

文章编号: 1007-4627(2009)02-0269-05

C 离子束诱变产生甜高粱汁酒精酵母高产菌株的研究*

严亚平^{1,2}, 王菊芳^{1, #}, 陆 栋^{1,2}, 董喜存¹, 高 峰¹, 马 良¹, 李文建¹

(1 中国科学院近代物理研究所, 甘肃 兰州 730000;

2 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘 要: 利用 100 MeV/u C 离子束对高产酒精酵母菌株进行了辐照诱变的研究。采用红四氮唑作为筛选指示剂, 得到了 5 株产酒能力有所提高的突变酵母菌。利用甜高粱汁的发酵结果表明, T4 突变菌株的产酒精能力比原始出发菌株提高了 18.6%, 且发酵液中的残糖含量也有所降低。随后对 T4 菌株在甜高粱汁中的最适宜发酵条件做了初步探索, 结果表明: 最适发酵温度和 pH 值分别为 30 °C 和 4.5。通过 10 l 发酵罐的验证试验表明: 在同样发酵条件下, T4 菌株的发酵率和产酒精能力都比原始出发菌株提高了 12%。

关键词: 重离子束; 酒精酵母; 甜高粱汁; 发酵

中图分类号: Q691 **文献标识码:** A

1 引言

20 世纪初, DeVries(1904)提出了辐射诱发突变的利用, 至今已有上百年的研究历史, 对微生物育种做出了重大贡献。辐射诱变的机理一般被认为是基因重组或染色体发生断裂而导致的基因突变或染色体畸变, 存在不可控制性和诱变谱狭窄、诱变能力低等不足。20 世纪 80 年代以来, 随着 N 离子束注入水稻种子诱发变异的发现, 揭开了离子束生物工程的研究序幕。现在的研究发现重离子束辐照具有传能线密度大、相对生物学效应高、能量沉积空间分辨率好及 DNA 双链切断功能等优点。如今, 重离子辐照技术在国内得到了较快的发展, 并已成功应用于植物、微生物的诱变育种^[1, 2]。

在当今的世界能源使用格局中, 石油是最主要的部分, 约占全球整个能源使用配比的 37%。但是, 作为一种不可再生能源, 石油的储量非常有限。近年来, 已经出现从可再生的资源中生产燃料酒精用于替代石油燃料的研究^[3]。燃料酒精具有清洁、环保、安全、可再生的优点, 已在欧美和巴西等国广泛使用。传统的酒精生产大部分都是以玉米为原

料进行发酵, 但由于玉米是我国重要的粮食资源, 消耗大量的玉米来生产乙醇将会引发与人争粮的严重问题, 我国政府已明确表示玉米酒精不是燃料酒精产业的发展方向。甜高粱以粮饲兼用、抗逆性强和生物产量高等优良特性受到世界各国关注。随着甜高粱产业的不断扩大, 利用甜高粱茎秆汁液经生物发酵生产酒精正成为国内外的研究热点^[4-9]。本实验就是以甜高粱汁作为发酵培养基, 利用重离子束对普通产酒精酵母 YY 进行辐照诱变, 采用红四氮唑(TTC)为指示剂, 筛选出能稳定遗传、酒精产量高的酵母突变菌株, 并初步对最适宜的发酵条件做探索, 最后进行中试发酵验证试验, 以期所获得的实验结果能够用于指导实际生产。

2 材料和方法

2.1 实验菌种和培养基

实验用产酒精酵母(YY)为本实验室保藏。固体培养基为 YEPD 培养基, 用以活化酒精酵母菌并作为 TTC 筛选下层培养基, 具体成分如下(g/l): 葡萄糖 20, 单摆脲 10, 酵母粉 10, 磷酸氢二钾 1, 硫酸镁 0.5, 氯化钠 2.5, 琼脂 20。TTC 筛选上层

* 收稿日期: 2008-02-14; 修改日期: 2009-05-17

* 基金项目: 中国科学院“西部之光”人才培养计划资助项目(O606180XBO); 中国科学院近代物理研究所所长基金资助项目(O70612SZO)

作者简介: 严亚平(1982-), 男(汉族), 陕西洛南县人, 硕士研究生, 从事生物物理专业研究; E-mail: yanyaping99@163.com

通讯联系人: 王菊芳, E-mail: jufangwang@impcas.ac.cn

培养基(g/l): TTC 0.3, 葡萄糖 30, 琼脂 20。发酵培养基为天然甜高粱汁, 每升中加入 2 g 硫酸铵、5 g 磷酸二氢钾和 3 g 硫酸镁。各种培养基 115 ℃ 下饱和蒸汽灭菌 20 min。

2.2 辐照

将活化好的酒精酵母制成菌悬液装入无菌培养皿中, 置于中国科学院近代物理研究所兰州重离子研究装置(HIRFL)的治癌终端上, 用 100 MeV/u 的 C 离子束辐照, 剂量分别为 6.25, 12.5, 25, 50 和 100 Gy。

2.3 高产酒精酵母菌的筛选

将经过辐照处理的菌种样品分别取出少量, 梯度稀释 10^{-6} , 用 TTC 双层培养基法进行初步筛选。具体过程如下: 吸取 100 μ l 稀释菌液涂布到下层平板培养基上, 30 ℃ 倒置培养 40 h, 无菌条件下倒入 10 ml TTC 上层培养基覆盖原有菌落, 30 ℃ 下避光保温 2—3 h, 然后根据菌落颜色的深浅判定酵母产酒精能力的大小^[10]。选择颜色较深的菌落接种到甜高粱汁培养基中培养 48 h, 记录 CO₂ 失重情况, 并对发酵液的酒精度和残糖含量进行分析, 根据结果复筛出性状最为优良的菌株。

酒精度的测定 取 100 ml 成熟发酵液, 加入 100 ml 蒸馏水, 置于电炉上蒸馏出 100 ml 液体, 摇匀后用酒精计和温度计分别测定其酒度和温度, 然后查表校正温度为 20 ℃ 时对应的酒精浓度。

还原糖测定 用斐林试剂法测定甜高粱汁中的还原糖^[11]。

总糖测定 样品经水解处理后用斐林试剂法测还原糖。

2.4 最适发酵温度和最适发酵 pH 值的确定

以筛选出的产酒精能力有明显提高的 T4 菌株为研究对象, 测定最适发酵温度和发酵 pH 值。

最适发酵温度的测定 取 0.5 ml 活化好的 T4 菌液装入盛有 20 ml 甜高粱汁培养基的三角瓶中, 分别置于 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 和 40 ℃ 恒温振荡培养 8 h, 之后静止培养 48 h, 每 6 h 称重一次, 记录 CO₂ 失重情况。

最适发酵 pH 值的测定 取 0.5 ml 活化好的 T4 菌液装入盛有 20 ml 甜高粱汁培养基的三角瓶中, 分别调节其 pH 值为 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0,

5.5 和 6.0, 置于 30 ℃ 恒温振荡培养 8 h, 之后静止培养, 记录 CO₂ 的失重情况。

2.5 中试发酵实验

T4 菌株与出发菌株的中试实验在 10 l 发酵罐(GUJS-10-100 AUTOBIO2000 型/东方生物工程设备技术公司)中进行。

3 结果与分析

3.1 高产酒精菌株的筛选

TTC 全称为 2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑, 是一种无色显色指示剂, 活菌中所含的脱氢酶可将它还原成红色的三苯基甲腊(TF), 通过菌落颜色的深浅可以判断酵母菌呼吸酶活力的大小, 即酵母产酒精能力的高低^[10]。将经过辐照的酒精酵母用 TTC 双层培养基进行初筛, 根据菌落显色的深浅, 挑选出 5 株颜色较深的菌株, 连同原始菌株 YY 一起接种到甜高粱汁培养基进行发酵复筛实验, 所得到的结果如表 1 所示。

表 1 初筛出的突变菌株和原始出发菌株在甜高粱汁中的发酵培养结果

菌株	酒精度 (%)	残糖量 / (g/l)	CO ₂ 失重量 / g
出发菌株 YY	8.6	4.23	10.2
突变菌株 T1	9.4	4.18	10.7
突变菌株 T2	8.8	4.20	10.7
突变菌株 T3	9.0	4.21	10.8
突变菌株 T4	10.2	4.07	11.9
突变菌株 T5	9.4	4.17	10.7

从表 1 可以看出, 在挑选出的 5 株突变菌中, T4 菌株的产酒能力最强, 发酵结束时, 发酵液中的酒精度达到了 10.2%, 比原始出发菌株的 8.6% 有了很大提高; 同时相比其它突变菌株和出发菌株, T4 菌株发酵液中的残糖量也相对较低, 表明发酵比较彻底; CO₂ 的失重量最高, 说明其发酵能力比较强。综合考虑, 选 T4 菌株进行最适宜发酵条件和中试实验。

3.2 温度和 pH 值对 T4 菌株产酒能力的影响

研究 T4 菌株在甜高粱汁中的最适宜发酵条件时, 将 CO₂ 失重作为衡量酒精发酵反应的程度。在

酒精发酵的过程中,葡萄糖等被利用生成酒精,同时放出 CO_2 。 CO_2 失重量越高,说明生成酒精的过程越剧烈,发酵能力就越强。实验所得到的温度与 CO_2 失重之间的关系如图 1 所示。

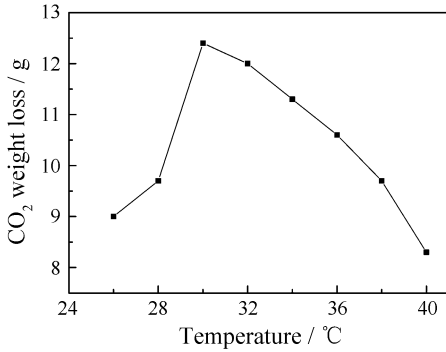


图 1 不同温度下 T4 菌株发酵能力的变化

由图 1 可以看出,发酵温度为 30 °C 时, CO_2 失重达到最大值为 12.4 g,此时 T4 酵母菌发酵能力最强。随着温度的逐渐升高, T4 菌的发酵能力逐渐下降。当温度依次 32, 34, 36 和 38 °C 时, CO_2 失重量分别为 12, 11.3, 10.6, 和 9.7 g; 当温度达到 40 °C 时,由于高温对细胞的损伤效应, CO_2 失重量仅为 8.3 g 发酵力比最高峰值下降了 33%。当温度低于 30 °C 时, T4 菌的发酵能力也明显下降,在 28 和 26 °C 时, CO_2 失重量为 9.7 和 9 g,比最高峰值分别下降了 21.8% 和 27.4%。

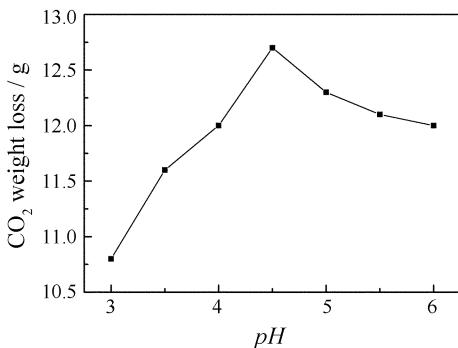


图 2 不同 pH 值条件下 T4 菌发酵能力的变化

实验所得到的 pH 值与 CO_2 失重之间的关系如图 2 所示。可以看出,当 pH 值为 4.5 时, CO_2 失重最大,为 12.7 g, T4 菌株的发酵能力最好。pH 值低于 4.5 时发酵能力明显下降, pH 值为 4.0, 3.5 和 3.0 时, T4 菌株 CO_2 失重依次为 12, 11.6 和 10.8 g,比最高峰值分别下降了 5.5%, 8.7% 和

15%, 而当 pH 值高于 4.5 时,发酵能力虽然也呈现出下降,但趋势不如低 pH 值时明显。

与温度对发酵能力的影响相比较, pH 值对酒精发酵能力的影响不如温度的影响明显。

3.3 T4 菌株和出发菌株的中试发酵验证实验

由于各步化学反应的最佳反应工艺条件可能随实验规模和设备等外部条件的不同而改变,因此,在基本发酵条件确定以后,用 10 l 发酵罐进行中试研究,将两次中试实验的结果归纳在表 2 中。

表 2 原始出发菌株 YY 和突变菌株 T4 在 10 l 中试发酵罐中的发酵培养结果

发酵时间 /h	T4 残糖量 / (g/l)	YY 残糖量 / (g/l)	T4 酒精度 (%)	YY 酒精度 (%)
0	140	140	0	0
6	53.7	62	4.8	4.2
12	22.8	48	7.2	5.7
18	1.8	29	8.6	6.3
24	1.7	8.7	9.8	7.5
30	1.6	4.5	9.8	7.9
36	1.6	2.4	9.8	8.6
42	1.6	2.4	9.8	8.6
48	1.6	2.4	9.6	8.6

从发酵结束后发酵液中酒精度的对比可以看出, YY 菌株在发酵进行到 36 h 时,发酵液中的酒精度达到了稳定值,为 8.6%,而 T4 菌株在发酵进行到 24 h 时发酵液中的酒精度就达到了稳定值,为 9.8%,而发酵时间却缩短近 12 h。表明 T4 菌株的发酵速度比原始出发菌株更快,酒精产率更高。

另外,对 T4 菌又进行了两次中试实验,结果如表 3 所示。与第一次的结果比较可以发现,在中试发酵条件下, T4 菌酒精产量可以稳定地达到 9.8% ($V_{\text{酒精}}/V_{\text{发酵液}}$),比出发菌株 YY 的酒精产量 8.6% 提高了 14%, T4 菌株发酵液中的残糖量也要比原始出发菌株发酵液的残糖量低,表明 T4 菌株的发酵更为彻底。通过用斐林试剂热滴定法测得发酵前总糖和发酵后残总糖,计算得到 T4 菌株的酒精产率最高可达理论值的 93.9%,略高于国内有关甜高粱汁酒精发酵实验在类似条件下的报道值 93%^[12]。几次中试实验相隔半年,但发酵结果却比较接近,表明筛选出的 T4 菌是可以稳定遗传的,

具有一定的工业应用前景。

表 3 T4 菌的 3 次中试实验结果比较

T4 菌中试实验	酒精产量(%)	残糖量/(g/l)	发酵时间/h	实验日期
1	9.8	1.6	24	2008 年 9 月 20—26 日
2	10.0	1.7	24	2008 年 10 月 9—13 日
3	10.1	1.4	22	2009 年 4 月 14—19 日

4 结论

酒精酵母的产酒精能力、酒精耐受性、发酵时间等是生产酒精中最为关键的要素，传统的工业用菌种都是针对玉米等淀粉质底物而选育的，并不一定就很适合高糖的甜高粱。因此，选育甜高粱汁酒精发酵高产菌株对利用甜高粱茎秆汁液生产酒精具有重要意义。重离子束作为一种新型的辐射源，具有常规辐射源所没有的优势，如能量可以集中释放和生物效应高等特点^[13]，用重离子对酒精酵母进行辐射处理，有望获得酒精发酵能力更强的突变株。

TTC 作为一种无色显色指示剂，可以根据菌落颜色的深浅判断酵母菌产酒精能力的高低，从而挑选出产酒能力较高的菌株^[10]，我们的实验结果表明：该方法在实际筛选工作中切实可行。将重离子辐照技术和 TTC 指示剂方法结合起来，可有效地提高高产酒精酵母菌的分离选育效率。本文成功地利用这种相结合的方法筛选出了一株发酵速度和产酒精能力都有较大提高的 T4 突变菌株，这株菌在甜高粱汁摇瓶试验中酒精产量可以达到 9.8% ($V_{酒精}/V_{发酵液}$)，后期的几次中试实验也可达到 10.0%，相比出发菌株的 8.6% 酒精产量至少提高了 14%，而且发酵时间也比出发菌株缩短了近 12 h。初步的实验结果表明，该菌株在利用甜高粱汁进行工业化生产酒精中具有较大的潜力。

参考文献 (References):

[1] Wu Dali, Hou Suiwen, Li Wenjian. Nuclear Physics Review, 2008, 25(3): 287(in Chinese).
(吴大利, 侯岁稳, 李文建. 原子核物理评论, 2008, 25(3): 287.)

[2] Dong Xicun, Li Wenjian. Journal of Anhui Agri Sci 2008, 36(12): 4924 (in Chinese).
(董喜存, 李文建. 安徽农业科学, 2008, 36(12): 4924.)

[3] Fu Qijun. Guangxi Light Industry, 2001, (2): 6(in Chinese).
(傅其军. 广西轻工业, 2001, (2): 6.)

[4] Zhao Lixin, Zhang Yanli, Shen Fengju. Renewable Energy, 2005, (4): 37(in Chinese).
(赵立欣, 张艳丽, 沈丰菊. 可再生能源, 2005, (4): 37.)

[5] Cao Junfeng, Gao Boping, Gu Weibing. Acta Agriculture Boreal-occidentalis Sinica, 2006, 15(3): 201(in Chinese).
(曹俊峰, 高博平, 谷卫彬. 西北农业学报, 2006, 15(3): 201.)

[6] Gnansounou E, Dauriat A, Wyman C E. Bioresource Technology, 2005, 96: 985.

[7] Bulawayo B, Bvochora J M, Muzondo M I, et al. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 1996, 12: 357.

[8] Liu Ronghou, Li Jinxia, Shen Fei. Renewable Energy, 2008, 33(5): 1130.

[9] Wang Feng, Cheng Xiyu, Wu Tianxiang, et al. Liquor-making Science & Technology, 2006, 146(8): 41(in Chinese).
(王峰, 成喜雨, 吴天祥等. 酿酒科技. 2006, 146(8): 41.)

[10] Chen Weiping, Tu Jin, Xiong Janhua, et al. Wine Technology, 2003, (6): 35(in Chinese).
(陈卫平, 涂谨, 熊建华, 张凤英. 酿酒科技, 2003, (6): 35.)

[11] Wang Furong. Fermentation Industry Analysis. Beijing: Light Industry Publishing Company of China, 1980, 6—22(in Chinese).
(王福荣. 工业发酵分析. 北京: 中国轻工业出版社, 1980, 6—22.)

[12] Sun Qing, Zhao Ling, Sun Bo, et al. Renewable Energy, 2005, 124: 18(in Chinese).
(孙清, 赵玲, 孙波等. 可再生能源, 2005, 124: 18.)

[13] Wei Zengquan. Nuclear Physics Review, 2003 19(3): 38(in Chinese).
(卫增泉. 原子核物理评论, 2003, 19(3): 38.)

Study on Yeast Mutant with High Alcohol Yield Fermented in Sweet Sorghum Juice Using Carbon Ion Irradiation^{*}

YAN Ya-ping^{1, 2}, WANG Ju-fang^{1, #}, LU Dong^{1, 2}, DONG Xi-cun¹, GAO Feng¹, MA Liang¹, LI Wen-jian¹

(1 *Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;*

2 *Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*)

Abstract: Five mutants with high ability of producing alcohol were selected out by using TTC as an indicator after irradiation of the alcohol yeast with 100 MeV/u carbon ions. The fermentation experiment in sweet sorghum juice showed that the alcohol production ability of mutant T4 strain increased 18.6% compared to the control strain. The residual sugar content in the juice was decreased too. After that, the optimum fermentation conditions of the T4 strain in sweet sorghum juice were investigated. The results showed that the optimum temperature and pH value for fermentation were 30 °C and 4.5, respectively. The verification experiment was fermented in a 10 l bio-reactor and the obtained data indicated that the fermentative rate and the ability of producing alcohol in T4 strain was higher than that in the control strain under the same fermentation condition.

Key words: heavy ion beam; alcohol yeast; sweet sorghum juice; fermentation

* **Received date:** 14 Feb. 2009; **Revised date:** 17 May 2009

* **Foundation item:** Western Light Talents Training Program of Chinese Academy of Sciences(O606180XBO); Director Fund of Institute of Modern Physics, Chinese Academy Sciences(070612SZO)

Corresponding author: Wang Ju-fang, E-mail: jufangwang@impcas.ac.cn