

利用菊芋一步法生产酒精工程菌构建的研究

李雪雁, 张 维, 张秀兰, 李 冰

(兰州理工大学生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730050)

摘要:为了构建一种能够直接利用菊芋(*Helianthus tuberosus*)来进行酒精发酵的融合菌株,选择适宜的原生质体制备与融合条件,将自行筛选所得的一种能高产菊粉酶的青霉菌与酿酒酵母进行原生质体融合,选择性地检出融合子,对其产酶能力、产酒精能力进行测定,并对其遗传稳定性进行研究,最终确定筛选出一株各项性能较优的融合菌株 R8。酒精发酵试验结果显示,菌株 R8 发酵菊粉的酒精得率为 41.16%,原料糖分利用率为 75.52%。

关键词:原生质体融合;菊芋;酒精发酵;优化

中图分类号:Q814;TS261.4;TS262.2

文献标识码:A

文章编号:1001-0629(2012)05-0833-04

菊芋(*Helianthus tuberosus*)是菊科向日葵属中能形成地下块茎的栽培种,其块茎中菊粉含量可占其干质量的 70% 以上,且这种植物适应性强,产量高,价格低廉,是一种宝贵的半野生资源,具有极大的开发利用价值。菊芋是酒精发酵的良好糖源,近年来,有关利用微生物菊粉酶进行菊芋酒精发酵的报道^[1]相继出现,但选育高产酒精菌种直接应用于生产仍是人们努力的方向。余响华等^[2]以 K 氏酵母、糖化酵母为亲本,采用单亲灭活原生质体融合技术进行属间融合,构建可直接转化淀粉产酒精的菌株。结果获得高于 92% 的形成率和 6.5% 的再生率,最终获得一株性状稳定、酒精转化率高的融合子,在含 5.0% 的可溶性淀粉发酵液中,酒精度可达 7.0%。本研究通过设定合适的原生质体制备与融合条件,使酿酒酵母^[3]与一种能高产菊粉酶的青霉菌菌株进行原生质体融合,通过测定融合菌株的产菊粉酶能力和产酒精能力,选用各项性能较优的融合子作为利用菊芋进行酒精发酵的菌株,旨在生物资源再生资源转化生产燃料酒精提供理论依据和研究资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)为兰州理工大学生命学院微生物实验室保存;青霉

菌(*Penicillium*)为本试验前期工作中筛选所得产菊粉酶的菌株。

1.1.2 培养基

酵母 YPD 培养基:蛋白胨 10 g · L⁻¹,葡萄糖 20 g · L⁻¹,酵母膏 10 g · L⁻¹。

青霉菌培养基:菊粉 40 g · L⁻¹,酵母膏 5 g · L⁻¹,(NH₄)₂HPO₄ 10 g · L⁻¹。

再生培养基:将 15% 蔗糖(溶透稳定剂)加入 YPD 培养基,成分参见酵母 YPD 培养基。

融合子酒精发酵培养基:菊粉 90 g · L⁻¹,酵母膏 5 g · L⁻¹,蛋白胨 10 g · L⁻¹。

1.1.3 试剂 Na₂HPO₄、柠檬酸、蔗糖、EDTA、β-巯基乙醇、PEG、CaCl₂、蜗牛酶、纤维素酶、酒石酸钾钠、醋酸钠、冰醋酸和果糖,试验所涉及药品均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 菌种活化与扩大培养 试验中,由于酿酒酵母和青霉菌冷藏了一段时间,故需对其活化 1~2 代。方法为在试管斜面培养基上,28~30 °C 培养 48 h,然后转入液体摇瓶中(装量为 100 mL/500 mL 三角瓶),28~30 °C,200 r · min⁻¹ 振荡培养。

1.2.2 原生质体制备

酵母菌原生质体制备

1) 离心洗涤、收集细胞:分别取 5 mL 上述培养

*收稿日期:2011-06-22 接受日期:2011-11-02

基金项目:2009 年甘肃省教育厅硕导基金项目(0908ZTB011)

作者简介:李雪雁(1965-),女,甘肃通渭人,教授,学士,研究方向为微生物学和发酵工艺学。E-mail:Lixueyan@lut.cn

至对数生长期的酵母细胞培养液, $3\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 弃上清液, 向沉淀的菌体中加入 5 mL 缓冲液, 用无菌接种环, 搅散菌体, 振荡均匀后离心洗涤 1 次, 再用 5 mL 高渗缓冲液离心洗涤 1 次, 收集菌体。

2) 酶解脱壁: 向收集的菌体中加入 3 mL 脱壁预处理剂, 振荡均匀, 于 $30\ ^\circ\text{C}$ 保温 30 min, 离心 5~10 min, 弃上清, 无菌水洗涤 2 次。所用脱壁酶为 1.5% 蜗牛酶, $30\ ^\circ\text{C}$, $150\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 轻微振荡, 每隔 30 min 取样镜检酶解程度, 处理 1~2 h 即可停止酶解处理, 加入 10% 蔗糖溶液低渗冲击, 然后离心 5~10 min, 弃酶液, 收集原生质体及未酶解细胞^[4-6]。用高渗溶液洗涤, 悬浮于原生质体保存液。

青霉菌原生质体制备: 用无菌接种环从静置液体培养的三角瓶中挑出菌膜(对数生长期), 置于无菌的圆底离心管中, 用 4 mL, 加入 3 mL 脱壁预处理剂, 稍微振荡, 于 $30\ ^\circ\text{C}$ 保温 30 min, 离心 5~10 min, 弃上清, 用 4 mL, 去上清液, 加入 2% 纤维素酶和 1% 蜗牛酶混合酶液共 3 mL, 同时加入 0.1 mL 10% β -巯基乙醇, 于 $30\ ^\circ\text{C}$ 水浴酶解 3 h, 间或摇动。酶解结束后, $2\ 500\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 弃酶液, 收集原生质体及未酶解细胞^[7-8]。

1.2.3 原生质体再生 将原生质体稀释适当倍数后涂于再生高渗培养基平板, $28\ ^\circ\text{C}$ 培养, 3~5 d 后观察。

1.2.4 原生质体融合 取两亲本原生质体各 1 mL, 混合于灭菌小试管中, $2\ 500\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 弃上清液, 向上述沉淀菌体中加入 2 mL 促溶剂, 轻轻摇匀, $32\ ^\circ\text{C}$ 水浴保温 30 min, 取适量, 适当稀释后涂布于完全培养基固体平板上, $28\ ^\circ\text{C}$ 培养 3~5 d 后观察。

1.2.5 融合子的性能测定 挑取原生质体融合后在以菊粉为唯一碳源的培养基平板上长出的若干大菌落接种, $30\ ^\circ\text{C}$ 培养 24~48 h, 后转接于液体完全培养基中。利用其营养标记、酶活力的测定、融合子的酒精发酵特性、细胞形态、体积大小、繁殖速率、发酵强度等方面的观察和测定结果来鉴定融合子。

1) 融合子菊粉酶活力测定: 菊粉酶的活力分为内切酶活力(D)和外切酶活力(S), 具体测定方法见参考文献[9]。

2) 酒精浓度测定: 取 100 mL 成熟发酵液到蒸馏瓶中, 加入 100 mL 水, 混匀后蒸馏。取馏出液

100 mL。用酒精比重计测定馏出液中的酒精浓度^[10], 再校正为 $20\ ^\circ\text{C}$ 时的酒精浓度。

3) 糖分利用率与酒精的实际出率的计算参考文献[11]。

2 结果

2.1 原生质体制备条件的选择

2.1.1 菌龄 原生质体的形成与菌龄有很大关系, 本试验选取对数生长期的酵母细胞培养液, 培养时间控制在 12 h 以内。丝状真菌生长较慢, 18 h 以后肉眼才能看见菌膜, 因此, 菌龄控制在 24 h 内, 以更好地形成原生质体。

2.1.2 脱壁条件的选择 酵母原生质体制备一般选用蜗牛酶作为脱壁酶, 本试验所采用的蜗牛酶浓度为 1.5%, 酶解时间 1~2 h。丝状真菌类原生质体制备一般选用蜗牛酶, 纤维素酶不同浓度的组合酶系, 本试验选择 2% 纤维素酶加 1% 蜗牛酶的混合酶液, 丝状真菌所需脱壁时间较长, 酶解时间约 3 h, 究其原因可能是菌膜没有被捣碎, 酶与菌丝体接触面积小, 不利于原生质体的释放。

2.2 原生质体的融合及融合子的检出 采用 PEG(MW 6000) 促融法, 将两亲本等比例混合, PEG 浓度为 30%, $32\ ^\circ\text{C}$ 水浴保温 30 min。

原生质体融合的两个亲本, 其一为可以产生菊粉酶的青霉菌, 其二为可以进行酒精发酵的酵母菌, 二者融合以后直接采取选择性培养基鉴定的方法可很容易检出真正的融合子, 挑取原生质体融合后长出的若干大菌落接种在以菊粉为唯一碳源的培养基平板上, $30\ ^\circ\text{C}$ 培养 24~48 h。后转接于液体完全培养基中, 其融合子的酒精发酵特性、酶活力测定、细胞形态、体积大小、繁殖速率等方面的观察和测定结果表明, 均不同于双亲菌株, 因此, 可确定为融合子。

2.3 酒精发酵菌株 R8 菌落形态 R8 菌株在平板上的菌落形态更接近于酵母菌, 只是菌落透明度并不高, 同时没有表现出很明显的青霉菌菌落的形态(图 1)。

2.4 融合子性能测定及筛选 通过对初步确定的 16 株融合菌株的进一步性能测定, 包括其产菊粉酶的能力、产酒精的能力以及遗传稳定性的研究, 最终确定一株利用菊芋发酵产生酒精的菌株。

2.4.1 产菊粉酶能力测定 融合菌株 R1、R3、R4、



图1 R8菌株平板菌落形态

Fig.1 Morphology of R8 strains flat colony

R8、R14产菊粉酶活力均极显著高于其他各组($P < 0.01$)(图2)。为了能从中筛选出产酒精能力强的发酵菌种,本研究将产菊粉酶活力相对较好的融合菌株R1、R3、R4、R10、R11、R14,在进一步的产酒精能力试验中都作为考察对象。

2.4.2 产酒精能力的测定 菌株R3和R8的产酒精能力均极显著高于其他各组($P < 0.01$),而且酒精得率均为41.16%(图3),这可能是由于菌株R3的酒精耐受性比R8好,R8的产酶能力随发酵液中酒精浓度的增加而受到抑制。但考虑到R8产菊粉酶活力高于R3,基本确定R8作为后续酒精发酵的菌株。测定误差,进行数据描述和分析。

2.4.3 融合子稳定性测定结果 融合子R8稳定性

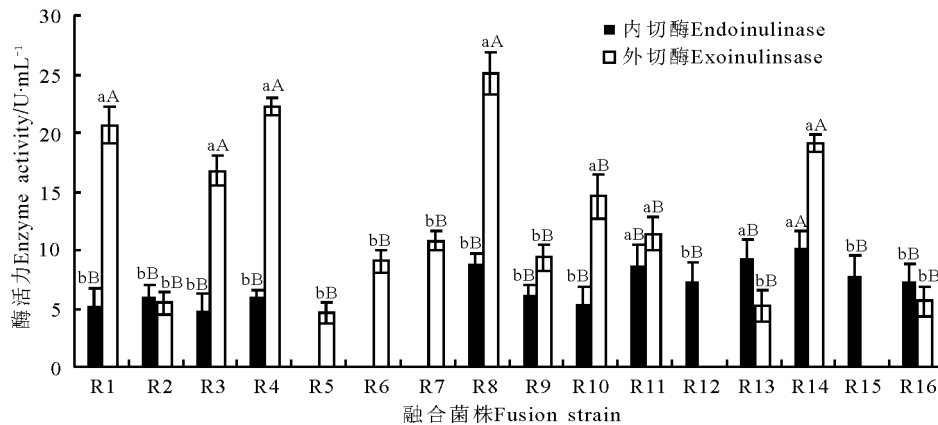


图2 R1-R16菊粉酶活力测定结果

Fig.2 Inulinase activity determination results of R1-R16

注:不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$),不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。下同。

Note: Different lower case and capital letters for the same inulinase indicate significant difference among different fusion strain at 0.05 and 0.01 level, respectively.

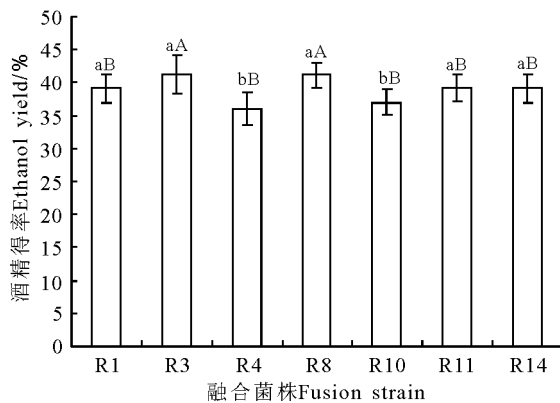


图3 融合菌株酒精发酵得率测定

Fig.3 Alcohol fermentation rate determination of fusion strains

测定结果表明,四代以内,酒精得率不变,均为41.16%,内切酶与外切酶活力有所波动,均为无规律小范围波动,稳定性相对良好(表1)。最终选择融合菌株R8作为进行后续发酵的菌株。

3 结论

选用适合酿酒酵母和青霉菌的不同原生质体制备条件,经融合与鉴定,筛选出了16株融合子,分别对其产菊粉酶和产酒精能力及其三代以上遗传稳定性做了测定,最终确定最优菌株为R8,内切酶活力为 $8.97 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$,外切酶活力为 $25.09 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$,酒精得率为41.16%,原料糖分利用率为75.52%,稳定性良好。

表1 融合子 R8 稳定性测定结果

Table 1 Stability of fusion R8

传代数 Pass algebra	第一代 First generation	第二代 Second generation	第三代 Third generation	第四代 Fourth generation
内切酶活力 Enzyme activity/ $U \cdot mL^{-1}$	8.82	9.25	9.08	8.97
外切酶活力 Exonuclease activity/ $U \cdot mL^{-1}$	25.60	24.39	24.77	25.09
酒精得率 Ethanol yield/%	41.16	41.16	41.16	41.16

利用原生质体融合技术构建出一种可以直接利用菊芋为原料来发酵产生酒精的菌种,经过初步的性能测定,筛选出一种产菊粉酶和产酒精能力较优的菌株,为进一步提高菊芋酒精发酵的产量有一定的参考意义。

参考文献

- [1] 李俊俊,唐艳斌,唐湘华. 复合酶在菊芋粉发酵生产燃料乙醇中的应用[J]. 酿酒科技, 2009(3):65-68.
- [2] 余响华,张华山,李亚芳. 原生质体融合构建直接转化淀粉生产燃料酒精的新型菌株[J]. 酿酒科技, 2006(5):25-28.
- [3] 李高扬,李建龙,王艳,等. 利用高产牧草柳枝稷生产清洁生物质能源的研究进展[J]. 草业科学, 2008,25(5):15-21.
- [4] 彭帮柱,岳田利,袁亚宏. 酵母菌与原生质体融合技

术[J]. 西北农业学报, 2004,13(1):101-103.

- [5] 李英军,马晓燕. 马克斯克鲁维酵母原生质体制备和再生条件的研究[J]. 酿酒科技, 2006(7):51-54.
- [6] 俞志敏,栾静,徐鹏. 耐高糖酿酒酵母原生质体制备与再生过程研究[J]. 酿酒科技, 2008(4):45-48.
- [7] 甘志波,赵学慧. 黑曲霉 AMS-11 原生质体的制备[J]. 湖北农业科学, 1994(3):32-34.
- [8] 王燕. 双亲灭活米曲霉原生质体融合中原生质体制备的研究[J]. 中国酿造, 2007(5):19-22.
- [9] 王静,金征宇. 黑曲霉产菊粉酶的发酵条件优化及诱变育种[J]. 生物技术, 2002,12(3):42-45.
- [10] 秦耀宗. 酒精工艺学[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1998:317-326.
- [11] 诸葛健,王正祥. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1994:97-99.

Construction of engineered bacteria for onestep producing alcohol with Jerusalem artichoke

LI Xue-yan, ZHANG Wei, ZHANG Xiu-lan, LI Bing

(School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Science and Technology, Lanzhou 730050, China)

Abstract: To obtain fusant strains being able to produce ethanol directly from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) materials efficiently, the protoplast fusion technique was used and some appropriate conditions were chosen for protoplast preparation and fusion. The protoplast fusion was conducted between *Saccharomyces cerevisiae* and a penicillium strain obtained by self-screening with a high yield of inulinase. The abilities of inulinase and ethanol production of detected fusants was determined. Their genetic stability was also studied. Finally, a superior strain named R8 was chosen for inulin alcoholic fermentation. The results showed that the ethanol content of fermented products was 41.16% and the raw sugar utilization rate was 75.52%.

Key words: protoplast fusion; Jerusalem artichoke; alcoholic fermentation; optimization

Corresponding author: LI Xue-yan E-mail: Lixueyan@lut.cn