

鸡粪中具有产酒精能力酵母的初步筛选

徐磊 (南通大学, 江苏南通 226007)

摘要 [目的] 筛选能发酵产酒精的酵母菌。[方法] 在鸡粪样品中经过初筛、复筛, 以及生理生化试验和发酵试验, 确定所筛选的酵母菌株产酒精的能力, 并对所筛选出菌株的适宜生长条件做初步研究。[结果] 共筛选出 4 株可发酵菌株: HY-1、HY-2、HY-3 和 HY-4, 其中 HY-1 产酒精能力最高。[结论] HY-1 菌株的适宜生长条件为: pH 值 6.5, 温度 30 ℃, 最适碳源为葡萄糖。该菌株的致死温度为 50 ℃。在最适条件下进行 HY-1 的酒精发酵试验, 测得发酵液中的酒精度达 6.90%。

关键词 鸡粪; 酒精; 酵母; 筛选

中图分类号 S182 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)31-15134-03

Preliminary Screening of Ethanol-producing Yeasts Strains from Chicken Manure

XU Lei (Nantong University, Nantong, Jiangsu 226007)

Abstract [Objective] The research aimed to obtain the yeast strains that could produce ethanol. [Method] After the first screening, second screening, physiological-biochemical test and fermentation test, the ethanol-producing abilities of yeast strains screened from chicken manure samples were confirmed. [Result] Four fermentable strains named HY-1, HY-2, HY-3 & HY-4 were isolated. The strain HY-1 produced the highest concentration of ethanol from all. [Conclusion] The optimum growth conditions of HY-1 were as follows: pH value of 6.5, temperature of 31 ℃, using glucose as the optimum carbon source, the mortal temperature of 50 ℃. In the fermentative experiment, the alcohol degree in the fermentation broth of HY-1 reached 6.90%.

Key words Chicken manure; Ethanol; Yeast; Screening

鸡粪是养禽业的副产品, 综合利用好鸡粪, 对实现物质循环利用、控制环境污染具有重大意义。鸡粪是重要的有机肥资源^[1-2], 通过自然界的有益菌对鸡粪进行除臭, 可在短时间内使鸡粪快速熟化成为有机肥。另一方面, 鸡粪中含有丰富的营养物质, 当前世界各国都非常重视以鸡粪为原料来生产微生物菌体蛋白饲料^[3]。虽然很多学者在鸡粪中筛选到了各种发酵优势菌, 包括细菌、放线菌和真菌, 并研究报道了其发酵效果^[4], 但从中筛选能发酵产酒精的菌株则鲜有报道。笔者通过自然选育的方法, 在鸡粪中分离出能发酵产酒精的酵母菌株, 为进一步扩大鸡粪的利用领域提供了科学依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 鸡粪来源。采集南通如皋地区蛋鸡养殖户鸡舍内的新鲜鸡粪放入灭菌的广口瓶中, 储藏于冰箱中备用。

1.1.2 培养基^[5]。YPD 培养基: 葡萄糖 2%, 蛋白胨 2%, 酵母浸膏 1%, pH 值 6.0 (加入 2% 琼脂粉为固体培养基)。豆芽汁发酵培养基: 蔗糖 10%, 硫酸镁 0.5%, 硝酸铵 0.5%, 磷酸二氢钾 0.5%, 20% 豆芽汁, pH 值自然。玉米粉发酵培养基: 葡萄糖 20%, 玉米粉 2%, 尿素 0.2%, 硫酸镁 0.6%, 磷酸二氢钾 0.2%, 酵母浸膏 0.3%, 氯化钠 1%, pH 值 4.5。糖发酵培养基: 糖 60% (葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖), 硫酸镁 0.4%, 磷酸二氢钾 0.2%, 酵母浸膏 0.6%, 硫酸铵 0.6%, pH 值 4.5。以上培养基均高压蒸汽灭菌, 灭菌条件为 121 ℃ 20 min (含有葡萄糖的培养基为 115 ℃ 20 min)。

1.2 方 法

1.2.1 酵母菌的分离与纯化。取适量鸡粪样品加入到带有玻璃珠的 100 ml 灭菌生理盐水瓶中, 放置摇床培养 3 h, 温度 28 ℃。然后取 5 ml 菌悬液加入富集培养基 (YPD 培养基), 摇床培养 48 h, 温度 28 ℃。富集后的酵母采用稀释涂布平

板法, 在 YPD 固体培养基上 28 ℃ 培养 72 h。挑取平板上长出的单菌落做纯培养。纯化后得到的菌株接入斜面培养基, 于 4 ℃ 冰箱保存备用。

1.2.2 产酒精酵母菌株的筛选。将分离出的酵母菌分别接入带有杜氏小管的 YPD 液体培养基中, 分别在 24、48 和 72 h 后观察杜氏小管中的产气情况。将酵母菌分别接入各种不同的发酵培养基, 进行发酵试验, 根据发酵液中酒精含量进行筛选, 酒精含量的测定方法参考文献^[6]。

1.2.3 碳源同化试验。配制 4 种糖发酵培养基, 分装后以 10% 的接种量将活化得到的不同菌株分别接入各自不同的糖发酵培养基中, 28 ℃ 培养 72 h。发酵结束后测定酒精度, 比较不同菌株在不同碳源下的发酵能力, 确定各菌株的最适发酵碳源。

1.2.4 致死温度试验。将菌株接入装有 YPD 液体培养基的试管中, 分别置于 40、45、50 ℃ 处理, 从各试管中取样涂布到 YPD 固体培养基上, 于 28 ℃ 培养, 观察有无菌落长出, 从而判断其致死温度。

1.2.5 耐酒精度试验^[7-9]。在无菌条件下, 向带有杜氏小管的 YPD 液体培养基中加入酒精, 使培养基中酒精含量分别为 10%、12%、14%、16% 和 18%, 混匀后将菌种分别接入, 28 ℃ 培养 1 周后观察杜氏小管中的产气情况。

1.2.6 最适发酵条件的确定。

1.2.6.1 最适 pH 值。将豆芽汁液体培养基 pH 值依次调节为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0, 菌种以 10% 的接种量接入, 置于 28 ℃ 培养, 发酵结束后测定不同 pH 值发酵液中的酒精度。

1.2.6.2 最适温度。菌种以 10% 的接种量接入葡萄糖发酵培养基中, 分别置于 25、28、31、34、37 ℃ 的摇床培养, 发酵结束后测定不同温度发酵液中的酒精度。

1.2.6.3 最佳碳源。同“1.2.3”。

2 结果与分析

2.1 菌种的筛选 共筛选出 4 株具发酵能力的酵母菌, 分

别为 HY-1、HY-2、HY-3、HY-4,这 4 株菌在不同的发酵培养基(豆芽汁培养基、玉米粉培养基等)中,分别显示出不同程度的产酒精能力。4 株菌的培养特征和个体形态特征见表 1。将上述 4 株酵母菌接入葡萄糖培养基中,相同条件下进行培养及发酵,确定了 4 株菌中产酒精量最高的为菌株 HY-1。

2.2 最适碳源 根据糖发酵试验结果,每一种酵母菌都可以利用 4 种糖,对各种糖的利用情况见图 1。由图 1 可以看出,4 株菌株均能较好地利用葡萄糖。碳源利用上各自的特点为:HY-1 最适碳源是葡萄糖,其次是蔗糖;HY-2 葡萄糖和蔗糖的利用情况比较相近;HY-3 最适碳源是葡萄糖,

表 1 菌落形态特征和菌株细胞形态特征

Table 1 The colony morphological characteristics and the cell morphological characteristics of strains

菌株 Strains	菌落颜色 Colony color	形状 Shape	隆起情况 Scabrosity	边缘 Edge	干燥或湿润 Dry or wet	表面状态 Surface state	透明度 Transparency	菌落大小 Colony size	细胞形态 Cell shape	大小 Size	繁殖方式 Propagation ways
HY-1	白色	圆形	凸起	整齐	湿润	光滑	不透明	小	卵圆形	小	出芽
HY-2	白色	不规则形	隆起	波状	干燥	颗粒状	不透明	大	椭圆形	大	出芽
HY-3	灰白色	不规则形	隆起	整齐	干燥	颗粒状	不透明	大	柠檬形	大	两端出芽
HY-4	黄色	不规则形	凸起	裂叶状	湿润	细长颗粒状	不透明	中	腊肠形	大	不明

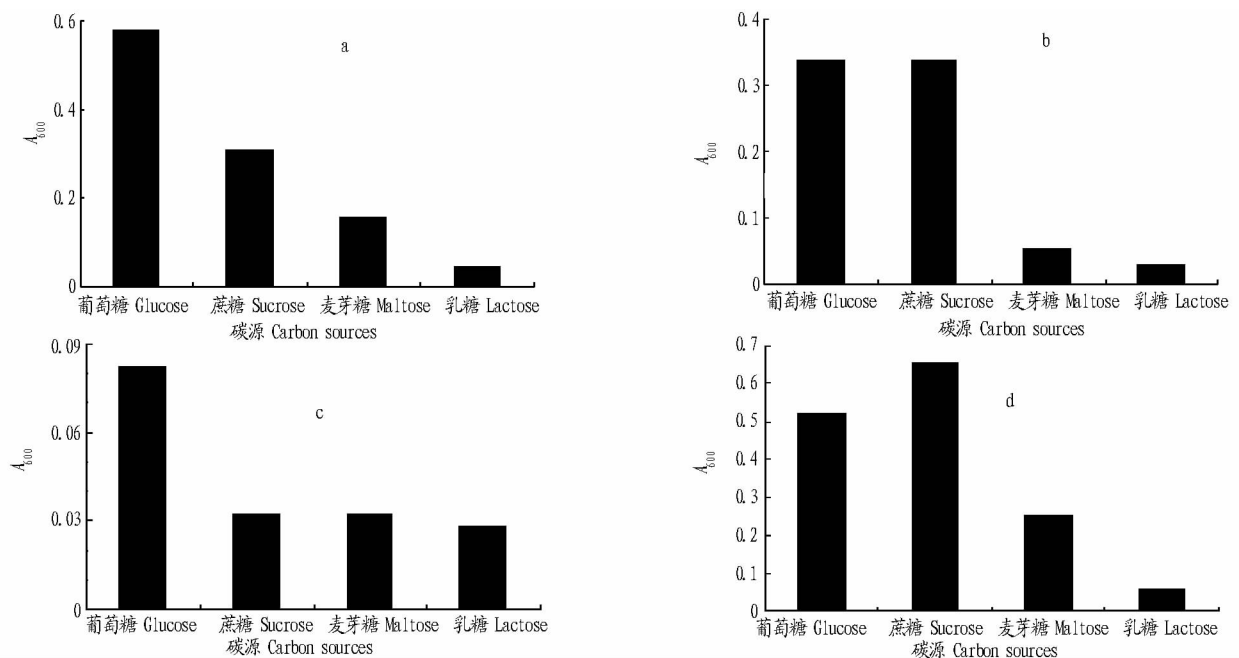


图 1 菌株 HY-1(a)、HY-2(b)、HY-3(c)和 HY-4(d)对 4 种碳源的利用情况

Fig. 1 The utilization of 4 kinds of carbon sources by strains HY-1(a), HY-2(b), HY-3(c) and HY-4(d)

表 2 4 种菌株的耐酒精能力试验结果

Table 2 The alcohol resistance of 4 kinds of strains

酒精含量//% Alcohol content	菌株 Strains	培养时间//d Culture time							气泡产生量 Bubble yield	耐酒精能力 Alcohol resistance
		1	2	3	4	5	6	7		
10	HY-1	有							++++	能很好生长
	HY-2	有							++++	能很好生长
	HY-3			有					+++	能生长
	HY-4		有						++++	能很好生长
12	HY-1	有							++++	能很好生长
	HY-2			有					+++	能生长
	HY-3				有				++	相对较难
	HY-4				有				+++	能生长
14	HY-1			有					+++	能生长
	HY-2				有				++	相对较难
	HY-3					有			+	很困难
	HY-4				有				++	相对较难
16	HY-1					有			+	很困难
	HY-2									不能生长
	HY-3									不能生长
	HY-4									不能生长
18	HY-1							有	+	很困难
	HY-2									不能生长
	HY-3									不能生长
	HY-4									不能生长

注:“有”表示有气泡产生;“+”的多少代表产气泡的多少。

Note: Chinese character “有” stands for having air bubble and the number of “+” stands for the amount of air bubble.

另外3种碳源的利用情况几乎无差别;HY-4最适碳源是蔗糖,其次是葡萄糖。

2.3 致死温度 将4株酵母菌分别在3个不同的温度下处理,发现经40和45℃处理后,4种酵母菌在培养基内依旧不同程度的生长出菌落,而50℃处理后则无菌落生长,所以判断4种菌的致死温度约为50℃。

2.4 耐酒精度 由表2可知,4株菌株在12%的酒精中都可以生长;但是在14%的酒精中HY-1能生长,HY-2和HY-4则相对较难,HY-3则很困难;当酒精度增加到16%和18%时,只有HY-1能生长,其余的都不能生长。

通过以上试验确定了HY-1的耐酒精度最高,产酒精能力最强。因而选取HY-1为试验对象,对其生长最适条件进行了初步测定。

2.5 HY-1的最适生长条件 由图2、3可知,适宜HY-1生长的pH值范围为6.0~7.0,且在6.5处达到最高;适宜温度为28~30℃。在该条件下,利用葡萄糖作为碳源,测定发酵液中的酒精含量达到6.90%。

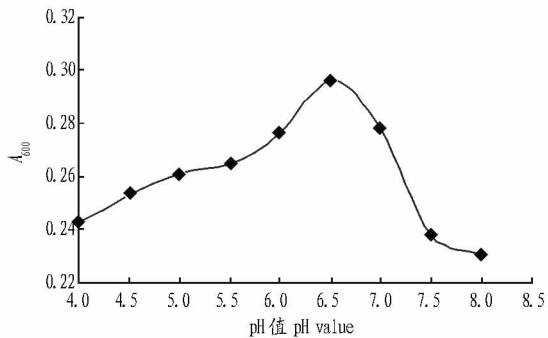


图2 pH值对菌株HY-1发酵的影响

Fig.2 The effects of pH value on the fermentation of strain HY-1

3 结论

(1)从鸡粪中共筛出4株产酒精的菌株,1株耐高酒精

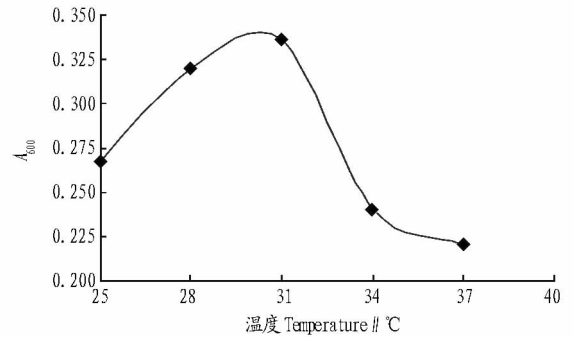


图3 温度对菌株HY-1发酵的影响

Fig.3 The effects of temperature on the fermentation of strain HY-1

度的酵母菌HY-1,30℃发酵72h,酒精产率为6.90%。

(2)酵母菌HY-1的适宜生长条件:发酵培养基pH值6.5;发酵温度为30℃;致死温度为50℃;最佳发酵碳源为葡萄糖。

参考文献

- [1] 李跻,郭旭宏.鸡粪的发酵处理方法与利用[J].农业科学研究,2007,28(3):97-98.
- [2] 马洪儒,陈晓东,张运真.养鸡场粪污治理技术与探讨[J].安徽农业科学,2007,35(26):8316-8318.
- [3] 石星群,殷培杰,何随成,等.发酵鸡粪的高温蛋白分解菌的筛选[J].土壤通报,2005,36(6):946-949.
- [4] 陈昭辉,付渊,孟庆翔,等.鸡粪发酵优势菌的筛选及其发酵效果的研究[J].中国家禽,2006,28(20):9-12.
- [5] 沈萍,范秀容,李广斌.微生物学实验[M].3版.北京:高等教育出版社,1999.
- [6] 岳元媛,向文良,张文学,等.白酒发酵糟醅中残余酒精含量检测方法的探讨[J].中国酿造,2005,148(7):55-57.
- [7] TAHIA BENITEZ. Selection of wine yeasts for growth and fermentation in the presence of ethanol and sucrose[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1983,45(5):1429-1436.
- [8] 池振明.提高酵母菌耐酒精能力的方法[J].微生物学通报,1993,20(3):180-183.
- [9] 刘海臣,冉金桥,张兴,等.酒糟中超高温耐高酒精度酵母菌株的选育[J].酿酒科技,2007,155(5):28-31.
- [10] 李轩然,刘琪璟,蔡哲,等.干烟洲针叶林的比叶面积及叶面积指数[J].植物生态学报,2007,31(1):93-101.
- [11] ENQUIST B J, NIKLAS K J. Global allocation rules for patterns of biomass partitioning in seed plants[J]. Science, 2002,295:1517-1520.
- [12] REICH P B, ELLSWORTH D S, WALTERS M B. Leaf structure (specific leaf area) modulates photosynthesis-nitrogen relations [J]. Funct Ecol, 1998,12:948-958.
- [13] GIVNISH T J. On the adaptive significance of leaf form in Topics in plant population biology[M]. NY:Columbia University Press,1979:375-407.
- [14] HOWLAND H C. Structural, hydraulic, and 'economic' aspects of leaf venation and shape. In biological prototypes and synthetic systems[M]. NY: Plenum Press,1962:183-191.
- [15] NIKLAS K J, COBB E D, NIINEMETS U, et al. "Diminishing returns" in the scaling of functional leaf traits across and within species groups [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007,104:8891-8896.
- [16] SHIPLEY B. Structured interspecific determinants of specific leaf area in 34 species of herbaceous angiosperm[J]. Funct Ecol, 1995,9:312-319.
- [17] PRICE C A, ENQUIST B J. Scaling mass and morphology in leaves: an extension of the WBE model[J]. Ecology, 2007,88:1132-1141.
- [18] ACKERLY D D, REICH P B. Convergence and correlations among leaf size and function in seed plants: a comparative test using independent contrasts [J]. Am J Bot, 1999,86:1272-1281.
- [19] 张林,罗天祥.植物叶寿命及其相关叶性状的生态学研究进展[J].植物生态学报,2004,28(6):844-852.
- [20] CORNELISSEN J H C, PEREZ-HARGUINDEGUY N, DAZ S, et al. Leaf structure and defence control litter decomposition rate across species and life forms in regional floras on two continents[J]. New Phytol, 1999,143:191-200.
- [21] WRIGHT I J, REICH P B, WESTOBY W, et al. The worldwide leaf economics spectrum[J]. Nature, 2004,428:821-827.
- [22] 李玉霖,崔建垣,苏永中,等.不同沙丘生境主要植物比叶面积和叶干物质含量的比较[J].生态学报,2005,20(1):80-87.

(上接第15133页)

生长关系,但是存在一个显著的集中趋势,即大叶片具有较小的SLA,其单位光合作用面积的生物量投入将高于较小的叶片。

参考文献