

一株中型假丝酵母发酵木糖产乙醇的特性研究

胡海军 葛向阳* 梁运祥

(华中农业大学 农业微生物学国家重点实验室 发酵工程研究室 武汉 430070)

摘要: 本研究对自然界中筛选得到的 1 株可以发酵木糖产乙醇的中型假丝酵母(*Candida intermedia*)的特性进行了研究。该菌株在 28°C、120 r/min、72 h 条件下, 发酵 3%木糖的乙醇产率最高, 达到理论值的 43.70%, 发酵 7%木糖得到的乙醇产量最高, 为 6.480 g/L。发酵时间延长到 156 h, 可以利用 8%木糖产乙醇 21.225 g/L, 产率为理论值的 72.87%。该菌株还可以在同样条件下, 发酵 13%葡萄糖得到乙醇 50.965 g/L, 达到理论值的 76.90%。以 3%+2%+3%分批补加糖, 比一次性发酵 8%木糖的乙醇产量提高 9.91%。在葡萄糖和木糖的混合培养基中, 优先利用葡萄糖, 同时还表现出葡萄糖对木糖发酵的促进作用, 当 2%的木糖与 6%葡萄糖混合时, 乙醇产量比两者单独发酵的加和提高 25%。

关键词: 木糖, 乙醇, 中型假丝酵母

Characters of Ethanol Producing *Candida intermedia* Yeast in Xylose Fermentation

HU Hai-Jun GE Xiang-Yang* LIANG Yun-Xiang

(Fermentation Engineering Research Laboratory, State Key Laboratory of Agricultural Microbiology,
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract: Characters of one *Candida intermedia* yeast strain which isolated from nature can produce ethanol from xylose-fermenting been systemic studied. In conditions 28°C, 120 r/min, 72 h, it can produce 6.480 g/L ethanol from 7% xylose and 43.70% theoretical production of ethanol from 3% xylose. It can produce up to 21.225 g/L ethanol when incubation time prolong to 156 h from 8% xylose. It also can ferment 13% glucose produce 50.965 g/L ethanol and reach 76.90% of theoretical ethanol production, respectively. Compared to CK, ethanol productivity can be improved 9.91% when add 8% xylose in three times as 3%, 2% and 3%, respectively. Glucose can be first utilized in the mixture sugar medium. When the ratio of xylose vs. glucose is 3:1 in mixture sugar, the productivity of ethanol can be improving 25%.

Keywords: Xylose, Ethanol, *Candida intermedia*

以纤维质材料为原料生产乙醇是缓解能源危机的方向之一。天然纤维素的降解产物中六碳糖(葡萄糖、半乳糖和甘露糖)约占 2/3, 五碳糖(D-木糖和 L-

阿拉伯糖)约占 1/3。而半纤维素的水解产物中 D-木糖高达 90%^[1]。

从自然界中可分离到多种发酵木糖产生乙醇的

菌种, 比较常见的主要有树干毕赤酵母(*Pichia stipitis*)、丝孢酵母(*Trichosporon* sp.)、管囊酵母(*Pachysolen tannophilus*)^[2]、耐热甲基营养酵母(*Hansenula polymorpha*)^[3]、休哈塔假丝酵母(*Candida shehatae*)^[4]、粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)^[5]等微生物类群。从自然界筛选木糖发酵菌株的工作在 20 世纪中期进行较多, 但由于发酵木糖产乙醇的能力不强, 所以其后研究不多。*P. tannophilus* NRRL Y-2460 是 1957 年从德国分离得到的, 发酵 20 g/L 木糖得到的乙醇为 3.68 g/L, 木糖的利用率仅有 18.4%; *P. stipitis* NRRL Y-7124 是 1967 年从法国筛选得到的, 研究最为广泛和深入, 并成功地用于发酵麦秸和水葫芦等纤维质原料生产乙醇^[6,7], 发酵 20 g/L 木糖得到的乙醇为 5.40 g/L, 木糖的利用率仅有 27.0%, 其他的菌株就更低^[2]。

菌株的木糖发酵特性研究工作进行较多, 耐热甲基营养酵母(*H. polymorpha*)野生型菌株可以在 30°C 至 45°C 温度范围内发酵葡萄糖和木糖得到乙醇, 对照 *P. stipitis* 反而在这个温度不能有效地发酵碳源。*H. polymorpha* 与 *P. stipitis* 相比表现出对乙醇有更高的耐受性^[3]。工程菌 *S. cerevisiae* 424A(LNH-ST)的生长动力学和在不同培养基上的乙醇产率等特性得到了详细的研究^[8]。在处理亚硫酸纸浆废液过程中, 运用到了菌株 *S. cerevisiae* 259ST 生产乙醇^[9]。同时也有用大肠杆菌 *Escherichia coli* KO11 构建重组菌株来进行木糖发酵的研究^[10]。为了在发酵中同时利用五碳糖和六碳糖, 休哈塔假丝酵母 *Candida shehatae* 和 *S. cerevisiae* 被用于混合发酵的研究中^[4]。

本研究筛选得到的菌株 3 对木糖有很好的发酵性能, 也能够高效地发酵葡萄糖。这些特性很适合于以纤维质为原料进行乙醇的工业化生产菌株要求, 所以有必要对它们的生长特性与发酵特性进行更加深入的研究, 找到最佳的发酵条件。对微生物的基本性状的了解不仅是工业生产的基础, 而且是进行分子生物学改造的基础。

1 材料与方法

1.1 菌株

从华中农业大学的花圃土中筛选得到。18S rDNA 序列分析中, 菌株 3 与中型假丝酵母或间型假

丝酵母(*Candida intermedia*)具有高度的一致性, Max ident 值为 99%^[11]。

1.2 培养基

YPD 培养基(g/L, 下同): 葡萄糖 20, 蛋白胨 20, 酵母汁浸膏 10, 琼脂 20。

斜面培养基: 木糖 20, 蛋白胨 5, 酵母汁浸膏 3, 琼脂粉 20。

液体培养基: 木糖 80, 蛋白胨 5, 酵母汁浸膏 3。

单糖发酵培养基: 木糖(葡萄糖)10~190, 蛋白胨 5, 酵母汁浸膏 3。

混合糖发酵培养基: 总糖 80(木糖:葡萄糖=3:1、2:1、1:1、1:2、1:3), 蛋白胨 5, 酵母汁浸膏 3。1 × 10⁵ Pa 灭菌 30 min。

1.3 实验方法

1.3.1 发酵条件: 接种量 10%, 培养基装液量为 90 mL/250 mL 三角瓶, 摇床转速为 120 r/min, 温度为 28°C, 发酵 72 h。

1.3.2 乙醇测定: 发酵液蒸馏后^[12], 使用重铬酸钾-比色法^[13] 检测乙醇含量。

本文中乙醇产量为乙醇的质量体积比(g/L)

乙醇产率=实际乙醇产量 g/L ÷ (糖含量 g/L × 理论产量 g/g) × 100%

混合糖乙醇产率=实际乙醇产量 g/L ÷ (葡萄糖含量 g/L × 0.51 g/g + 木糖含量 g/L × 0.46 g/g) × 100%。

1.3.3 混合糖发酵液残留糖成分定性分析: 发酵液离心 4500 r/min 离心 15 min, 取上清, 使用 TLC (Thin Layer Chromatogram, 薄层层析)^[14] 定性检测残留糖成分。层析溶剂: 氯仿:甲醇 = 60:40 (V/V)。显色剂为苯胺-二苯胺-磷酸: 取 1 g 二苯胺、1 mL 苯胺和 5 mL 85%磷酸溶于 50 mL 丙酮中。

1.3.4 分批补糖对发酵产乙醇的影响试验: 把浓度为 8% (M/V) 的木糖或葡萄糖, 分 3 次添加, 起始培养基中添加 3%, 发酵 24 h 和 48 h 后分别加入 2% 和 3%, 记为 3%+2%+3%; 其他分批添加的比例为 3%+3%+2% 和 4%+2%+2%。对照为 8% 的起始培养基木糖或葡萄糖浓度。

2 结果与分析

2.1 木糖发酵结果

在木糖浓度为 7% 时, 乙醇产量最大, 为

6.480 g/L, 在木糖浓度为 3%时, 乙醇产率最大, 为理论值的 43.70%。菌株 3 发酵不同浓度木糖时, 乙醇的产量与产率的最大不是同步达到的(如图 1)。

2.2 葡萄糖发酵结果

菌株 3 发酵不同浓度葡萄糖时, 在葡萄糖浓度为 13%时, 乙醇产量与产率同步达到最大, 分别为 50.965 g/L 和理论值的 76.90% (图 2)。

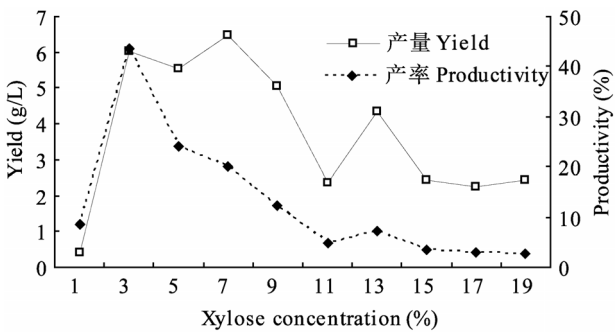


图 1 菌株 3 发酵木糖的乙醇产量与产率
Fig. 1 Ethanol yield and productivity of strain 3 from xylose

天然纤维素降解液中的主要成分是葡萄糖和木糖, 菌株 3 对葡萄糖和木糖都有很高的发酵能力, 在纤维素乙醇发酵中有一定应用前景。

2.3 混合糖发酵结果

对各个比例的发酵液进行了薄层层析分析, 如图 3。在葡萄糖和木糖不同比例的发酵液中, 残留的

成分 R_f 值与木糖标准品的 R_f 值相等, 说明残留的糖都是木糖, 在发酵中, 葡萄糖得到了优先利用。

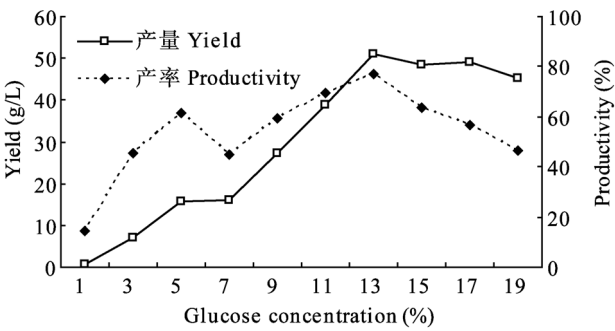


图 2 菌株 3 发酵木糖的产量与产率
Fig. 2 Ethanol yield and productivity of strain 3 from glucose

研究菌株 3 发酵 5 种不同比例的木糖和葡萄糖混合培养基, 发现发酵混合糖的乙醇产量, 比单独发酵等量木糖和葡萄糖的乙醇产量的加和提高了 2%~25%。当木糖和葡萄糖比例为 3:1 时, 即 6%的木糖与 2%葡萄糖混合时, 乙醇产量提高幅度最大, 为 25%。

2.4 分批补糖方式对发酵结果的影响

分别进行了 3%+2%+3%、3%+3%+2%和 4%+2%+2%比例的分批补糖发酵, 结果表明菌株 3 比一次性发酵 8%的木糖或葡萄糖的乙醇产量都有不同

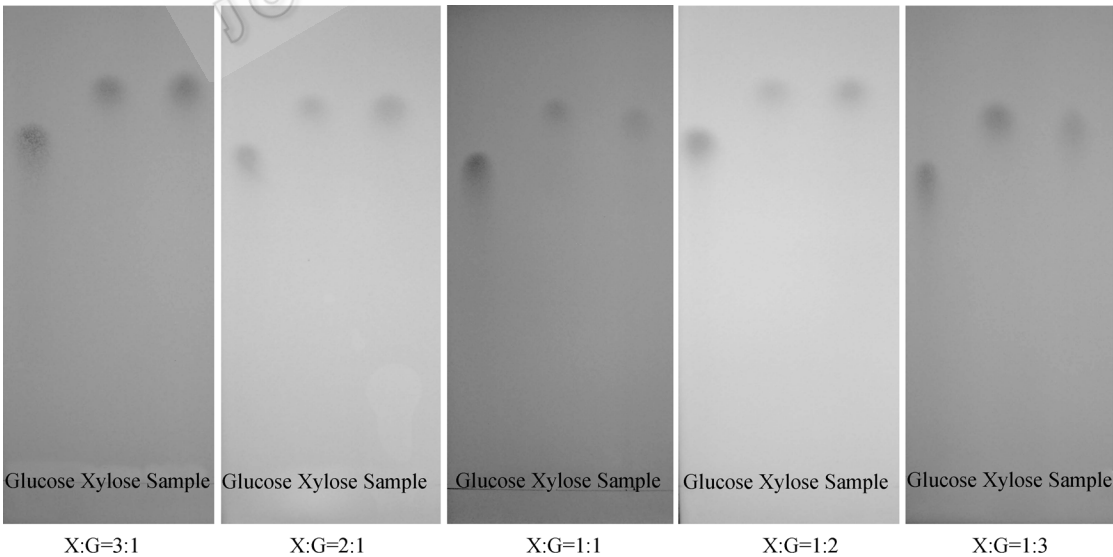


图 3 发酵液薄层层析照片
Fig. 3 TLC photos of fermented liquid

注：图中 Glucose 为葡萄糖标准品, Xylose 为木糖标准品, Sample 为菌株 3 发酵液, X:G 代表发酵液中木糖与葡萄糖的混合比例
Note: Glucose: Glucose standard sample; Xylose: Xylose standard sample; Sample: Strain 3 fermented liquid sample; X: Xylose; G: Glucose; X:G: Mixed ratio of Xylose to Glucose in liquid medium

程度的提高。在 3%+2%+3%分批补糖发酵中,效果最明显,发酵葡萄糖的乙醇产量提高了 24.65%,发酵木糖的乙醇产量提高 9.91%(见图 4 和图 5)。

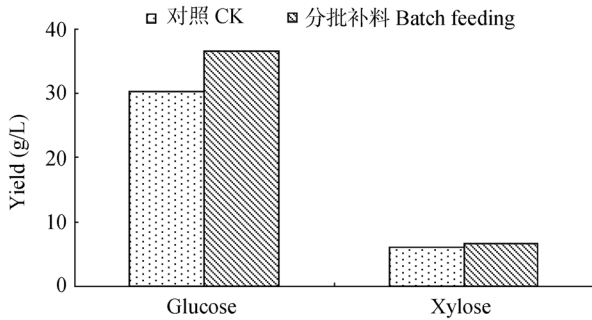


图 4 3%+2%+3%分批补糖对乙醇产量的提高作用
Fig. 4 Improvement to ethanol yield of batch feeding as 3%+2%+3%

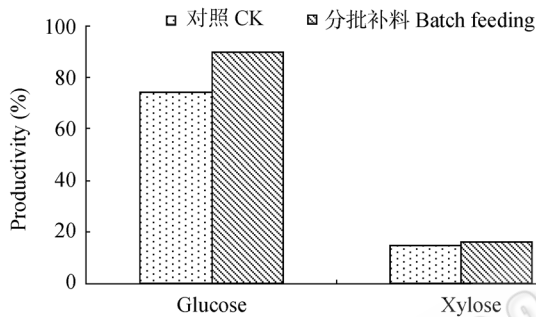


图 5 3%+2%+3%分批补糖对乙醇产率的提高作用
Fig. 5 Improvement to ethanol productivity of batch feeding as 3%+2%+3%

2.5 通氧状况对木糖发酵结果的影响

根据图 6 中曲线,可以判定随着摇床转速的提高,三角瓶中的供氧情况得到改善,从而带来的乙醇产量的提高趋势很明显,而且在 180 r/min 以后,乙醇产量还有进一步提高的趋向。通氧情况对菌株 3 的发酵能力有很大的促进作用。

2.6 发酵时间对发酵结果的影响

从图 7 中的曲线可以知道,在发酵的前 120 h,乙醇产量增长缓慢。在 120 h 后,乙醇产量才有大幅度的增加。菌株 3 在发酵 156 h 后,乙醇产量达到最大,为 21.225 g/L,产率为理论值的 72.87%。

值得注意的是,菌株 3 发酵 132 h,乙醇产量就达到了 16.274 g/L,为最高产量的 76.67%。在保持乙醇总产量相当的前提下,减少发酵时间,从而可降低生产成本。

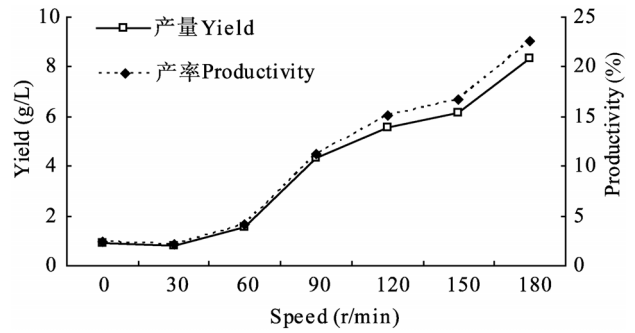


图 6 不同通氧状况的乙醇产量与产率
Fig. 6 Ethanol yield and productivity in different aeration level

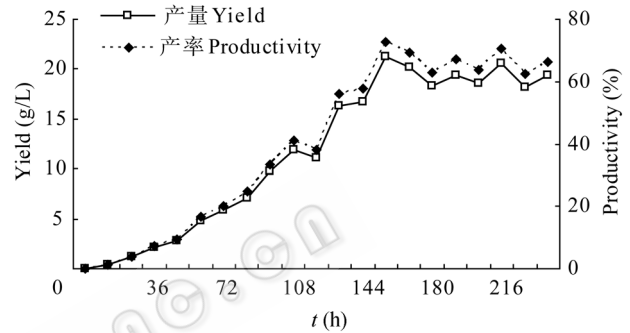


图 7 发酵时间对乙醇产量和产率的影响
Fig. 7 Effect of time to ethanol yield and productivity

3 结论与讨论

对筛选得到的 1 株中型假丝酵母菌株 3(*Candida intermedia*)发酵木糖产乙醇的部分特性进行了研究。该菌株在 28°C、120 r/min、72 h 条件下,发酵 3%木糖的乙醇产量达到理论值的 43.70%,发酵 7%木糖得到乙醇 6.480 g/L。发酵时间延长到 156 h,可以利用 8%木糖产乙醇 21.225 g/L,为理论值的 72.87%。该菌株还可以在同样条件下,发酵 13%葡萄糖得到乙醇 50.965 g/L,为理论值的 76.90%。分批加糖可以提高乙醇产量。混合糖发酵时,菌株 3 优先利用葡萄糖,葡萄糖的存在可能会促进对木糖的利用。提高转速对供氧情况的改善可以直接带来乙醇产量的提高。

发酵条件对发酵结果很重要,发酵培养基中碳源的种类,发酵时间和发酵起始 pH,以及培养基中的微量成分例如营养盐等都会对发酵结果产生不同程度的影响。下一步还可以针对发酵 pH、发酵温度等发酵条件进行详细的研究,对培养基成分进行进一步的优化。这都是从外界条件来着手提高发酵能

力,另外一个方面是通过传统物理化学诱变或者基因工程改造菌种,从内部来提高发酵木糖的能力。

从已经得到的结果来看,筛选得到的这个菌株性能较好,发酵木糖产乙醇 21.225 g/L,达到理论值的 72.87%,远远超出已有菌株的水平。菌株 3 同时可以高效发酵葡萄糖,而且葡萄糖的存在可以促进木糖的利用,使得该菌株在纤维素乙醇工业化生产的应用前景广阔。另外分批补糖的方式对乙醇发酵有明显的促进作用,这为工业化生产的工艺设计提供了理论指导。

参 考 文 献

- [1] 洪解放,张敏华,刘 成,等. 代谢木糖生产乙醇的基因工程菌研究进展. 食品与发酵工业, 2005, 31(1): 114–118.
- [2] 刘 健,陈洪章,李佐虎. 木糖发酵生产乙醇的研究. 工业微生物, 2001, 31(2): 36–41.
- [3] Olena BR, Oksana MC, Andrii AS. Xylose and cellobiose fermentation to ethanol by the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *FEMS Yeast Res*, 4: 157–164.
- [4] Lebeau T, Jouenne T, Junter GA. Long-term incomplete xylose fermentation, after glucose exhaustion, with *Candida shehatae* co-immobilized with *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Res*, 2007, 162(3): 211–218.
- [5] 张 潇,朱冬青,王 丹,等. 粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)木糖发酵的研究. 微生物学报, 2003, 43(4): 466–472.
- [6] Nigam JN. Ethanol production from wheat starw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. *Journal of Biotechnology*, 2001, 87: 17–27.
- [7] Nigam JN. Bioconversion of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to motor fuel ethanol by xylose-fermenting yeast. *Journal of Biotechnology*, 2002, 97: 107–116.
- [8] Shekar G, Leland MV. Kinetics of growth and ethanol production on different carbon substrates using genetically engineered xylose-fermenting yeast. *Bioresource Technology*, 2007, 98: 677–685.
- [9] Steve SH, Allison M, Janet L, et al. Xylose fermentation by genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* 259ST in spent sulfite liquor. *Bioresource Technology*, 2004, 92: 163–171.
- [10] Lima KGC, Takahashi CM, Alterthum F. Ethanol production from corn cob hydrolysates by *Escherichia coli* KO11. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2002, 29: 124–128.
- [11] 胡海军,梁运祥,葛向阳. 发酵木糖生产乙醇菌株的筛选与鉴定. 酿酒, 2008, 2: 58–60.
- [12] 吴国峰,李国全,马永强. 工业发酵分析. 北京: 化工出版社, 2006, pp.56–57.
- [13] 蔡定域. 实用白酒分析. 成都: 成都科技大学出版社, 1994, pp.543–544.
- [14] 赵永芳. 生物化学技术原理与应用. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002, pp.51–58.

稿件书写规范

论文中有关正、斜体的约定

物种的学名: 菌株的属名、种名(包括亚种、变种)用拉丁文斜体。属的首字母大写,其余小写,属以上用拉丁文正体。病毒一律用正体,首字母大写。

限制性内切酶: 前 3 个字母用斜体,后面的字母和编码正体平排,例如: *Bam*H 、 *Hind* 、 *Eco*R 、 *Msp* 、 *Sau*3A 等。

氨基酸和碱基的缩写: 氨基酸缩写用 3 个字母表示时,仅第一个字母大写,其余小写,正体。碱基缩写为大写正体。

基因符号用小写斜体,蛋白质符号首字母大写,用正体。