

耐高温酵母菌株的分离、鉴定及其酒精发酵初步研究

陈叶福 王正祥 王晨霞 方慧英 诸葛健

(江南大学工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214036)

摘要: 从 381 个自然样品中筛选得到 2 株耐高温酵母 THFY-4 和 THFY-16。THFY-4 能够在 51℃, 含 30% 葡萄糖的培养基中生长; THFY-16 能够在 45℃, 30% 葡萄糖的培养基中生长。经初步鉴定, THFY-4 为克鲁维属酵母, THFY-16 为酵母属酵母。进一步的 37℃ 发酵实验证明, THFY-4 在静置条件下的发酵性能很差, 发酵 60h 只能从 20% 的葡萄糖产生 4.88% (v/v) 的酒精; 而 THFY-16 在相同的条件下从 20% 的葡萄糖中产生 11.44% (v/v) 酒精。以 THFY-16 为发酵菌种, 以芭蕉芋糖化液为培养基进行酒精发酵, 24h 发酵结束, 从含 16.1% 葡萄糖的糖液得到 9.43% (v/v) 的酒精, 达到理论产量的 91.0%。

关键词: 耐高温酵母, 克鲁维酵母属, 酵母属, 酒精发酵

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 05-0024-04

PRELIMINARY STUDY ON ISOLATION, IDENTIFICATION AND ETHANOL FERMENTATION OF THERMOTOLERANT YEAST

CHEN Ye-Fu WANG Zheng-Xiang WANG Chen-Xia FANG Hui-Ying ZHU GE Jian

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036)

Abstract: Two thermotolerant, ethanol-producing yeast cultures: THFY-4 and THFY-16 were isolated from 381 nature samples. THFY-4 can grow on 30% glucose plate at 51℃, while THFY-16 can grow on the same medium at 45℃. After preliminary identification, THFY-4 was identified as *Kluyveromyces* sp. and THFY-16 belongs to *Saccharomyces* genus. The ethanol fermentation experiment shows that THFY-4 can only produce 4.88% (v/v) ethanol from 20% glucose after 60 hours, while THFY-16 can produce 11.44% ethanol under the same condition. When using saccharified *Canna edulis* Ker wort as fermentation medium, 9.43% (v/v) ethanol were produced from 16.1% glucose, which is 91.0% of the theoretical yield.

Key words: Thermotolerant yeast, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, Ethanol fermentation

随着人们能源危机意识和环保意识的不断增强, 以燃料酒精作为汽油的替代品逐

收稿日期: 2002-09-12, 修回日期: 2002-11-04

渐成为共识, 燃料酒精的发酵生产也越来越受关注。降低生产成本是燃料酒精发酵生产的关键。传统的酿酒酵母的酒精发酵最适温度为 28℃ ~ 33℃, 一般不超过 36℃。这一限制因素增加了乙醇生产成本, 甚至在部分气温较高地区根本无法进行正常生产。因此, 国内外酒精生产行业都十分重视耐高温酵母的选育工作^[1-3]。应用耐高温酵母于酒精生产, 有以下好处^[2]: (1) 可节约冷却费用, 节水, 节能; (2) 可维持夏季正常生产; (3) 夏季生产与常温酵母相比, 可减少污染生酸, 提高出酒率; (4) 一般还可缩短发酵周期, 提高设备利用率。

本文通过自然分离筛选方法从天然样品中分离得到两株耐高温酵母菌株 THFY-4 和 THFY-16, 对其作了初步鉴定, 并进行了 250mL 三角瓶酒精发酵实验。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 安琪高温活性干酵母 (THAADY); 市售。

1.1.2 样品: 稍微腐烂的热带水果、花朵、土壤、酒曲、酒醅、热带温泉土、水样等。

1.1.3 培养基: 富集培养基: 葡萄糖 300g, 酵母膏 3g, 蛋白胨 5g, 青霉素钠 0.5g, 定容至 1L。初筛分离培养基: 葡萄糖 200g, 玉米浆 20g, 尿素 2g, 青霉素钠 0.5g, 去氧胆酸钠 1g, 琼脂 20g, 定容至 1L。复筛发酵培养基: 葡萄糖 200g, 玉米浆 20g, 尿素 2g, 定容至 1L。菌种保藏培养基: 葡萄糖 150g, 玉米浆 20g, 尿素 2g, 琼脂 20g, 定容至 1L。麦芽汁液体培养基: 11 ~ 12°P 麦芽汁。麦芽汁固体培养基: 11 ~ 12°P 麦芽汁 + 2% 琼脂。液体种子培养基: 葡萄糖 150g (或含相当葡萄糖浓度的芭蕉芋糖化液), 玉米浆 20g, 尿素 2g, 定容至 1L。发酵培养基: 适当浓度的葡萄糖或芭蕉芋糖化液, 玉米浆 20g, 尿素 2g, 定容至 1L。

1.2 方法

1.2.1 耐高温酵母的初筛和复筛: 初筛: 取适量样品接入富集培养基中, 于 45℃ 摇床培养 6h 后 45℃ 恒温培养箱中静止培养。将有生长迹象的样品稀释涂布含有去氧胆酸钠的分离平板。挑典型酵母菌落转接初筛斜面。复筛: 将斜面菌种接一环于新鲜的 20mL 种子液体培养基中, 于 37℃, 200r/min 摇床培养 8h。按 10% 的接种量将菌种接入装有 100mL 发酵培养基的三角瓶中, 放入 40℃ 的培养箱, 静置发酵 48h 后测酒精含量。

1.2.2 酒精度的测定: 气相色谱法, 安捷伦 1490 气相色谱仪, $\phi 3 \times 1$ 不锈钢柱, 沪产 401 有机担体 (100-120 目) 载气: 氮气, 柱温 140℃, 检测器温度 200℃, 进样温度 200℃。

1.2.3 糖的测定: 还原糖用直接滴定法测定^[4], 总糖用蒽酮法测定^[4], 葡萄糖用生物传感分析仪测定。

1.2.4 酵母鉴定方法: 见文献 [5]。

2 结果与讨论

2.1 耐高温酵母筛选结果

经过初筛从 381 个不同来源的样品中得到 26 株能够在 45℃, 20% 葡萄糖的初筛平板上生长的酵母菌株。通过乙醇发酵进行复筛, 得到两株典型的酵母菌株 THFY-4, THFY-16。结果如表 1 和表 2。

表1 耐高温酵母复筛结果

菌株	初始葡萄糖浓度 (% , w/v)	发酵温度 (°C)	酒精产量 (% , v/v)	残葡萄糖 (% , w/v)
THFY-4	15	40	6.5	2.3
THFY-16	20	40	9.19	2.2
THAADY	20	40	8.71	3.0

表2 THFY-4和 THFY-16在不同温度下的生长情况

菌株	t/°C						
	33	37	40	45	50	51	53
THFY-4	++	++	++	++	++	+	-
THFY-16	++	++	++	+	-	-	-
THAADY	++	++	+	-	-	-	-

注: ++ 良好生长, + 生长, - 不生长

从复筛结果来看, THFY-4能够在51°C,含有30%葡萄糖的培养基上生长,耐高温性能很好,但是其发酵性能较差; THFY-16虽然耐高温性能不及THFY-4,但是其发酵性能较好,其在40°C下的发酵性能与对照菌株安琪耐高温活性干酵母相当。THFY-4和THFY-16在耐高温性能和发酵性能上各有所长。

2.2 酵母菌株初步鉴定结果

将THFY-4和THFY-16进行初步鉴定。鉴定结果如下。

2.2.1 形态培养特征: THFY-4: 椭圆形, (7.5~4) μm × (5~3.75) μm, 芽殖; 在麦芽汁液体培养基中为底部生长, 不形成膜, 环或岛; 在麦芽汁固体平板上的巨大菌落形态如照片, 菌落平坦, 乳白色, 边缘光滑; 在玉米粉琼脂培养基上不生成假菌丝; 在醋酸钠产孢培养基上生成子囊, 每个子囊中1~4枚长圆形子囊孢子, 子囊易消失, 孢子从子囊中脱离出来, 彼此分离或几个连在一起。THFY-16: 椭圆形或圆形, (12.5~5) μm × (12.5~5) μm, 芽殖; 在麦芽汁液体培养基中为底部生长, 不形成膜, 环或岛; 在麦芽汁固体平板上的巨大菌落形态如照片, 菌落较厚, 乳白色边缘略显波状, 中心凸起; 在玉米粉琼脂培养基上不生成假菌丝; 在醋酸钠产孢培养基上生成子囊, 并永久性存在, 每个子囊中1~4枚圆形或卵圆形子囊孢子。

2.2.2 糖类发酵试验结果见表3。

2.2.3 同化碳源试验结果见表4。

2.2.4 同化氮源试验: THFY-4和THFY-16都不能同化硝酸钾, 亚硝酸钠和尿素。

表3 糖类发酵实验结果

	THFY-4	THFY-16
D-葡萄糖	+	+
D-半乳糖	+	+
麦芽糖	-	+
甲基-吡喃葡萄糖苷	-	-
蔗糖	+	+
海藻糖	-	+
蜜二糖	-	+
乳糖	+	-
纤维二糖	-	-
棉子糖	+	+
菊糖	+	W
可溶性淀粉	-	-
木糖	-	-

注: + 发酵, - 不发酵, W 微弱发酵

表4 同化碳源实验结果

	THFY-4	THFY-16
D-葡萄糖	+	+
D-半乳糖	+	+
麦芽糖	+	+
甲基-吡喃葡萄糖苷	-	-
蔗糖	+	+
海藻糖	+	+
蜜二糖	-	+
乳糖	+	-
纤维二糖	+	-
棉子糖	+	+
菊糖	+	+
可溶性淀粉	-	-
木糖	+	-
山梨糖	+	-
D-阿拉伯糖	+	-
鼠李糖	+	-
赤藓醇	-	-
甘露醇	+	-
柠檬酸	+	-

注: + 利用, - 不利用

综合上述鉴定结果, THFY-4 在麦芽汁培养基中细胞呈椭圆形, 大小 $(7.5 \sim 4) \mu\text{m} \times (5 \sim 3.75) \mu\text{m}$, 芽殖; 不生成假菌丝; 每个子囊中 1-4 枚长圆形子囊孢子; 能够发酵蔗糖, 乳糖, 棉子糖和菊糖, 不能发酵麦芽糖, 纤维二糖; 能够利用木糖, 阿拉伯糖和鼠李糖; 不能同化硝酸盐。根据有关的酵母鉴定文献, 应归为克鲁维酵母属 (*Kluyveromyces*), 其种名有待于进一步确认。

THFY-16 在麦芽汁培养基中细胞呈椭圆形或圆形, 大小 $(12.5 \sim 5) \mu\text{m} \times (12.5 \sim 5) \mu\text{m}$, 芽殖; 不生成假菌丝; 生成永久性存在的子囊, 每个子囊中 1-4 枚圆形或卵圆形子囊孢子; 能够发酵葡萄糖, 麦芽糖, 半乳糖, 蜜二糖, 棉子糖, 海藻糖和蔗糖, 微弱发酵菊糖, 不能发酵纤维二糖和乳糖; 不能同化硝酸盐。根据有关的酵母鉴定文献, 应归为酵母属 (*Saccharomyces*), 其种名还有待于进一步确认。

2.3 酒精发酵实验

2.3.1 THFY-4 和 THFY-16 的发酵性能比较: 以筛选得到的两株耐高温酵母作为发酵菌种, 以初始葡萄糖浓度为 20% (w/v) 的发酵培养基进行 250mL 三角瓶酒精发酵实验, 以耐高温活性干酵母作对照, 在 37℃ 进一步对 THFY-4 和 THFY-16 的发酵性能做一比较, 实验结果见表 5。

由表 5 可以看出 THFY-4 在静置条件下的发酵性能很差, 在 60h 仍有 7.14% 的残糖, 酒精度只有 4.88%; 而 THFY-16 在静置条件下的发酵性能较好, 48h 能从 20% 的葡萄糖中产生 11.44% 的酒精, 与安琪耐高温活性干酵母相当。

2.3.2 芭蕉芋糖化液的 250mL 三角瓶酒精发酵实验: 以 THFY-16 为发酵菌种, 以芭蕉芋糖化液为发酵培养基进行 250mL 三角瓶酒精发酵实验, 发酵温度 37℃, 结果见图 1。

发酵进行到 9 h, 葡萄糖和总糖迅速减少, 酒精增加也比较快, 到 24h 时残葡萄糖为 0.05%, 残总糖为 1.19%, 发酵结束。从含 16.1% 葡萄糖的糖液得到 9.43% (v/v) 的酒精, 为理论产量的 91.0%。

表 5 不同耐高温菌株的发酵性能比较

菌种	残葡萄糖 (% , w/v)	酒精度 (% , v/v)	发酵时间 (h)
THFY-4	7.14	4.88	60
THFY-16	0.38	11.44	48
THAADY	0.42	10.72	48

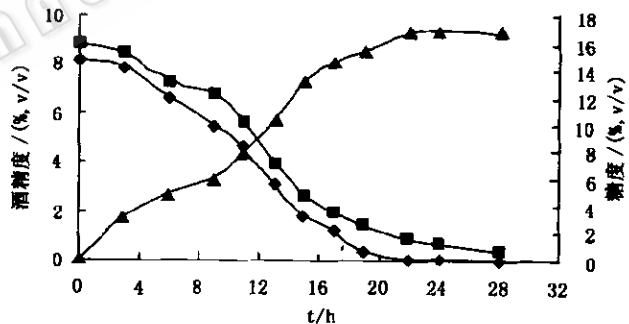


图 1 芭蕉芋糖化液发酵结果

▲ 酒精度, ◆ 葡萄糖, ■ 总糖

参考文献

- [1] Banat I M, Nigam P, Marchant R. World J Microbiol Biotechnol, 1992, 8: 259 ~ 263.
- [2] 孙志浩, 吴燕, 杨晓伟, 等. 江苏食品与发酵, 1991, 2: 13 ~ 16.
- [3] 蒋亚平, 蔡金芝, 杨宝玉, 等. 微生物学通报, 1992, 19 (6): 328 ~ 331.
- [4] 大连轻工业学院等八大院校合编. 食品分析. 北京: 中国轻工业出版社, 1994.
- [5] Barnett J A, Payne R W, Yarrow D. YEAST: Characteristics and identification (second edition); Cambridge, 2000.