

# 利用木糖高产乙醇酵母菌的 ARTP 诱变选育

张立钊<sup>1,2,3</sup>, 张娟<sup>1</sup>, 蒋轩<sup>1</sup>, 陈力力<sup>2,3\*</sup>, 卢昌丽<sup>2</sup>

(1. 广东产品质量监督检验研究院, 广东广州 510670) (2. 湖南农业大学食品科技学院, 湖南长沙 410128)

(3. 食品科技和生物技术湖南省重点实验室, 湖南长沙 410128)

**摘要:** 为了提高酵母菌利用木糖发酵产乙醇的能力, 将分离得到的野生菌株异常威克汉姆酵母 A42 通过常温常压等离子体 (ARTP) 技术进行诱变处理, 从中选育具有优良性能的高产乙醇突变菌株。结果表明: 诱变处理时间 120 s 为最佳诱变条件, 在该条件下对 A42 进行诱变, 此时致死率达到 97.53%。对该条件下 ARTP 诱变后的菌株进行两轮的筛选得到突变菌株 A42-338, 发酵 60 h 乙醇含量为 20.78 g/L, 其乙醇产量较出发菌株提高了 42.59%, 且传代 8 次各代乙醇产量变化率不超过 2.50%。将异常威克汉姆酵母 A42-338 在油茶籽壳发酵培养基中发酵 60 h 乙醇含量为 19.88 g/L, 还原糖残糖含量为 9.06 g/L, 其中木糖残糖含量为 1.79 g/L, 葡萄糖残糖含量为 7.27 g/L, 木糖利用率为 84.61%, 葡萄糖利用率为 81.05%, 糖转化率为 0.40 g 乙醇/g 糖。因此, ARTP 诱变是一种高效可行的酵母菌育种方法。

**关键词:** 常温常压等离子体诱变; 异常威克汉姆酵母; 木糖; 乙醇; 油茶籽

文章编号: 1673-9078(2021)11-159-166

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.11.0268

## ARTP Mutation Breeding of Ethanol Producing Yeast Using Xylose

ZHANG Lizhao<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Juan<sup>1</sup>, JIANG Xuan<sup>1</sup>, CHEN Lili<sup>2,3\*</sup>, LU Changli<sup>2</sup>

(1. Guangdong Testing Institute of Product Quality Supervision, Guangzhou 510670, China)

(2. College of Food Science and Technology Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

(3. Hunan Provincial Key Laboratory of Food Science and Biotechnology, Changsha 410128, China)

**Abstract:** In order to improve the ability of saccharomycete to produce ethanol by xylose fermentation, the wild strain of *Wickerhamomyces anomalus* A42 was mutated by normal temperature and atmospheric pressure plasma technology (ARTP), and a high ethanol producing mutant strain with excellent performance was selected. The results showed that the best mutation condition was 120 s, under this condition, the lethal rate of A42 was 97.53%. The results showed that the ethanol yield of A42-338 was 42.59% higher than that of the original strain, and the ethanol content was 20.78 g/L after 60 h of fermentation, and the change rate of ethanol production of each generation was not larger than 2.50% after 8 passages. The results showed that the content of ethanol and reducing sugar of A42-338 were 19.88 g/L, 9.06 g/L, 1.79 g/L, 7.27 g/L, 84.61%, 81.05% and 0.40 g ethanol/g sugar respectively. Therefore, ARTP mutation is an efficient and feasible method for yeast breeding.

**Key word:** atmospheric and room temperature plasma; *Wickerhamomyces anomalus*; xylose; ethanol; *Camellia oleifera* seed

引文格式:

张立钊, 张娟, 蒋轩, 等. 利用木糖高产乙醇酵母菌的 ARTP 诱变选育[J]. 现代食品科技, 2021, 37(11): 159-166, +95

ZHANG Lizhao, ZHANG Juan, JIANG Xuan, et al. ARTP mutation breeding of ethanol producing yeast using xylose [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(11): 159-166, +95

木糖作为木聚糖的一个组分(木聚糖中 85%~96% 是木糖), 在自然界以多糖的形态广泛存在于植物纤维中<sup>[1-3]</sup>。对植物纤维进行预处理制得木糖提取液, 再通

收稿日期: 2021-03-13

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 项目 (2013AA102107)

作者简介: 张立钊 (1994-), 硕士, 研究方向: 食品生物技术, E-mail:

zhanglizhaozlz@qq.com

通讯作者: 陈力力 (1962-), 博士, 教授, 研究方向: 食品生物技术, E-mail:

chenlili001281@sina.com

过微生物发酵可制得可再生清洁燃料—乙醇<sup>[4-8]</sup>, 对于缓解当今世界面临的能源、环境问题具有十分重要的现实意义。酵母菌是糖类发酵产乙醇的重要菌种之一, 目前, 利用己糖转化为乙醇的工艺已经成熟, 而能利用木糖作为碳源生长繁殖的酵母大多不能发酵木糖生产乙醇或者乙醇产率也较低, 目前报道已知的酵母菌种中发酵木糖生产乙醇的产量最高仅 10.4 g/L, 因此选育能利用木糖并能高产乙醇的酵母菌是决定植物纤维资源生产乙醇的关键因素之一<sup>[9-13]</sup>, 有待进一步研

究。

常压室温等离子体 (atmospheric and room temperature plasma, ARTP) 诱变育种是在室温常压条件下, 用高纯氦气 (He) 产生的大量等离子体流, 作用于微生物细胞, 使其细胞膜的结构及通透性改变, 并引起遗传物质 DNA 损伤而产生大量突变株, 从中筛选获得目标菌株的菌种选育方法。该方法与传统诱变方法相比, 能够有效造成 DNA 多样性的损伤, 突变率高, 并易获得遗传稳定性良好的突变株; 与分子操作手段相比, 具有操作简便、成本低、无有毒有害物质参与诱变过程等优点。目前, 此育种方法已广泛应用于细菌、放线菌、真菌、酵母等各种微生物的育种工作中<sup>[14-19]</sup>。

本研究将从植物原料中自然分离鉴定得到的一株能利用木糖发酵生产乙醇的异常威克汉姆酵母采用 ARTP 诱变育种技术, 以乙醇产量为考察指标, 从中选育具有优良性能的高产乙醇突变菌株。并以油茶籽壳木糖提取液为主要原料进行乙醇发酵, 以此评价选育菌株的应用效果。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

本试验所用水果均购至湖南农业大学东之源超市滨湖店, 苹果为嘎啦 75# 苹果, 从中分离出来的酵母菌菌株分别编号首字母为 A。

### 1.2 试剂与培养基

木糖、红四氮唑 (RT) 等上海瑞永生物科技有限公司; Plant Genomic DNA Kit 试剂盒、凝胶回收试剂盒北京康为世纪生物科技有限公司; 油茶籽壳木糖提取液由实验室自制<sup>[20]</sup>。

木糖富集培养基: 木糖 300 g/L、氯化钠 2 g/L; 木糖筛选培养基: 木糖 20 g/L、蛋白胨 20 g/L、酵母粉 10 g/L、琼脂 20 g/L; 种子液培养基: 木糖 20 g/L、蛋白胨 20 g/L、酵母粉 10 g/L; 混合糖发酵培养基: 木糖+葡萄糖 50 g/L、硫酸铵 10 g/L、酵母粉 2 g/L、硫酸二氢钾 2 g/L、硫酸镁 1 g/L, pH 自然; TTC 下层培养基: 木糖 10 g/L、酵母粉 1.5 g/L、蛋白胨 2 g/L、硫酸镁 0.4 g/L、磷酸二氢钾 1 g/L、琼脂 30 g/L、pH 5.5~5.7; TTC 上层培养基: 红四氮唑 (RT) 0.5 g/L、木糖 0.5 g/L、琼脂 1.5 g/L; 油茶籽壳发酵培养基: 油茶籽壳木糖提取液、葡萄糖 35.05 g/L、硫酸铵 10 g/L、酵母粉 2 g/L、硫酸二氢钾 2 g/L、硫酸镁 1 g/L, pH 自然。所有培养基均经 121 °C 高压蒸汽灭菌 30 min,

备用。

### 1.3 仪器与设备

752 型紫外可见分光光度计, 上海光谱仪器有限公司; 7890B 气相色谱仪, Merck Millipore; DB-5MS 色谱柱 (30 m×250 μm×0.25 μm), Agilent; ZWY-240 恒温培养振荡器, 上海智城分析仪器制造有限公司; SPX-250BIIS 生化培养箱, 天津市泰斯特仪器有限公司; ARTP-II S 诱变育种仪, 无锡源清天木生物技术有限公司。

### 1.4 试验方法

#### 1.4.1 分离与筛选

分别称取剪碎的 (约 1 cm×1 cm) 苹果果皮制备样品悬液, 接种到木糖富集培养基中, 28 °C, 180 r/min 振荡培养 7 d, 随后将培养液涂布木糖筛选培养基上 28 °C 恒温培养 3~5 d, 挑取酵母菌状单菌落制备种子液, 接种混合糖发酵培养基, 于 28 °C, 100 r/min 振荡发酵培养 60 h, 采用气相色谱法<sup>[21]</sup>测定各菌株发酵液乙醇含量, 筛选出产乙醇菌株。

#### 1.4.2 菌株鉴定

YPD 培养基接种培养观察筛选菌株的菌落形态, 美兰染色光学显微镜观察菌体形态特征, 对其进行初步分类; 提取菌株基因组 DNA, 以引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')<sup>[22]</sup>进行 PCR 扩增。利用 Sanger 测序法, 根据 PCR 产物大小判断单向或双向测序。通过 GenBank 网站的 BLAST 程序与数据库中已有的酵母菌 ITS 序列进行同源性比较分析并构建系统发育树。

#### 1.4.3 ARTP 诱变处理

将上述分离菌株在 28 °C, 160 r/min 条件下恒温振荡培养 20 h, 取培养液 5 mL 4000 r/min 离心 3 min, 用无菌生理盐水洗涤菌泥 (离心沉淀物) 3 次, 重悬菌泥于含 5% 甘油的无菌生理盐水中, 制备菌悬液。以诱变处理时间 (30、60、90、120、150 s,) 为自变量, 进行诱变处理, 诱变处理基本条件为取菌悬液 (10<sup>8</sup> 个/mL) 10 μL 分别均匀涂于载片, 将载片放到 ARTP 诱变育种仪对应孔位, 在载片距等离子体放射源 2 mm、处理功率为 120 W、诱变仪的工作气体为氦气, 其气流量 10 SLM, 产生的等离子体温度在 25~35 °C 条件下, 诱变处理适当时间。诱变处理后, 将附着在载片上的菌体洗脱制备诱变样品悬液, 采用稀释平板计数法于木糖筛选培养基培养后计算致死率, 制作致死率曲线。挑取致死率 80% 以上的培养平板中的菌落

作为突变菌株，备用。

$$\text{致死率}/\% = \frac{\text{未经诱变处理菌落数} - \text{经诱变处理菌落数}}{\text{未经诱变菌落数}} \times 100\%$$

### 1.4.4 突变菌株的筛选

将上述突变菌株涂布接种于木糖筛选培养基平板，28℃恒温培养48h后，挑取单菌落分别接种至加有杜式小管的混合糖发酵培养基试管中（同时接出发菌株作为对照），28℃恒温培养48h，观察杜氏小管中的产气情况，选取产气较多的正突变菌株及出发菌株分别点种到TTC下层培养基上，28℃恒温培养，待长出单菌落后在其上面倒入TTC上层培养基，阴暗处28℃恒温培养2h，观察平板内各个菌落的颜色，计算突变菌株的正突变率；筛选出颜色较红的菌落采用1.3.1的方法发酵培养，取样分析各菌株乙醇产生情况，筛选出乙醇产量较高的优良突变菌株，并进行遗传稳定性试验。

### 1.4.5 利用油茶籽壳木糖发酵生产乙醇试验

参考1.4.1的发酵条件，将高产乙醇突变菌株在油茶籽壳发酵培养基中发酵60h，采用气相色谱法测定乙醇含量，分析菌株乙醇产生情况，并参考文献<sup>[23]</sup>方法测定发酵液中葡萄糖、木糖的残糖含量，计算糖利用率及糖转化率。

### 1.4.6 数据处理

采用Origin 2018绘图，IBM SPSS Statistics 25数据分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 酵母菌分离与筛选结果

表1 酵母菌株发酵的乙醇产量

Table 1 Ethanol production by yeast strains

菌株编号	乙醇含量/(g/L)
A25	8.66±0.34
A42	11.93±0.48
A64	8.06±0.37
A70	8.35±0.58
A95	11.04±0.64

从样品中共分离得到126株能利用木糖作为唯一碳源生长的疑似酵母菌株，编号为A1-A126，采用混合糖发酵培养基进行乙醇发酵，筛选出菌株A25、A42、A64、A70、A95，其乙醇产量相对较高，乙醇含量范围在8.06~11.93g/L，具体数据见表1。

### 2.2 菌株鉴定结果

#### 2.2.1 形态特征鉴定结果

菌落形态结果如图1所示，A25菌落为白色略带红色，不透明；菌落形态为圆形，表面干燥，粗糙，有部分不规则的凸起。A42、A64、A70、A95菌落为淡红色，不透明；菌落形态为圆形，边缘整齐，表面较干燥，较粗糙。

从上述5个菌落挑取少量菌体涂片镜检结果如图2所示。A25菌株呈柠檬状近椭圆。A42、A64、A70以及A95菌株呈卵圆形，均单个菌体分散排列。形态特征结果可初步鉴定分离得到的5个利用木糖产乙醇的菌株均为酵母菌。

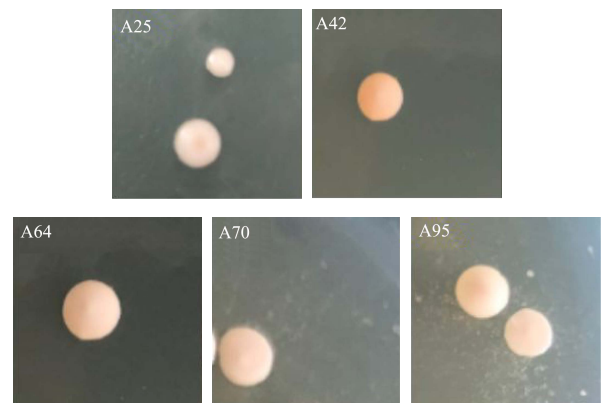


图1 酵母菌菌落形态

Fig.1 Colony morphology of yeast

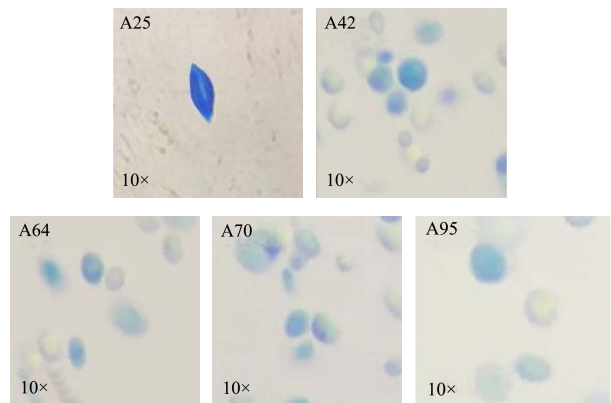


图2 酵母菌菌体形态

Fig.2 Yeast cell morphology

#### 2.2.2 分子生物学鉴定结果

PCR扩增产物电泳图谱如图3所示，各菌株PCR扩增产物的琼脂糖凝胶电泳条带均在长度介于500~750bp之间，都有较大且明亮的扩增产物条带，条带均单一且清晰，无弥散及拖尾现象，没有非特异性扩增现象出现，表明PCR扩增结果符合后续试验要求。测序获得的ITS基因序列与GenBank中收录的基因序列进行同源性比较，并将典型菌株的ITS序列提交GenBank，用MEGA 6.0软件构建系统发育树如图4、图5。

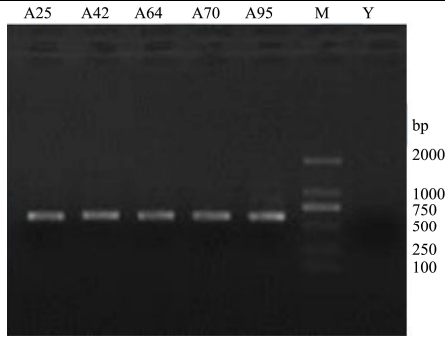


图3 PCR 扩增产物电泳图谱

Fig.3 Electrophoretogram of PCR products

注: M: DNAMarker, Y: 阴性对照。

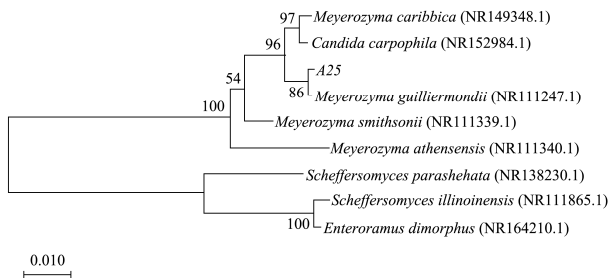


图4 A25 酵母菌的 5.8S rDNA-ITS 基因序列系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree of 5.8S rDNA its gene sequence of yeast

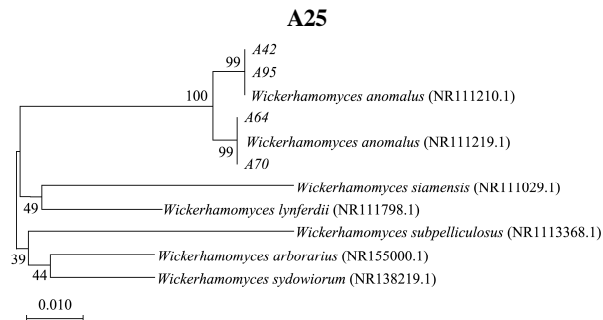


图5 A42、A64、A70、A95 酵母菌的 5.8S rDNA-ITS 基因序列系统发育树

Fig.5 Phylogenetic tree of 5.8S rDNA its gene sequence of yeast A42, A64, A70 and A95

根据菌株的形态特征, 结合 ITS 基因序列进行菌株鉴定, 这 5 株真菌分别属于毕赤酵母属 (*Pichia Hansen*) (1/5) 的季也蒙毕赤酵母 (*Meyerozyma guilliermondii*, A25); 汉逊酵母属 (*Hansenula H.et P.Sydow*) (4/5) 的异常威克汉姆酵母 (*Wickerhamomyces anomalous*, A42)、异常威克汉姆酵母 (*Wickerhamomyces anomalous*, A64)、异常威克汉姆酵母 (*Wickerhamomyces anomalous*, A70) 和异常威克汉姆酵母 (*Wickerhamomyces anomalous*, A95)。

研究表明汉逊酵母属 (*Hansenula H.et P.Sydow*) 中的异常威克汉姆酵母 (*Wickerhamomyces anomalous*) 在传统发酵食品中有过相关报道。刘建利<sup>[24]</sup>将从各省收集的 18 个面引子样品基于宏基因组采用 PCR 扩增

ITS1 区, Illumina Miseq 测序, 云平台分析样品中酵母菌群落, 结果表明样品中共有 12 个属、16 种酵母菌, 其中上述菌属为优势菌属。窦晓等<sup>[25]</sup>对不同时期大曲中分离的酵母菌采用 26S rRNA D1/D2 区序列进行分析比对, 共分离鉴定了 260 株酵母菌, 分属于 22 个种, 其中异常威克汉姆酵母 101 株, 为主要的优势菌种。上述报道证明该菌株在食品应用中的可行性。另外, 该属的酵母菌也有利用木糖发酵的能力, 陈启顺<sup>[26]</sup>对四川八个地区家白酒厂的酒醅进行代谢木糖真核微生物分离纯化, 经分子生物学鉴定 104 株真核微生物中有 4 株汉逊酵母属 (*Hansenula H.et P.Sydow*), 但该属的酵母菌是否能利用木糖发酵产乙醇, 并未见到相关报道。

异常威克汉姆酵母发酵时还能产生多种挥发性香气物质, 叶萌祺等<sup>[27]</sup>通过产酯试验对从果库空气样品和 3 个品种苹果样品中分离纯化得到 6 株产香性能较好的酵母菌。通过苹果酒发酵试验发现其中一株异常威克汉姆酵母 (*Wickerhamomyces anomalous*) YN6 的产酯能力最强。GC-MS 测定结果表明, 接种 YN6 后能产生丙酸乙酯、乙酸丙酯、乙酸-2-甲基丙基酯、乙酸异丁酯、乙酸丁酯和壬醛等特有物质。上述菌种的报道均通过己糖发酵, 而本文得到的该菌株具有利用木糖发酵产乙醇的能力。

### 2.3 诱变处理时间对突变菌株致死率影响

诱变处理时间对突变菌株的突变率影响非常大, 时间过短则蛋白质或 DNA 损伤较小, 细胞在进行修复的过程中不足以发生突变, 而时间过长则会导致突变菌株全部死亡或者存活的数量过少。选择上述乙醇产量最高的异常威克汉姆酵母 A42 作为出发菌株, 其在 ARTP 不同诱变处理时间后得到的致死率曲线见图 6。诱变处理时间对致死率的影响分为三个阶段, 在诱变处理时间为 30 s 到 60 s 范围内致死率快速升高, 从 13.33% 升高到 53.33%, 诱变处理时间从 60 s 到 120 s 范围内, 致死率继续升高, 120 s 时达到 97.53%, 诱变处理时间从 120 s 到 150 s 范围内致死率缓慢升高, 直至菌体全部死亡。因此选择诱变处理时间为 120 s 能保证致死率在 80% 以上且有一定数量的菌株存活, 因此将其作为后续试验的诱变条件。

该致死率曲线与沈飞翔等<sup>[28]</sup>报道的用 ARTP 诱变方法作用于产  $\gamma$ -聚谷氨酸枯草芽孢杆菌的致死率曲线较为相似, 在诱变处理时间为 30 s 时致死率达到 80%, 120 s 时可达到 90% 以上。贾婵媛等<sup>[29]</sup>采用紫外诱变方法对产木糖醇的热带假丝酵母 JS-3 进行不同辐射时间下的处理, 发现 8 min 时菌株致死率达到 78%,

12 min 才达到 96%。以上说明 ARTP 诱变方法产生的高浓度活性粒子对微生物具有较强的破坏力。另外,各种微生物均应选择适当的处理方法,才能达到最佳的诱变效果。

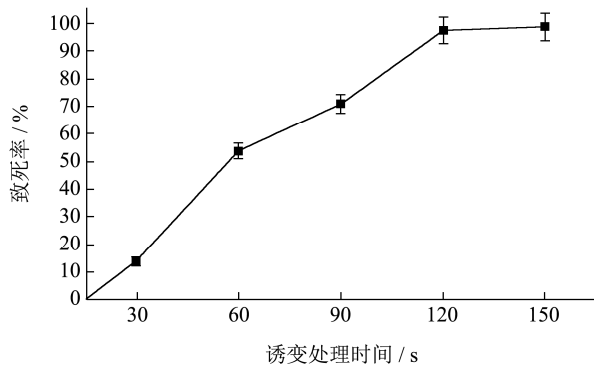


图6 异常威克汉姆酵母 A42 在 ARTP 不同诱变处理时间后的致死率曲线

Fig.6 Lethality curve of *Wickerhamomyces anomalus* A42 after different time of ARTP mutation

乙醇的工业生产常采用酿酒酵母或卡尔酵母进行乙醇发酵,这些菌种均只能利用葡萄糖等己糖作为碳源而不能利用木糖等戊糖。研究表明,假丝酵母能发酵 D-木糖异构化代谢物 D-木酮糖生产乙醇<sup>[30]</sup>,但其发酵产乙醇能力有限。另有研究表明<sup>[31,32]</sup>在云南采集的腐木样品中用木糖分离培养基、木聚糖分离培养基、纤维二糖分离培养基分离出了 3 株产乙醇的新酵母菌种 *Clavispora* sp. NYNU 161120<sup>T</sup>、*Clavispora* sp. NYNU 174173<sup>T</sup>、*Scheffersomyces* sp. NYNU 17926<sup>T</sup>,其中乙醇产量最高的为 *Clavispora* sp. NYNU 161120<sup>T</sup>,其发酵 20 h 乙醇含量最高达到 10.40±0.02 g/L。由此可见本试验筛得的酵母菌利用木糖发酵产乙醇的能力相对较高,可将其作为亲本菌株通过诱变育种技术进一步提高乙醇产量。

近年来逐渐兴起以等离子体作为新型物理诱变源的 ARTP 诱变育种,ARTP 对微生物的作用主要为高浓度的中性活性粒子,用 ARTP 处理后的细胞,其膜通透性增强,在细胞基质中产生 ROS 并进入细胞核,从而与细胞中的生物大分子发生作用,如与 DNA 作用发生 DNA 的链间交联或烷基化或者与蛋白质作用形成超氧化物,从而改变细胞的遗传特性和代谢活性<sup>[33-36]</sup>。利用 ARTP 技术对酵母菌进行诱变育种相较于其他育种方法具有鲜明的优势,研究表明用两种物理诱变方法对酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*, CCIC-1517RM) 进行紫外线和  $\gamma$  射线的复合诱变,得到诱变菌株 LH4,通过发酵条件优化后最终乙醇浓度仅 0.55 g/L<sup>[37]</sup>。张鑫鑫等<sup>[38]</sup>将 *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 进行紫外诱变,再通过其与酿酒酵母

*Saccharomyces cerevisiae* F3 (通过基因组重排技术获得的耐高温酿酒酵母)进行原生质体融合实验,得到融合子 UF44,其发酵最高乙醇含量为 16.45 g/L。由此可以证实相较于传统的育种方法 ARTP 诱变在酵母菌诱变育种上的优越性,该方法能更大限度的提升酵母菌发酵产乙醇的能力。

另有报道称采用 ARTP 诱变育种仪对两株酿酒酵母菌株分别进行诱变。突变酵母菌株发酵的啤酒中嘌呤含量相比初始菌株分别降低了 23.6%和 21.3%。对两株突变菌株进行连续传代 10 次并进行发酵啤酒实验,其发酵性能、发酵啤酒中总嘌呤含量和啤酒品质均保持稳定<sup>[39]</sup>。由此可见 ARTP 诱变育种方法在酵母菌诱变育种中的有效性。

## 2.4 突变菌株初筛

在进行酵母菌发酵培养时,菌株产气的时间越早、产气量越多,则代表菌株发酵产乙醇的性能越好。为此,本研究以杜氏管发酵法进行发酵培养,半定量分析突变菌株的产气量。挑选的 500 株 A42 突变菌株中杜氏小管充满气体的 236 株;充满 2/3 气体的 48 株;充满 1/3 气体的 84 株;少于 1/3 气体或没有气体 132 株,亲本菌株为充满 2/3 气体。

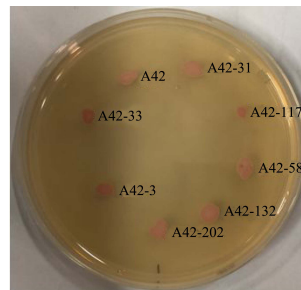


图7 TTC 比色法初筛 A42 突变菌株部分结果

Fig.7 Partial results of screening A42 mutant by TTC colorimetry

TTC (2,3,5-氯化三苯基四氮唑)是一种能与酵母菌的代谢产物发生显色反应的显色剂,通过颜色可以判断酵母呼吸酶活力的大小,间接反映酵母产乙醇能力的高低。在培养的酵母菌落上倾倒入一层 TTC 显色剂,菌落则会显示深浅不一的红色,产乙醇能力强的酵母会显现深红色,再者为粉红色、微红色甚至不显色突变菌株的红色深度越深,乙醇产量可能就越高,说明该突变菌株在 ARTP 诱变中发生的正突变效应越大。如图 7 所示为产气量比亲本菌株多的 236 个突变菌株中部分显色反应结果及与出发菌株的对比。以菌落反应后显现出来的红色深度为考察标准进行筛选,其结果表明 36 株为深红色,177 株为粉红色,23 株为微红色或不显色,亲本菌株 A42 为微红色。

本试验将红色深度比亲本菌株多的突变菌株视为发生了正突变效应的突变菌株, 计算得正突变率为42.60%。选择36个正突变菌株进行下一轮的复筛。

## 2.5 突变菌株复筛

采用气相色谱法测定各菌株摇瓶发酵产物的乙醇含量, 对比分析结果见表2, 少数菌株的乙醇产量低于出发菌株。由此可以看出复筛的必要性, 因为以产气量和呼吸酶活力为指标的筛选仅能初步确定正突变菌株, 结合目标产物乙醇含量测定才能正确筛选出ARTP诱变发生正突变效应的菌株。突变菌株中乙醇产量最高的菌株为异常威克汉姆酵母A42-338, 其乙醇产量较亲本菌株提高了42.59%, 含量为20.78 g/L。

表2 A42突变菌株复筛的乙醇产量

Table 2 Ethanol production of A42 mutants screened again

突变菌株 编号	乙醇含量 (g/L)	突变菌株 编号	乙醇含量 (g/L)
A42-28	16.33±0.69	A42-193	18.95±0.31
A42-33	19.63±0.43	A42-203	12.35±0.29
A42-37	17.48±0.36	A42-221	17.61±0.46
A42-39	16.42±0.56	A42-253	16.74±0.42
A42-54	15.11±0.33	A42-254	16.40±0.46
A42-60	15.53±0.36	A42-262	16.50±0.39
A42-83	16.10±0.38	A42-274	12.85±0.34
A42-89	18.65±0.32	A42-282	13.22±0.45
A42-96	13.87±0.35	A42-286	15.52±0.28
A42-124	16.66±0.41	A42-338	20.78±0.37
A42-128	17.52±0.37	A42-350	19.05±0.25
A42-131	16.93±0.29	A42-385	16.99±0.46
A42-150	17.06±0.34	A42-404	17.07±0.33
A42-151	17.35±0.36	A42-422	16.69±0.29
A42-152	14.04±0.36	A42-450	16.73±0.32
A42-154	16.73±0.31	A42-454	17.84±0.37
A42-182	18.08±0.42	A42-470	13.50±0.42
A42-191	18.32±0.57	A42-490	14.44±0.43

## 2.6 优良菌株遗传稳定性试验

突变菌株的遗传稳定性对于该菌株在实际工业中的应用具有极其重要的意义, 因此对筛选出的突变菌株A42-338传代培养8次, 通过测定突变菌株的各代发酵液中的乙醇含量考察其遗传稳定性。由图8可知, A42-338经过8次代传乙醇产量在20.41~20.84 g/L之间, 波动范围在2.50%以内, 表明该菌株具有良好的遗传稳定性, 是一株具有很大工业应用前景的乙醇生产菌, 可作为后续用于应用研究的酵母菌突变菌株。

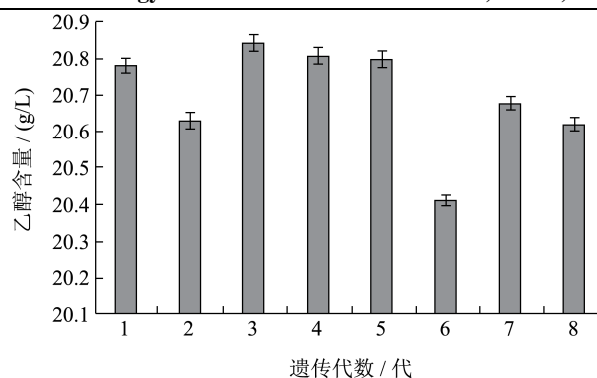


图8 各菌株传代培养后各代乙醇产量

Fig.8 Ethanol content of each strain after subculture

## 2.7 优良菌株发酵油茶籽壳木糖产乙醇

研究表明, 油茶籽壳发酵培养基中木糖含量为11.63 g/L, 葡萄糖含量为38.87 g/L。按1.4.1中的发酵条件, 将异常威克汉姆酵母A42-338在油茶籽壳发酵培养基中发酵60 h后, 乙醇含量为19.88 g/L, 还原糖残糖含量为9.06 g/L, 其中木糖残糖含量为1.79 g/L, 葡萄糖残糖含量为7.27 g/L, 木糖利用率为84.61%, 葡萄糖利用率为81.05%, 糖转化率为0.40 g乙醇/g糖。由此证明该突变菌株是一株具有应用价值的利用木糖高产乙醇的酵母菌。

## 3 结论

ARTP诱变是一种高效可行的酵母菌育种方法, 将分离得到 *Wickerhamomyces anomalus* A42 进行ARTP诱变处理120 s, 此时致死率达到97.53%, 在高致死率下且有一定数量存活的菌株, 是诱变育种的较佳条件, 其乙醇产量较亲本菌株提高了42.59%, 达到20.78 g/L, 且传代8次各代乙醇产量变化率不超过2.5%。通过 *Wickerhamomyces anomalus* A42-338 对油茶籽壳木糖提取液的发酵, 有望开发出具有特殊风味的酒精饮料等新产品, 提升农产品的附加值以及利用率。后续研究可继续针对 *Wickerhamomyces anomalus* A42-338 进行发酵油茶籽壳的条件优化, 以提高油茶籽壳的利用率。

## 参考文献

- [1] A Kardošová, A Malovíková, V Pätoprstý, et al. Structural characterization and antitussive activity of a glucuronoxylan from *Mahonia aquifolium* (Pursh) Nutt [J]. Carbohydrate Polymers, 2002, 47(1): 27-33
  - [2] 许文婷, 杨晓光, 王瑞琴, 等. 低聚木糖的生理功能、应用及检测研究[J]. 广西糖业, 2017, 5: 38-43
- XU Wenting, YANG Xiaoguang, WANG Ruiqin, et al.

- Physiological function, application and detection of xylooligosaccharides [J]. Guangxi Sugar Industry, 2017, 5: 38-43
- [3] GUO Lei, HU Yangdong, WU Lianying, et al. The green hydrolysis technology of hemicellulose in corncob by the repeated use of hydrolysate [J]. Chinese Journal of Chemical Engineering, 2018, 26(1): 191-195
- [4] 刘金,张立钊,陈力力,等.油茶籽壳的活性成分及提取方法研究进展[J].食品工业,2018,39(9):273-276  
LIU Jin, ZHANG Lizhao, CHEN Lili, et al. Advances in research on extraction technologies of bioactive substances from camellia seed shell [J]. The Food Industry, 2018, 39(9): 273-276
- [5] 钱朋智,张梅娟.甘蔗叶水解生产木糖工艺研究[J].中国糖料, 2018,40(3):17-21  
QIAN Pengzhi, ZHANG Meijuan. Study on production process of xylose from sugarcane leaf by hydrolysis [J]. Sugar Crops of China, 2018, 40(3): 17-21
- [6] 王毓,熊子灵,肖霄,等.龙竹微波水热法制备低聚木糖的研究[J].西北农业学报,2018,27(11):1701-1706  
WANG Yu, XIONG Ziling, XIAO Xiao, et al. Microwave-assisted treatment of bamboo for the production of xylo-oligosaccharides [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2018, 27(11): 1701-1706
- [7] 仪鑫,孙元琳,陈树俊,等.酶法制备黑小麦麸皮阿魏酰低聚木糖的工艺优化[J].食品工业科技,2016,37(6):191-195,200  
YI Xin, SUN Yuanlin, CHEN Shujun, et al. Optimization of enzymatic preparation of feruloylated oligosaccharides from black-grained wheat [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(6): 191-195, 200
- [8] 苏小军,王康,李清明,等.酶法水解超级稻秸秆木聚糖制备低聚木糖的工艺研究[J].激光生物学报,2018,27(6):561-566  
SU Xiaojun, WANG Kang, LI Qingming et al. Preparation of xylooligosaccharide from super rice straw by xylanase hydrolysis [J]. Acta Laser Biology Sinica, 2018, 27(6): 561-566
- [9] Narendra Reddy, YANG Yiqi. Biofibers from agricultural byproducts for industrial applications [J]. Trends in Biotechnology, 2004, 23(1): 22-27
- [10] 孟建宇,冀锦华,贾丽娟,等.基于三种碳源筛选低温纤维素降解菌及其复合系的降解能力分析[J].生物技术通报,2019,35(8):77-84  
MENG Jianyu, JI Jinhua, JIA Lijuan, et al. Isolation of cold-adapted cellulose-degrading bacteria using three different carbon sources and analysis on the degrading ability of consortia [J]. Biotechnology Bulletin, 2019, 35(8): 77-84
- [11] 边玲.一种新型透明质酸酶在大肠杆菌中的表达及其在透明质酸低聚糖制备中的应用[J].食品与药品,2009,11(11):60  
BIAN Ling. Expression of a novel hyaluronidase in *Escherichia coli* and its application in preparation of hyaluronic oligosaccharides [J]. Food and Drug, 2009, 11(11): 60
- [12] Foley Gerald. Renewable energy in third world development assistance learning from experience [J]. Elsevier, 1992, 20(4): 355-364
- [13] 黄达明,王美娟,管国强,等.运动发酵单胞菌和依哈塔假丝酵母混合发酵秸秆产乙醇[J].食品与发酵工业,2017,43(1):31-36  
HUANG Daming, WANG Meijuan, GUAN Guoqiang, et al. Ethanol production from corn stover using mixed cultures of *Zymomonas mobilis* and *Candida shehatae* [J]. Food and Fermentation Industries, 2017, 43(1): 31-36
- [14] 余增亮,邱励俭,霍裕平.离子注入生物效应及育种研究进展[J].安徽农学院学报,1991,4:251-257  
YU Zengliang, QIU Lijian, HUO Yuping. Research progress on biological effect and breeding of ion implantation [J]. Journal of Anhui Agricultural University, 1991, 4: 251-257
- [15] HUA Xiufu, WANG Jun, WU Zuojun, et al. A salt tolerant *Enterobacter cloacae* mutant for bioaugmentation of petroleum- and salt-contaminated soil [J]. Biochemical Engineering Journal, 2009, 49(2): 201-206
- [16] ZONG Hong, ZHAN Yao, LI Xiang, et al. A new mutation breeding method for *Streptomyces albulus* by an atmospheric and room temperature plasma [J]. African Journal of Microbiology Research, 2012, 6(13): 3154-3158
- [17] 杨心萍,宋词,张伟豪,等.常压室温等离子体与5-溴尿嘧啶复合诱变及快速选育腺苷高产菌株[J].食品与发酵工业,2020, 46(9):73-77  
YANG Xinping, SONG Ci, ZHANG Weihao, et al. Combined mutagenesis of ARTP and 5-BU for improving production of adenosine in *Bacillus subtilis* [J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(9): 73-77
- [18] XU Fangqian, WANG Jinqiang, CHEN Sanfeng, et al. Strain improvement for enhanced production of cellulase in *Trichoderma viride* [J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2011, 47(1): 53-58
- [19] AN Jun, GAO Fuli, MA Qiuyue, et al. Screening for enhanced astaxanthin accumulation among *Spirulina platensis* mutants generated by atmospheric and room temperature plasmas [J]. Algal Research, 2017, 25(6): 464-472

- [20] 张立钊,卢昌丽,陈力力,等.酶法处理油茶籽壳制备低聚木糖工艺的优化[J].食品工业,2020,41(5):126-129  
ZHANG Lizhao, LU Changli, CHEN Lili, et al. Optimization of enzymatic treatment of camellia oleifera seed shell for preparation of xylooligosaccharides [J]. The Food Industry, 2020, 41(5): 126-129
- [21] 谢勇,刘晓宇.气相色谱法测定饮料中乙醇含量[J].分析测试技术与仪器,2002,1:56-58  
XIE Yong, LIU Xiaoyu. Determination of ethanol in drink by gas chromatography [J]. Analysis and Testing Technology and Instruments, 2002, 1: 56-58
- [22] 唐玲,刘平,黄瑛,等.酵母的分子生物学鉴定[J].生物技术通报,2008,5:84-87  
TANG Ling, LIU Ping, HUANG Ying, et al. Molecular biology identification for yeast [J]. Biotechnology Bulletin, 2008, 5: 84-87
- [23] 陈承.葡萄糖木糖混合发酵乙醇研究[D].北京:北京化工大学,2009  
CHEN Cheng. The study of ethanol co-fermentation with glucose and xylose [D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2009
- [24] 刘建利,孙敏,袁凤霞,等.利用高通量测序技术分析传统面引子中的酵母菌多样性[J].食品科技,2018,43(4):15-22  
LIU Jianli, SUN Min, YUAN Fengxia, et al. Analysis of yeast diversity in traditional sourdough starters by high-throughput sequencing [J]. Food Science and Technology, 2018, 43(4): 15-22
- [25] 窦晓,杨建刚,曹新志,等.基于26S rRNA D1/D2区序列对不同时期大曲中酵母菌的分离与鉴定[J].现代食品科技,2018,34(2):97-101  
DOU Xiao, YANG Jiangan, CAO Xinzhi, et al. Isolation and identification of yeast from Daqu in different periods by 26S rRNA D1/D2 region sequence [J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(2): 97-101
- [26] 陈启顺.木糖代谢真核微生物分离鉴定与特性研究[D].成都:四川农业大学,2013  
CHEN Qishun. Separation identification and characterization of eukaryotic microorganisms of xylose metabolism [D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2013
- [27] 叶萌祺,袁亚宏,岳田利,等.产香酵母分离鉴定与苹果酒发酵中的应用[J].农业机械学报,2013,44(12):187-192  
YE Mengqi, YUAN Yahong, YUE Tianli, et al. Isolation and identification of aroma-producing yeasts and its application in cider fermentation [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2013, 44(12): 187-192
- [28] 沈飞翔,李秀颖,胥维昌,等.产 $\gamma$ -聚谷氨酸枯草芽胞杆菌菌株的高效诱变及发酵条件优化[J].氨基酸和生物资源,2015,37(1):61-66  
SHEN Feixiang, LI Xiuying, XU Weichang, et al. Mutagenesis of poly- $\gamma$ -glutamic acid high-producing bacillus subtilis strain and optimization of fermentation condition [J]. Biotic Resources, 2015, 37(1): 61-66
- [29] 贾婵媛,杨平平.热带假丝酵母转化生产木糖醇条件优化[J].中国酿造,2011,4:136-139  
JIA Chanyuan, YANG Pingping. Optimization of xylitol production conditions with *Candida tropicalis* [J]. China Brewing, 2011, 4: 136-139
- [30] 邓立红,王艳辉,马润宇.混合培养在酒精发酵中的研究进展[J].酿酒,2005,1:32-35  
DENG Lihong, WANG Yanhui, MA Runyu. Research progress of mixed culture in alcohol fermentation [J]. Liquor Making, 2005, 1: 32-35
- [31] 郑君.纤维二糖发酵酵母菌新种鉴定及其发酵特性研究[D].南阳:南阳师范学院,2019  
ZHENG Jun. Identification of novel cellobiose-fermenting yeasts and their fermentation characteristics [D]. Nanyang: Nanyang Normal University, 2019
- [32] 刘开放,王敏,郑君,等.骆驼凝乳酶工程菌发酵培养基的优化[J].现代食品科技,2017,33(12):170-176  
LIU Kaifang, WANG Min, ZHENG Jun, et al. Optimization of fermentation medium for genetically engineered strain with camel chymosin-producing capability [J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(12): 170-176
- [33] 席志文,黄林娜,翟一畅,等.ART-DES连续诱变选育高产 $\epsilon$ -聚赖氨酸突变株[J].食品科学,2020,41(14):131-137  
XI Zhiwen, HUANG Linna, ZHAI Yichang, et al. Sequential mutagenesis treatment with atmospheric and room temperature plasma and diethyl sulfate for enhanced microbial production of  $\epsilon$ -Poly-L-lysine [J]. Food Science, 2020, 41(14): 131-137
- [34] 祁田甜,张婵,胡济美,等.常压室温等离子体诱变技术选育高产Monacolin K紫色红曲霉突变株[J].食品科学,2015,36(9):66-70  
QI Tiantian, ZHANG Chan, HU Jimei, et al. *Monascus purpureus* mutant strains with high Monacolin K yield obtained by atmospheric and room temperature plasmas [J]. Food Science, 2015, 36(9): 66-70

(下转第95页)