

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 MgSO₄。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

文章编号: 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 MgSO₄. 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

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

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

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 °C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 °C, 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 (20 pmol/μL) 0.5 μL, 最后加 dH₂O 23 μL。PCR 循环为: 预变性, 94 °C 5 min; 变性, 94 °C 0.5 min; 退火, 55 °C 0.5 min, 延伸, 72 °C 1 min, 循环 30 次; 72 °C 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 °C 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 °C 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 MgSO₄, 0.6 g/L of Na₂HPO₄, 15 mg/L of FeSO₄ and 15 mg/L ZnSO₄, 接种, 30 °C 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 °C 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 °C 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。

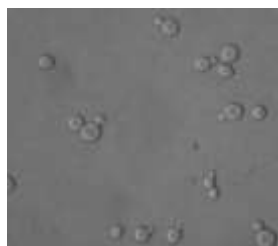


图 1 P14 菌株的个体形态 (40×10)

Fig.1 Individual morphology of strain P14

(2) 菌落特征

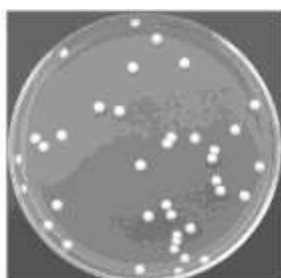


图 2 菌株 P14 菌落特征

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 °C 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。

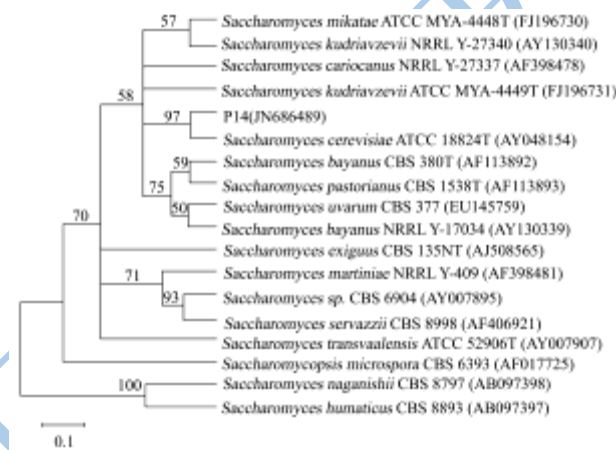


图 3 菌株 P14 的系统进化树

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

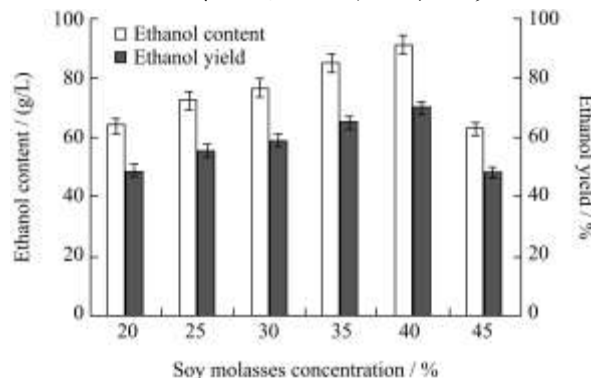


图 4 大豆糖蜜浓度对乙醇发酵的影响

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。

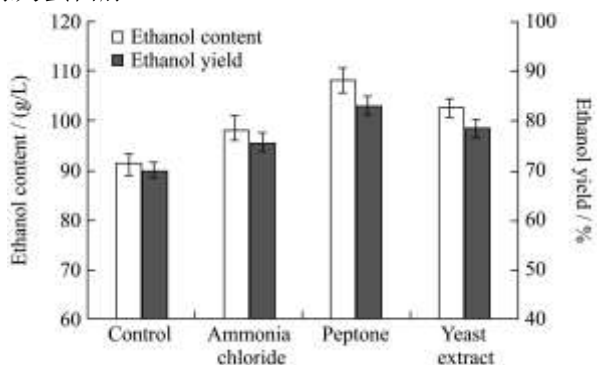


图5 补加氮源对乙醇发酵的影响

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
0.3 g/L	93.2±2.6	71.7±2.0
MgSO ₄ 0.4 g/L	112.6±3.9	86.6±3.0
0.5 g/L	105.8±3.0	81.4±2.3
0.3 g/L	94.2±2.9	72.5±2.2
Na ₂ HPO ₄ 0.6 g/L	106.8±3.5	82.2±2.7
0.9 g/L	101.3±2.8	77.9±2.2
10 mg/L	98.5±3.4	75.8±2.6
FeSO ₄ 15 mg/L	100.9±3.6	77.6±2.8
20 mg/L	92.6±3.1	71.2±2.4
0.8 mg/L	87.9±3.0	67.6±2.3
ZnSO ₄ 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 MgSO₄, 0.6 g/L of Na₂HPO₄和15 mg/L的FeSO₄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ZnSO₄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 MgSO₄, 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 MgSO₄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。

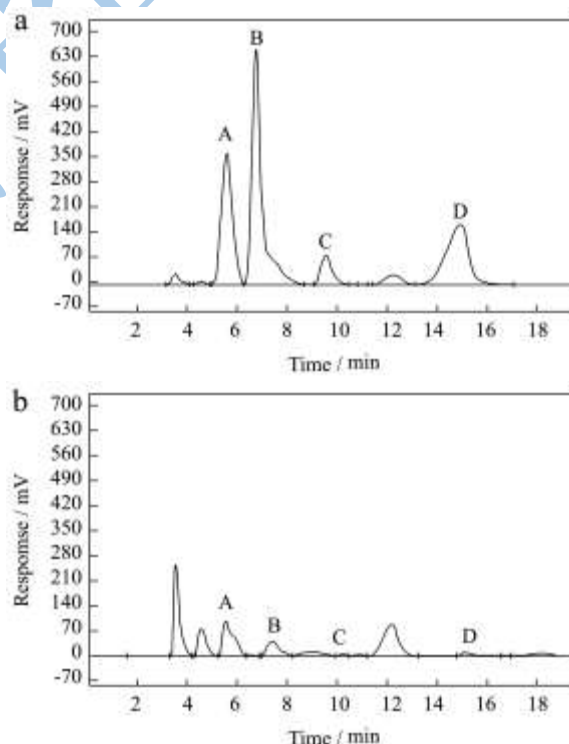


图6 发酵前后大豆糖蜜培养基中主要糖的高效液相色谱分析
Fig.6 HPLC analysis of main sugars present in the soy molasses medium before (a) and after (b) fermentation

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 MgSO₄。

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 MgSO₄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]. Bioresource 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 Biotechnology, 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-alcohol-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 fruit-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 wort 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