以大豆糖蜜为原料高产乙醇酵母的筛选鉴定及其发酵特性研究

高玉荣，李大鹏，李青川，李本领
（黑龙江八一农垦大学食品学院，黑龙江大庆 163319）

摘要：从大豆糖蜜中进行高产乙醇酵母的筛选和鉴定，并对其发酵特性进行研究。从大豆糖蜜中通过菌种的富集分离，TTC 平板法初筛，耐乙醇能力及乙醇发酵能力的测定，筛选出一株乙醇产量达 9.07% (*V/V*)的菌株 P14。通过个体形态、菌落特征、生理生化及 26S rDNA D1/D2 区序列分析将菌株 P14 鉴定为酿酒酵母。研究了大豆糖蜜浓度及添加氮源和无机盐对酿酒酵母 P14 发酵生产乙醇的影响及酿酒酵母 P14 对大豆糖蜜中低聚糖的利用，结果表明大豆糖蜜浓度、添加氮源和无机盐对乙醇发酵影响显著，最佳的大豆糖蜜浓度为 40%，添加氮源为 1.2 g/L 的蛋白胨；补加的无机盐为 0.4 g/L $MgSO_4$。在此培养基中发酵 72 h 后，糖蜜中 90.10%的葡萄糖，91.23%的蔗糖，92.56%的棉籽糖和 96.97%的水苏糖被酵母利用。因此大豆糖蜜中筛选出来的酿酒酵母 P14 具有较强的利用大豆糖蜜中的大豆低聚糖发酵产生乙醇的能力。

关键词：大豆糖蜜；乙醇；筛选；鉴定；发酵特性
文章篇号：1673-9078(2014)11-43-47 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.11.009

Screening, Identification, and Fermentation Characteristics of High-yielding Ethanologenic Yeasts and Their Utilization of Soybean Molasses as A Raw Material

GAO Yu-rong, LI Da-peng, LI Qing-chuan, LI Ben-ling
(College of food science, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daing 163319, China)

Abstract: A strain of yeast producing a high ethanol yield was isolated from soybean molasses, and its fermentation characteristics were studied. The strain P14, with an ethanol yield of up to 9.07% (*V/V*), was isolated from soybean molasses by enrichment and isolation of strains, preliminary screening using a 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) assay, and determination of ethanol tolerance and fermentation capacity. Strain P14 was identified as *Saccharomyces cerevisiae* on the basis of morphological characteristics, colony morphology, physiological and biochemical tests, and sequence analysis of the D1/D2 region of 26S rDNA. The effects of the concentration of soybean molasses, and addition of a nitrogen source and mineral salts on ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* P14, as well as the utilization of oligosaccharides in soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* P14 were studied. The results showed that soybean molasses concentration, and addition of a nitrogen source and mineral salts significantly influenced ethanol fermentation. The following conditions were determined to be optimal: 40% soybean molasses concentration, 1.2 g/L of peptone, and 0.4 g/L of added $MgSO_4$. After fermentation for 72 h in this medium, 90.10% of glucose, 91.23% of sucrose, 92.56% of raffinose, and 96.97% of stachyose in molasses had been utilized by the yeast. Therefore, the *Saccharomyces cerevisiae* strain P14 identified from soybean molasses has a relatively strong capacity to produce ethanol by fermentation, using soy oligosaccharides present in soybean molasses.

Key words: soybean molasses; ethanol; screen; identify; fermentation characteristics

大豆糖蜜是以豆粕为原料生产大豆浓缩蛋白过程产生的副产物，每生产1 t的大豆浓缩蛋白可产生大约0.34 t的大豆糖蜜。大豆糖蜜的含糖量可达50%以上，其中含有大量的棉子糖、水苏糖、蔗糖等[1]。因为大豆糖蜜溶液性状粘稠，比较难于处理。目前国内主要将其作为廉价的饲料添加物，而未将其作为独立的产业链进行开发利用，从而造成了资源浪费[2]。由于大豆糖

收稿日期：2014-04-13
基金项目：黑龙江八一农垦大学博士启动基金（B2009-14）；黑龙江省研究生创新基金（YJSCX2011-258HLJ）
作者简介：高玉荣（1970-），女，博士，教授，硕士研究生导师，主要研究方向：微生物与发酵工程

蜜中含有可发酵性糖，国外一些学者将其作为生产丁醇、槐糖脂等生物产品的发酵培养基进行了相关的研究[3~6]。Qureshi等人[3]报道了以*Clostridium beijerinckii* BA101为菌种，利用大豆糖蜜发酵生产丁醇。Siqueira等人[4]研究了以酿酒酵母为菌种，利用大豆糖蜜发酵生产燃料。Solaiman等人[5]报道了以*Candida bombicola* ATCC 22214为菌种，利用大豆糖蜜发酵生产槐糖酯。Tong等人[6]报道了以*Cryptococcus aureus* G7a为菌种，利用大豆糖蜜发酵生产单细胞蛋白。高玉荣等人[7]筛选到一株利用大豆糖蜜高产蛋白的热带假丝酵母CGMCC2.587，研究了以大豆糖蜜为原料发酵生产单细胞蛋白的发酵工艺。

目前世界范围内存在能源紧缺问题，世界各国都根据自己的国情积极研究和开发新能源，把发展生物燃料（主要包括生物乙醇和生物柴油）作为解决能源问题的一条重要途径。用大豆糖蜜作原料生产燃料乙醇，不仅能提高大豆糖蜜的利用价值，而且符合国家的政策战略走向，具有非常广阔的开发和应用前景。

对乙醇生产来说，酵母的发酵能力是非常重要的[8]。大豆糖蜜中含有的大量的棉籽糖和水苏糖，一般酵母难以利用。本文从大豆糖蜜中进行高产乙醇酵母的筛选鉴定，并对其发酵特性进行研究，以期为以大豆糖蜜为原料进行乙醇工业生产奠定基础。

1 实验材料与方法

1.1 材料

1.1.1 大豆糖蜜

大豆糖蜜：黑龙江双河松嫩生物科技有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 大豆糖蜜中高产乙醇酵母菌的筛选

从大豆糖蜜中采样，进行酵母菌的富集及分离，TTC平板法初筛，耐乙醇酵母菌的筛选及乙醇产量的测定[9]。

1.2.2 酵母菌的鉴定

形态特征鉴定：菌种个体形态和菌落特征。

生理生化试验：包括发酵糖类，同化碳源、氮源试验，类淀粉化合物生成试验，无维生素生长、50% (*m/m*)葡萄糖-酵母膏生长测试，放线菌素酮抗性试验，37 ℃生长试验。

分子生物学鉴定：将细胞于50 μL TaKaRa Lysis Buffer for Microorganism to Direct PCR中，变性后离心。在80 ℃，15 min，提取DNA。采用NL1 (5′-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3′) 和NL4 (5′-GGTCCGTGTTTCAAG-3′)[7]进行26S rDNA D1/D2区的目的片段扩增。PCR扩增体系条件为(50 μL)：TaKaRa Lysis Buffer for Microorganism to Direct PCR 1 μL，PCR Premix 25 μL，D1/D2 Forward primer (20 pmol/μL) 0.5 μL D1/D2 Reverse primer (20pmol/μL) 0.5 μL，最后加dH_2O 23 μL。PCR循环为：预变性，94 ℃ 5 min；变性，94 ℃ 0.5 min；退火，55 ℃ 0.5 min，延伸，72 ℃ 1 min，循环30次；72 ℃保温5 min。将PCR产物交大连宝生物工程有限公司纯化和测序。在NCBI的GenBank数据库中搜索已知酵母菌的26S rDNA D1/D2区序列，用Clustal W软件匹配排列，用MEGA5.0软件中的Neighbor-joining分析法构建系统发育树，并进行1000次的Bootstraps检验。

1.2.3 大豆糖蜜浓度、氮源和无机盐对乙醇发酵的影响

在500 mL的三角瓶中添加200 mL可溶性固形物含量分别为20、25、30、35、40和45%的大豆糖蜜，接种酵母菌悬液5%，30 ℃静置发酵72 h后测定乙醇含量。

在可溶性固形物含量40%的大豆糖蜜中分别添加1.2 g/L的氯化铵、蛋白胨和酵母膏，接种酵母菌悬液5%，30 ℃静置发酵72 h后测定乙醇含量。

在可溶性固形物含量40%的大豆糖蜜中分别添加0.4 g/L of $MgSO_4$, 0.6 g/L of Na_2HPO_4, 15 mg/L of $FeSO_4$ and 15 mg/L $ZnSO_4$，接种，30 ℃静置发酵72 h后测定乙醇含量。

1.2.4 菌种对大豆糖蜜中糖的利用分析

在确定的最适大豆糖蜜浓度、氮源和无机盐浓度下，30 ℃静置发酵72 h后测定大豆糖蜜中糖的利用情况。

1.2.5 分析方法

乙醇产量的测定方法：蒸馏法[10]。

乙醇产率的测定方法：(乙醇百分含量×100)÷(初始糖浓度×0.511)[4]。

糖含量的测定方法：高效液相色谱法[11]。

2 结果与分析

2.1 大豆糖蜜中高产乙醇酵母菌的筛选

从大豆糖蜜中采样，经酵母菌的富集及分离，TTC平板法初筛获得具有典型酵母菌菌落特征显色较深的的菌株156株，经耐乙醇酵母菌的筛选获得耐20%乙醇的菌株13株，将这些菌株接种进行乙醇发酵，通过乙醇产量的测定，筛选出一株在大豆糖蜜中乙醇产量

达 9.07% (*V*/*V*)的高产菌株 P14[9]。

2.2 菌种鉴定

2.2.1 形态特征观察

（1）菌种个体形态

由图 1 可以看出，在 10%麦汁液体培养基中 25 ℃培养 1~2 d，经高倍显微镜观察，P14 为卵圆形，大小(2.5~4.5) μm×(3.0~8) μm；一端出芽或两端出芽。

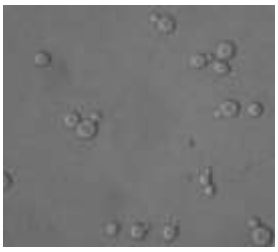


图 1 P14 菌株的个体形态（40×10）

Fig.1 Individual morphology of strain P14

（2）菌落特征

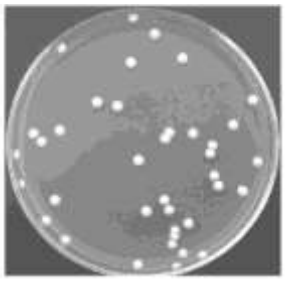


图 2 菌株 P14 菌落特征

Fig.2 Colony characteristics of strain P14

由图 2 可以看出，菌株 P14 菌落质地呈奶酪状，粘稠，乳白色，反光、光滑、无疣状脊状突起、无发毛样突起，平滑，有隆起。

2.2.2 生理生化鉴定

菌株 P14 能发酵葡萄糖、半乳糖、蔗糖与棉子糖，不发酵乳糖。能同化蔗糖、葡萄糖、麦芽糖、半乳糖、棉子糖、甘露糖、海藻糖、山梨糖、纤维二糖、甘油、菊粉、乙醇、D-甘露醇、α-甲基-葡萄糖苷、柠檬酸、水杨苷、琥珀酸，不能同化乳糖、可溶性淀粉、松三糖、蜜二糖、D-核糖、D-木糖、赤藓醇、乳酸、核糖醇、肌醇、L-阿拉伯糖和 D-阿拉伯糖。不能同化硝酸钾和亚硝酸钠。在无维生素培养基上不能生长。能在 37 ℃生长。类淀粉化合物的生成试验为阴性。放线菌素酮抗性试验为阴性。

根据菌株P14的形态、生理生化试验，结合 Barnett JA. 的《酵母菌的特征与鉴定手册》[12]，可将菌株 P14 初步鉴定为酿酒酵母。

2.2.3 分子生物学鉴定

通过使用引物 NL1 和 NL4 对菌株 P14 的 26S rDNA 的基因序列进行扩增，得到大小为 558 bp 的序列片段。将有关已知酵母菌株的 26S rDNA 基因序列下载，与菌株 P14 的基因序列一起构建成了系统发育树。由图 3 可见，P14 则以较高的置信度和酿酒酵母模式菌株 *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1907^T 聚于内群的同一分支上，说明 P14 与酿酒酵母模式菌株 *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1907^T 具有较近的亲缘关系，属于同一物种。因此，结合形态、生理生化特性及分子生物特性，将 P14 菌株鉴定为 *Saccharomyces cerevisiae*，基因序列接受号为 JN686489。

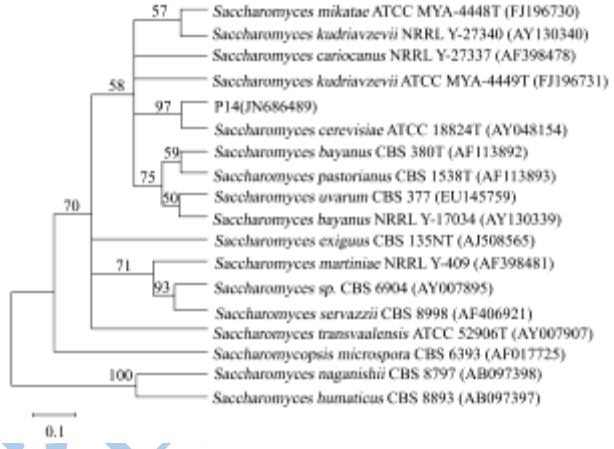


图 3 菌株 P14 的系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of yeast species, including strain P14

2.3 大豆糖蜜浓度、氮源和无机盐对乙醇发酵的影响

2.3.1 大豆糖蜜浓度对乙醇发酵的影响

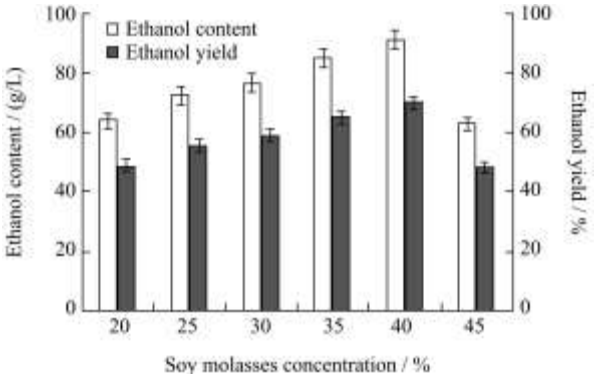


图4 大豆糖蜜浓度对乙醇发酵的影响

Fig.4 Effect of concentration of soy molasses on ethanol content and ethanol yield

由图4可以看出，大豆糖蜜浓度对发酵液中乙醇含量及乙醇产率影响显著，糖蜜浓度在20到40%，随着糖蜜浓度的增加乙醇含量及乙醇产率逐渐增大，当糖蜜浓度大于40%时，乙醇发酵受到抑制，因此，乙醇发酵的适宜糖蜜浓度为40%。

2.3.2 补加氮源对乙醇产量的影响

与空白对照相比，在大豆糖蜜培养基中添加1.2 g/L的氮源（氯化铵，蛋白胨和酵母膏）显著提高了乙醇含量及乙醇产率($P<0.05$)。添加1.2 g/L的蛋白胨，发酵液中的乙醇含量最大为107.8 g/L，乙醇产率达到82.9%.。氮源是酵母生长必须的营养物质，可影响酵母的生长和乙醇的发酵，论文的实验结果表明大豆糖蜜中*Saccharomyces cerevisiae* P14发酵乙醇适宜补加的氮源为蛋白胨。

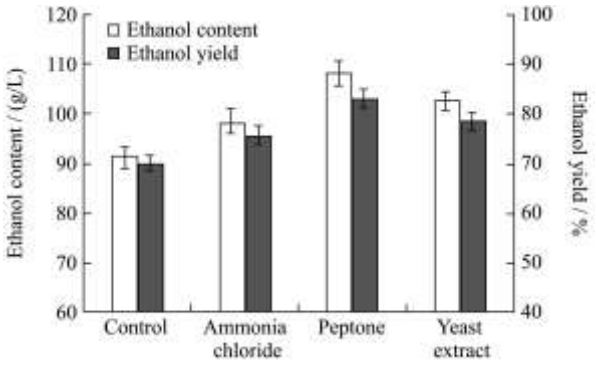


图5 补加氮源对乙醇发酵的影响

Fig.5 Effect of nitrogen supplementation on ethanol content and ethanol yield

2.3.3 补加无机盐对乙醇产量的影响

表1 补加无机盐对乙醇产量的影响

Table 1 Effect of addition of mineral salt on ethanol content and ethanol yield

补加的无机盐		乙醇含量/(g/L)	乙醇产量/%
Control		91.5±2.8	70.4±2.2
$MgSO_4$	0.3 g/L	93.2±2.6	71.7±2.0
	0.4 g/L	112.6±3.9	86.6±3.0
	0.5 g/L	105.8±3.0	81.4±2.3
Na_2HPO_4	0.3 g/L	94.2±2.9	72.5±2.2
	0.6 g/L	106.8±3.5	82.2±2.7
	0.9 g/L	101.3±2.8	77.9±2.2
$FeSO_4$	10 mg/L	98.5±3.4	75.8±2.6
	15 mg/L	100.9±3.6	77.6±2.8
	20 mg/L	92.6±3.1	71.2±2.4
$ZnSO_4$	0.8 mg/L	87.9±3.0	67.6±2.3
	1.2 mg/L	90.2±2.5	69.4±1.9
	1.6 mg/L	88.3±2.6	67.9±2.0

由表1可以看出，当补加0.4 g/L of $MgSO_4$，0.6 g/L of Na_2HPO_4和15 mg/L的$FeSO_4$提高了大豆糖蜜培养基中的乙醇浓度，使乙醇浓度分别提高到112.6、106.8、100.9 g/L。但补加$ZnSO_4$并没有提高乙醇的浓度。因此实验结果表明，*S. cerevisiae* P14发酵大豆糖蜜产乙醇适宜补加的无机盐为0.4 g/L $MgSO_4$，乙醇产率为86.6%。某些无机盐可以作为酶的激活剂，从而影响乙醇的产量。Mojović *et al.*等人[13]也报道了添加无机盐使*S. cerevisiae* var. *ellipsoideus*在固定化体系中使乙醇浓度提高了8.6 %。

2.4 菌种对大豆糖蜜中糖的利用情况

在确定的 500 mL 最佳大豆糖蜜培养基大豆糖蜜浓度 40%，添加 1.2 g/L 蛋白胨，0.4 g/L $MgSO_4$ 中发酵 72 h 后，*S. cerevisiae* P14 对主要糖的利用情况见图4。发酵前，通过液相色谱法测定大豆糖蜜中各种糖的含量为葡萄糖 15.59 g/L，蔗糖 27.71 g/L，棉籽糖 3.49 g/L，水苏糖 14.84 g/L，发酵结束后测定大豆糖蜜中各种糖的含量为葡萄糖 1.54 g/L，蔗糖 2.43 g/L，棉籽糖 0.26g/L 和水苏糖 0.45 g/L。因此，发酵结束后，糖蜜中 90.10%的葡萄糖，91.23%的蔗糖，92.56%的棉籽糖和 96.97%的水苏糖被利用。葡萄糖和果糖通常能被 *S. cerevisiae* 利用转化为乙醇。但水苏糖和棉籽糖中含 α-1, 6 糖苷键，能被 β 半乳糖苷酶水解，但通常 *S. cerevisiae* 不能产生[14]。本文从大豆糖蜜中筛选出的 *S. cerevisiae* P14 具有高效利用的大豆棉籽糖和水苏糖的能力，可用于以大豆糖蜜为原料发酵生产乙醇。

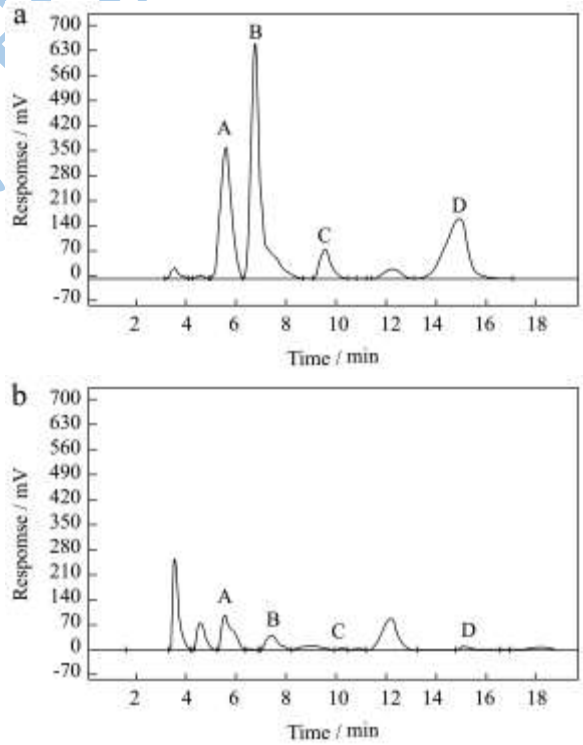


图6 发酵前后大豆糖蜜培养基中主要糖的高效液相色谱分析

Fig.6 HPLC analysis of main sugars present in the soy molasses medium before (a) and after (b) fermentation

注：葡萄糖（A），蔗糖（B），棉籽糖（D），水苏糖（C）。

3 结论

3.1 通过形态特征观察、生理生化试验并结合 26S rDNA D1/D2 区序列分析的方法，将从大豆糖蜜中筛选出乙醇产量达9.07% (*V/V*)的菌株P14鉴定为酿酒酵母。

3.2 大豆糖蜜浓度、氮源和无机盐对乙醇发酵的影响显著，最佳的大豆糖蜜浓度为40%，添加氮源为1.2 g/L的蛋白胨；补加的无机盐为0.4 g/L $MgSO_4$。

3.3 *S. cerevisiae* P14 在最佳大豆糖蜜培养基大豆糖蜜浓度40%，添加1.2 g/L蛋白胨，0.4 g/L $MgSO_4$中发酵 72 h后，糖蜜中90.10%的葡萄糖，91.23%的蔗糖，92.56%的棉籽糖和96.97%的水苏糖被利用。

参考文献

[1] 方伟辉,华欲飞,张喆,等.大豆粕酒精可溶物的成分分离与鉴定[J].中国油脂,2004,29(1):57-61
FANG Wei-hua, HUA Yu-fei, ZHANG Zhe, et al. Fractionation and identification in alcohol solubles of soybean meal [J]. China Oils and Fats, 2004, 29(1): 57-61

[2] 蒋丽华,华欲飞.大豆糖蜜综合利用[J].粮食与油脂,2006,8: 12-14
JIANG Li-hua, HUA Yu-fei. The utilization of soy molasses [J]. Cereals & Oils, 2006, 8: 12-14

[3] QURESHI N, Lolas A, Blaschek H P. Soy molasses as fermentation substrate for production of butanol using Clostridium beijerinckii BA101 [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2001, 26(5): 290-295

[4] Siqueira P F, Karp S G, Carvalho J C, et al. Production of bio-ethanol from soybean molasses by Saccharomyces cerevisiae at laboratory, pilot and industrial scales [J]. Bioresoure Technology, 2008, 99: 8156-8163

[5] Solaiman D K, Ashby R D, Zerkowski J A, et al. Simplified soy molasses-based medium for reduced-cost production of sophorolipids by Candida bombicola [J]. Biotechnology Letters, 2007, 29(9): 1341-1347

[6] Tong Z, Zhenming C, Jun S A. highly thermosensitive and permeable mutant of the marine yeast Cryptococcus aureus G7a potentially useful for single-cell protein production and its nutritive components [J]. Marine Biotechnol gy, 2009, 11: 280-286

[7] Yurong Gao, Dapeng Li, Yang Liu. Production of single cell protein from soy molasses using Candida tropicalis [J]. Annals Microbiology, 2012, 62: 1165-1172

[8] 杨登峰,关妮,米慧芝,等.乙醇生产酵母菌的选育[J].现代食品科技,2008,24(6):506-508
YANG Deng-feng, GUAN Ni, MI Hui-zhi. Breeding of a high ethanol-producing yeast strain [J]. Modern Food Science and Technology, 2008, 24(6): 506-508

[9] 李青川,高玉荣.大豆糖蜜中高产乙醇菌株的筛选及其生长特性研究[J].黑龙江八一农垦大学学报,2012,24(2): 61-64
LI Qing-chuan, GAO Yu-rong. Research on screening and growth characteristics of high-alchol-yield yeast in soybean molasses [J]. Journal of Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2012, 24(2): 61-64

[10] GB/T 15038-2006,葡萄酒、果酒通用分析方法[S]
GB/T 15038-2006, Universal analyzing method of wine and friut-wine [S]

[11] 林艳,单连菊.高效液相色谱法测定啤酒、发酵液和麦汁中的糖类和乙醇[J].山东化工,1998,5:60-62
LIN Yan, SHAN Lian-ju. Measuring the sugar and ethanol in beer, fermented liquid and mort by high efficiency liquid chromatography method [J]. Shandong Chemical Industry, 1998, 5: 60-62

[12] Barnett JA.胡瑞卿译.酵母菌的特征与鉴定手册[M].青岛:青岛海洋大学出版社,1991
Barnett JA. HU Rui-qing translate. Handbook of the characteristics and identification of yeasts [M]. Tsingtao: Ocean University of Tsingtao Publisher, 1991

[13] Mojović L, Rakin M, Vukašinović M, et al. Production of bioethanol by simultaneous saccharification and fermentation of corn meal by immobilized yeast [J]. Chemical Engineer Transactions, 2010, 21: 1333-1338

[14] Zech M, Görisch H. Invertase from Saccharomyces cerevisiae: reversible inactivation by components of industrial molasses media [J]. Enzyme Microbiology Technology, 1995, 17: 41-46