

酸性发酵工业废水中耐酸酵母的筛选研究

李伟安¹,唐圣云^{1,2},王戎²,刘清斌²,董凯锋²

(1.四川理工学院生物工程系,四川 自贡 643000;2.五粮液集团有限公司,四川 宜宾 644000)

摘要: 对不同酸度的发酵工业废水当中的酵母菌进行分离、筛选和鉴定,得到2株耐酸酵母菌株A₁和A₂,并对筛选出的酵母菌进行耐酸性和发酵力的比较研究。结果表明,菌株A₁在pH≤3的条件下,仍能保持较高的发酵代谢能力,综合性能较佳。

关键词: 微生物;耐酸酵母菌;发酵工业废水;筛选;发酵性能

中图分类号:Q93-3;TS261.1;X797

文献标识码:A

文章编号:1001-9286(2011)09-0038-04

Research on the Screening of Acid Tolerant Yeast Strains from Industrial Fermentation Wastewater

LI Weian¹, TANG Shengyun^{1,2}, WANG Rong², LIU Qingbin² and DONG Kaifeng²

(1. College of Bioengineering, Sichuan University of Science and Engineering, Zigong, Sichuan 643000;

2. Wuliangye Group Co.Ltd., Yibin, Sichuan 644000, China)

Abstract: Yeast strains were separated from industrial fermentation wastewater of different acidity, after screening and identification, two acid-proof yeast strains A₁ and A₂ were finally obtained. Then acid tolerance capability and the fermenting power of the two strains were compared and the results showed that strain A₁ could maintain high metabolism capacity in the conditions of pH ≤ 3 and it presented satisfactory comprehensive performance.

Key words: microbe; yeast; acid-resistant yeast; fermentation characteristics

酵母菌是发酵工业中重要的一类微生物,不但广泛应用于面包、酒精等的发酵,近年来还应用于从酵母菌体中提取医药、食品和化工等方面的重要产物,以及石油发酵脱脂棉和糖化饲料的发酵。

酵母菌是单细胞微生物,属真菌类。酵母菌在自然界分布广泛,主要生长在偏酸性、潮湿的含糖环境中,最适生长温度为25~30℃,pH4.5~5.5。酵母菌属于兼性厌氧微生物,在空气充足时,进行好氧呼吸,生长代谢快,繁殖旺盛;在厌氧条件下进行厌氧呼吸,进行乙醇发酵,产生乙醇。在传统白酒生产过程,窖池内的厌氧发酵期一般为数十天至数月不等。酵母菌在发酵过程中,一般在整个发酵过程的前期,对发酵原料的转化利用能力较高,产酒精能力也较强。但随着发酵过程的不断进行,窖池内的pH值会随酸性物质的产生积累呈现不断下降的趋势,特别是窖池的pH≤4.5时,酵母菌的生理代谢活动逐渐受到抑制,对发酵原料的转化利用率降低,产乙醇能力逐渐下降甚至停止^[1]。因此,若能选育出在白酒发酵生产后期的高酸度环境下,仍具有旺盛的生理代谢活动、较强的原

料转化利用及乙醇生产能力的耐酸酵母菌群,将会提高原料的转化利用率和白酒产量,改善白酒生产传统工艺,产生较大的社会效益和经济效益。

在发酵工业生产过程中排出的酸性废水,其中含有大量的有机质可以为微生物生长繁殖提供营养。同时由于微生物本身的自发突变与自然选择,废水中会产生和存在耐酸性酵母菌。因此,利用微生物学、遗传学等的相关原理与技术方法,通过菌种的分离、纯化以及筛选、鉴定等相关试验,以pH值呈梯度差异的培养基为选择条件,从发酵工业酸性废水中,进行了耐酸性酵母菌的筛选与研究。

1 材料与方法

1.1 仪器

显微镜,蒸汽灭菌锅,电热恒温培养箱,酸度计,糖度计,特种净化工作台,恒温振荡器,电热恒温水浴锅。

1.2 材料

不同酸度的发酵工业废水:各酒厂生产废水;麦芽粉:四川射洪制药厂。

收稿日期:2011-05-30;修回日期:2011-06-22

作者简介:李伟安(1986-),男,山东潍坊人,在读硕士研究生,研究方向为微生物代谢调控及白酒发酵。

通讯作者:唐圣云,高级工程师。

1.3 原理与方法

1.3.1 实验原理

发酵工业废水中的酵母菌在不断生长繁殖的过程中会产生一定量的自发突变,一旦耐酸突变发生,由于自然选择的作用,耐酸突变个体会存活于 pH 值较低的酸性废水中;因此,采用酸度形成梯度差异的选择培养基可以从相关实验材料中筛选得到耐酸酵母菌株。

1.3.2 实验方法

1.3.2.1 培养基的制备

①麦芽汁培养基:将麦芽粉与水按 1:4 的比例置于 60 °C 恒温水浴锅糖化 4 h,过滤、稀释到 5~6°Brix,121 °C 灭菌 20 min (液体培养基加入 2% 琼脂即为固体培养基),pH 约为 6.0。

②麦芽汁选择性培养基:在无菌操作条件下,用盐酸调节麦芽汁培养基的酸度,形成酸度梯度分别为 pH1.5、pH2.5、pH3.5 的麦芽汁选择培养基。

③指示剂培养基:先将麦芽汁培养基灭菌,60 °C 时,在无菌操作条件下加入适量的 TTC (0.5% TTC 1 mL 加到 100 mL 琼脂中,使用前先灭菌)溶解,倒平板。

④糖发酵肉汤培养基^[2]:牛肉浸膏 3 g,蛋白胨 1 g,氯化钠 5 g,1.6% 溴甲酚紫 1 mL,将各成分相互混匀(溴甲酚紫除外),加热溶解在 1000 mL 水中,pH 调至 7.2,加入溴甲酚紫,116 °C 灭菌 20 min。

1.3.2.2 酵母菌的分离纯化

1.3.2.2.1 菌种的活化

取 pH 值分别为 pH3.5、pH4.5、pH5.5 未经处理的发酵工业废水各 1 mL,加入到 10 mL 麦芽汁培养基中,28 °C 活化培养。每天转接 1 次,共转接 4 次。

1.3.2.2.2 酵母菌的分离纯化

用麦芽汁琼脂培养基倒平皿,采用稀释涂布平板法和平板划线分离法,对活化后的菌悬液中的酵母菌进行纯化分离。在菌种检查时,先外观检查确定无杂菌斑,接着用显微镜检查,最后是酵母菌产孢培养,通过显微镜观察 4 个孢子的子囊,进一步确定是否纯酵母菌种。将筛选出的性能较好的酵母菌落转到固体培养基上保温培养,并在 4 °C 下冷藏备用。

1.3.2.3 耐酸酵母菌的分离筛选

根据原材料的 pH 区间为 3.5~5.5 及本实验测得的酵母菌的最适 pH 区间为 4~5,将自然选育的酸度梯度定为 pH3.5、pH2.5 及 pH1.5。

将分离得到的酵母菌挑取少许转接至试管固体斜面培养基上培养,得试验种。将每个试验种接到各个酸度梯度的麦芽汁选择培养基上,于 28 °C 恒温培养 2 d,重复 3 次。然后选取高酸度条件下生长较好的菌株。

1.3.2.4 耐酸酵母的反培养鉴定

为了进一步确定选育出的菌株是否具耐酸性,对选出的耐酸性较好的酵母菌种在 pH3.5 条件下培养,进行反培养鉴定。

1.3.2.5 耐酸酵母菌的 TTC 法筛选

将菌株制成菌悬液,采用涂布法分别涂布在指示培养基上,30 °C 恒温培养 48 h。利用产酒精能力强的酵母菌能还原红四氮唑(TTC)变为红色这一特性^[3],筛选出红色最深的菌株。

1.3.2.6 耐酸酵母菌的性能鉴定

1.3.2.6.1 糖类发酵试验

鉴定所需的碳源为葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖,分别制成 20% 的糖溶液,112.6 °C 灭菌 30 min。将上述 4 种糖溶液各取 2 mL,分别加入到含 10 mL 糖发酵肉汤培养基的试管中(内带杜氏小管)。酵母菌经活化后分别接入到上述培养基中,25 °C 条件下培养,每隔 2 d 观察发酵情况,连续观察 2 周,4 周后再观察 1 次。每次观察时注意杜氏小管中产 CO₂ 的量,以及出现的速度,判断发酵情况。以杜氏小管中有气泡计为阳性,无气泡为阴性,重复 3 次^[4]。

1.3.2.6.2 生长曲线的测定

取盛有 100 mL 无菌麦芽汁培养液的 500 mL 锥形瓶 5 个,各瓶中加入振荡培养 20 h 的酵母培养液 30 mL,30 °C 恒温培养。于培养后的 0 h、2 h、4 h、6 h、8 h、10 h、12 h、14 h、16 h、18 h、20 h、22 h、24 h、26 h、28 h、30 h、32 h、34 h 分别用无菌移液管从各瓶中吸取培养液 5 mL,在 560 nm 下测定 OD₅₆₀ 值。

1.3.2.6.3 发酵力的测定^[5]

采用 CO₂ 失重法原理,将酵母菌接种在装有 100 mL 麦芽汁培养基的 500 mL 三角瓶中,置于 30 °C 恒温、200 r/min 的摇床上培养,每天称重 1 次,以 CO₂ 的减少量来反映酵母菌的发酵力。

2 结果与分析

2.1 原料与菌种

2.1.1 供试原料的酸度

对供试原料的酸度进行分析,结果见表 1。

表 1 供试材料的 pH 值

项目	麦芽汁培养基	酸性废水 (B ₁)	酸性废水 (B ₂)	酸性废水 (B ₃)
pH 值	6.0	3.5	4.5	5.5

2.1.2 供试原料中的耐酸酵母菌株

对供试原料中的耐酸酵母菌株(pH≤2.5)的平均种群密度进行分析,结果见表 2。

表2 耐酸酵母菌株的平均种群密度

项目	酸性废水(B ₁)	酸性废水(B ₂)	酸性废水(B ₃)
种群密度(%)	0.47	0.13	0.02

2.2 选育结果

对经自然选育后的菌株进行酸性条件培养,见表3~表5。

表3 pH3.5的酸性废水(B₁)中酵母菌的酸性培养结果

pH值	菌株		
	1	2	3
3.5	+++	+++	+++
2.5	++	++	++
1.5	+	-	+

注:“+”越多表示菌体长得越好,“-”表示几乎没生长,下同。

表4 pH4.5的酸性废水(B₂)中酵母菌的酸性培养结果

pH值	菌株		
	1	2	3
3.5	+++	+++	+++
2.5	+	+	++
1.5	-	+	+

表5 pH5.5的酸性废水(B₃)中酵母菌的酸性培养结果

pH值	菌株		
	1	2	3
3.5	+++	+++	+++
2.5	+	+	+
1.5	-	-	-

表3是pH为3.5的酸性废水中,酵母菌的选育情况,可以看出,在pH3.5时,菌种能正常生长,在pH2.5条件下生长完全不受抑制,pH为1.5条件下生长率也较高,可以选用。表4是pH4.5的酸性废水中酵母菌的选育情况,结果表明,在pH2.5条件下,菌种生长虽受到一定的抑制,但在pH1.5条件下仍能生长,符合要求,可以选用。表5是pH5.5的酸性废水中酵母菌的选育情况,可以看出,在pH3.5条件下,菌种能正常生长,在pH2.5条件下,生长受到抑制,在pH1.5条件下,完全不生长,说明菌种的耐酸性较差,不符合选育要求。

根据实验结果,从pH3.5和pH4.5的酸性废水中筛选出3株耐酸性较好的酵母菌株,分别记为A₁、A₂和A₃。

2.3 反培养鉴定

对选育出的3株耐酸性能较好的酵母菌株在pH2.5条件下进行反培养鉴定,结果见表6。

2.4 TTC显色

对3株菌株进行TTC显色实验,结果见表7。

从表7中可以看出,菌株A₁和A₂的繁殖能力和产

表6 反培养鉴定结果

项目	菌株A ₁	菌株A ₂	菌株A ₃
鉴定结果	耐酸	耐酸	耐酸

表7 TTC显色结果

菌株	次数		
	1	2	3
A ₁	++	+++	+++
A ₂	+++	+++	++
A ₃	-	+	-

注:“+”越多表示TTC平板红色越深,“-”表示几乎没有红色。

酒精能力较一致,在发酵过程中的同步性较好。菌株A₃的生长代谢同步性不一致,故舍弃菌株A₃,保留菌株A₁和A₂。

2.5 耐酸酵母菌株的性能鉴定

2.5.1 糖类发酵实验

分别用葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖作为碳源,对菌株A₁和A₂进行糖类发酵实验,结果见表8。

表8 耐酸酵母菌株A₁和A₂糖类发酵实验结果

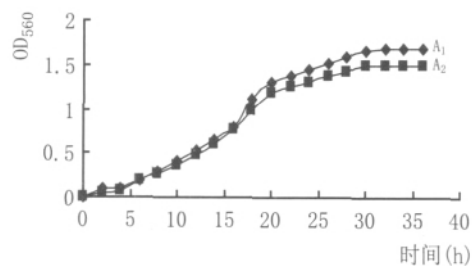
发酵糖类	A ₁	A ₂
葡萄糖	+++	+++
麦芽糖	+++	+
蔗糖	+	++
乳糖	-	-

注:“+”越多表示杜氏小管中的气泡越多,“-”表示没有气泡。

从表8中可以看出,菌株A₁和A₂都能利用葡萄糖、麦芽糖和蔗糖,不能利用乳糖。A₁对葡萄糖和麦芽糖的利用率较高,对蔗糖的利用率较低。A₂对3种糖的利用率大小依次为葡萄糖>蔗糖>麦芽糖。

2.5.2 生长曲线的测定

耐酸酵母菌株A₁和A₂的生长曲线见图1。

图1 耐酸酵母菌株A₁和A₂的生长曲线

从图1中可以看出,菌株A₁和A₂基本上同一时间进入对数期和发酵期,菌株A₁的生长繁殖能力略强于菌株A₂。

2.5.3 发酵力的测定

耐酸酵母菌株A₁和A₂的发酵力测定结果见图2。

从图2中可以看出,在发酵条件相同的情况下,菌株A₁产生的CO₂明显多于菌株A₂,说明菌株A₁能形成生

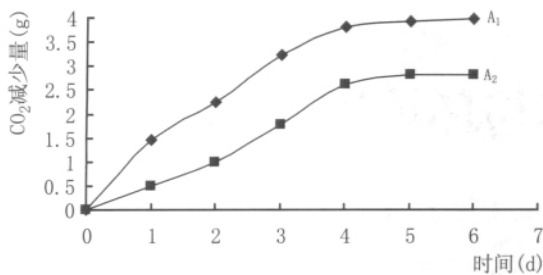


图2 耐酸酵母菌株 A₁ 和 A₂ 的发酵力的比较

长优势,有效抑制杂菌,有较高的原料利用率,其发酵性能明显高于菌株 A₂。

3 结论

从不同 pH 值的发酵工业酸性废水中,通过筛选分离得到 2 株耐酸性酿酒酵母,并对其性能进行了初步研究。通过对糖类发酵实验、生长曲线的测定和发酵力的测

定,发现菌株 A₁ 有较高的发酵速率和发酵能力。综上所述,菌株 A₁ 的综合性能较好。对于菌株 A₂ 可以通过人工诱变育种等生物技术来进一步选育,有希望获得性能更高的耐酸酿酒酵母菌。

参考文献:

- [1] 罗惠波,李光辉.耐酸酵母菌的筛选研究[J].四川理工学院学报,2004(17):151.
- [2] 陈天寿.微生物培养基的制造与应用[M].北京:中国农业出版社,1995:510-511.
- [3] 陈卫平,涂谨,熊建华,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.
- [4] 李文,张伟.耐高温高产酒精酵母的分离鉴定及其应用研究[J].河北农业大学,2007:15.
- [5] 郝林.食品微生物学实验技术[M].北京:中国农业出版社,2001:82.

中国(贵州)国际酒类博览会开幕

本刊讯 2011年8月18日上午10:00,中国(贵州)国际酒类博览会暨2011中国·贵阳投资贸易洽谈会在中国避暑之都——贵州贵阳隆重开幕。

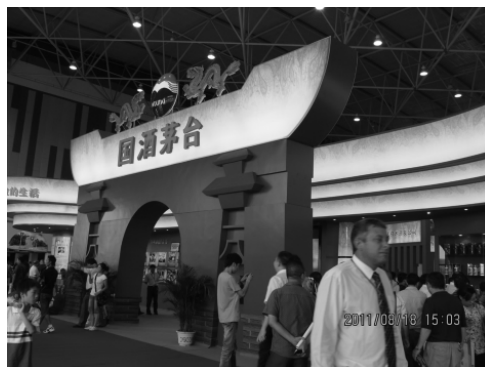
中共中央政治局委员、国务院副总理王岐山宣布开幕,全国人大常委会副委员长司马义·铁力瓦尔地出席了开幕式。贵州省委书记、省人大常委会主任栗战书,商务部党组副书记、副部长姜增伟代表主办方致辞,省委副书记、省长赵克志主持开幕式。

本次酒博会的主题是“展示全球佳酿,承接产业转移,促进开放开发”。贵州省委、省政府希望通过此次活动,进一步深化与国内外酿酒业同行的交流合作,推动贵州省酿酒产业扩大规模、提升档次、拓展市场。同时,进一步扩大对外开放,开展项目推介、招商引资、贸易洽谈,引进一批国内外知名大财团、大企业、大项目,特别是高新技术产业和战略性新兴产业项目及其创新团队、领军人才,参与贵州省工业强省战略和城镇化带动战略的实施,推动贵州省经济社会又好又快、更好更快发展。

这是一场美酒云集的展会。其中1号展馆作为世界知名酒展馆,茅台酒、五粮液、拉菲红酒、拉图红酒、轩尼诗XO、人头马XO、百威啤酒、青岛啤酒等国内外知名酒类品牌集中亮相,充分展示了世界各地丰富多彩、博大精深的酿酒文化,3号展馆作为主题馆,集中展示了新西兰馆、德国馆、东欧馆、西班牙馆、澳大利亚馆、法国馆、南非馆、东南亚馆、南美馆、北美馆和东欧-东欧馆11个外国(地区)馆,1个国际名酒廊和我国12个省(市、自治区)省馆及香港馆、台湾馆,5、7、8号展馆作为综合馆,集中展示贵州十大名酒、老百姓喜爱的贵州白酒,7个不单独设馆的省(市、自治区)组团参展企业及其他国内外酒类商品,综合展示酿造酒(葡萄酒、啤酒、地方性酿造酒、果酒及黄酒)、蒸馏酒、配制酒(以保健酒为主)以及酒类包装、技术、酒类衍生品等。

2011中国·贵阳投资贸易洽谈会特色商品展是本届酒博会系列活动之一,在2、4、6号馆举行,展览面积28000平方米,设综合馆、地区馆、省外馆,境内外参展企业1034家。其中,综合馆设前言、交通基础设施、科技创新、装备制造、能源资源、新材料及化工建材、动漫、特色食品、药品、旅游商品、旅游资源、特色农产品、金融、人居环境、非物质文化遗产、林产品森林旅游、投资环境招商政策软环境及洽谈区等17个展区,全面展示贵州经济社会及特色优势产业发展、特色商品、招商引资政策及投资环境建设等方面的综合情况。地区馆设贵阳市、六盘水市、遵义市、安顺市、黔南州、黔东南州、黔西南州、毕节地区、铜仁地区等9个分馆,共有422家企业参展。全面介绍全省9个州市地经济社会发展状况及“十二五”发展规划,推介特色优势产业,展示矿产、民族文化、旅游等资源,宣传招商引资政策及投资软环境建设情况等。省外馆共分3个区域:外省展区、综合展区、境外展区。通过展览展示展销,推动贵州省企业与国内外客商的合作交流,促进发达地区产业转移。

据悉,本届酒博会共设有8个展馆,总面积7.2万平方米,参展企业1854家,参展人员和采购商1.2万人,拟签订酒类贸易合同1670个,贸易总额439.7亿元。集中签订投资项目148个,总投资1188亿元。可以说,本次酒博会规模宏大,效果令人欣喜。(伊挺金 小小 江砂)



国酒茅台展馆



贵州董酒馆