

# 利用木糖产乙醇酵母菌株的构建

付 松

(安徽丰原生物化学股份有限公司, 安徽 蚌埠 233010)

**摘要:** 以酿酒酵母缺陷型(*Saccharomyces cerevisiae*)与黏红酵母(*Rhodotorula glutinis*)为亲本菌株, 分别采用聚乙二醇(PEG)和电击方法进行原生质体融合。对得到的融合细胞进行木糖发酵验证, 通过检测发酵液中乙醇的含量, 筛选出 1 株产乙醇的重组酵母菌株。利用该重组酵母进行木糖、葡萄糖共发酵, 发酵条件为接种量 3%, 发酵温度 27~30 ℃, pH 5.5~6.5, 发酵组分为 4%木糖、3%蛋白胨、2%酵母浸粉和 12%葡萄糖, 发酵周期 40 h, 结果重组酵母可发酵木糖, 木糖消耗速率明显低于葡萄糖, 乙醇浓度为 72 g/L。

**关键词:** 黏红酵母; 酿酒酵母; 原生质体融合; 乙醇发酵

**中图分类号:** TK6; Q939.97; Q815 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1463(2018)05-0014-04

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1463.2018.07.005

## Construction of Ethanol Yeast Strain Using Xylose

FU Song

(Anhui BBCA Biochemical Group Co., Ltd., Bengbu Anhui 233010, China)

**Abstract:** In this paper, *Saccharomyces cerevisiae* and *Rhodotorula glutinis* were used as parent strains, and protoplast fusion was performed using polyethylene glycol (PEG) and electroporation methods. The resulting fused cells were subjected to xylose fermentation verification. By detecting the ethanol content in the fermentation broth, a high-yield recombinant yeast strain was selected. The recombinant yeast was used for the co-fermentation of xylose and glucose. The fermentation conditions were as follows: inoculation amount 3%, fermentation temperature 27 ~ 30 ℃, pH 5.5 ~ 6.5, fermentation composition of 4% xylose, 3% peptone, 2% yeast extract and 12% glucose, fermentation cycle 40 h. The experimental results showed that the recombinant yeast could ferment xylose, but the consumption rate of xylose was significantly lower than that of glucose, and the ethanol yield could reach 72 g/L.

**Key words:** *Rhodotorula glutinis*; *Saccharomyces cerevisiae*; Protoplast fusion; Ethanol fermentation

随着能源的巨大需求和化石燃料的日渐枯竭, 人们加快了对新能源开发的节奏。可再生的清洁型能源乙醇被称为最具发展前景的液体燃料, 近几十年来, 人们不断加深对燃料乙醇的研究, 工艺技术也不断得到优化<sup>[1-2]</sup>。目前国内外多采用木质纤维为原料生产乙醇, 但工业技术上仍存在不足和缺陷<sup>[3]</sup>。

木质纤维原料通过各种物理、化学方法降解后, 微生物主要以降解后的木糖和葡萄糖为碳源生产乙醇, 而获得能发酵木糖、稳定遗传并且产乙醇的菌株成为问题的关键<sup>[4-5]</sup>。黏红酵母能发酵木糖产乙醇, 但产量低; 酿酒酵母是乙醇发酵的优良菌株, 但本身却缺乏木糖代谢途径。原生质体融合为基因重组的重要手段, 起源于 20 世纪 50 年代<sup>[6]</sup>。原生质体融合技术采用物理或化学方法使得遗传性状不同的细胞进行融合, 通过基因

或染色体的重组, 从而获得具有双亲遗传性状的新菌株。

原生质体融合是一种应用广泛且随机的基因重组方法, 具有不受微生物种族之间的限制, 克服远缘杂交的障碍等优点。作为一种高效育种技术, 该技术在抗生素、生物乙醇菌株选育中起到了至关重要的作用。张博润等<sup>[7]</sup>采用聚乙二醇(CaCl<sub>2</sub>/PEG)方法进行属间酿酒酵母的融合, 并对得到的融合子的交配型、细胞大小和含量进行检测, 证明不存在异核体, 融合是稳定的。20 世纪 80 年代以来, Zimmermann 等通过对微生物和植物原生质体、脂质体和动物细胞进行电场融合<sup>[8-11]</sup>, 为后续电击融合技术做了铺垫。自然界中广泛应用的酵母菌株为树干毕赤酵母(*Pichia stipitis*)、热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)和嗜单宁管囊酵母(*Pachysolen tannophilus*)等<sup>[12-14]</sup>。笔者采用 PEG

收稿日期: 2018-05-29

作者简介: 付松(1977—), 男, 安徽合肥人, 工程师, 主要从事生物发酵工作。Email: BBCABIOTECH@gmail.com。

和电击方法将酿酒酵母缺陷型和黏红酵母融合,成功构建筛选出1株产乙醇的新菌株。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 菌株 黏红酵母(*Rhodotorula glutinis*)CGM-CC2.704 购于中国普通微生物菌种保藏管理中心。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)CICC1292 由安徽丰原生物化学股份有限公司实验室保存并提供。

1.1.2 试剂 磷酸缓冲液(PB):三水合磷酸氢二钾0.87 g,磷酸二氢钾8.34 g,蒸馏水定容至1 L。预处理剂:EDTA 0.1 g,β-巯基乙醇0.1 mL(100 mL磷酸缓冲液)。高渗磷酸缓冲液(PBS):100 mL PB中加蔗糖17 g。蜗牛酶液:PBS配制,0.22 μm 无菌过滤器过滤。CaCl<sub>2</sub>溶液:0.5 mol/L。PEG溶液:PB中加35% PEG(MW=6 000)和CaCl<sub>2</sub> 10 mmol/L。以上溶液(除酶液)均在121 ℃灭菌20 min。

1.1.3 培养基 YNB培养基、YPD培养基、再生培养基。

### 1.2 酿酒酵母缺陷型突变株的获得

1.2.1 菌种活化 将酿酒酵母接种于YPD斜面培养基上,在27~30 ℃恒温培养箱中培养2 d,重复1~2次。菌种活化后,用灭菌牙签挑取适量酿酒酵母单菌落接种于YPD液体培养基,27~30 ℃,220 r/min,摇床培养14~16 h。培养菌体生长到对数生长期OD<sub>600</sub>=1.0~1.5时,该酵母即用作突变株。

1.2.2 菌株突变及筛选 取适量上述酵母,4 500 r/min下离心5 min收集菌体,ddH<sub>2</sub>O洗涤2次,将菌体于10 mL柠檬酸缓冲液中悬浮。添加亚硝基胍(NTG,化学诱变剂)至终浓度为120 μg/mL。室温下摇床振荡培养1 h,于4 500 r/min下离心5 min收集菌体,ddH<sub>2</sub>O洗涤2次后接入100 mL YNB培养基中,30 ℃培养3 h。之后添加制霉菌素至终浓度为25 μg/mL,于28 ℃培养3 h,4 500 r/min下离心5 min后收集菌体,ddH<sub>2</sub>O洗涤2次后于1 mL ddH<sub>2</sub>O中悬浮,最后将悬浮液稀释并涂布于YNB培养基(含5-FOA、尿嘧啶及尿苷)上筛选缺陷型突变株。

### 1.3 原生质体的制备

1.3.1 菌种活化 操作方法同1.2.1。

1.3.2 制备方法 分别将菌种营养缺陷型酿酒酵母(*S. cerevisiae* CICC1292)和黏红酵母(*R. glutinis* CGMCC2.704)活化,接入30 mL YPD培养基中,30 ℃、200 r/min下培养10~12 h后收集菌体,细胞数稀释为1.0×10<sup>7</sup>~2.0×10<sup>7</sup>个/mL,ddH<sub>2</sub>O洗涤

2次后加预处理剂,30 ℃保温20~25 min后将预处理剂离心去除,再用高渗缓冲液洗涤1次,添加蜗牛酶液,于30 ℃振荡培养,定点取样微检,停止酶解(大约90%的细胞变成原生质体),3 000 r/min,10 min离心去酶后,2次渗透压稳定剂洗涤,于稳渗剂中悬浮,备用。

### 1.4 原生质体的融合、鉴定

1.4.1 电击融合 将2种原生质体各取1 mL进行离心,CaCl<sub>2</sub>洗涤,Bio-Rad电转仪进行电转(5 kV/cm,25 F,200 Ω),时间30 ms。

1.4.2 PEG融合 将2种原生质体各取1 mL进行离心,CaCl<sub>2</sub>洗涤,加入PEG-CaCl<sub>2</sub> 2 mL,30 ℃振荡融合30 min。用高渗缓冲液洗涤2次。

1.4.3 融合子鉴定 将电击融合后的细胞涂布于高渗固体培养基(不含有尿苷、尿嘧啶)上,将PEG融合后的稀释液涂布于再生培养基(不含有尿苷、尿嘧啶)上,于30 ℃下培养2~3 d,筛选融合子。由于营养缺陷型细胞不能在缺乏尿苷、尿嘧啶的培养基上生长,原生质体融合后即可恢复为原养型,即融合子能在不含尿苷、尿嘧啶的培养基上生长。通过对其细胞体积观察进行融合子确定。

### 1.5 融合子发酵木糖的筛选

将筛选得到的酿酒酵母和黏红酵母融合子涂布于含3%木糖的YPD平板上,筛选出菌落较大的菌株,通过不断提高木糖浓度和多次传代培养,挑选较好的菌株于6%木糖的YPD平板上。2~3 d后挑取较大菌落进行木糖发酵,发酵液成分为4%木糖、3%蛋白胍、2%酵母浸粉和12%葡萄糖,通过检测乙醇含量筛选产乙醇的菌株。进行多次优化筛选,最终筛选出乙醇产量较高的重组菌株。

### 1.6 木糖、葡萄糖共发酵

1.6.1 融合子的活化 具体操作方法同1.2.1。

1.6.2 发酵方法 取活化后的酵母,以3%的接种量进行微氧发酵,发酵温度27~30 ℃,pH 5.5~6.5,发酵组分为4%木糖、3%蛋白胍、2%酵母浸粉和12%葡萄糖,定时测定发酵液中的木糖、葡萄糖消耗量及乙醇产量。

## 2 结果与分析

### 2.1 原生质体的制备

以活化后的酿酒酵母营养缺陷型和黏红酵母为亲本菌株,在预处理剂、高渗缓冲液以及蜗牛酶液等一系列处理后,经显微镜镜检观察,发现视野范围内的大部分细胞体积增大,说明成功制

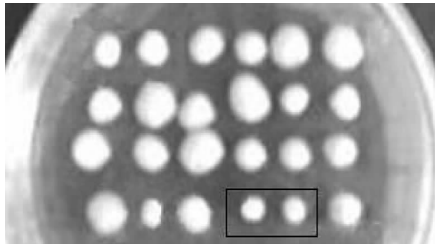
备了原生质体。具体形态见图 1。



图 1 制备的原生质体

## 2.2 融合子的筛选

将原生质体经电击和 PEG 融合后涂布在再生培养基上(不含尿苷、尿嘧啶),通过观察发现,融合后的细胞体积和 DNA 含量约为 2 个亲本菌株的 2 倍,而未融合的细胞体积明显小于已融合的细胞,说明原生质体融合成功。融合子细胞形态见图 2。



注:方框内为对照。

图 2 融合子的筛选

## 2.3 木糖、葡萄糖共发酵

将多次筛选得到的较大菌落的融合子,以 3% 接种量、发酵温度 27~30 ℃、pH 5.5~6.5,发酵液组分 4% 木糖、3% 蛋白胨、2% 酵母浸粉和 12% 葡萄糖为条件进行发酵,发酵周期 40 h。每隔 5 h 进行定点取样,检测木糖、葡萄糖的消耗量和乙醇产量。

从图 3 可以看出,重组酵母可在上述条件下消耗木糖,同时观察到在 30 h 内葡萄糖被全部消耗,说明木糖的消耗速率明显低于葡萄糖,即重组酵母可发酵木糖,乙醇浓度为 72 g/L。

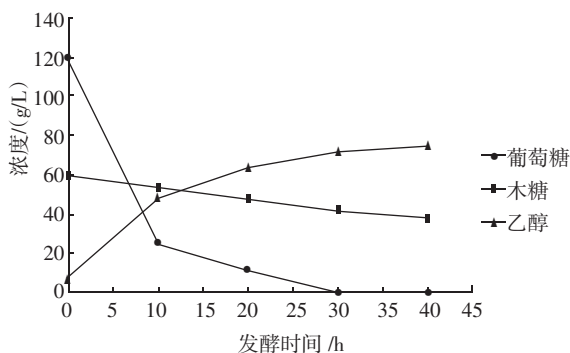


图 3 融合子共发酵葡萄糖及木糖生产乙醇曲线

## 3 结论

试验利用酿酒酵母营养缺陷型与黏红酵母为亲本菌株,采用原生质体融合技术获得重组酵母。重组酵母既能利用木糖,又能产乙醇。发现 PEG 等化学诱导剂为细胞毒素,细胞融合后需立即洗涤,而电场融合没有任何后效应。电击融合的效率,设备、步骤简单。木糖发酵试验表明,在 3% 接种量、发酵温度 27~30 ℃、pH 5.5~6.5,发酵液组分 4% 木糖、3% 蛋白胨、2% 酵母浸粉和 12% 葡萄糖的条件下可发酵木糖,乙醇浓度为 72 g/L。

## 参考文献:

- [1] BALAT M, BALAT H, Z C. Progress in bioethanol processing[J]. Progress in Energy and Combustion Science, 2008, 34(5): 551-573.
- [2] SAXENA R C, ADHIKARI D K, GOYAL H B. Biomass-based energy fuel through biochemical routes: A review[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2009, 13(1): 167-178.
- [3] 闭帅珠, 彭林才, 陈克利. 蔗渣纤维素乙醇的预处理技术研究进展[J]. 生物质化学工程, 2016, 50(2): 53-60.
- [4] 马 斌, 储秋露, 朱均均, 等. 4 种木质纤维素预处理方法的比较[J]. 林产化学与工业, 2013, 33(2): 25-30.
- [5] 曹 萌, 官彦婷, 张 宜, 等. 生产纤维乙醇的原生质融合菌株的构建[J]. 太阳能学报, 2011, 32(7): 1046-1051.
- [6] 孙剑秋, 周东坡. 微生物原生质体技术[J]. 生物学通报, 2002, 37(7): 9-11.
- [7] 张博润, 王永红, 刘书锋, 等. 酿酒酵母原生质体的融合[J]. 微生物学通报, 1986(2): 65-67.
- [8] ZIMMERMANN U, VIENKEN J. Electric field-induced cell-to-cell fusion[J]. Journal of Membrane Biology, 1982, 67(3): 165-182.
- [9] ZIMMERMANN U. Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena[J]. Biochim. Biophys. Acta., 1982, 694(3): 227-277.
- [10] BERG H, AUGSTEN K, BAUER E, et al. Possibilities of cell fusion and transformation by electrostimulation[J]. Bioelectrochemistry & Bioenergetics, 1984, 12(1-2): 119-133.
- [11] 汪和陆, 鲁玉瓦. 电场诱导细胞融合[J]. 生物化学与生物物理进展, 1985(3): 52-58.
- [12] GRABEK-LEJKO D, RYABOVA O B, OKLEJEWICZ B, et al. Plate ethanol-screening assay for selection of the *Pichia stipitis* and *Hansenula polymorpha* yeast mutants with altered capability for xylose alcoholic ferment-



# 中药材低氧高氮仓储气体环境创建方法研究

王学喜<sup>1,2</sup>, 吴小华<sup>1,2</sup>, 颀敏华<sup>1,2</sup>, 陈柏<sup>1,2</sup>, 石建业<sup>3</sup>

(1. 甘肃省农业科学院农产品贮藏加工研究所, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃省农产品贮藏加工工程技术研究中心, 甘肃 兰州 730070; 3. 定西市农业科学研究院, 甘肃 定西 743000)

**摘要:** 以甘肃道地大宗中药材当归、黄芪、党参干燥品为试验材料, 通过筛选帐膜材料及气体置换方法, 建立中药材低氧高氮仓储气体环境, 并对低氧高氮仓储环境下3种中药材的虫蛀、霉变情况及主效成分保持效果进行评价。结果表明, 应用0.18 mm TPU膜、0.12 mm PVC膜和0.12 mm PE膜, 采用排气法、负压抽洗法、循环制氮充气法均可创建出适于中药材仓储的低氧高氮气体环境。在该环境下仓储当归、黄芪和党参1 a, 中药材不生虫、不发霉, 有效成分含量显著高于空气仓储, 保质期可延长7个月以上。

**关键词:** 当归; 黄芪; 党参; 低氧高氮; 仓储气体环境; 有效成分

**中图分类号:** S567; R282.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1463(2018)07-0017-04

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1463.2018.07.006

## Study on the Establishment of Low-Oxygen and High-Nitrogen Gas Environment for Chinese Herbal Medicine Storage

WANG Xuexi<sup>1,2</sup>, WU Xiaohua<sup>1,2</sup>, XIE Minhua<sup>1,2</sup>, CHEN Bai<sup>1,2</sup>, SHI Jianye<sup>3</sup>

(1. Agricultural Product Storage and Processing Research Institute, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China; 2. Engineering and Technology Research Center for Agricultural Product Storage and Processing of Gansu Province, Lanzhou Gansu 730070, China; 3. Dingxi Academy of Agricultural Sciences, Dingxi Gansu 743000, China)

**Abstract:** With dried products of Danggui, Huangqi and Dangshen of Chinese medicinal herbs in Gansu as the experimental materials, the screening film material and gas replacement methods were used to establish a low-oxygen and high-nitrogen gas environment for Chinese herbal medicines storage, and the effects on control of insect moth, mildew and retention of main effective components of three kinds of Chinese medicinal materials were evaluated under the low oxygen and high nitrogen storage conditions. The results show that 0.18 mm TPU film, 0.12 mm PVC film and 0.12 mm PE film can be used to create a suitable low oxygen and high nitrogen gas environment for storage of Chinese medicinal materials by exhaust method, negative pressure gas extraction method and cyclic nitrogen charging method. The application of this environment to store Danggui, Huangqi, and Dangshen for one year can avoid insects and mildews, and the content of the effective component is significantly higher than that in the air storage, and the shelf life can be prolonged for more than 7 months.

**Key words:** Danggui; Haugnqi; Dangshen; Low-oxygen and high-nitrogen; Gas environment for storage; Effective component

甘肃省是全国中药材优势主产区之一, 也是国家重要的中药原料生产供应保障基地<sup>[1-2]</sup>。2017年全省中药材种植面积30万hm<sup>2</sup>, 产量118万t, 种植面积和产量均居全国第一, 中药材生产呈现持续规模化发展的强劲势头<sup>[3]</sup>。但大部分中药材

在仓储过程中, 极易发生虫蛀和霉变, 氧化褐变导致色泽暗淡、药效降低。为解决上述问题, 生产上常采用硫磺熏蒸, 引起中药材安全性问题<sup>[4-7]</sup>。硫磺熏蒸遭到限制后, 又应用比硫磺毒性更强的磷化铝进行处理, 中药材仓储的安全隐患依然严

收稿日期: 2018-06-06

基金项目: 甘肃省农业科学院创新项目“甘肃道地大宗中药材低氧无硫绿色仓储技术研究示范”(2016GAAS23)。

作者简介: 王学喜(1969—), 男, 甘肃武威人, 副研究员, 主要从事农产品贮藏加工研究工作。联系电话: (0)13893113223。

通信作者: 吴小华(1984—), 女, 甘肃靖远人, 助理研究员, 硕士, 主要从事农产品贮藏加工研究工作。Email: wuxiaohua.84@163.com。

tation[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2006, 33: 934-940.

[13] 林影, 张聚宝, 向柱方. 假丝酵母 *Candida* sp. 木糖发酵生产乙醇[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2006, 34(5): 33-36.

[14] 刘天霞, 宋彦彦, 张鹏. 嗜单宁管囊酵母木糖酒精发酵的研究[J]. 纤维素科学与技术, 2005, 13(1): 11-16.

(本文责编: 郑丹丹)