

三株甘蔗糖蜜酒精发酵高产酵母菌株的筛选*

Screening Three High-yield *Saccharomyces cerevisiae* Strains for Alcohol Fermentation of Sugarcane Molasses

陆琦¹,张穗生¹,吴仁智^{1,2},陈东^{1,2},黄日波¹

LU Qi¹,ZHANG Sui-sheng¹,WU Ren-zhi^{1,2},CHENG Dong^{1,2},HUANG Ri-bo¹

(1. 广西科学院非粮生物质酶解国家重点实验室,国家非粮生物质能源工程技术研究中心,广西生物炼制重点实验室,广西南宁 530007; 2. 广西大学生命科学与技术学院,广西南宁 530003)

(1. State Key Laboratory of Non-food Biomass Enzyme Technology, National Engineering Research Center for Non-food Biorefinery, Guangxi Key Laboratory of Biorefinery, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China; 2. Life Science and Technology College, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530003, China)

摘要:从甘蔗糖厂的废弃物中筛选到3株甘蔗糖蜜酒精发酵高产菌株MF1001、MF1002和MF1003,经rDNA ITS序列同源比对鉴定为酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的不同菌株。3个菌株均可以完全利用葡萄糖和蔗糖,部分利用棉子糖和半乳糖,均不能利用乳糖和木糖。MF1001发酵甘蔗糖蜜的残糖含量明显低于目前使用的生产菌株,略低于标准测定菌株CICC31149和CICC31279,MF1002和MF1003的残糖含量略低于目前使用的生产菌株。与生产菌株相比,3个菌株在甘蔗糖蜜的生长速率略低,但是维持高菌数的时间较长。按目前甘蔗糖蜜酒精生产的发酵工艺,3个菌株30℃发酵72h的醪液酒精含量分别为14.26%(V/V)、14.48%(V/V)和13.50%(V/V),比目前生产使用的菌株高19.5%~28.6%;37℃发酵40h的醪液酒精含量分别为12.03%(V/V)、12.06%(V/V)和12.14%(V/V),比目前生产使用的菌株高10.0%~11.7%。这3个菌株具有提高甘蔗糖蜜发酵醪液酒精含量的潜在工业价值。

关键词:酵母菌株 筛选 酒精 糖蜜

中图分类号:Q591,TQ926 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-9164(2010)04-0368-05

Abstract: Three high-yield strains, MF1001, MF1002 and MF1003, for alcoholic fermentation of sugarcane molasses, were screened from years old wastes of sugar mill. By aligning ITS sequences using the program Blast with GenBank databases, the strains were identified belong to different strains of *Saccharomyces cerevisiae*. All screened strains can completely utilize glucose and sucrose, partly utilize raffinose and galactose, but cannot utilize lactose and xylose for metabolism. The un-fermentable residual sugar of MF1001 fermenting sugarcane molasses was significant lower than that of two control strains used currently for industrial alcohol fermentation with sugarcane molasses as substrate, and a little lower than that of standard strains currently used for determining un-fermentable sugar of sugarcane molasses. The un-fermentable

residual sugar of MF1002 and MF1003 fermenting sugarcane molasses was a little lower comparing with industrial strains. The growth rate of screened strains in 20°Bx sugarcane molasses was slower than that of industrial strains, but they maintained a large cell number for a longer period. By using the industrial process for alcohol fermentation of sugarcane molasses, the alcohol concentration in broth of fermenting sugarcane molasses by screened strains at 30 °C for 72h was 14.26% (V/V), 14.48% (V/V) and

收稿日期:2010-09-28

作者简介:陆琦(1983-),男,研究实习员,主要从事甘蔗糖蜜酒精发酵等生物质能源方面研究。

* 科技部科技人员服务企业行动项目(2009GJE10002),广西科学研究与技术开发计划项目(桂科合 10100019-21,桂科攻 1099071,桂科转 10123005-17),广西科学院科技攻关项目(桂科院研 0708),广西科学院基本科研业务费项目(10YJ25SW15)资助。

13.5%(V/V) for MF1001, MF1002 and MF1003, respectively, 19.5%~28.6% higher than that of industrial strains(11.30% and 11.26%). Even under 37°C, the alcohol concentration of broth after fermentation for 40h by screened strains was 12.03%(V/V)、12.06%(V/V)和 12.14%(V/V), respectively, still 10.0%~11.7% higher than that of industrial strains (10.93% and 10.87%). The results indicated that the screened strains are much potential for industrial utilization to enhance the alcohol concentration of sugarcane molasses fermentation.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae* strain, screening, alcohol, molasses

糖蜜是蔗糖生产的副产物,在我国广西、云南和广东等主要蔗糖产区已经成为酒精发酵生产的主要原料。但是,我国目前的甘蔗糖蜜酒精发酵水平较低,发酵成熟醪液的酒精含量通常只有 10%(V/V)左右,最高不超高 11%^[1,2],而且对环境的污染也很严重,生产每容积酒精会产生 12~14 倍容积,含 COD 8~12×10⁴ mg/L, BOD₅ 4~6×10⁴ mg/L 的蒸馏废液^[3,4]。目前我国对甘蔗糖蜜酒精发酵产生的废液还没有较为理想的处理办法。提高甘蔗糖蜜酒精生产发酵醪液的酒精浓度,不仅可以提高设备的生产效率和劳动生产率,而且降低能耗和减少废液排放,对显著提高酒精生产的经济效益,具有重要意义^[5]。提高甘蔗糖蜜酒精生产发酵醪液酒精浓度的关键是获得高性能的生产菌株。Gu 等^[6]报道了 1 株酿酒酵母菌株 1912,并研究其糖蜜酒精的发酵工艺,其 5L 发酵罐发酵 72h 的醪液酒精浓度达 13.6%(V/V),酒精发酵效率为 85%,摇瓶发酵 48h 的醪液酒精含量达 15%。但是,1912 菌株进行糖蜜酒精发酵时需要对甘蔗糖蜜进行 121°C 加热 30min 灭菌的预处理,与目前甘蔗糖蜜酒精发酵工业所采用的生产工艺不同,推广应用受到一定限制。我们从甘蔗糖厂的废弃物中筛选得到 3 株发酵甘蔗糖蜜高产酒精的酿酒酵母菌株,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

菌种筛选样品为甘蔗糖厂排污沟的陈年沉积物,取自广西的甘蔗糖厂。样品取回后于 4°C 保存备用。

用于甘蔗糖蜜非发酵糖含量测定的标准菌株购自中国工业微生物菌种保藏中心,为酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)菌株 CICC31149(AS 2.1190)和 CICC31279(AS 2.1190)。

实验以目前甘蔗糖蜜酒精生产使用的菌株 AQ01 和 AQ02 为对照菌株,由广西凭祥市丰浩酒精有限公司提供,安琪酵母股份有限公司生产,AQ01 为超级酿酒高活性干酵母,AQ02 为耐高温酿酒高活性干酵母。

实验所用甘蔗糖蜜来自广西凭祥市丰浩酒精有

限公司,锤度 83.5°Bx,总糖含量 49.5%,非发酵糖含量 4.34%。配制甘蔗糖蜜培养基时将糖蜜稀释至一定锤度,按重量添加 0.2%的尿素和 0.02%的磷酸,用硫酸调 pH 值至 3.8~4.0。甘蔗糖蜜培养基现配现用。YPD 培养基由蛋白胨 2%,酵母粉 1%,葡萄糖 2%,固体培养基添加琼脂 2%,自然 pH 值,121°C 灭菌 20min 制成。蔗糖发酵培养基由蛋白胨 2%,酵母粉 1%,蔗糖 40%,自然 pH 值,121°C 灭菌 20min 制成。实验所用试剂均为分析纯以上级别。

1.2 菌株筛选

将采回的样品稀释为 100%、75%、50%、25% 共 4 个浓度,添加 100×10⁶ 的氨苄青霉素,于 30°C,180rpm 培养 2 周,镜检酵母的生长情况,选择浓度最高并有酵母生长的培养物,从中取 1ml 菌液移入 YPD 培养基富集培养 48h,划线接种 YPD 平板培养基,30°C 培养 48h,挑单菌落接种蔗糖发酵培养基,30°C,180rpm 培养 24h,再静置培养 48h,定时测定培养液的酒精含量,筛选酒精产量高的菌株。

将筛选得到的酵母菌株在 YPD 平板培养基划线连续纯化 3 代,得到纯化菌株,于 YPD 斜面培养基 4°C 保存。

1.3 菌株活化培养

斜面菌株实验前接种 YPD 液体培养基,30°C,180rpm 培养过夜,再转接 1 次同条件培养至菌数 2×10⁸/ml,4°C 下保存,2 天内使用。

1.4 菌株分子鉴定

将活化菌株 YPD 培养基培养 8h 至对数期菌龄,菌数 2×10⁸/ml,取菌液 12000rpm×5min 离心,弃上清液,无菌蒸馏水洗涤 2 次,收集菌体,液氮冷冻研磨破碎,用酚-氯仿法^[7]提取酵母菌体的基因组 DNA。

菌株 rDNA ITS1-5.8S-ITS2 克隆,以菌体的基因组 DNA 为模板,ITS1 引物序列为正向引物,ITS4 引物序列为反向引物,使用 TaKaRa Fungi Identification PCR Kit(Code No. D317)试剂盒 PCR 扩增菌株的 ITS1-5.8S-ITS2 序列,反应按试剂盒的指南操作。PCR 扩增程序为:94°C 预变性 5min;94°C 变性 0.5min、56°C 退火 0.5min、72°C 延伸 1min、30 个

循环;72℃延伸 5min。反应完成后,取 5 μ l 于 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳分离,使用 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0(Code No. DV805A) 试剂盒切胶回收目的片段,对目的片段进行双向 DNA 测序。DNA 测序由宝生物工程(大连)有限公司进行。

正向引物^[8]:5'-TCCGTAGGTGAACCT-GCGG-3'。

反向引物^[8]:5'-TCCTCCGCTTATTGATAT-GC-3'。

序列比对是将扩增得到的菌株 rDNA ITS1-5.8S-ITS2 序列用 NCBI 的 BLAST2.0 进行同源分析(Nucleotide-Nucleotide BLAST),搜索的数据库为 Genbank 核酸数据库,根据比对结果对菌株进行分子鉴定。

1.5 碳源同化实验

将活化菌株接种至 YPD 培养基培养 8h 至对数期菌龄,取 2ml 菌液,12000rpm \times 5min 离心,弃上清液,加 2ml 无菌蒸馏水洗涤菌体 3 次,最后收集菌体悬浮于同体积的无菌蒸馏水中。按文献[9]的生长图谱方法进行菌株的碳源同化实验,考察菌株对各种糖分的利用能力。

1.6 菌株发酵甘蔗糖蜜的非发酵残糖含量测定

精确称取甘蔗糖蜜 120g,加 1000g 蒸馏水溶解,按重量添加 0.2% 的尿素和 0.02% 的磷酸,用硫酸调 pH 值至 3.9,分装至三角瓶,每瓶 100g,接种 3~4 个斜面的测定菌株,于 32℃,180rpm 下培养 48h,取醪液测定残留总糖和残留还原糖,计算糖蜜非发酵糖分含量。同时测定标准菌株 CICC31149、CICC31279 和生产对照菌株 AQ01 和 AQ02 的非发酵残糖含量作比较。

1.7 菌株在甘蔗糖蜜中的生长测定

活化菌株接种 YPD 培养基培养 8h 至对数期菌龄,接种 100ml 的 20°Bx 甘蔗糖蜜培养基,控制初始菌数为 0.05~0.06 \times 10⁸/ml,于 30℃,180rpm 下培养,定时取样计数,测定菌数的生长情况。

1.8 酒精发酵

将活化菌株接种至 YPD 培养基培养 8h 至对数期菌龄后接种蔗糖培养基进行蔗糖酒精发酵。糖蜜酒精发酵按目前甘蔗糖蜜酒精生产的发酵工艺进行。菌液(菌数 2 \times 10⁸/ml)接种 100ml 的 20°Bx 糖蜜培养基,接种量 5%,培养 8h 至菌数增至 2 \times 10⁸/ml,补料同体积 55°Bx 的糖蜜培养基,启动酒精发酵。发酵前 24h 均 180rpm 摇动,此后静置发酵至 72h,定时抽样测定醪液的酒精含量。

1.9 菌数计数

菌液稀释 10 倍,采用血球计数板计数。

1.10 酒精含量测定

以乙腈为内标,采用气相色谱法测定酒精含量。发酵液 12000rpm \times 5min 离心,取上清液 0.6ml,加 0.6ml10% 的乙腈,补充蒸馏水至总体积 2.0ml,上气相色谱仪,根据乙醇和乙腈的峰面积按公式:乙醇含量(% ,V/V) = (乙醇峰面积/乙腈峰面积) \times 0.9936,计算乙醇含量(% ,V/V)。含量计算公式中的 0.9936 为换算常数,根据同一条件下测定乙醇和乙腈的标准曲线回归方程求得。

气相色谱条件:FID 检测器,加热口温度 250℃,柱箱温度 100℃,检测器温度 325℃,载气为氮气,进样口分流比 50:1,氮气总流量 70.5ml/min,检测器氢气流量 40ml/min,空气流量 450ml/min。

1.11 糖分含量测定

取发酵醪液或糖蜜培养基 0.2ml 于 2ml 离心管中,加入 1.8ml 蒸馏水,加 5mg 碱性醋酸铅,反复倒置摇匀,12000rpm \times 5min 离心,取上清液 100 μ l 用 DNS 法测定还原糖。另取 1.0ml 上清液,加 100 μ l 6mol/L 盐酸,摇匀,70℃ 水解 15min,冰水浴冷却至室温,加 120 μ l 20% 的 NaOH 溶液摇匀中和,离心,取上清液 100 μ l 用 DNS 法测定总糖。DNS 法测定还原糖按美国能源部的方法^[10]进行。

2 结果和分析

2.1 菌株筛选

样品稀释后培养 2 周后,镜检发现,浓度为 75%、50%、25% 的样品均有大量的酵母生长。取浓度为 75% 的样品在 YPD 培养基平板划线培养,挑 100 个菌落接种蔗糖发酵培养基进行酒精发酵 72h,结果发现有 1 个发酵管的酒精含量达到了 14.46%。对该管菌株进行分离纯化,得到 3 株发酵甘蔗糖蜜高产酒精的菌株,命名为 MF1001、MF1002 和 MF1003。形态观察结果表明,3 个株菌的细胞均为卵圆形,芽殖,在生孢培养基(含葡萄糖 1g/L,酵母粉 1.5g/L,KCl1.8g/L,NaAc \cdot 3H₂O 13.6g/L),28℃,130rpm 培养 3 天后开始形成主要为 2 孢排列和 3 孢排列的孢子囊。从而初步确定它们为酵母菌株。

2.2 菌株鉴定

利用 rDNA ITS 序列鉴定酵母菌,目前已有许多报道^[11,12],在大多数已描述的酵母菌种间,rDNA ITS 序列的碱基差异一般都不大于 1%,目前比较公认的观点是 rDNA ITS 序列的差异不大于 1% 的属于同一个种^[13]。我们对筛选出的 3 个菌株的 rD-

NA ITS 序列进行分析,其 G+C 含量及同源比对的结果(表 1)显示,菌株之间 ITS 序列的同源性达到了 98%~99%。用 NCBI 的 BLAST2.0 对 GenBank 数据库进行同源搜索发现, MF1001 与收录号为 AM262830.1 等 36 株酿酒酵母菌的 ITS 序列具有 99% 的同源性, MF1002 与收录号为 AB533539.1 等 6 株酿酒菌的 ITS 序列具有 100% 的同源性,与收录号为 AB533543.1 等 92 株酿酒酵母菌的 ITS 序列具有 99% 的同源性,而 MF1003 与收录号为 AM262830.1 等 33 株酿酒酵母菌具有 99% 的同源性。结合这些菌株的外观形态,表明所筛选到的 3 个菌株为酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的不同菌株。

表 1 筛选菌株 rDNA ITS 序列 G+C 含量及相互同源比对分析

Table 1 G+C content and homology alignment score between ITS sequence of screened strains

菌株 Strains	G+C 含量 G+C Content(%)	同源性 Homology(%)
MF1001	39.2	99*
MF1002	39.3	100*
MF1003	40.0	99*
MF1001 vs MF1002	—	99
MF1001 vs MF1003	—	98
MF1002 vs MF1003	—	99

* 菌株 MF1001, MF1002, MF1003 的 rDNA ITS 序列与 GenBank 中已有的 36 株, 6 株, 33 株酿酒酵母的 ITS 序列具有 99%, 100%, 99% 同源性。

* The rDNA ITS sequence of MF1001, MF1002 and MF1003 had 99%, 100% and 99% homology with ITS sequence of 36, 6 and 33 *saccharomyces cerevisiae* strains in Genbank database, respectively.

2.3 菌株对糖的同化能力

筛选菌株与标准菌株、糖蜜酒精生产菌对照菌株的碳源同化实验结果(表 2)显示,对测定的葡萄糖、蔗糖、棉子糖、乳糖、半乳糖和木糖等 6 种糖分,标准菌株 CICC31149、CICC31279 和生产菌株 AQ01、AQ02 除了木糖和乳糖外均能同化,其中, CICC31149 对棉子糖完全能同化,其它 3 株菌能大部分同化。筛选菌株与标准菌株和生产菌株一样均不能同化乳糖和木糖,均能够完全同化蔗糖和葡萄糖。但二者也存在不同,筛选菌株对棉子糖和半乳糖只能部分同化,而标准菌株和生产对照菌株完全能同化半乳糖。

2.4 菌株对甘蔗糖蜜糖分的利用能力

筛选菌株利用甘蔗糖蜜后非发酵糖分的含量测定结果(图 1)显示,标准菌株 CICC31149 和 CICC31279 的非发酵残总糖含量分别为(4.60±0.16)%和(3.98±0.36)%,残留还原糖含量分别为(3.52±0.52)%和(3.00±0.31)%,对照生产菌株

表 2 筛选菌株碳同化实验结果

Table 2 Carbon metabolism of screened strains

菌株 Strains	葡萄糖 Glucose	蔗糖 Sucrose	棉子糖 Raffinose	乳糖 Lactose	半乳糖 Galactose	木糖 Xylose
31149	+++	+++	+++	0	+++	0
31279	+++	+++	++	0	+++	0
AQ01	+++	+++	++	0	+++	0
AQ02	+++	+++	++	0	+++	0
MF1001	+++	+++	+	0	++	0
MF1002	+++	+++	++	0	+	0
MF1003	+++	+++	+	0	++	0

+++ :完全能同化, ++ :能大部分同化, + :能少量同化, 0 :完全不能同化。

+++ : Metabolism completely; ++ : Metabolism major partly; + : Metabolism minor partly; 0 : un-capability to metabolism.

AQ01 和 AQ02 的残糖含量高于标准菌株,残留总糖分别为(4.81±0.16)%和(5.02±0.16)%,残留还原糖分别为(3.72±0.21)%和(4.14±0.11)%。筛选菌株 MF1001 的残总糖和残留还原糖分别为(3.88±0.47)%和(3.15±0.36)%,残留糖含量略低于 CICC31279 和 CICC21149 ($P < 0.05$)。MF1002 和 MF1003 残留总糖分别为(4.91±0.26)%和(4.76±0.52)%,残留还原糖分别为(3.52±0.52)%和(3.52±0.42)%,残留糖含量略高于标准菌株,但是明显低于生产菌株 AQ02, AQ01。这说明筛选得到的 3 株酿酒酵母均具有较强的利用甘蔗糖蜜中糖分的能力,其中, MF1001 利用甘蔗糖蜜糖分的能力最强。

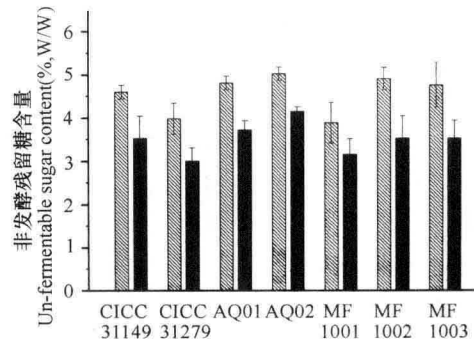


图 1 筛选菌株利用甘蔗糖蜜的残糖含量(二次试验的平均值和标准差)

Fig. 1 Residual sugar content after screened strains ferment sugarcane molasses (Average and standard deviation of duplicate determination)

□ : 残留总糖, ■ : 残留还原糖。

□ : Residual total sugar, ■ : Residual reductive sugar.

2.5 菌株在甘蔗糖蜜中的生长情况

筛选菌株和对照生产用菌在 20°Bx 甘蔗糖蜜的生长结果(图 2)显示,生产菌株 AQ01 和 AQ02 均在培养 16h 菌数达到最高,分别为 9.51×10^8 /ml 和 7.40×10^8 /ml,此后菌数快速下降,培养至 40h 菌数分别只有 5.17×10^8 /ml 和 5.10×10^8 /ml,分别下降

45.6%和31.1%，而筛选菌株 MF1001、MF1002 和 MF1003 均在培养 24h 菌数在达到最大值，分别为 8.34×10^8 /ml、 6.95×10^8 /ml 和 5.26×10^8 /ml，培养至 40h 菌数分别为 6.14×10^8 /ml、 5.83×10^8 /ml 和 4.69×10^8 /ml，只分别下降 26.4%、16.1% 和 10.8%。与生产用菌相比，筛选菌株的生长速率较慢，保持较高菌数的时间较长。从图 2 还可以看出，3 株筛选菌株中，MF1001 的生长速率较快，菌数最多，MF1002 次之，MF1003 较慢，菌数最少。

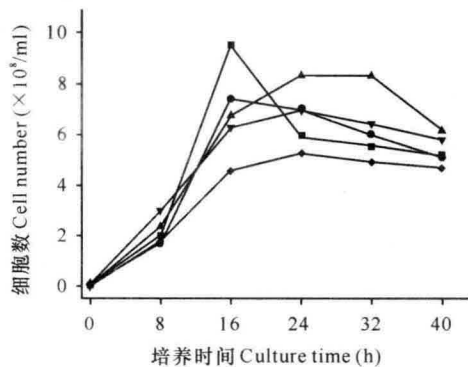


图 2 筛选菌株在 20°Bx 甘蔗糖蜜中的生长情况(二次试验的平均值和标准差)

Fig. 2 Growth rate of screened strains in 20°Bx sugarcane molasses (Average and standard deviation of duplicate determination)

■: AQ01, ●: AQ02, ▲: MF1001, ▼: MF1002, ◆: MF1003。

2.6 菌株利用甘蔗糖蜜发酵酒精的能力

比较筛选菌株与对照生产菌株在发酵温度 30℃，发酵时间 72h 下发酵甘蔗糖蜜产酒精的结果(图 3)可见，筛选菌株的产酒精能力显著高于现在使用的生产菌株。MF1001、MF1002、MF1003 发酵 72h 的醪液酒精含量分别为 14.26% (V/V)、14.48% (V/V) 和 13.50% (V/V)，而生产菌株 AQ01 和 AQ02 只有 11.30% (V/V) 和 11.26% (V/V)，筛选菌株比生产菌株高出 19.5%~28.6%。

考虑到我国产糖区的夏天较为炎热，酒精发酵设备不完善，夏天生产时发酵罐温较高，进一步考察 37℃ 下筛选菌株的甘蔗糖蜜酒精发酵结果(图 4)显示，MF1001 和 MF1003 均在发酵 32h 醪液的酒精含量达到最大值，发酵 40h 醪液酒精含量略有下降，而 MF1002、AQ01 和 AQ02 则在发酵 40h 醪液酒精含量达到最大。醪液酒精含量方面，MF1001、MF1002 和 MF1003 的醪液酒精含量最大值分别为 12.03% (V/V)、12.06% (V/V) 和 12.14% (V/V)，比目前生产使用的菌株 AQ01 (10.94% (V/V)) 和 AQ02 (10.87% (V/V)) 高出 10%~11.7%。筛选菌株在较高温度下的发酵甘蔗糖蜜产酒精的能力也显著高于

现在生产使用的 AQ01 菌株和 AQ02 菌株。

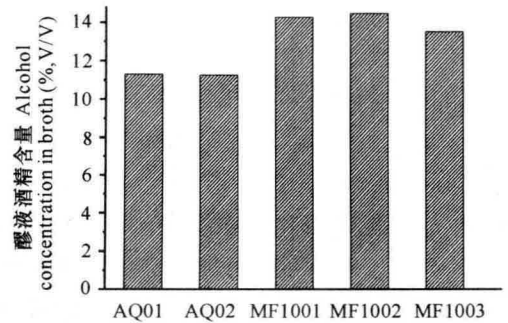


图 3 筛选菌株发酵甘蔗糖蜜的醪液酒精含量(二次试验的平均值)

Fig. 3 Alcohol concentration in broth of screened strains fermenting sugarcane molasses (Average of duplicate fermentation)

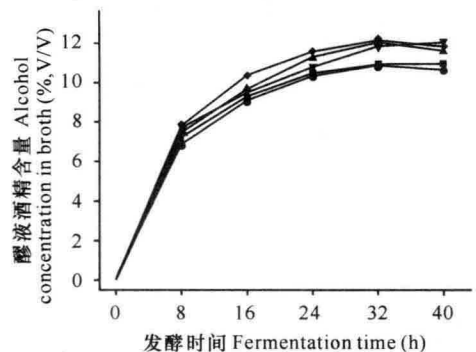


图 4 筛选菌株 37℃ 下甘蔗糖蜜酒精发酵曲线(二次试验的平均值)

Fig. 4 Alcohol fermentation curve of screened strains at 37°C (Average of duplicate fermentation)

■: AQ01, ●: AQ02, ▲: MF1001, ▼: MF1002, ◆: MF1003。

3 结论

本次实验研究从甘蔗糖厂排污沟的陈年沉积物中筛选得到的 3 个菌株 MF1001、MF1002 和 MF1003 属酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的不同菌株。与目前酒精生产中应用的菌株不同，这 3 个菌株都不能利用乳糖和木糖，对半乳糖也只能部分利用。但是，这 3 个菌株却具有较强的利用甘蔗糖蜜中糖分的能力，其中，MF1001 对甘蔗糖蜜中糖分的利用能力显著高于生产用菌株，略高于甘蔗糖蜜非发酵糖分测定标准菌株 CICC31149 和 CICC31279，MF1002 和 MF1003 的利用能力也略高于生产应用对照菌株。这 3 个筛选得到的菌株发酵甘蔗糖蜜产酒精的能力，特别是在温度 30℃ 下，显著高于目前使用的生产菌株。本次实验筛选得到的 3 个酿酒酵母菌株具有较高的生产应用潜力。

(下转第 376 页 Continue on page 376)

适宜的生长温度在 21℃~30℃ 之间,而对于发酵产灵菌红素而言最适的温度为 27℃。

3 结论

碳源、氮源以及无机盐对红树林细菌 (*Flavobacterium* sp.) 生物量及产灵菌红素都有不同程度的影响。优化组合最佳的培养基组合为麦芽糖 10.0 g/L, 蛋白胨 10.0g/L, 磷酸氢二钾 0.25g/L, 硫酸镁 0.1g/L。最合适 pH 值为 6.0, 最合适的盐度为 10‰, 最合适的温度为 27℃。

参考文献:

[1] 盛磊, 王勇. 灵菌红素的制备与抗菌效果观察[J]. 农垦医学, 1998, 20(4): 203-204.
[2] Melvin M S, Tomlinson J T, Saluta G R, et al. Double

-Strand DNA cleavage by copper-prodigiosin[J]. Am Chem Soc, 2000, 122(26):6333-6334.

[3] Jeong H, Yim J H. Genomic blueprint of *Hahella chejuensis*, a marine microbe producing an algicidal agent[J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33(22):7066-7073.
[4] 刘伯雅, 魏东芝, 鲁思然, 等. 灵菌红素对有害藻类的除藻活性研究[J]. 中国环境科学, 2010, 30(4): 477-482.
[5] 王以斌, 何碧娟, 郑洲, 等. 红树林细菌 *Flavobacterium* sp. 的抑藻活性物质鉴定及其对亚历山大藻抑制作用的初步研究[J]. 中国海洋药物杂志 2008, 27(6):1-4.
[6] 郑怀礼. 生物絮凝剂与絮凝技术[M]. 北京: 化学工业出版社环境科学与工程出版中心, 2004:147-148.

(责任编辑:尹 闯)

(上接第 372 页 Continue from page 372)

参考文献:

[1] 熊子书. 甘蔗糖蜜酒精酵母菌的筛选与应用[J]. 酿酒科技, 1996, 73(1), 11-13.
[2] 熊子书. 中国酿酒酵母菌的研究——不同酒类酵母筛选与应用纪实(上)[J]. 酿酒科技, 2002, 112(4), 23-27.
[3] 成官文, 章非娟, 穆军, 等. 糖蜜酒精废液厌氧生物处理研究进展[J]. 环境科学与技术, 2003, 26(1), 50-53.
[4] 周桂, 邓光辉, 何子平. 糖蜜酒精废液综合利用进展[J]. 广西民族学院学报: 自然科学版, 2000, 6(2): 111-114.
[5] 侯保朝, 杜风光, 郭永豪, 等. 高浓度酒精发酵[J]. 酿酒科技, 2005, 130(4): 93-96.
[6] Gu Yansong, Qiao Min, Zhou Quan, et al. Hyperproduction of alcohol using yeast fermentation in highly concentrated molasses medium[J]. Tsinghua Science and Technology, 2001, 6(3): 225-230.
[7] 谢丽源, 张勇, 邓科君, 等. 基于 rDNA ITS 序列分析的桑黄真菌菌株分子鉴定[J]. 食品科学, 2010, 31(09): 182-186.
[8] White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[M]//Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, et al. PCR Protocols, a Guide to Methods and Applica-

tions. San Diego, CA: Academic Press, 1990:315-322.

[9] 杜连祥, 路福平. 微生物学实验技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005:166.
[10] National Renewable Energy Laboratory (NREL). Measurement of cellulose activities[M]// Laboratory analytical procedure, Lap - 006, NREL Golden Co, 1996.
[11] Nisiotou A A, Gibson G R. Isolation of culturable yeasts from market wines and evaluation of the 5.8S-ITS rDNA sequence analysis for identification purposes [J]. Letters in Applied Microbiology, 2005, 41: 454-463.
[12] Granchi L, Bosco M, Messini A, et al. Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region[J]. Journal of Applied Microbiology, 1999, 87:949-956.
[13] 白逢彦, 王启明, 陆惠中, 等. 酵母菌种内和种间 rDNA 序列保守性和变异性分析[J]. 新疆大学学报: 自然科学版, 2004, 21(Supp):157.

(责任编辑:邓大玉)