母菌株 [J]. 中国酿造, 2010, 29 (10): 35 - 38.