

酵母菌种的复壮研究

韩丽丽¹ 赵 秦¹ 涂振东² 叶 凯² 刘 敏¹

(1.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;2.新疆农业科学院,新疆 乌鲁木齐 830091)

摘要: 研究了燃料乙醇发酵菌种 H15 的纯化复壮方法,并比较了复壮前后菌种的发酵能力,结果表明,经纯化复壮后的 G1#、G2# 和 G3# 比复壮前菌种的发酵力分别提高了 17.94%、16.96% 和 16.39%,说明所用纯化复壮方法在酵母 H15 的复壮工作中是有效的。

关键词: 微生物; 酵母菌; 复壮

中图分类号:Q93-3;TS261.1;TS262.2 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2008)12-0035-03

Research on Rejuvenation of Yeast Strains

HAN Li-li¹, ZHAO Qin¹, TU Zhen-dong², YE Kai² and LIU Min¹

(1. Teaching & Research Department of Biological Defense, Institute of Chemical Defense and Commanding Engineering of PLA, Beijing 102205; 2. Xinjiang Uygur Municipality Academy of Agricultural Sciences, Xinjiang 830091, China)

Abstract: The purification and rejuvenation methods of yeast strain H15 for fuel ethanol fermentation were studied. The fermenting power of yeast strains before and after rejuvenation was compared. The results showed that the fermenting power of yeast strains G1#, G2# and G3# after rejuvenation increased by 17.94%, 16.96% and 16.39% respectively, which proved that the purification and rejuvenation methods introduced in this paper were effective.

Key words: microbe; yeast; rejuvenation

随着世界能源的逐渐耗竭,生物质能源越来越受到人们的关注。甜高粱秸秆作为可再生的生物质,可通过酿酒酵母发酵生产燃料乙醇。但是在长期的传代和保藏过程中,由于外界条件或某些因素的变化,使群体表现出衰退现象;或者受培养条件影响(如培养基营养不良、缺乏氧气、接种时间掌握不当等),菌种会发生衰老或者污染杂菌等现象^[1],这些都会造成一些优良性状如发酵力等减弱或消失^[2~3],所以对菌种进行复壮以恢复其性能显得非常重要。

酵母 H15 是通过诱变育种得到的乙醇高产菌株,它能利用甜高粱秸秆所含的大量葡萄糖生产乙醇。但是在长期的实验操作中其乙醇发酵力出现退化现象,通过对酵母 H15 进行纯化复壮,可以使优良性状得到恢复,保证菌种长期稳定。本文以 H15 为实验材料,对酵母菌种的复壮方法进行探讨,以期恢复 H15 的优良性状,并对酵母菌种复壮工作提供实验指导。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

基金项目 新疆维吾尔自治区高新技术研究发展计划甜高粱秸秆转化液体燃料综合技术开发(200615120)。

收稿日期:2008-09-03

作者简介 韩丽丽,女,硕士,主要从事燃料乙醇发酵菌种开发。

通讯作者 刘敏,女,主要从事生物防护及生物质能源研究。

酵母 H15,本实验室诱变的乙醇高产菌株,但出现退化现象。

1.1.2 培养基

5%YPD 培养基:蛋白胨 20 g,葡萄糖 50 g,酵母膏 10 g,蒸馏水定容至 1 L;固体 YPD 再加 20 g 琼脂,115℃ 灭菌 30 min。

麦芽汁培养基:称取麦芽浸取物 5 g,加少许蒸馏水搅动溶解,加水至 100 mL。固体培养基在麦芽汁培养基成分基础上加 2 g 琼脂,于 115℃ 灭菌 30 min。麦芽浸取物(BR)购买于北京双旋微生物培养基制品厂。

PDA 培养基^[4]:称取去皮马铃薯 200 g,切成小块,加 1000 mL 水煮沸 30 min,用双层纱布滤成清液,加水至 1000 mL,加入 20 g 葡萄糖完全溶解,pH 自然。固体培养基在液体 PDA 培养基成分上加 20 g 琼脂;115℃ 灭菌 30 min。

1.1.3 试剂

乙醇标准溶液:优级无水乙醇 0.2 g 于 100 mL 容量瓶中,加水至刻度。乙醇浓度为 2 mg/mL。

5%重铬酸钾溶液:5 g 重铬酸钾(AR)溶于 50 mL

水中,加 10 mL 浓硫酸,放冷,加水至 100 mL。

1.2 实验方法

1.2.1 纯化复壮流程

菌种活化:将酵母 H15 接种在 5% YPD 固体斜面上,30℃ 恒温培养 1 d,重复 2 次。用灭菌牙签挑取适量活化的酵母菌斑接种于 5 mL 液体 YPD 培养基中,于 30℃、200 r/min 摇床震荡培养 12~16 h,此时可达到对数生长期。

初筛:为了确定最适合酵母 H15 生长的培养基,分别取上述活化菌液 100 μ L,置于 5 mL 5% YPD 培养基、麦芽汁培养基、PDA 培养基 3 种不同的液体培养基中,于 30℃、200 r/min 摇床震荡培养 12~16 h,分别稀释为 10 万倍和 100 万倍 2 个浓度梯度,取 50 μ L 稀释液涂布到相应的固体 5% YPD 培养基、麦芽汁培养基和 PDA 培养基平皿中,30℃ 恒温培养 2 d,观察并记录菌落生长情况。

复筛:比较菌落生长情况,确定出最适合酵母 H15 生长的培养基,再从中挑出光滑圆润、色泽乳白、形状规则且较大的菌斑^[5],用牙签挑取少许置于相应的 5 mL 液体培养基中,30℃ 200 r/min 摇培过夜。取 1.5 mL 菌液 3500 r/min 离心 5 min 得菌体,加入 1 mL 相应液体培养基重悬,山梨醇、甘油处理过夜。各取 1 mL 处理后的菌液离心得菌体,分别加入 1 mL 相应液体培养基重悬,稀释 10 万倍后涂布在固体培养基上,30℃ 恒温培养,3 d 后观察记录。

1.2.2 摇瓶发酵验证实验

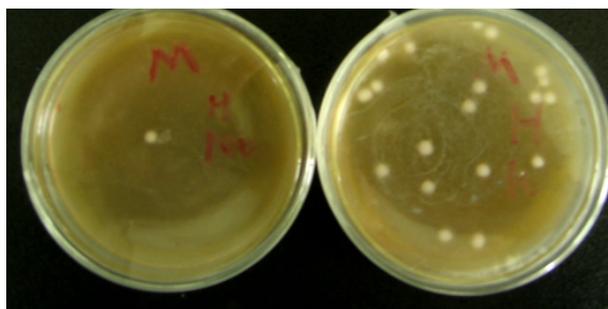
用灭菌牙签挑取复筛中生长较好的菌落,置于 5 mL 5% YPD 液体培养基中,30℃ 200 r/min 摇培过夜制作发酵种子。取 1 mL 左右(保证接菌量一致)种子菌液于 50 mL 5% YPD 液体培养基中,于 30℃ 200 r/min 摇床振荡发酵,同时以复壮前的 H15 为对照,3 d 后蒸馏并检测乙醇浓度。

2 结果与分析

2.1 初筛结果与分析

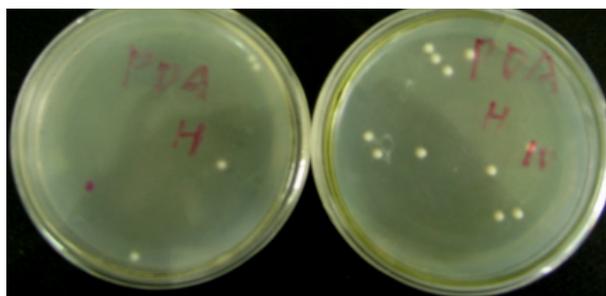
酵母 H15 活化后,取适量摇培至对数生长期的菌液稀释一定倍数后,分别涂布到麦芽汁培养基、PDA 培养基、5 mL 5% YPD 培养基 3 种不同平皿中,30℃ 恒温培养 3 d 后的菌落形态见图 1、图 2 和图 3。

不同菌落其形态不同,同一菌落生长环境不同,形态也不同。由图 1、图 2 和图 3 可以看出,相对麦芽汁培养基和 PDA 培养基,酵母 H15 在 5% YPD 培养基中生长 3 d 的菌斑更加丰满圆润,形状规则,表面光滑湿润,色泽乳白。从中挑出 5 个典型菌落,编号 1#~5#,为后续的甘油、山梨醇处理实验做准备。另外,在后续的菌



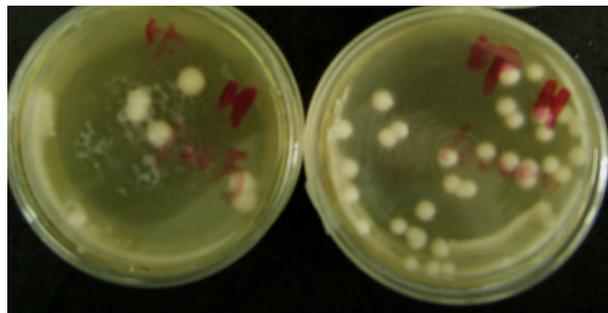
注:左侧平皿中稀释 100 万倍,右侧平皿中稀释 10 万倍。

图 1 麦芽汁培养基中酵母 H15 生长 3 d 的形态



注:左侧平皿中稀释 100 万倍,右侧平皿中稀释 10 万倍。

图 2 PDA 培养基中酵母 H15 生长 3 d 的形态



注:左侧平皿中稀释 100 万倍,右侧平皿中稀释 10 万倍。

图 3 5% YPD 培养基中酵母 H15 的生长 3 d 的形态

种培养工作当中优先使用 5% YPD 培养基。

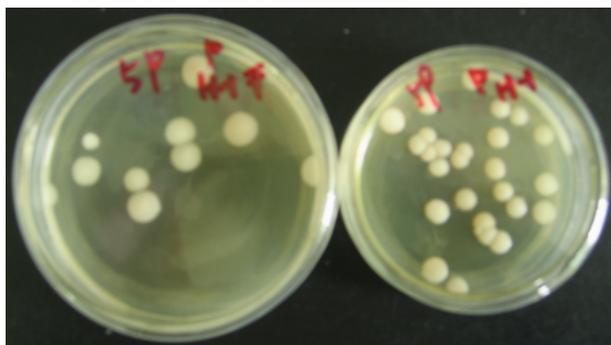
2.2 复筛结果与分析

山梨醇、甘油处理 1#~5# 菌液培养过夜后,稀释并涂布 5% YPD 平皿,生长 3 d 后菌落形态见图 4 和图 5(以 1# 和 2# 为例)。

由图 4 和图 5 可以看出,用甘油处理过的 1# 和 2# 在 5% YPD 培养基平皿中生长 3 d 后的菌落数目比用山梨醇处理过的要少,3#、4# 和 5#(图片略)也是如此,可能是甘油处理过程中对菌体破坏较大,山梨醇处理效果较好,尚需进一步发酵验证。

2.3 摇瓶发酵实验结果与分析

分别将甘油和山梨醇处理过的生长较好菌株进行发酵,各做 3 个发酵样,编号分别为 G1、G2、G3 和 S1、



注:左侧平皿中为甘油处理的,右侧为山梨醇处理的。

图4 甘油或山梨醇处理后酵母 H15 1# 生长 3 d 的形态



注:左侧平皿中为甘油处理的,右侧为山梨醇处理的。

图5 甘油或山梨醇处理后酵母 H15 2# 生长 3 d 的形态

S2、S3,同时以处理前的H15为对照,3 d后蒸馏发酵液,重铬酸钾法检测乙醇含量,结果见表1。

表1 G1、G2、G3和S1、S2、S3与H15
发酵液中乙醇含量

菌株	乙醇含量(mg) n=3	提高率(%)
H15 (CK)	683.56±85.34	—
S1	806.17±41.15	17.94
S2	799.52±26.62	16.96
S3	795.62±49.48	16.39
G1	782.85±66.84	14.53
G2	610.74±102.11	-10.65
G3	744.47±79.02	8.91

由表1可以看出,除G2菌种的乙醇发酵能力较复壮前的H15降低了10.65%外,S1、S2、S3、G1和G3较复壮前的H15都有不同程度的提高,表明本文所用复壮方法是有效的。

用山梨醇处理的S1、S2和S3分别提高了17.94%、16.96%和16.39%,提高幅度较大,这表明山梨醇复壮效果可能比甘油更好。此外,甘油处理的G2菌种的乙醇发酵能力比复壮前降低,这可能是由于个体差异造成,或者是甘油处理过程中,菌种内部有关分子结构受到破坏等原因,也同时表明了不是每次复壮都能得到理想的菌种。

3 讨论

虽然麦芽汁培养基和PDA培养基营养也相当丰富,但是酵母H15在5%YPD培养基中生长最好。在进行微生物菌种的保藏、纯化复壮中证明5%YPD培养基对这种菌种的复壮最适合。

本实验分离筛选出的S1、S2和S3菌株为优良菌株,其发酵产乙醇能力比原始退化菌株分别提高了17.94%、16.96%和16.39%。由此可见,本文中的纯化复壮方法对酵母H15是适用的。

参考文献:

- [1] 董新篁.啤酒酵母菌种复壮的技术措施[J].酿酒科技,1999,(5):32-34.
- [2] 刘蔚,祝红艳,孙莉,等.酵母的纯化及其在啤酒生产中的重要性[J].酿酒科技,2000,(5):38-39.
- [3] 谢建中.啤酒酵母分离纯化选育[J].酿酒科技,2000,(2):28-29.
- [4] 杜连祥,路福平.微生物学实验技术[M].北京:中国轻工业出版社,2006.
- [5] 韩宝隆.谈谈预防酵母菌种的退化[J].酿酒科技,1999,(2):24-25.

茅台啤酒大举进军欧洲市场

本刊讯:“茅台啤酒口感醇正,非常适合欧洲人的口味”经过对茅台啤酒的4次考察后,2008年11月18日,德国康内尔集团董事长陈正康先生一口气签下了40万箱茅台啤酒518和300系列的订单。此前,茅台啤酒成功通过欧盟权威检测机构——欧盟检测总局罗玛尔实验室的严格检测,各项标准均达到欧盟标准,顺利拿到了出口欧盟的“通行证”。至此,茅台啤酒成为得到欧盟通行证的为数不多的中国啤酒之一。

11月18日上午,陈正康先生和德国慕尼黑啤酒协会会长Herbert Brust一起参观了茅台啤酒的整个生产线。陈正康表示,德国是一个啤酒大国,目前,德国传统的啤酒顾客群正逐渐减少,不少顾客转而寻求国外各种口味的啤酒。经过多次考察,他们发现茅台啤酒不仅口感醇正,而且喀斯特地貌的水质使啤酒看起来透彻清亮。此外,茅台啤酒能和德国媲美的先进生产设备及优质的原材料也让他们惊叹。他们对欧洲市场调研的结果表明,茅台啤酒很受欧洲尤其是对啤酒口味挑剔的德国消费者的欢迎。陈正康表示,今后还将加大茅台啤酒进口量。(江砂)