

甜高粱秸秆发酵菌种的诱变育种及其固态发酵工艺的研究

刘健^{1,2}, 叶凯³, 陈美珍¹, 陈高云², 高小燕¹, 涂振东³, 刘敏²

(1. 汕头大学理学院生物系, 广东 汕头 515063; 2. 中国人民解放军防化指挥工程学院三系生物防护教研室, 北京 102205; 3. 新疆维吾尔自治区农科院, 新疆 乌鲁木齐 830091)

摘要: 以耐酒精高活性干酵母为原始出发菌株进行⁶⁰Co- γ 辐射诱变处理, 经逐级筛选和300 g甜高粱秸秆固态发酵, 确定H13为最佳诱变菌种; 并对H13菌株的甜高粱秸秆固态发酵工艺进行研究。结果表明, 粉碎后的甜高粱秸秆300 g, 5%的菌体接种量、68%的基质含水量、36℃条件下发酵60 h, 乙醇产率达6.4 g/100 g鲜秸秆。

关键词: 微生物; 甜高粱秸秆; ⁶⁰Co- γ 辐射诱变; 固态发酵

中图分类号: Q93-3; TS261.1; Q81; S261.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2011)06-0028-04

Study on Mutation Breeding of Fermenting Strains for Sweet Sorghum Stalk & Its Solid Fermentation Techniques

LIU Jian^{1,2}, YE Kai³, CHEN Meizhen¹, CHEN Gaoyun², GAO Xiaoyan¹, TU Zhendong³ and LIU Min²

(1. Department of Biology, Shantou University, Shantou, Guangdong 515063; 2. Department of Biological Defense, Institute of PLA Chemical Defense and Commanding Engineering, Beijing 102205; 3. Xinjiang Uigur Municipal Academy of Agricultural Science, wunumuqi, Xinjiang 830091, China)

Abstract: Angel active dry yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) was selected as original strains and mutated by radiation of⁶⁰Co- γ , then H13 strain was obtained through screening and solid fermentation test (fermented with 300 g sweet sorghum stalk). The optimum fermentation conditions of H13 strain were summed up as follows through experiments: 300g grinding sweet sorghum stalk, 5% bacteria inoculation quantity, 68% water content of substrate, 60 h fermentation at 36℃, and ethanol yield could reach 6.4 g/100 g stalk.

Key words: microbe; sweet sorghum stalk; radiation of⁶⁰Co- γ mutation; solid fermentation

随着人类社会的发展,石油、煤炭、天然气等化石能源急剧消耗,造成的环境污染问题日益严重,寻找开发新型、清洁的能源已成为全世界关注的话题。燃料乙醇是一种清洁的可再生能源,用它取代部分汽油,对减轻环境污染、节省石油资源、促进农业产业化发展等具有重要意义,是最有希望替代传统能源的液体燃料。

甜高粱为短日照C4植物,具有很高的光合效率,生长能力特别强,有“高能作物”之称。以甜高粱为原料发展燃料乙醇产业,不仅可以缓解日益加剧的能源问题,还会在社会、经济、生态等方面产生良好的效益。美国、巴西等国都纷纷开展了对甜高粱的培育和种植以及生产燃料乙

醇方面的研究和开发,我国也已加入这一行列^[1-2]。

能否实现利用甜高粱生产燃料乙醇,关键技术因素之一就是菌种的转化率的高低,发酵菌种的优劣将直接关系到燃料乙醇的产率。诸多学者也纷纷利用各种不同手段进行了甜高粱发酵菌种的育种筛选工作^[3-4]。本文以安琪耐高温酒精活性干酵母为原始菌种,采用⁶⁰Co- γ 辐射诱变处理,经逐级筛选以期获得具有优势的发酵菌种,并对其甜高粱秸秆固态发酵工艺进行了探索。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

基金项目:甜高粱秸秆五碳糖发酵菌株引进与基因工程改造(2010-Z46) 现代高粱产业技术体系建设任务书(nycytx-12-03-01-01) 能源甜高粱产量与含糖量协同提高关键技术研究(3-30) 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(200821175)。

收稿日期:2011-03-30

作者简介:刘健,男,在读研究生,研究方向:微生物发酵。

通讯作者:刘敏,女,主要从事生物防护及生物质能源研究。

优先数字出版时间:2011-04-19 地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20110419.1634.002.html?uid=>

1.1.1 菌种

耐高温酒精活性干酵母:安琪酵母股份有限公司生产。

1.1.2 甜高粱秸秆

成熟的甜高粱秸秆收割后,鲜秸秆由粉碎机粉碎至数毫米长度。

1.1.3 培养基

YPD培养基:蛋白胨 20 g,葡萄糖 20 g,酵母膏 10 g,加蒸馏水至 1 L;固体培养基加琼脂 15 g。

TTC 上层培养基:葡萄糖 0.5 g,琼脂 1.5 g,TTC(红四氮唑)0.05 g,加蒸馏水至 100 mL。

TTC 下层培养基:葡萄糖 1 g,蛋白胨 0.2 g,酵母膏 0.15 g,KH₂PO₄ 0.1 g,MgSO₄·7H₂O 0.4 g,琼脂 3 g,加蒸馏水至 100 mL。

1.2 实验方法

1.2.1 诱变菌种的选育

1.2.1.1 菌种的活化

在 2%葡萄糖水溶液中加入 1 g 干酵母,30℃活化 1 h 后,在 YPD 平板上做划线,挑取单菌落于液体 YPD 培养基中,200 r/min、30℃下摇床培养 12~16 h。

1.2.1.2 ⁶⁰Co-γ 辐射诱变处理

取培养 12 h 后的安琪酵母菌液于 1.5 mL 离心管中,进行 ⁶⁰Co-γ 辐射诱变,诱变分为 5 个剂量组,分别是 2 kGy、3 kGy、4 kGy、5 kGy 和 6 kGy。将照射后的菌液按一定比例稀释,涂布于 YPD 平板,未经处理的菌液涂板作为对照,30℃恒温箱中培养,注意观察平板上菌落的生长情况^[5]。

诱变致死率计算公式:

$$\text{致死率} = \frac{\text{对照组菌落数} - \text{诱变组菌落数}}{\text{对照组菌落数}} \times 100\%$$

1.2.1.3 TTC 平板一级筛选

红四氮唑(2,3,5-氯化三苯基四氮唑,TTC)是一种显色指示剂,原本色为无色,由于活菌中所含脱氢酶可将它还原成红色的 TF,使平板上原先几乎看不见的微小菌落染成肉眼清晰可见的红色菌落,且通过其颜色深浅可判断酵母中脱氢酶活力的大小,即酵母产酒精能力的高低,能力越强,显色越深。

采用点接种法是将菌种接种于 TTC 下层培养基上,30℃下培养至形成一定大小的菌斑,将预先配制好的上层培养基冷却至 45℃左右,慢慢倒入下层培养基上,将菌落覆盖,移至暗处于 30℃下显色,3 h 后取出,比较菌落颜色,挑取颜色较深的菌落进行下一级筛选^[4,6]。

1.2.1.4 杜氏小管二级筛选

一级筛选得到的菌种经活化培养后,分别接种于含

有杜氏小管的 YPD 液体培养基试管中,每株 3 个平行,30℃下 200 r/min 摇床培养 12~24 h,观察杜氏小管中的产气情况。

1.2.1.5 液态摇瓶发酵三级筛选

将上级筛选所得菌种,接入 50 mL YPD 液体培养基中,200 r/min 30℃下恒温发酵,每隔 2 h 记录 CO₂ 的失重情况,发酵终止后进行蒸馏,测定乙醇浓度,每组 3 个平行取平均值。

1.2.1.6 甜高粱秸秆固态发酵

将粉碎后的甜高粱秸秆(含水率 74%,含糖量 18.5%,还原糖 5.96%)每份 300 g 装入 1 L 的三角瓶中,每组 3 个平行,将菌液离心所得菌体以 3%的接种量接入到秸秆中,30℃恒温箱中静止发酵,每隔 12 h 翻动 1 次,并记录 CO₂ 的失重情况,发酵结束后取样测定乙醇及糖分含量^[7]。

1.2.2 诱变菌种固态发酵工艺的研究

将粉碎后的甜高粱秸秆(含水率 66%,含糖量 28.1%,还原糖含量 7.74%)每份 300 g 装入 1 L 的三角瓶中,将活化培养后的菌液离心所得菌体接入到秸秆中,30℃恒温箱中静止发酵,每隔 12 h 翻动 1 次,在此基础上分别确定最佳的接种量、发酵温度、含水率和发酵时间条件^[7]。

1.2.3 测定方法

总糖、还原糖测定:取 100 g 秸秆加水 300 mL,浸泡 12 h 后过滤取滤液,苯酚-硫酸法测定总糖含量^[8],DNS 法测定还原糖含量^[9]。

乙醇含量测定:将发酵后的秸秆用 250 mL 蒸馏水洗涤过滤,取 100 mL 滤液蒸馏,当馏分接近 50 mL 时停止蒸馏,所得馏分采用重铬酸钾氧化分光光度法测定^[10]。

秸秆含水率测定:45℃烘干至恒重,根据前后质量差值计算。

CO₂ 失重测定:重量法^[11],当 CO₂ 的失重小于 0.1 g/h 时,视为发酵结束。

2 结果与分析

2.1 最佳诱变菌株的确定

2.1.1 ⁶⁰Co-γ 辐射诱变效果

采用不同的剂量对原始菌株进行辐射诱变后,按一定比例稀释后涂布于平板,观察菌落生长情况并计数,各剂量组对原始菌株的致死率见图 1,最低剂量组 2 kGy 的致死率约为 93%,最大剂量组 6 kGy 的致死率为 99%以上,但仍未达到完全致死率,在 YPD 平板上形成数个菌落。

2.1.2 TTC 平板一级筛选结果

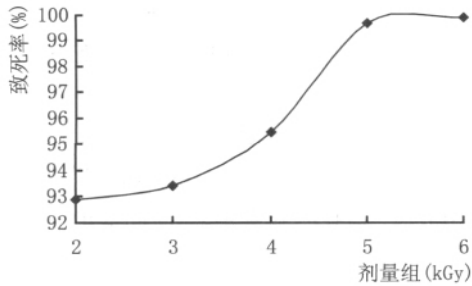


图1 不同剂量组的辐射对原始菌株的致死率

辐射诱变后的菌液均匀涂布在 YPD 平板上培养,挑取菌斑较大的单菌落,与原始菌株一同进行 TTC 平板显色反应,显色结果见图 2,挑取染色较深的菌落共 15 株,依次命名为 H1、H2、H3……H14、H15,接入 YPD 液体培养基中,进行下一步筛选。

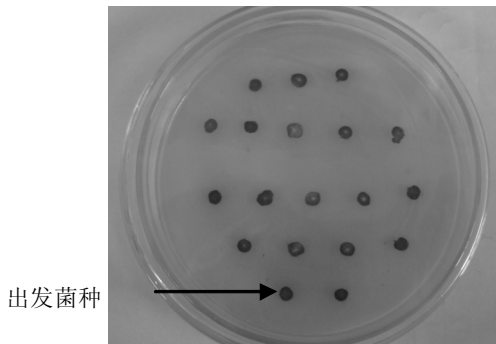


图2 TTC 平板显色结果

2.1.3 杜氏小管二级筛选结果

将上级筛选所得菌株经活化培养后接入含有杜氏小管的 10 mL 液体培养基中,进行杜氏小管产气实验,每个菌株做 3 个重复,原始菌株作为对照,结果见表 1。

表1 杜氏小管产气实验结果

菌种编号	产气情况	菌种编号	产气情况
H1	+++	H9	+++
H2	++++	H10	++++
H3	+++	H11	++
H4	++	H12	+
H5	+++	H13	++
H6	++	H14	+
H7	+	H15	+++
H8	+++	原始菌种	++

注:“++++”表示杜氏小管中充满气体;“+++”表示杜氏小管中充满 3/4 气体;“++”表示杜氏小管中充满 1/2 气体;“+”表示杜氏小管中充满 1/4 气体。

由表 1 可知,H1、H2、H3、H5、H8、H9、H10、H15 与原始菌株相比产气较多,对这 8 个菌株进一步进行筛选,并重新命名为 H11、H12、H13、H14、H15、H16、H17、H18。

2.1.4 液态摇瓶发酵三级筛选结果

将筛选所得 8 个菌株和原始菌株进行 50 mL 液体培养基摇瓶发酵实验。根据 CO₂ 的失重情况,发酵进行

到 12 h 后发酵结束,对发酵液进行蒸馏,测定其乙醇含量,结果见表 2。

表2 液态摇瓶发酵实验结果

菌种编号	乙醇含量(mg/mL)	提高率(%)
H11	5.281	5.48
H12	5.843	16.70
H13	5.970	19.24
H14	5.659	13.04
H15	5.795	15.75
H16	5.255	4.96
H17	5.327	6.40
H18	5.145	2.78
原始菌种	5.006	—

由表 2 可知,H12、H13、H15 提高率都在 15% 以上,其中 H13 较原始菌株的提高率大,达到了 19.24%。因此,经过三级筛选,确定 H12、H13、H15 为 ⁶⁰Co- γ 辐射诱变所得的优势菌株,进入秸秆固态发酵实验。

2.1.5 甜高粱秸秆固态发酵比较结果

经过三级筛选之后,得到 H12、H13、H15 这 3 株诱变优势菌株。通过 300 g 甜高粱秸秆固态发酵实验,确定最佳诱变菌株,结果见表 3。

表3 甜高粱秸秆固态发酵结果

菌种	乙醇得率(g/100 g)	还原糖含量(%)	提高率(%)	乙醇转化率(%)
H12	3.94	0.60	11.3	47.9
H13	4.23	0.55	19.5	51.0
H15	3.90	0.58	10.2	47.3
原始菌种	3.54	0.61	—	43.2

由表 3 可知,H13 的乙醇得率最高,为 4.23 g/100 g 鲜秸秆,乙醇转化率为 51%,与原始菌株 3.54 g/100 g 的乙醇得率相比,提高了 19.5%,确定为最佳诱变菌株。

2.2 菌株 H13 最佳发酵条件的确定

2.2.1 接种量对甜高粱秸秆固态发酵的影响

图 3 为接种量对甜高粱秸秆固态发酵结果的影响。由图 3 可以得出,当接种量为 5% 时,乙醇产率是最高的,100 g 甜高粱秸秆可以生成 5.29 g 乙醇,此时发酵基质中的残糖含量也相对较低,为 0.73%。接种量过低或者过高都会影响乙醇的产率,5% 为最佳接种量。

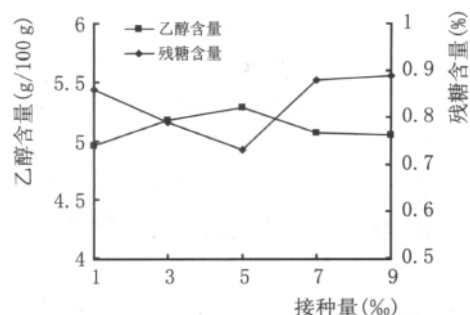


图3 接种量对甜高粱秸秆固态发酵的影响

2.2.2 温度对甜高粱秸秆固态发酵的影响

图4为温度对甜高粱秸秆固态发酵结果的影响。由图4可知,随着温度的升高,乙醇的产量也逐渐增加,当温度达到34℃以上时,乙醇生成的速率放缓,到38℃时乙醇的生成量已无太大变化。这说明菌种H13在较高的温度下具有较强的发酵能力,36℃为最佳发酵温度。

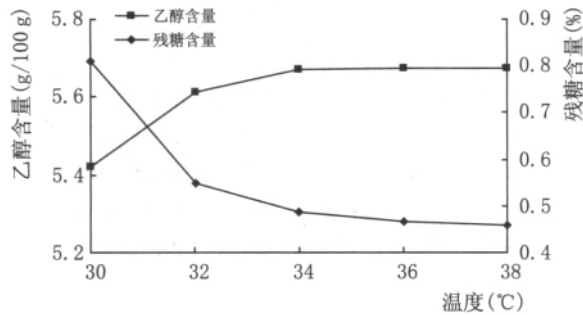


图4 温度对甜高粱秸秆固态发酵的影响

2.2.3 含水量对甜高粱秸秆固态发酵的影响

由于含水量的不同导致发酵基质中糖分含量的不同,因此以乙醇转化率作为衡量含水量对发酵影响的标准。图5为含水量对甜高粱秸秆固态发酵的影响结果。

由图5可以看出,当发酵基质的含水量逐渐升高时,乙醇的转化率逐渐增加,含水量为68%~70%时,乙醇转化率达到58%;当含水量高于70%,乙醇的转化率出现了略微下降,这说明水分含量过高可能会对菌种的发酵产生抑制作用。因此,68%为最佳含水量。

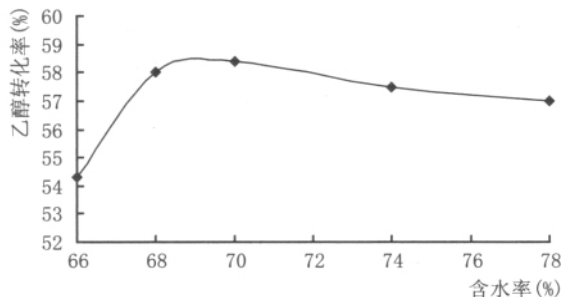


图5 含水量对甜高粱秸秆固态发酵的影响

2.2.4 发酵时间对甜高粱秸秆固态发酵的影响

图6为发酵时间对甜高粱秸秆固态发酵的影响结果。由图6可知,发酵的时间主要集中在24~48h内,乙醇的产量急剧增加,到60h,发酵基本结束,乙醇产量达到最高值,为6.4 g/100 g底物。

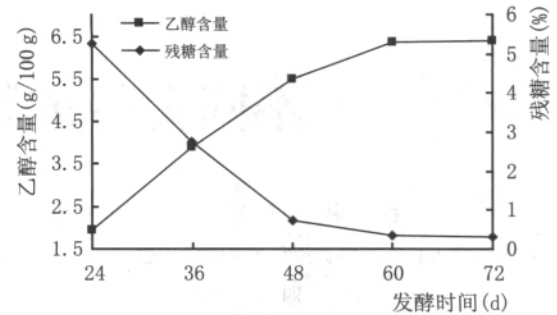


图6 发酵时间对甜高粱秸秆固态发酵的影响

TTC 平板显色、杜氏小管产气及液态摇瓶发酵逐级筛选,得到了3株较原始菌株具有较强发酵能力的诱变菌株;300 g甜高粱秸秆固态发酵试验结果显示,菌株H13的乙醇得率最高,为4.23 g/100 g鲜秸秆,较原始菌株提高了19.5%,乙醇转化率为51%,该株被确定为最佳诱变菌株。

3.2 在确定了最佳诱变菌株H13后,对其甜高粱秸秆固态发酵的最佳条件进行了试验,得出300 g甜高粱秸秆固态发酵的最佳条件为:5‰的接种量、68%的基质含水量、36℃条件下恒温发酵,每12 h翻动1次,60 h后发酵结束。经测定,乙醇产率可达6.4 g/100 g鲜秸秆,发酵后产物的还原糖含量为0.31%。

参考文献:

- [1] 赵立欣,张艳丽,沈丰菊.能源作物甜高粱及其可供应性研究[J].可再生能源,2005(4):37.
- [2] 刘杰,李源有,郑士梅,等.利用甜高粱秸秆加工乙醇存在的问题及建议[J].吉林农业科学,2007,32(2):62-63.
- [3] 董永胜,张德中,王立言,等.固态发酵耐高温酒精酵母的选育及生产应用[J].酿酒,2005,5(32):30-33.
- [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].可再生能源,2006,126(2):32-35.
- [5] 张变英.⁶⁰Co-γ射线对白腐菌和黑曲霉的诱变效应以及木质素降解的研究[D].南宁:广西大学,2003.
- [6] 陈卫平,涂谨,张凤英,等.红四氮唑在酒精酵母选育中的应用效果研究[J].酿酒科技,2003(6):35-37.
- [7] 康利平,刘莉,刘萍,等.甜高粱秸秆固态发酵生产燃料乙醇研究[J].农业工程学报,2008,24(7):181-184.
- [8] 林颖,吴毓敏,吴雯,等.天然产物中的糖含量测定方法正确性的研究[J].天然产物研究与开发,1996,8(3):5-8.
- [9] 栾雨时,包永明.生物工程实验技术手册[M].北京:化学工业出版社,2005:4-6.
- [10] 林仁权,胡文兰,陈国亮.重铬酸钾氧化分光光度法测定酒中乙醇含量[J].浙江预防医学,2006,18(3):78-79.
- [11] 沈飞.甜高粱茎秆汁液发酵制取乙醇的试验研究[D].沈阳:沈阳农业大学,2006.

3 结论

3.1 耐高温酒精活性干酵母是目前已广泛应用于酿酒、制取乙醇的高活性干酵母,具有发酵周期短、出酒率高等特点。以此作为出发菌株,采用⁶⁰Co-γ辐射诱变,再经