

利用甘蔗糖蜜酒精发酵液生产腐植酸的 菌种鉴定及发酵条件研究*

奉灵波¹ 周瑞芳¹ 赵辰龙¹ 陈桂光¹ 李杨瑞² 李楠^{1,2,3**}

(1 广西大学生命科学与技术学院 南宁 530004 2 广西农业科学院 南宁 530007)

(3 广西作物遗传改良生物技术重点实验室 南宁 530007)

摘要 从土壤中筛选出一株适合用甘蔗糖蜜酒精发酵液生产腐植酸的菌株 H812。单因素实验和正交实验结果表明,该菌株培养的最适酒精发酵液浓度为 16°Bx,最适培养条件为:时间 8d、温度 34℃、摇床转速 200r/min、初始 pH7.0、接种量 12% 和装液量 50ml/250ml,其中温度对发酵产品影响显著。在优化的条件下,腐植酸产量为 38.12 g/L,较优化前提高了 148.34%。对 H812 菌株进行形态特征分析以及 ITS 序列分析,推测该菌株为曲霉属真菌。

关键词 H812 菌株 甘蔗糖蜜酒精发酵液 腐植酸 菌种鉴定 发酵条件优化

中图分类号 Q819

甘蔗糖蜜酒精发酵液是制糖工业中残留物——甘蔗糖蜜进行酒精发酵后产生的酱酒色高浓度有机废水^[1],是制糖工业最严重的污染源^[2]。它排放量大、颜色深、酸度大、营养丰富、成分复杂,若不加利用而直接排入水体中,不仅浪费了资源,而且环境污染十分严重^[3]。腐植酸(Humic Acid,简称 HA)是由死亡的动植物遗骸在水分和空气存在的条件下经长期微生物分解、转化及地球物理化学作用后生成的复杂无定形高分子化合物^[4]。它含有羧基、羟基、醇羟基、醌基、羰基、甲氧基等多种活性基团,具有弱酸性、亲水性、络合性、胶体吸附性、螯合性等特性^[5],广泛应用于农业、医药、工业等行业中。腐植酸一般从泥炭、风化煤中提取得到,近年来发酵法生产腐植酸越来越受到国内外科技工作者的重视。发酵法生产腐植酸是模拟天然腐植酸的生成过程,将特定的微生物接种到培养基中,通过微生物发酵而制取腐植酸的过程^[6],其腐植酸产品官能团比例高、分子量小、水溶性好、螯合能力强、而且还含有有益微生物^[7]。本实验以农业废弃物——糖蜜酒精发酵液为原料,通过发酵法生产腐植酸,既充分利用了酒精发酵液中的营养物质,减轻了对环境的污染,又

获得了生物活性高的生化腐植酸产品,其经济效益、社会效益和生态效益显著,具有很好的发展前景。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 采集池塘活性污泥,进行腐植酸产生菌的筛选。

1.1.2 培养基 种子培养基(%):马铃薯 20.0,蔗糖 2.0,琼脂 2.0,自然 pH。

发酵培养基:将甘蔗糖蜜酒精发酵液稀释成不同浓度灭菌备用。甘蔗糖蜜酒精发酵液由广西南宁糖业股份有限公司明阳糖厂提供,含有机物 6%~8%,总氮 0.3%~0.5%。

1.1.3 主要仪器 METTLER TOLEDO 320 pH 计;METTLER TOLEDO PL303 精密电子天平(德国 METTLER 公司);SPX-250 恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂);SKY-211B 振荡培养箱(上海苏坤公司);数字阿贝折光仪(上海明兹精密仪器有限公司);PCR 反应扩增仪(加拿大 BBI 公司);YXJ-2 离心机(湘仪离心机仪器有限公司);H6-1 微型电泳槽 上海精益有机玻璃制品仪器厂;凝胶成像系统 Gene Genius 公司。

1.2 方法

1.2.1 菌体形态特征及孢子结构观察 菌落培养特

收稿日期:2012-07-06 修回日期:2012-08-14

* 第 46 期中国博士后资金资助项目

**通讯作者,电子信箱:linan97690612@163.com

征观察:挑取少量活化后的孢子,采用点植培养法^[8]接种于 PDA 培养基上,置于 37℃ 生化培养箱中培养 2 天,观察菌落大小、菌丝颜色、菌落质地、孢子颜色、有无渗出物等特征并记录。

菌体形态特征观察:采用载片培养法^[9]观察菌体形态,取少量孢子点种在 PDA 平板培养基上,在周围交叉斜插已灭菌的盖玻片,置于 37℃ 生化培养箱中培养 2 天后,将盖玻片放于已滴有乳酸苯酚液的载玻片上,用研究显微镜观察孢子囊、孢子囊梗、菌丝体状态等特征。

1.2.2 霉菌总 DNA 的提取 按照生工 SK1375 真菌基因组 DNA 抽提试剂盒说明书提取。

1.2.3 PCR 扩增 对菌株的 ITS 序列进行 PCR 扩增,引物为真菌通用引物^[10],

ITS1 序列:5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3';

ITS4 序列:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'。

PCR 扩增体系为:2μl 模板 DNA、1μl ITS4 (10 μmol/L)、1μl ITS1 (10 μmol/L)、1μl dNTP mix (10 mmol/L each)、5μl 10 × Taq reaction Buffer、0.4μl Taq (5 u/μl),加水至 50μl。

PCR 扩增程序:94℃ 预变性 5min,94℃ 变性 30s,55℃ 退火 35s,72℃ 延伸 1min,共 35 个循环,72℃ 延伸 8min。保存于 -20℃ 备用。

1.2.4 扩增产物的纯化 将 PCR 产物电泳,切割所需 DNA 条带,按生工 SK1131 说明书纯化目的核酸片段,送往生工生物工程(上海)有限公司测序,将测得的 ITS 区序列通过 NCBI 网站进行 Blast 程序比较分析,与已报道真菌菌株的 ITS 区序列进行同源性比较并构建系统发育树。

1.2.5 发酵培养基及发酵条件优化 以 13°Bx、pH6.5 的糖蜜酒精发酵液作为初始培养基,初始培养条件为:250ml 的摇瓶装液量 50ml、接种量为 10%、160r/min、37℃ 下培养 5d。依次考察糖蜜酒精发酵液浓度、发酵时间、温度、摇床转速、初速 pH、接种量、装液量对腐植酸产量的影响。根据单因素试验结果设计正交试验,探索较佳的发酵工艺参数。

1.2.6 腐植酸含量的测定方法 目前腐植酸含量的测定方法主要有容量法和重量法^[11]。容量法测定的实际上是碳值^[12],而糖蜜酒精发酵液中含有大量的色素、残糖,这些物质都可以提供碳,因此容量法检测结果偏高。重量法以腐植酸不溶于酸但可溶于碱为依据,符合公认的腐植酸的概念,不存在容量法的缺点,所以本

试验采用重量法测定腐植酸含量。

2 结果与分析

2.1 高产 HA 发酵菌种的鉴定

菌株在 PDA 培养基上生长迅速,2 天后平均直径达到 68.12mm。菌落初期为白色,慢慢变为黄色,最后变为棕色。菌落边缘为白色,呈宽 8mm 左右的环;白环向内为棕色环,质地疏松,有无色液滴分泌;中心区域黑色,呈丘状凸起,无渗出物,形成白、棕、黑同心环。随着时间的延长,白色环消失,最终为黑色。菌落正反面颜色不同,背面呈褐色。菌丝有隔膜,不分叉,分生孢子梗单枝,较长,顶端产生近球形顶囊,表面产生许多小梗,小梗上着生成串的表面粗糙的球形分生孢子。孢子为圆形或椭圆形,开始为黄色,逐渐变为棕黑色(图 1)。测定基因序列结果显示,序列长度为 576bp,在 NCBI 网站中进行 Blast 程序比较分析,然后使用 MEGA 软件构建系统发育树,结果见图 2。进化关系分析表明,H812 菌株与曲霉属真菌同源关系最近,达到 94%,构成一个小分支。结合形态鉴定的结果,判断菌株 H812 是丛梗孢目丛梗孢科曲霉属真菌。

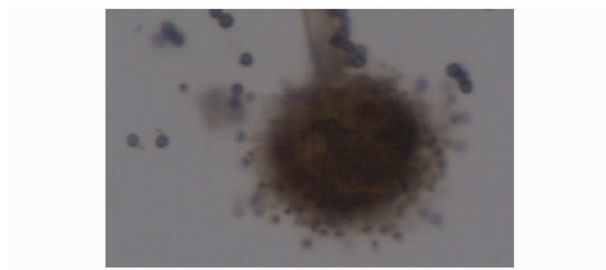


图 1 H812 菌株孢子囊

Fig. 1 The sporangia characteristics of H812

2.2 发酵培养基及发酵条件优化结果

2.2.1 培养基浓度对腐植酸产量的影响 培养基中的碳源、氮源是菌体合成细胞物质、代谢产物的物质基础,同时也是微生物维持生命活动的能量来源。微生物生长代谢不仅需要合适的碳源种类、氮源种类,同时还需要合适的碳源浓度、氮源浓度及碳氮比例。甘蔗糖蜜酒精发酵液成分复杂,含有大量的有机物,碳源、氮源和无机盐离子种类丰富,能够提供微生物生长代谢所需要的营养物质。用纯水对甘蔗糖蜜酒精发酵液进行稀释,虽然不能改变碳源种类、氮源种类、无机盐离子种类及碳氮比例,但是能够改变碳源、氮源和无机盐离子浓度,获得不同浓度的甘蔗糖蜜酒精发酵液。

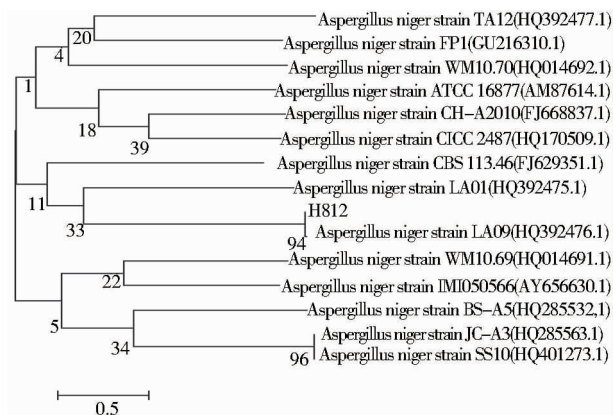


图2 H812菌株同源进化关系树

Fig. 2 Homology tree of H812

为确保最佳浓度,将培养至对数后期的菌株分别接种至 12°Bx、14°Bx、16°Bx、18°Bx、20°Bx、22°Bx 的甘蔗糖蜜酒精发酵液培养基中,按初始条件发酵 5 天后,测定腐植酸的含量。结果如图 3 所示,酒精发酵液浓度为 16°Bx 时,腐植酸的产量最高,产量达到 15.35g/L;当浓度较低时,培养基不能满足微生物的生长代谢的营养需求,腐植酸产量较低;浓度过高则降低了溶氧量,同时各种金属离子浓度变大,渗透压较大,从而抑制了微生物的生长代谢,导致腐植酸产量降低。因此,甘蔗糖蜜酒精发酵液浓度选择 16°Bx 较好。

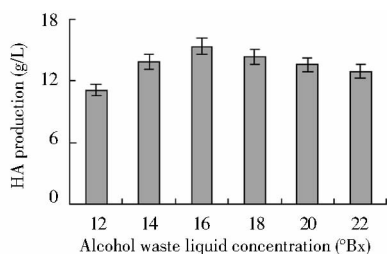


图3 糖蜜酒精发酵液浓度对 HA 产量的影响

Fig. 3 Effect of different alcohol waste liquid concentration on the HA production

2.2.2 发酵时间对腐植酸产量的影响 培养时间是影响微生物产腐植酸的一个重要条件,培养时间过短,培养基中大量的营养物质未被利用,复杂的腐植酸还未完全形成;培养时间过长,则导致代谢产物积累过多和菌体细胞自溶而影响腐植酸的产量。为了选择发酵的最佳时间,以确定后续实验的发酵周期,在上述优化条件下,分别发酵 4 天、5 天、6 天、7 天、8 天、9 天后进行腐植酸含量测定。实验结果(图 4)表明,培养时间对腐植酸产量有较大影响,随着培养时间的延长,菌株产

生的腐植酸量逐渐增加,当培养时间达到 7 天时,腐植酸含量达到 18.32g/L,培养时间超过 7 天后,腐植酸产量逐渐减少。因此,发酵时间选择 7 天最佳。

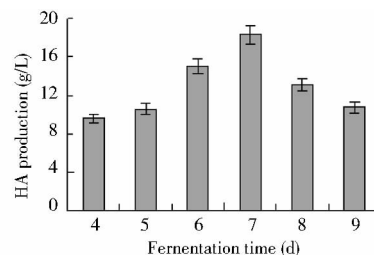


图4 发酵时间对 HA 产量的影响

Fig. 4 Effect of fermentation time on the HA production

2.2.3 发酵温度对腐植酸产量的影响 微生物的生长、代谢产物的合成都是在各种酶的催化作用下进行的,培养温度不仅影响微生物的生长量,而且对代谢产物的合成也有很大的影响。培养温度过低使菌株生长缓慢,生长延滞期长;温度过高则导致微生物细胞内酶系失活,从而抑制菌株生长和腐植酸产物的合成。在上述已经优化的最佳培养条件下,设计 28℃、31℃、34℃、37℃、40℃、43℃ 6 个发酵温度,分析不同培养温度对菌株产腐植酸影响。实验结果表明(图 5):改变培养的温度,微生物产生腐植酸的能力变化较大。随着培养温度升高,腐植酸的产量也随着增加,但培养温度超过 34℃ 时,温度越高,腐植酸的产量反而降低。因此,培养温度选择 34℃ 最合适,此时腐植酸含量为 23.18g/L。

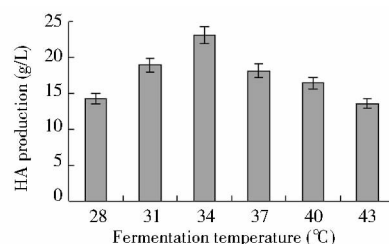


图5 发酵温度对 HA 产量的影响

Fig. 5 The impact of fermentation temperature on HA production

2.2.4 转速对腐植酸产量的影响 对于好氧的微生物,菌体在大量扩增过程中进行氧化分解代谢需要大量的氧气,采用适当的转速可以提供培养过程中足够的氧供给同时也减少不必要的动力消耗。因此在上述优化条件下,通过改变摇床转速来实现对发酵液中溶

氧浓度的调控,分别以 140r/min、160r/min、180r/min、200r/min、220r/min 的转速恒温培养,7 天后测定腐植酸的含量。实验结果如图 6 所示,摇床转速对腐植酸产量影响较大,菌株对转速要求也较高。可能由于菌株生长较快,呼吸强度较高,耗氧量较大,而 16°Bx 糖蜜酒精发酵液粘度较大,氧传递能力较低,因此对转速要求较高。当转速 200r/min 时溶解氧才能满足菌体生长代谢需求,腐植酸产量达到 31.70g/L,因此最佳转速为 200r/min。

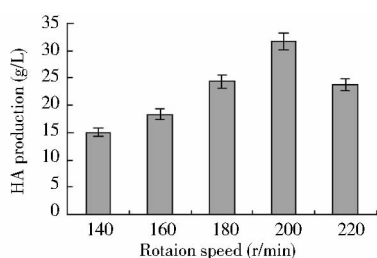


图 6 摇床转速对 HA 产量的影响

Fig. 6 The impact of rotation speed on HA production

2.2.5 初始 pH 对腐植酸产量的影响 由于氢离子与细胞膜上的酶相互作用,发酵培养基 pH 影响微生物的营养物质吸收、细胞膜电荷变化、发酵产物合成等方面,因此任何微生物的生长代谢都有其最适 pH 环境。调节糖蜜酒精发酵液液体培养基的初始 pH 值分别为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0,发酵后测定腐植酸的含量,寻找 H812 菌产腐植酸的最适 pH 范围。实验结果(图 7)表明:初始 pH 值对菌株产腐植酸有影响,当初始 pH 值为 7.0 时,产腐植酸最高。因此,培养基的最佳初始 pH 值应控制在 7.0。

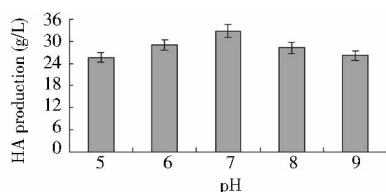


图 7 初始 pH 对 HA 产量的影响

Fig. 7 The impact of pH on HA production

2.2.6 接种量对腐植酸产量的影响 接种量的大小影响发酵的周期和产量:接种量小,菌体延滞期较长从而延长发酵周期,增加了污染机率和动力消耗;接种量大,有利于充分利用营养物质,缩短发酵周期,提高设备使用效率。因此选择合适的接种量不仅能确保最高的腐植酸产量,而且能实现节能减排的经济效益。分

别以 4%、6%、8%、10%、12%、14% 的接种量接入到上述优化后的培养基中发酵,寻找最适接种量。实验结果如图 8 所示,发现在 12% 接种量时具有最大的产量,本研究确定最适宜接种量为 12%。

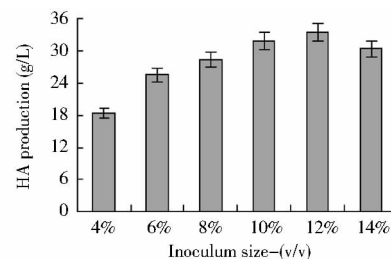


图 8 接种量对 HA 产量的影响

Fig. 8 The impact of inoculum size on HA production

2.2.7 装液量对腐植酸产量的影响 装液量也是影响摇瓶发酵溶解氧的主要因素之一,在摇瓶发酵时,一般通过开始培养时选择合适的摇瓶转速和装液量来控制溶解氧量。在摇瓶转速一定时,装液量的多少直接影响培养基中的溶氧量,因此选择合适的装液量能在一定程度上提高腐植酸产量。在保持其他单因素优化后的最佳条件下,本文考察了装液量 30ml、50ml、60ml、70ml、80ml 对腐植酸产量的影响。装液量体积实验显示,250ml 的摇瓶装液量为 50ml 时,腐植酸产量最高,达到 33.66g/L(图 9)。

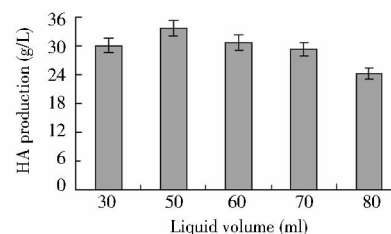


图 9 装液量对于 HA 产量的影响

Fig. 9 The liquid volume impact on the HA production

2.2.8 发酵条件正交试验结果 通过对上述单因素实验,初步确定了 H812 发酵产腐植酸的最优条件,对单因素实验数据整理分析发现,发酵时间、发酵温度、摇床转速三个因素对于 H812 发酵产腐植酸影响较大。为了进一步确定这三个因素的最优组合,以单因素实验为依据,对发酵时间、发酵温度、摇床转速三个因素进行正交试验,其他条件均保持单因素优化确定的最优条件。

根据正交设计实验结果表(表 1)和方差分析表

(表2)可以看出,三个因素中发酵温度对发酵影响显著,三个因素的影响顺序为:温度 > 转速 > 时间,关于三个因素的最佳条件组合为 $A_3B_2C_2$,即 H812 菌株在 34℃、200r/min 培养 8d 的条件下腐植酸产量最高。由于正交设计实验组中没有出现该组合,故在 $A_3B_2C_2$ 的

条件下做一组验证性实验。验证性实验结果显示,在 8d、200r/min、34℃ 的条件下腐植酸产量为 38.12 g/L,比在 200r/min、34℃ 发酵培养 6d 的条件下腐植酸产量高 4.14g/L。因此本实验选择三个因素组合为 8d、34℃、200r/min。

表 1 H812 菌株发酵条件正交试验结果

Table1 The results of orthogonal test $L_9(3^4)$ of fermentation conditions of H812

No.	Factors				HA weight (g/L)
	A Cultural time (d)	B Rotate speed (r/min)	C Temperature (℃)	D Error	
1	6	180	31	1	25.98
2	6	200	34	2	33.98
3	6	220	37	3	18.26
4	7	180	34	3	29.83
5	7	200	37	1	20.22
6	7	220	31	2	26.88
7	8	180	37	2	20.88
8	8	200	31	3	28.92
9	8	220	34	1	30.59
K_1	26.073	25.563	27.260	25.597	
K_2	25.643	27.707	31.467	27.247	
K_3	26.797	25.243	19.787	25.670	
Ri	1.154	2.464	11.680	1.650	

表 2 H812 菌株发酵条件正交试验方差分析结果

Table 2 The variance analysis of orthogonal test $L_9(3^4)$ of fermentation conditions of H812

Factor	SS	df	F	$F_{0.05}$	Significant level
Cultural time	2.038	2	0.391	19.000	No significant
Rotate speed	10.764	2	2.064	19.000	No significant
Temperature	209.969	2	40.270	19.000	Significant
Error	5.214	2	1.000	19.000	No significant
Error	5.21	2			

3 结 论

(1)根据 ITS 序列分析结果,结合菌落形态及特征结构的观察结果,推测菌株 H812 是丛梗孢目丛梗孢科曲霉属真菌。

(2)通过单因素试验和正交试验发现产腐植酸的最佳条件组合为:培养基浓度 16°Bx、发酵时间 8 天、温度 34℃、转速 200r/min、初始 pH7.0、接种量 12%、装液量 50ml/250ml,其中温度对腐植酸产量有显著影响。在此条件下腐植酸产量达到 38.12g/L,较优化前提高了 148.34%。

(3)本试验以糖蜜酒精发酵液为原料,通过发酵法生产广泛应用的腐植酸,不仅将酒精发酵液变废为宝,促进了资源的循环再生利用,为农业废弃物综合利用、

废物的资源化和功能化提供了参考,同时也为提升我国生物腐植酸产品的生产能力与质量水平,实现生物腐植酸的产业化打下基础,凸显“资源-产品-废弃物-再生资源”的循环式经济流程,生态效益和经济效益显著,具有很好的发展前景。

参考文献

- [1] 黄伟添,陈乐军. 甘蔗糖蜜酒精废液综合利用的探索与实践. 甘蔗糖业,1997,5:41-45.
Huang W T, Chen L J. Reserch and experiment of the comprehensive utilization of alcohol waste from cane molasses. Sugarcane and Cane sugar, 1977,5:41-45.
- [2] 李爱华. 浅谈糖蜜酒精废液的综合利用. 酿酒,1998,6:31-32.
Li A H. Discussion on the comprehensive utilization of molasses alcohol waste water, Liquor Making,1998,6:31-32.

- [3] 李清解. 糖蜜酒精废液的处理和利用. 化工技术与开发, 1990, 1:55-59.
Li Q J. Treatment and utilization of molasses alcohol waste water. Technology & Development of Chemical Industry, 1990, 1:55-59.
- [4] 郑平. 煤炭腐植酸的生产和应用. 北京: 化学工业出版社, 1991.
Zheng P. Production and Application of Coal Humic Acid. Beijing: Chemical Industry Press, 1991.
- [5] Fein J B, Boily J F, Guclu K, et al. Experimental study of humic acid adsorption onto bacteria and Al-oxide minerals surfaces. Chemical Geology, 1999, (162): 33-45.
- [6] 曾宪成, 成绍鑫. 腐植酸的主要类别. 腐植酸, 2002, 2: 4-6.
Zeng X C, Cheng S X. The main categories of humic acid. Humic Acid, 2002, 2: 4-6.
- [7] 柳丽芬, 阳卫军, 韩威, 等. 腐植酸微生物溶解研究. 煤炭转化, 1997, 20(1): 71-76.
Liu L F, Yang W J, Han W, et al. Study on the bio-solubilization of humic acid by microorganisms. Coal Conversion, 1997, 20(1): 71-76.
- [8] 祖诺夫, 胡宝龙, 周德庆. 微生物实验教程. 上海: 复旦大学出版社, 1993.
Zu N F, Hu B L, Zhou D Q. Microbiology Experiment Course. Shanghai: Fudan University Press, 1993.
- [9] 唐丽杰. 微生物实验. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学出版社, 2005.
Tang L J. Microbiology Experiment. Harbin: Harbin Institute of Technology Press, 2005.
- [10] White T J, Bruns T, Lee S. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. New York: Academic Press Inc., 1990. 5-322.
- [11] 孙淑和, 孙学彬, 赵冰清, 等. 腐植酸钠. 中华人民共和国化工部. 1987 年. HG/T 3278-1987.
Sun S H, Sun X B, Zhao B Q, et al. Sodium Humate. The Chemical Industry Ministry of China. 1987. HG/T 3278-1987.
- [12] 马志军. 对腐植酸在肥料应用中检测方法的几点意见. 腐植酸, 2004, 4: 11-12.
Ma Z J. On the humic acid in fertilizer application methods for the detection of a few opinion. Humic Acid, 2004, 4: 11-12.

Identification of Microorganism Producing Humic Acids with Sugarcane Molasses Alcohol Waste Water and Optimum the Fermentation Conditions

FENG Ling-bo¹ ZHOU Rui-fang¹ ZHAO Chen-long¹ CHEN Gui-guang¹ LI Yang-rui² LI Nan^{1,2,3}

(1 College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China)

(2 Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China)

(3 Guangxi Crop Genetic Improvement and Biotechnology Laboratory, Nanning 530007, China)

Abstract The H812 strain was screened from sludge, it could make use of sugarcane molasses alcohol waste water to product humic acid, and it was preliminarily identified as *Aspergillus* sp by its culture characteristics, morphological features and ITS sequence analysis. The results of the monofactorial researchs and orthogonal experiments showed that 16° Bx was the optimal Bx of molasses alcohol waste water. The optimal fermentation conditions were: 8days, 34℃, 200r/min, pH7.0, inoculum size 12%, liquid volume 50ml/250ml, and the fermentation temperature had significant influence on the production of humic acid. At optimized fermentation conditions, HA content fermented with H812 strain was 38.12 g/L, and increased by 148.34% than before optimization.

Key words H812 strain Sugarcane molasses alcohol waste water Humic acid Identification Ferment conditions optimization