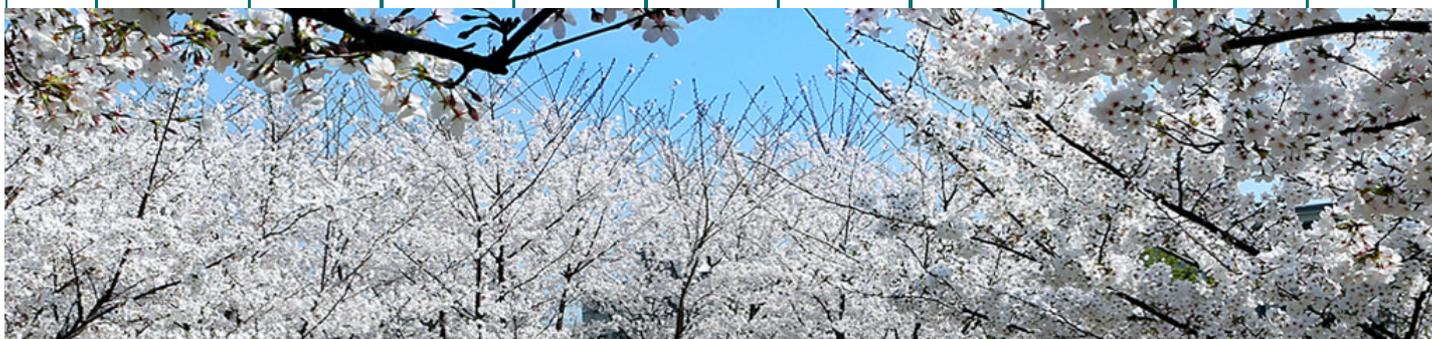




首页	实验室概况	研究方向	承担项目	科研成果	人才培养	学术交流	开放基金	规章制度	测试平台	下载中心
----	-------	------	------	------	------	------	------	------	------	------



人才培养

优秀学位论文

当前位置: 首页 > 人才培养 > 优秀学位论文 > 2014年

毕业生

2015年

2014年

2013年

2012年

2011年

2010年

优秀学位论文

(1)

在读研究生

硕士研究生：刘小波（2014年江苏省优秀硕士学位论文）

导师：余晓斌 教授

专业：发酵工程

论文题目：丙酮丁醇梭菌的选育及其丁醇耐受性和发酵工艺的研究

论文摘要：与其他生物燃料相比，生物丁醇各方面的性质与汽油最为接近，因此被认为是一种可替代汽油的、非常有前景的可再生生物燃料。生物丁醇的研究和生产已成为世界能源领域热点话题之一。本文主要从丙酮丁醇梭菌的选育、丁醇耐受性及其发酵工艺的优化三方面进行研究，旨在为丁醇发酵提供更多的种质资源、研究方法和思路。

本实验根据丁醇高产菌株的特性，设计出丁醇-刃天青-生淀粉多因子复合筛选方案。利用此筛选方案从我国西北成功地分离获得了一株丁醇产生菌D64并经鉴定为丙酮丁醇梭菌（*Clostridium acetobutylicum*）。结果表明，多因子复合筛选方法较其他单因子筛选方法更有效，能较快获得丁醇高产菌。

采用人工模拟生物进化方法将野生菌株D64进行多轮次丁醇胁迫驯化和多因子复合筛选后，获得丁醇耐受性突变株T64，其丁醇耐受性较野生菌（1.5%，v/v）提高了66.7%，发酵7%玉米醪丁醇产量由13.35 g/L提高到14.18 g/L，总溶剂（丙酮，丁醇，乙醇）达到21.2 g/L。*C. acetobutylicum* T64再经氮离子束注入诱变后共获得NT641、NT642、NT643、NT644、NT645五株突变株且最高可耐受3%的丁醇，其中NT642菌株发酵7%玉米醪丁醇产量为15.4 g/L，总溶剂为22.4 g/L，较原始菌株分别提高了8.6%和5.6%。这些丁醇耐受性突变株为进一步选育高产菌提供了优良的菌株来源。

丁醇对细胞的生长具有明显的抑制作用，在同一丁醇浓度下，丁醇耐受性越强的细胞更能适应这种不良的生长环境。同时，温度也能影响*C. acetobutylicum* NT642细胞对丁醇的耐受性。当丁醇浓度在2%以下，低温（35℃和37℃）时丁醇对细胞生长的抑制作用明显较高温（40℃）时弱；然而当丁醇浓度更高时，则高温（40℃）时丁醇的抑制作用更强。通过菌落形态和电镜观察发现，丁醇耐受菌可通过细胞形态的改变来抵抗丁醇的毒害作用。此外，提高生产菌株对丁醇的耐受性，可提高其丁醇产量、丁醇比，但总溶剂并未得到明显提高。

木薯的成本低且淀粉含量高，是一种可开发的发酵工艺原料。单纯以6%木薯发酵，丁醇和总溶剂产量分别只有10 g/L和18 g/L左右，然而将木薯和玉米按3:1混合发酵时丁醇和总溶剂产量分别可提高到11 g/L和21 g/L。以木薯为原料发酵时，培养基无需酶解只需糊化处理20 min，其最适初始pH范围为5.0~6.0，但必须补充一定氮源。

在6%的木薯培养基中添加2 g/L NH₄Ac，丁醇产量可达到11.8 g/L，总溶剂为21 g/L以上，分别较对照提高约1.8 g/L和4 g/L。此外，发酵12 h后，添加0.2%的NaHCO₃丁醇和总溶剂的产量分别达到13 g/L和21 g/L左右，较对照分别提高约3 g/L和5 g/L。当发酵进入产溶剂期（约24 h），补加8 g/L的葡萄糖丁醇和总溶剂分别可提高1.7 g/L和3.96 g/L，但对NH₄Ac的补加则应选择在前酸前期而不是产溶剂期。

关键词：生物丁醇；丙酮丁醇梭菌；选育；丁醇耐受性；发酵工艺

(2)

硕士研究生：殷晓霞（2014年江苏省优秀硕士学位论文）

导 师：陈 坚 教授

专 业：发酵工程

论 文 题 目：代谢工程改造解脂亚溶酵母 α -酮戊二酸

论文摘要：本论文以一株能在胞外积累大量 α -酮戊二酸和丙酮酸的解脂亚溶酵母(*Yarrowia lipolytica*)硫酸素营养缺陷型菌株CCTCC M207143为出发菌株，以与丙酮酸代谢密切相关的乙酰辅酶A代谢途径和丙酮酸羧化途径为研究对象，结合代谢工程和发酵工程手段，强化丙酮酸进入三羧酸循环(TCA循环)的代谢通量，实现丙酮酸向 α -酮戊二酸的有效转化。在促进 α -酮戊二酸过量合成的同时减少副产物—丙酮酸的积累，提高发酵液中 α -酮戊二酸对丙酮酸的浓度比。本论文主要结论如下：

(1) 通过酶切连接技术，将潮霉素磷酸转移酶基因(hph)替换现有质粒p0上的尿嘧啶标记基因(URA3)，构建重组质粒p0(hph)。重组质粒p0(hph)中hph基因赋予p0(hph)质粒对潮霉素B的抗性，可作为后续重组菌筛选的标记基因。将p0(hph)转化*Y. lipolytica* WSH-Z06感受态细胞，在200 μ g/mL的潮霉素B平板上筛选重组菌*Y. lipolytica*-CON，作为后续试验的对照菌。

(2) 调控乙酰辅酶A代谢促进 α -酮戊二酸的生成。(1) 选取来自酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK2)的乙酰辅酶A合成酶基因(ACS1)，构建整合型表达载体p0(hph)-ACS1，将p0(hph)-ACS1转化*Y. lipolytica* WSH-Z06感受态细胞，经筛选得到一株过量表达*S. cerevisiae*乙酰辅酶A合成酶的重组菌*Y. lipolytica*-ACS1。重组菌胞内乙酰辅酶A合成酶的比酶活可达0.92 U/mg protein，比对照菌提高10.5倍，胞内乙酰辅酶A含量达到4.97 nmol/mg DCW，比对照菌提高131.2%。摇瓶发酵结果表明，过量表达ACS1基因使重组菌中 α -酮戊二酸产量达到42.2 g/L，比对照菌(36.3 g/L)提高16.2%；同时丙酮酸产量为14.5 g/L，比对照菌降低31.6%。(2) 选取来自小鼠(*Mus musculus*)的ATP-柠檬酸裂解酶基因(ACL)，构建整合型表达载体p0(hph)-ACL，将p0(hph)-ACL转化*Y. lipolytica* WSH-Z06感受态细胞，经筛选得到一株过量表达*M. musculus* ATP-柠檬酸裂解酶的重组菌*Y. lipolytica*-ACL。重组菌胞内ATP-柠檬酸裂解酶的比酶活可达1.51 U/mg protein，比对照菌提高11.6倍，胞内乙酰辅酶A含量达到5.25 nmol/mg DCW，比对照菌提高144.2%。摇瓶发酵结果表明，过量表达ACL基因使重组菌中 α -酮戊二酸产量达到46.7 g/L，比对照菌(36.3 g/L)提高28.6%；同时丙酮酸产量为10.6 g/L，比对照菌降低50%。以上结果表明，提高胞内乙酰辅酶A供给能够有效促进丙酮酸的进一步代谢并促进 α -酮戊二酸的过量积累。

(3) 强化丙酮酸羧化途径促进 α -酮戊二酸的生成。(1) 选取来自*S. cerevisiae* CEN.PK2的丙酮酸羧化酶基因(ScPYC1)，构建整合型表达载体p0(hph)-ScPYC1，将p0(hph)-ScPYC1转化*Y. lipolytica* WSH-Z06感受态细胞，筛选得到一株过量表达*S. cerevisiae*丙酮酸羧化酶的重组菌*Y. lipolytica*-ScPYC1。重组菌胞内丙酮酸羧化酶的比酶活可达0.59 U/mg protein，比对照菌提高6.5倍。摇瓶发酵结果表明，过量表达ScPYC1基因使重组菌中 α -酮戊二酸产量达到45.2 g/L，比对照菌(36.3 g/L)提高24.5%；同时丙酮酸产量为10.2 g/L，比对照菌降低51.9%。(2) 选取来自米根霉(*Rhizopus oryzae*)的丙酮酸羧化酶基因(RoPYC2)，构建整合型表达载体p0(hph)-RoPYC2，将p0(hph)-RoPYC2转化*Y. lipolytica* WSH-Z06感受态细胞，筛选得到一株过量表达*R. oryzae*丙酮酸羧化酶的重组菌*Y. lipolytica*-RoPYC2。重组菌胞内丙酮酸羧化酶的比酶活可达0.87 U/mg protein，比对照菌提高10.2倍。摇瓶发酵结果表明，过量表达RoPYC2基因使 α -酮戊二酸产量达到49.1 g/L，比对照菌(36.3 g/L)提高35.3%；同时丙酮酸产量为6.4 g/L，比对照菌降低69.8%。(3) 利用定量PCR和酶活测定技术，研究过量表达丙酮酸羧化酶前后与 α -酮戊二酸和丙酮酸代谢相关途径的变化情况。综合分析重组菌中关键基因的转录和关键酶活性的变化，可知强化丙酮酸羧化途径能够有效促进碳代谢流经丙酮酸羧化途径进入TCA循环并强化异柠檬酸向 α -酮戊二酸的转化，从而提高 α -酮戊二酸的产量。

(4) 重组菌的发酵优化与控制。研究乙酸钠对*Y. lipolytica*-ACS1产酸的影响、柠檬酸三钠对*Y. lipolytica*-ACL产酸的影响以及生物素对*Y. lipolytica*-ScPYC1和*Y. lipolytica*-RoPYC2产酸的影响。结果表明，乙酸钠的最佳添加量为6 g/L，此时*Y. lipolytica*-ACS1中 α -酮戊二酸产量达到49.2 g/L，比对照(42.2 g/L)提高16.6%，丙酮酸产量为17.5 g/L，比对照提高20.7%。柠檬酸三钠的最佳添加量是4 g/L，此时*Y. lipolytica*-ACL中 α -酮戊二酸产量达到53.1 g/L，比对照(46.7 g/L)提高13.7%，丙酮酸产量为7.4 g/L，比对照降低30.2%。在*Y. lipolytica*-ScPYC1中，生物素的最佳添加量是0.6 mg/L，此时 α -酮戊二酸产量达到51.2 g/L，比对照(45.2 g/L)提高13.3%，丙酮酸产量为7.2 g/L，比对照降低29.4%。在*Y. lipolytica*-RoPYC2中，生物素的最佳添加量是1.0 mg/L，此时 α -酮戊二酸产量达到55.6 g/L，比对照(49.1 g/L)提高13.2%，丙酮酸产量为4.6 g/L，比对照降低8.1%。在3-L发酵罐上采取pH两阶段控制策略， α -酮戊二酸的最大产量可达62.5 g/L，比对照提高47.4%，丙酮酸产量仅为13.5 g/L，比对照降低61.5%， α -酮戊二酸/C丙酮酸比对照提高282.6%。以上结果表明，通过适当的发酵优化和控制，重组菌中 α -酮戊二酸产量得到显著提高。

关键词： α -酮戊二酸；丙酮酸；乙酰辅酶A代谢；丙酮酸羧化；代谢工程

(3)

硕士研究生：周芸芸(2014年江苏省优秀硕士学位论文)

导 师：李 崎 教授

专 业：发酵工程

论 文 题 目：酒花新鲜度评价体系的初步研究

论文摘要：酒花是酿造啤酒的重要原料，可以赋予啤酒令人愉悦的苦味。其中苦味物质 α -酸和 β -酸既是其主要的风味物质，又是酒花中抑菌、防止杂菌污染的主要物质。酒花的质量影响着啤酒的口感、风味及稳定性。

本文建立了反相高效液相色谱法同时检测酒花中 α -酸、 β -酸和异 α -酸的主要异构体。色谱柱为：EC 250/4 Nucleosil 100-5 C18，保护柱：CC 8/4 Nucleosil 100-5 C18，流动相A：水溶液(磷酸0.1%，0.2 mM EDTANa₂)；流动相B：乙

臍。流速为1.0 mL/min, 双波长检测UV270 nm和UV315 nm, 柱温30°C, 进样体积10 μ L。方法精密度高(R2在2%左右), 检测限低, 加标回收率90.0-105.0%之间。该方法同时可将酒花中 α -酸、 β -酸6种主要异构体和异 α -酸3种主要异构体共9种物质一次性分离, 操作简单、准确可靠。

利用上述RP-HPLC方法深入分析了不同品种颗粒酒花在不同温度储藏过程中 α -酸和 β -酸的变化以及异 α -酸的生成情况。结果表明, 酒花在储藏过程中, α -酸和 β -酸含量不断减少, 其中葎草酮的变化最明显。不同品种的酒花的降解速度有很大差异, 以 α -酸为例, 在50°C条件下老化6天后, 青岛大花、马可波罗、哥伦布和混合颗粒中的 α -酸分别下降了8.05%、12.24%、12.02%和5.12%。30°C条件下老化12个星期后, 分别下降了3.80%、9.99%、8.35%和4.86%。自然储藏-4°C条件下8个月后分别下降了1.42%、5.41%、3.64%和2.44%, 可能与酒花中苦味物质组分分布相关, 如M α -酸/M β -酸、M葎草酮/M加葎草酮、合葎草酮的含量等。异 α -酸会在酒花老化初期产生, 含量较低, 会随着酒花老化的而发生氧化降解成其他老化成分。同时在实验中发现, 酒花新鲜度的变化可以很好的用酒花新鲜度指数 (Hop Freshness Index, HFI) = M葎草酮/M β -酸/M α -酸来描述, 该指标不受酒花中 α -酸含量的限制, 与HSI值和劣化度相比, 更具稳定性。该指标同时适用于不同温度引起的酒花老化的评价, 具有很好的应用前景。

初步分析了强制老化后酒花的主要成分, 研究发现在酒花老化过程中 α 酸和 β 酸发生氧化降解, 部分生成异 α 酸, 随着老化的进行, 继而产生如葎草酮和希鲁酮等衍生氧化物。酒花中的总多酚含量逐渐减少, 具有抗氧化性的酚酸也发生氧化聚合, 使用液相色谱检测几乎无响应峰。通过测定总多酚、DPPH清除率、TRAP值、TBA值等抗氧化指标来分析老化的酒花对麦汁和啤酒的抗氧化能力影响, 实验发现老化酒花的主要成分发生氧化降解或是氧化聚合, 丧失了有效成分, 对麦汁和啤酒风味稳定性影响较大, SI值可以很好的反映麦汁和啤酒的抗氧化能力和风味稳定性的变化。

关键词: 酒花; α -酸和 β -酸; 异 α -酸; 酒花新鲜度指数(HFI); 抗氧化能力



技术支持: 信息化建设与管理中心
校内备案号: JW备170139

地址: 江苏省无锡市蠡湖大道1800号

邮编: 214122

联系电话: 0510-85912032

服务邮箱: klib@jiangnan.edu.cn



微信服务号



微信订阅号



e江南APP