

文章编号:1673-1689(2006)02-0083-05

同步糖化发酵菊芋生产酒精中黑曲霉菌株的选育

葛向阳¹, 张伟国^{1,2}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214036)

摘要: 使用以菊粉为惟一碳源的培养基从自然界中分离出 6 株产菊粉酶较强的菌种, 其中黑曲霉 SL-08 还可以最大程度地提高塞尔维亚酵母 Z-06 的发酵活力和耐酒精能力, 通过紫外和亚硝基胍诱变, 得到菌株 SL-09, 酶活提高近两倍。以菊芋粉为底物, 利用黑曲霉 SL-09 和塞尔维亚酵母 Z-06 采用同步糖化与发酵法, 30 °C 发酵 60 h, 使发酵酒精体积分数达到 19.0%, 转化率为理论转化率的 86%。

关键词: 菊芋; 酒精; 黑曲霉; 菊粉酶

中图分类号: TQ 920

文献标识码: A

Screening *Aspergillus niger* for Production of Ethanol from Jerusalem Artichoke Flour by Simultaneous Saccharification and Fermentation

GE Xiang-yang¹, ZHANG Wei-guo^{1,2}

(1. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036 China; 2. School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Six inulinase producing fungi strains were isolated from soil by a medium using inulin as unique carbon source. Among them, *Aspergillus niger* SL-08, which strongly enhanced the fermentation activity and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* Z-06, was subjected to UV and NTG mutagenesis. As a result, *Aspergillus niger* SL-09 was obtained and the enzyme activities were enhanced to a level, which was about two folds higher than that of the original strain. 19.0% of ethanol was produced from *Jerusalem artichoke* flour within 60 h of fermentation by simultaneous saccharification and fermentation using *Aspergillus niger* SL-09 and *Saccharomyces cerevisiae* Z-06. The conversion yield from *Jerusalem artichoke* to ethanol reached 86% of the theoretical value.

Key words: *Jerusalem artichoke*; ethanol; *Aspergillus niger*; inulinase

菊芋原产于北美温带地区, 17 世纪传入欧洲, 该植株不但营养丰富, 而且耐寒、耐旱、抗病虫害, 一次种植终生收益, 并能较好地生长在极其贫瘠的

土地上, 所以近年来在国内外受到普遍的关注, 种植面积也逐渐扩大。自 20 世纪 30 年代以来利用菊芋生产酒精的研究不断深入, 较为常用的工艺有两

收稿日期: 2005-05-18; 修回日期: 2005-06-20.

作者简介: 葛向阳(1974-), 男, 江苏徐州人, 发酵工程硕士研究生。

步法,即先糖化后发酵,该工艺成本较高;另一种为一步法,是利用具有产菊粉酶的酵母,直接发酵生产酒精,该法的最终发酵醪酒精含量较低,同时二者的转化率也较低^[1~3]。

20世纪90年代开始出现利用菊芋同步法生产酒精,但周期长达5 d^[4]。作者从自然界中经过反复筛选得到一株更适合同步法利用菊芋生产酒精的黑曲霉,并采用新的生产工艺,从而缩短60%的发酵周期,同时达到较高的转化率。

1 材料与方 法

1.1 菌种

黑曲霉 SL-08 (*A. niger* SL-08) 选自甘肃产菊芋根部的土壤中,采用马铃薯培养基^[5],30℃培养3 d,4℃保藏,每月转接一次。各菌株鉴定参照《真菌的形态与鉴定》进行^[6]。酒精酵母由作者所在实验室分离、驯化并保藏的塞尔维亚酵母 Z-06 (*S. cerevisiae* Z-06),具有一定的耐酒精能力。该菌株在麦芽汁琼脂培养基^[5]斜面上培养,4℃保藏。

1.2 原料

菊芋由甘肃雄鹰农产品公司惠赠,菊芋粉的制备是将洗净去皮的鲜菊芋切成薄片,60℃风干48 h,使水分降到5%左右,然后粉碎过筛。

1.3 培养基

1.3.1 酵母种子培养基 酵母膏 10 g/L,蛋白胨 20 g/L,葡萄糖 20 g/L,自然 pH,121℃灭菌 15 min。

1.3.2 黑曲霉选择性培养基 菊粉 20 g/L,NaNO₃ 3 g/L,KCl 0.5 g/L,K₂HPO₄ 1 g/L,FeSO₄·7H₂O 0.001 g/L,MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L,(NH₄)H₂PO₄ 2 g/L,去氧胆酸钠 1 g/L,琼脂 20 g/L,pH 6.7,121℃灭菌 15 min。

1.3.3 黑曲霉摇瓶产酶培养基成分 蔗糖 30 g/L,蔗糖酯 5 g/L,(NH₄)₂HPO₄ 12 g/L,KCl 0.7 g/L,MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L,FeSO₄·7H₂O 0.001 g/L,pH 4.5,121℃灭菌 15 min。

1.4 方 法

1.4.1 酶活的测定 菊粉酶的活力分为内切酶活力和外切酶活力,分别用 I 和 S 表示。测量方法依据 Pessoni 等人的报道进行^[7],内切酶活力的测定是以菊粉作为底物,取 1 mL 稀释酶液加入 4 mL 2%的菊糖溶液(0.2 mol/L,pH 4.5的醋酸缓冲液配制),50℃反应 30 min,以每分钟转化底物成为 1 μmol 还原糖所需的酶量为一个活力单位。外切酶活力的测定是以 2%蔗糖溶液代替菊糖溶液,按上

述操作,以每分钟转化底物成为 1 μmol 还原糖所需的酶量为一个活力单位。I/S 值反映了内切酶活力和外切酶活力的比值,该值大则反映了该酶的内切活力相对较高,反之则表示其外切活力相对较高。

1.4.2 黑曲霉的初筛 将鲜菊芋周围的土用无菌水洗下,稀释,并均匀涂布于选择性平板上,30℃培养 48 h,选择透明圈较大的菌落进行摇瓶实验,检测菊粉酶活力,选出酶活较高的菌株继续进行酒精发酵实验,检测其对酵母活力和耐酒精能力提高的程度,筛选出用于进一步诱变的菌株。

1.4.3 黑曲霉产酶实验 将初筛得到的菌株分别接入装有 120 mL 产酶培养基的 500 mL 烧瓶中,30℃摇瓶培养(140 r/min),24 h 后每瓶中加入 1 g 碳酸钙以维持 pH 值的稳定。定时取样,用 pH 5.6 的醋酸缓冲液稀释,5 000 r/min 离心 5 min,取上清液进行酶活的测定。

1.4.4 紫外线与亚硝基胍复合诱变 先作诱变剂对菌株的致死曲线,选择诱变剂量,再进行诱变育种。将诱变后的菌株接种在选择性培养基上培养,以透明圈大小挑选产酶较强的菌株,然后进行摇瓶复筛。

1.4.5 酵母种子的制备 从斜面上取一环酵母接入装有 100 mL 种子培养基的 500 mL 烧瓶中,30℃摇瓶(140 r/min)培养 30 h。在 4℃5 000 r/min 离心发酵液 5 min,收集酵母细胞。

1.4.6 发酵实验 以蔗糖作为底物来确定各黑曲霉菌丝体对酒精酵母耐酒精能力的影响。将成熟的酵母种子培养基离心,再把细胞重新均匀地分散于 150 mL、30℃摇瓶培养 4 d 的黑曲霉 SL-09 培养液中,补加蔗糖 30 g,(NH₄)₂SO₄ 0.45 g,KH₂PO₄ 0.15 g,调 pH 5.0,并使酵母细胞浓度为 10⁸ 个/mL,30℃于 250 mL 烧瓶中静态发酵,小剂量的蔗糖不间断地加入到发酵醪中,以使蔗糖浓度维持在抑制浓度以下。各发酵瓶均配置装有 30% 浓硫酸的发酵栓,发酵产生的 CO₂ 通过发酵栓被排放出去,以维持发酵瓶的厌氧环境。由于 CO₂ 的释放,发酵醪质量将减轻,可以通过发酵醪所减少的质量来计算所消耗的糖量:理论上释放 CO₂ 的量(g)×2.16 = 总耗糖量(g)×90%。发酵结束后,将发酵醪于 4℃,5 000 r/min 离心 5 min,取上清液检测酒精含量,并比较各自的发酵结果。

1.4.7 同步发酵实验 在装有 200 mL 质量浓度为 25 g/dL 的菊芋粉的 500 mL 发酵瓶中加入酵母种子,混合均匀,使酵母浓度为 10⁸ 个/mL,安装发酵栓,30℃静态发酵。通过发酵醪质量的减轻速

度来确定发酵强度,6 h 后加入 60 mL 30 ℃ 摇瓶培养 4 d 的黑曲霉 SL-09 培养液,继续发酵 6 h 后将 40 g 菊芋粉均匀地混入发酵醪中,另外的 30 g 菊芋粉在随后的 15 h 后加入,60 h 后发酵终止。

1.4.8 检测方法

1)还原糖的检测:采用 DNS 法^[8],用果糖作标样绘制 DNS 显色的标准曲线。

2)酵母计数:使用血球计数板。

3)pH 值:采用精密酸度计测量。

4)酒精体积分数的测定:离心发酵醪,除去细胞,取 100 mL 上清液,加入 100 mL 蒸馏水后蒸馏出 100 mL 冷凝液,测量馏出液酒精浓度^[9]。

5)菌体密度的测量:过滤培养液收集菌丝体,冷冻干燥至衡重,用每升培养液中干菌丝体的质量表示菌体密度;

6)总糖的测定:采用酸水解法^[10]。

2 结果

2.1 黑曲霉 SL-08 的选育

反复筛选得到 6 株产酶较强的菌株,产酶活力见图 1 所示。青霉产酶活力最强,其次为两株黑曲霉,两株米曲霉和一株木霉产酶能力最弱。

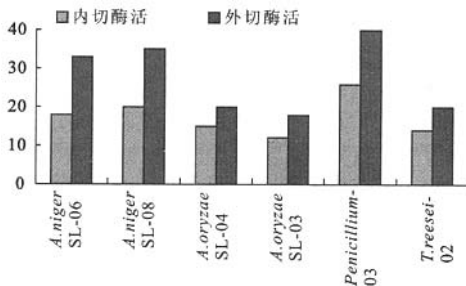


图 1 从土壤中分离出的 6 株产菊粉酶较强菌株的产酶量

Fig.1 Enzyme activity of various strains isolated directly from soil

2.2 发酵实验

将青霉-01 和两株黑曲霉被用来进行发酵实验,并以不含有任何菌丝体的实验做为参照,结果见图 2。从图 2 可以看出,尽管青霉菌株产酶活力较强,但该菌株对酵母的发酵活性和耐酒精能力基本没有促进作用。然而,黑曲霉、特别是黑曲霉 SL-08,其发酵进行 72 h 后,酒精体积分数达到 20%,所以该菌株的菌丝体对酵母的发酵活力和耐酒精能力有较弱的提高作用,这大概是由于黑曲霉 SL-09 的菌丝体含有丰富的脂蛋白(PL),这种物质已被验证可以较大幅度地提高酵母的发酵活力和耐

酒精能力^[11]。

图 2 3 株高产菊粉酶菌种的酒精发酵

Fig.2 Fermentation tests of the three strains with high enzyme activities

2.3 黑曲霉的诱变

2.3.1 黑曲霉 SL-08 的 UV 诱变 紫外线对黑曲霉 SL-08 菌株的致死曲线见图 3。其它报道中采用紫外线诱变的最佳正突变率所对应的致死率一般为 60%~70%,因此作者采用的紫外线诱变的致死率为 62%,以此确定诱变剂量(即 15 W 紫外灯,10 cm 距离,照射时间为 120 s)诱变处理孢子悬液,经选择性平板培养初筛,摇瓶复筛,获得产酶活力较强的突变株黑曲霉 SL-082,其产菊粉酶活力和转化酶获利分别达到 30 U/mL 和 52 U/mL,较出发菌提高了近 50%。

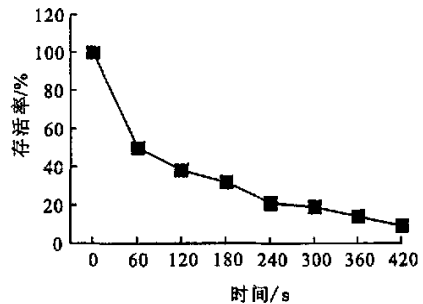


图 3 紫外线对黑曲霉 SL-08 的致死曲线

Fig.3 Lethality curve of Aspergillus niger SL-08 subjected to UV mutagenesis

2.3.2 黑曲霉 SL-082 的 NTG 诱变 采用亚硝基胍对黑曲霉 SL-082 进行诱变,亚硝基胍对黑曲霉 SL-082 的致死曲线见图 4。许多研究表明,采用亚硝基胍诱变的最佳致死率一般应为 90%左右。作者采用的亚硝基胍诱变的致死率为 90%,由此确定诱变剂量(亚硝基胍质量浓度为 1.0 g/L, 37 ℃ 下处理 90 min)处理样品,经选择性平板初筛,摇瓶复筛,获得突变株黑曲霉 SL-09,其内切酶活力和外切酶活力分别达到 54 U/mL 和 92 U/mL,较出发菌提高了近两倍。将该株菌在 30 ℃ 摇瓶培养 4

d, 并进行发酵实验, 结果见表 1。

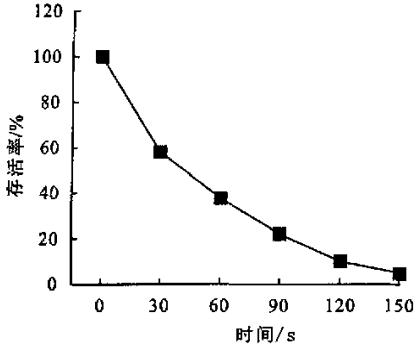


图 4 NTG 对黑曲霉 SL-08 的致死曲线

Fig. 4 Lethality curve of *Aspergillus niger* SL-08 sub-jected to NTG mutagenesis

由表 1 可见, 该酶的 I 和 S 值在培养 4 d 后分别达到 54 U/mL 和 92 U/mL; I/S 值接近 0.6, 这一点与 Nakamura 等人^[4]所采用的黑曲霉 817 有很大的差别, 黑曲霉 817 在摇瓶培养 5 d 后, I 和 S 值分别为 68.5 U/mL 和 8.8 U/mL, I/S 值为 7.8; 因此黑曲霉 SL-09 的发酵液显示出极强的外切酶

活性。黑曲霉-09 的菌丝体由于含有丰富的脂蛋白 (PL), 所以在经过 60 h 的发酵, 使发酵醪酒精体积分数达到 21%^[11]。

表 1 黑曲霉 SL-09 的产酶和酒精发酵试验结果

Tab. 1 Enzyme production and ethanol test of *A. niger* SL-09

参数	结果
内切酶活/(U/mL)	54
外切酶活/(U/mL)	92
I/S	0.59
发酵时间/h	60
酒精体积分数/%	21

2.3.3 黑曲霉 SL-09 的诱变谱系 黑曲霉 SL-09 的诱变谱系见图 5。通过 UV 和 NTG 诱变, 使菌株的酶活提高了近 2 倍, 而所产酶的 I/S 值基本保持恒定, 维持着较高的外切酶活力。比较 UV 和 NTG 诱变结果可以看出, NTG 在提高菊粉酶活力上是一种更为有效的诱变方法^[12]。

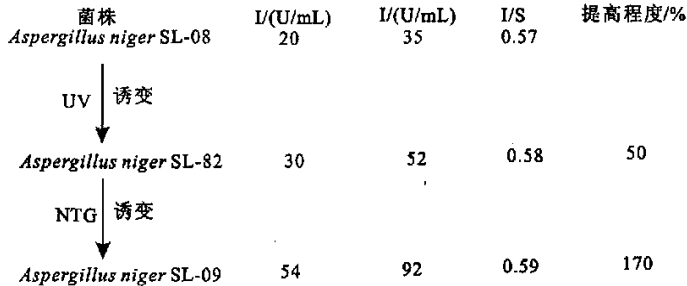


图 5 黑曲霉 SL-09 的诱变谱系

Fig. 5 Mutagenesis pedigree of *Aspergillus niger* SL-09

2.4 黑曲霉 SL-09 传代稳定性研究

将黑曲霉 SL-09 菌株在斜面培养基上传代 5 次, 每次接种产酶培养基, 30 °C 摇瓶培养 4 d 后测定酶活, 结果内切酶活力仍然保持在 50 U/mL 以上, 同时外切酶活力也维持在 90 U/mL 左右。表现出较好的传代稳定性。

2.5 同步糖化与发酵

为了最大程度地降低高浓度糖对酵母活力的抑制作用, 同时提高糖对酒精的转化率, 在发酵的初期不加入糖化剂, 而是在酵母将大部分可直接发酵的糖耗尽后开始糖化, 然后才添加菊芋粉, 使最终发酵醪的酒精体积分数达到最大。在发酵的过程中定时取样、离心、进行残糖分析, 结果见图 6。

由于菊芋粉中含有部分单糖、二糖、酵母、可直接利

用的低聚糖以及各种氮源和矿物质, 而且不存在酒精和 CO₂ 的抑制作用, 所以发酵初期酵母活力最大, 生产强度为 7.5 g/(L·h), 酵母可以直接利用总糖的 65%。在酒精发酵过程中, 酵母迅速地消耗单糖, 从而消除了菊粉酶水解菊粉的产物抑制, 这样更有利于发酵迅速而彻底地进行。对菊芋粉的加入酵母有一个短暂的适应期, 随后活力逐渐恢复。随着酒精体积分数的升高, 酵母活力逐渐下降, 总发酵 60 h 后终止, 最终酒精体积分数为 19.0%, 转化率为理论转化率的 86%。

3 讨论

由于鲜菊芋的水分在 75% 左右, 总糖质量分数为 20% 左右, 所以直接利用菊芋的根茎发酵生产酒

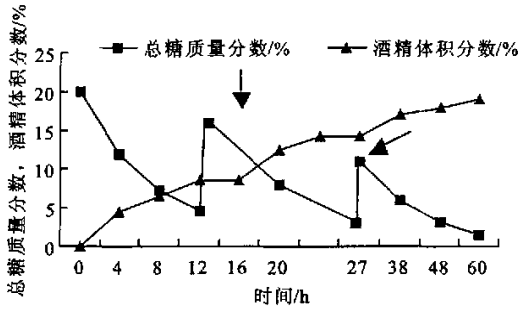


图 6 黑曲霉 SL-09 与塞尔维亚酵母 Z-06 同步糖化发酵菊芋生产酒精(箭头表示分别在发酵 12 h 和 27 h 后添加 40 g 和 30 g 菊芋粉)

Fig. 6 Simultaneous saccharification and fermentation of Jerusalem artichoke to ethanol by *Aspergillus niger* SL-09 and *Saccharomyces cerevisiae* Z-06

精的最终发酵酒精体积分数低于 11%，经浓缩的菊芋汁由于糖的浓度较高，抑制了酵母的活力，使其发酵最终酒精体积分数低于 15%，而且发酵不彻底，周期较长^[4,13]。虽然直接利用经提纯的菊粉，采用同步法经过 3 d 的发酵可以把酒精体积分数提高到 21.3%^[14]，但菊粉价格目前较高，不适合用于酒精的生产。为了降低菊芋发酵生产酒精的成本，同时提高发酵最终酒精体积分数，作者采用菊芋粉作为介质来进行同步糖化与发酵，在整个发酵过

程中无需添加无机盐。由于在发酵过程中糖的质量分数始终保持在较低的水平，使酶活和酵母的活力都得到了充分的发挥，所以将发酵周期缩短到了 60 h，转化率为理论转化率的 86%。

黑曲霉是最为常用的菊粉酶生产菌，该菌种由于易于培养而且产酶特性稳定而被应用于工业化生产^[15]。黑曲霉 SL-09 是从 6 株产菊粉酶活力较强的菌种中筛选出来，然后采用不同的诱变方法经过反复诱变得到的，它不但高产菊粉酶，而且其外切酶活力较强，从而更有利于快速彻底地发酵菊芋生产酒精。该菌株的菌丝体还可以较大幅度地提高酵母的发酵活力和耐酒精能力，这可能是其菌丝体富含脂蛋白(PL)的缘故^[11]。有趣的是，在研究中发现曲霉的其它几个菌株也高产菊粉酶，但是对酵母的活力始终没有激活作用，这大概是其菌丝体的组成与作者所采用的黑曲霉菌丝体的组成有所差异的原因。

为了最大限度地提高转化率，缩短发酵周期，在酒精达到最高抑制浓度之前，应在保留酵母活力的前提下将总糖降至最低，然后再补加菊芋粉，因为实验发现，发酵初始总糖质量分数越高，则其被消耗的速度就越慢，发酵结束时残糖质量分数就越高，转化率就越低，此结论与 Atiyeh 等人^[16]的报道一致。

参考文献:

- [1] Vandamme E J, Derycke D J. Microbial inulinase: Fermentation process, properties, and application[J]. *Adv Appl Microbiol*, 1983, 29: 139-176.
- [2] Guiraud J P, Daurelles J, Galzy P. Alcohol production from Jerusalem artichoke using yeasts with inulinase activity[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1981, 23: 487-493.
- [3] Guiraud J P, Caillaud J M, Gazy P. Optimization of alcohol production from Jerusalem artichoke[J]. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol*, 1982, 14: 81-85.
- [4] Nakamura T, Ogata Y, Hamada S, et al. Ethanol production from Jerusalem artichoke tubers by *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *J Ferment Bioeng*, 1996, 81: 564-566.
- [5] 沈萍, 范秀荣, 李广武. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999. 214-222.
- [6] 戴芳澜. 真菌的形态与鉴定[M]. 北京: 科学出版社, 1987. 25-30.
- [7] Pessoni R A B, Figueiredo-Ribeiro R C I, Braga M R. Extracellular inulinase from *Penicillium janczewskii*, a fungus isolated from the rhizosphere of *Vernonia herbacea*[J]. *J Appl Microbiol*, 1999, 87: 141-147.
- [8] 清华大学生化系编. 生物化学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 1979. 50-56.
- [9] 章克昌. 酒精工业手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1997. 140-151.
- [10] 天津轻工业学院, 大连轻工业学院, 无锡轻工业学院编. 工业发酵分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994. 6-15.
- [11] Hayashida S, Ohta K. Effects of phosphatidylcholine or ergosteryl oleate on physiological properties of *Saccharomyces sake*[J]. *Agric Biol Chem*, 1980, 44: 2561-2567.
- [12] Skowronek M, Fiedurek J. Selection of biochemical mutants of *Aspergillus niger* resistant to some abiotic stresses with increased inulinase production[J]. *J Appl Microbiol*, 2003, 95: 686-691.

(下转第 92 页)

数低的清爽型黄酒创造了机会,另外,由于蛋白质的降解性降低,大部分蛋白质在酿造结束后随米渣被过滤除去,也有望提高成品黄酒的非生物稳定性。

3 结 论

大米经过高温流化 α -化后体积膨胀,淀粉晶体从紧密的球状变成松散片状,比表面积增大,更容易被淀粉酶降解,表明高温流化 α -化工艺与蒸煮具有相同的使淀粉糊化的能力,但机理完全不同。高

温流化 α -化是一种“干法”糊化技术,和蒸煮工艺相比,无高浓度废水污染;高温流化 α -化后水分质量分数急剧降低,降低了处理后污染杂菌和淀粉老化的可能性,从而提高了原料的利用率;糊化率与蒸饭法持平,脂肪去除率略高于蒸饭法,降低了脂肪对成品酒风味的不利影响,尤其适合我国以糙米为原料的酿造酒生产;糯米高温流化 α -化处理后,可降解氮质量分数降低,为酿造低氨基酸质量分数的清爽型酿造酒、提高黄酒的稳定性创造了机会。

参考文献:

- [1] 周家琪. 黄酒生产工艺(第二版)[M]. 北京:中国轻工业出版社,1996.
- [2] 石原直树. 日本国公开特许公报(P),平3-292878.
- [3] 高山卓美. 清酒“焙炒造り”について[J]. 日本醸造協会雑誌,1992,87(12):849-859.
- [4] 张建华,彭昌亚,段作营,等. 焙炒米糊化率的快速测定方法[J]. 酿酒,2002,29(1):80-81.
- [5] 顾国贤. 酿造酒工艺学(第二版)[M]. 北京:中国轻工业出版社,2000.
- [6] 康明官. 黄酒生产问答[M]. 北京:中国轻工业出版社,1987.

(责任编辑:李春丽)

(上接第87页)

- [13] Szambelan K, Nowak J, Chrapkowska K J. Comparison of bacterial and yeast ethanol fermentation yield from Jerusalem artichoke tubers pulp and juices[J]. *Acta Sci Pol Technol Aliment*, 2004, 3: 45-53.
- [14] Ohta K, Hamada S, Nakamura T. Production of high concentration of ethanol from inulin by simultaneous saccharification and fermentation using *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59: 729-733.
- [15] Skowronek M, Fiedurek J. Optimisation of inulinase production by *Aspergillus niger* using simplex and classical method [J]. *Food Technol Biotechnol*, 2004, 42: 141-146.
- [16] Atiyeh H, Duvnjak Z. Production of fructose and ethanol from cane molasses using *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 36858[J]. *Acta Biotechnol*, 2003, 23: 37-48.

(责任编辑:李春丽)