

木糖发酵产乙醇丝状真菌的鉴定及发酵特性

范金霞, 杨 谦, 姚 琳, 陈 刚

(哈尔滨工业大学 生命科学与工程系, 150001 哈尔滨, yangq@hit.edu.cn)

摘 要: 针对目前对丝状真菌的木糖发酵研究较少的现状, 应用杜氏管发酵法初筛和发酵测定法复筛对不同环境的土壤样品进行菌株的筛选, 并采用显微镜观察和 18S rRNA 序列扩增分析对菌种进行鉴定; 用重铬酸钾法对菌株的发酵特性进行研究. 结果表明: 筛选到一株能发酵木糖的丝状真菌, 命名为 cs-28; 经形态学和生物学鉴定为尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*); 它不仅能发酵木糖, 同时也能利用葡萄糖、蔗糖和玉米秸秆等多种发酵碳源; 其最适氮源为酵母提取物; 在温度为 30 ℃、初始 pH 值为 6.0、初始木糖质量浓度为 20 g · L⁻¹ 时乙醇产率最高. 该研究结果为木质纤维素原料的生物转化提供新的菌种资源和工艺参数.

关键词: 木糖; 乙醇; 丝状真菌; 发酵

中图分类号: Q939.5; Q815

文献标志码: A

文章编号: 0367-6234(2011)06-0065-05

Identification and characterization of filamentous fungus during xylose fermentation for ethanol production

FAN Jin-xia, YANG Qian, YAO Lin, CHEN Gang

(Dept. of Life Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, 150001 Harbin, China, yangq@hit.edu.cn)

Abstract: At present, yeast is the main microorganism involved in ethanol production using xylose as carbon source. The filamentous fungi have been less studied compared to yeast. Duchenne tube and ethanol yield assay methods were applied to screen different microbes for xylose fermentation. The microorganism producing the highest amount of ethanol was identified by microscopy and 18s rRNA amplification and analysis. Fermentation assays of this microorganism were studied by the Potassium dichromate method. The screening results showed that the organism code named cs-28 was *Fusarium oxysporum*. It was found that this fungus could ferment xylose, glucose, sucrose and corn stalk to produce ethanol. The optimal nitrogen source was yeast extract. The ethanol production rate was highest at initial pH 6.0 and 30 ℃, when initial xylose concentration was 20 g · L⁻¹. Thus, cs-28 can be used as a new strain for transformation of cellulose materials to ethanol. Moreover, characterization of cs-28 on xylose fermentation can be applied in technological advancement.

Key words: Xylose; ethanol; filamentous fungus; fermentation

燃料乙醇因其污染小、具有环境友好型的特点, 成为新型燃料资源有望取代日益减少的化石能源(如石油和煤炭)^[1]. 传统乙醇发酵原料为玉米、淀粉等粮食作物, 粮食短缺的今天这一生产方式受到很大的限制. 木质纤维素物质(如农作物

废弃物、木屑、薯渣等)是世界上最为丰富的生物质资源^[2], 由纤维素、半纤维素和木质素组成, 其水解产物主要是葡萄糖和木糖. 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 能发酵葡萄糖但不能发酵木糖产生乙醇. 80 年代以来, 众多的学者进行了木糖菌种的筛选以及菌种遗传工程改造研究, 木糖发酵微生物主要集中在毕氏酵母 (*Pichia*), 假丝酵母 (*Candida*) 和管囊酵母 (*Pachysolen*) 3 个属^[3], 构建基因重组菌常用的宿主菌种有酿酒酵母 (*S. cerevisiae*)、运动发酵

收稿日期: 2010-03-26.

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目 (2006AA10Z424);
“十一五”国家科技支撑计划项目 (2006BAD07A01);
哈尔滨市科技攻关项目 (2007AA6CN094).

作者简介: 范金霞 (1978—), 女, 博士研究生;
杨 谦 (1959—), 男, 教授, 博士生导师.

单胞菌 (*Zymomonas mobilis*) 和大肠杆菌 (*E. coli*)^[4-6], 对丝状真菌的木糖发酵研究的很少. 本试验从自然界中筛选到一株丝状真菌发酵木糖产乙醇的菌株, 对其进行了形态学和分子生物学鉴定, 同时对其发酵特性进行了研究.

1 试 验

1.1 试验材料

1.1.1 试验菌种

cs-28 由本试验室分离, 现已送至中国典型微生物研究所保存. *E. coli* Top10 为本实验室保存. 树干毕赤酵母 (*Pichia stipitis*) 来自中科院微生物研究所.

1.1.2 试剂

Taq DNA 聚合酶、dNTP、pMD-18T 载体、DNAMarker (DL2000) 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 胶回收试剂盒购自上海华舜生物公司, 引物合成和测序由上海生工生物技术有限公司完成; 木糖购自美国 Sigma 公司; 其他试剂均为国产分析纯试剂.

1.1.3 培养基

初筛培养基 (PXA): 马铃薯 $200\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 木糖 $20\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 琼脂 $20\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 值自然.

复筛培养基: 木糖 2%, 酵母粉 0.4%, 蛋白胨 0.2%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.6%, KH_2PO_4 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2%, CaCl_2 0.1%.

发酵培养基: KH_2PO_4 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2%, CaCl_2 0.1%, 碳源 2%, 氮源 1.2%.

种子培养基 (PX 培养基): 马铃薯 $200\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 木糖 $20\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 值自然.

PDA 培养基: 马铃薯 $200\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 葡萄糖 $20\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 琼脂 $20\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

1.2 试验方法

1.2.1 菌种分离、纯化和筛选

取 1 g 采集的土样溶于 10 mL 无菌水中 30°C 振荡 1 h, 经适当稀释后, 涂布于 PXA 平板上, 30°C 恒温培养 48 h; 挑取生长较快菌落, 经多次分离纯化, 将获得的丝状真菌纯培养物保存. 纯化后的单菌落经复筛培养基进行杜氏管发酵试验进一步筛选, 最后利用发酵培养基进行乙醇质量浓度的测定, 挑选出乙醇产量最高的菌株作为下一步研究对象.

1.2.2 菌种鉴定

形态学鉴定参考文献[7]. 分子生物学鉴定根据 18S rRNA ITS 序列引物: T1: $5' - \text{TCC GTA GGT GAA CCT GCG G} - 3'$, T2: $5' - \text{TCC TCC}$

$\text{GCT TAT TGA TAT GC} - 3'$. 基因组 DNA 提取参见文献[8]方法进行. PCR 反应体系: 所有 PCR 反应均在 $20\text{ }\mu\text{L}$ 标准反应体系中进行, 其中含 $2\text{ }\mu\text{L}$ Buffer 缓冲液, $1.6\text{ }\mu\text{L}$ 2.5 mmol/L dNTPs, 每一引物均 $1\text{ }\mu\text{L}$ (10 mmol/L), $0.125\text{ }\mu\text{L}$ Taq 酶, $1\text{ }\mu\text{L}$ 模板 DNA, 加无菌超纯水至 $20\text{ }\mu\text{L}$, 于 PCR 仪上按 94°C 预变性 5 min, 然后按 94°C 、30 s, 56°C 、30 s, 72°C 、1 min, 循环 32 次, 最后 72°C 延伸 10 min. PCR 产物的克隆测序: 按照胶回收试剂盒说明回收目的片段, 连接克隆载体, 转化大肠杆菌感受态细胞 Top10, 提取质粒 DNA, 双酶切鉴定后, 挑取阳性克隆子送至上海生工生物技术有限公司进行测序. 测序结果利用 NCBI 网站的 Blastn 和 DNASTAR 进行序列比较分析.

1.3 分析方法

乙醇产量测定采用重铬酸钾比色法^[9]. 木糖质量浓度测定采用 DNS 比色法^[10].

1.4 发酵特性研究

1) 不同碳源对乙醇产量的影响. 选取 12 种不同的碳源, 按质量比 2% 加入到发酵培养基中.

2) 不同氮源对乙醇产量的影响. 选择 12 种不同的氮源, 按质量比 1.2% 加入到培养基中, 以 2% 的木糖作为碳源, 获得最佳氮源.

3) 初始 pH 值对乙醇产量的影响. 用盐酸调节发酵培养基的初始 pH 值, 分别为 5.0、5.2、5.4、5.8、6.0、6.2, 确定最佳的发酵酸碱条件.

4) 不同温度对乙醇产量的影响. 将接种后的液体培养基分别放在 20°C 、 24°C 、 26°C 、 28°C 、 30°C 、 32°C 、 34°C 、 36°C 的培养箱中静止培养, 比较温度对产乙醇的影响.

5) 不同初始木糖质量浓度对乙醇产量的影响: 在发酵培养基中加入质量比分别为 2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10% 的木糖进行发酵, 比较乙醇产量.

2 结果与分析

2.1 菌种的分离、筛选和鉴定

2.1.1 菌种的分离与筛选

通过对 30 份土样中筛选得到能在 PXA 培养基上生长的菌株 58 株, 利用杜氏管发酵检测到 16 种菌株能产气, 对其进行发酵试验, 测定乙醇产量, 得到一株产乙醇量最高的菌株 cs-28. 通过 cs-28 与树干毕赤酵母乙醇产量的比较可以看出, cs-28 最高乙醇产量在发酵的第 144 小时, 而树干毕赤酵母在第 96 小时, cs-28 产乙醇的周期比树干毕赤酵母长, 但乙醇产量高于毕赤酵母 (图 1).

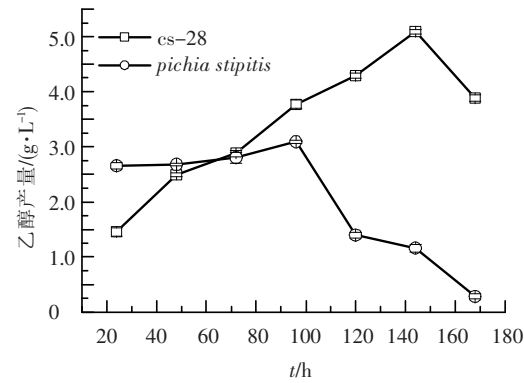


图1 cs-28与树干毕赤酵母乙醇产量的比较

2.1.2 形态学鉴定

将 cs-28 放在 PDA 培养基上培养. 该菌株在培养 2 d 后菌落直径超过 2.5 cm, 7 d 达 8 ~ 9 cm; 在室温(25 ℃)下, 菌丝生长良好, 棉絮状至绒毛状, 最初白色, 逐渐中央粉色, 后期转变为紫色, 培养基反面深紫色(图 2). 菌丝经棉兰染色后显微镜观察结果: 菌丝有隔, 分枝, 透明; 有大小两种类型分生孢子(图 3(a)), 小型分生孢子数量较多, 从菌丝的侧生而单出的瓶状小梗上长出或从分生孢子梗上长出, 不呈链生而是假头状着生, 椭圆形、纺锤形、卵形、逗点形; 大型分生孢子时常较少, 产于粘孢团中或从分孢子梗上长出; 镰刀形、纺锤形; 顶端细胞窄细; 有隔, 3 ~ 6 个分隔(图 3(b)).

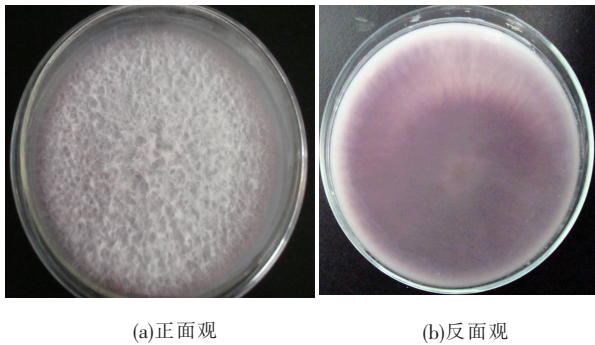


图2 cs-28在PDA培养基中生长7d的菌落形态

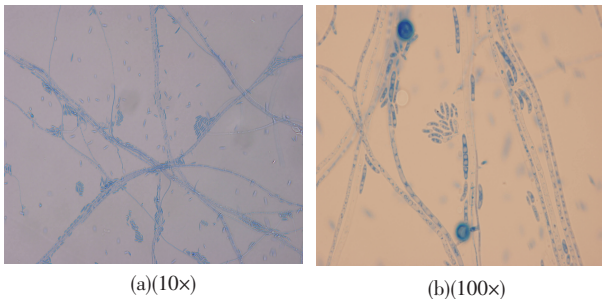
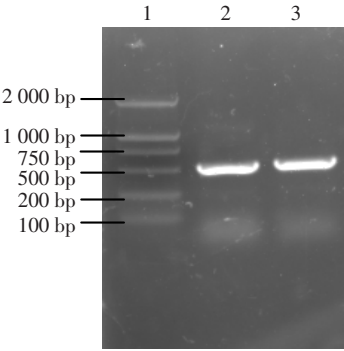


图3 cs-28孢子的显微观察

2.1.3 分子生物学鉴定

以 cs-28 基因组 DNA 为模板, 应用真菌通用的 18s rRNA 引物进行 PCR 扩增, 得到大约

500 bp 片段(图 4), 将目的片段连接克隆载体 pMD-18T 后进行测序. 利用 DNASTAR 软件队测序结果进行处理后, 获得了 535 bp 核苷酸序列. 通过 NCBI 网站上 Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行相似性搜索, 结果显示与 *Fusarium oxysporum* 的相似性为 100%, 结合形态学观察结果可以确定该菌株为尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*).



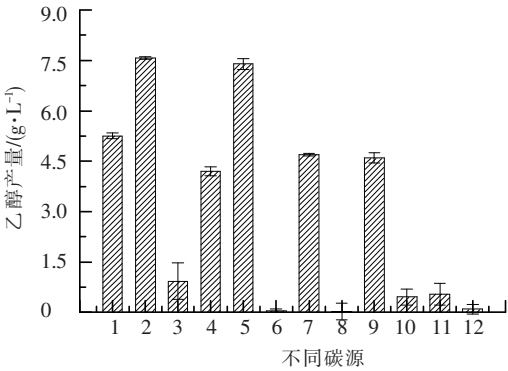
1- Marker 2000; 2~3-18s rRNA 条带.

图4 cs-28 18s rRNA 片段扩增结果

2.2 发酵特性

2.2.1 不同碳源对乙醇发酵的影响

选取 12 种不同的碳源进行发酵试验, 结果见图 5, cs-28 对蔗糖、葡萄糖发酵产乙醇能力最强, 对乳糖的发酵能力最弱. 对 12 种碳源均有不同程度的乙醇发酵能力, 其碳源应用谱广泛, 有望成为工业发酵待选菌种.

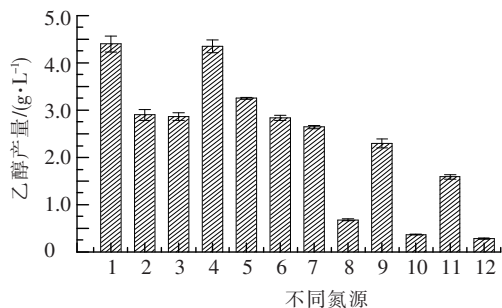


1—淀粉; 2—蔗糖; 3—麦芽糖; 4—果糖; 5—葡萄糖; 6—羧甲基纤维素钠; 7—木聚糖; 8—乳糖; 9—半乳糖; 10—木糖醇; 11—甘露醇; 12—玉米秸秆.

图5 不同碳源对cs-28乙醇产量的影响

2.2.2 不同氮源对乙醇发酵的影响

不同氮源对 cs-28 发酵产乙醇的试验结果见图 6. 可以看出, 有机氮源比无机氮源产乙醇的量高. 在有机氮源中 yeast extract 的产乙醇量最高, 达 4.28 g · L⁻¹, 与黄豆面发酵效果持平, 考虑到发酵成本, 以下的发酵试验中采用黄豆面作为氮源. 在无机氮源中, 硝态氮比铵态氮效果好. 其中 NaNO₃ 的发酵效率最高, 达 2.61 g · L⁻¹.



1—酵母提取物; 2—蛋白胨; 3—豆粕水; 4—黄豆面; 5—玉米面; 6—豆粕; 7—NaNO₃; 8—NH₄AC; 9—NH₄NO₃; 10—(NH₄)₂SO₄; 11—KNO₃; 12—尿素。

图 6 不同氮源对 cs-28 乙醇产量的影响

2.2.3 不同温度对乙醇发酵的影响

温度对乙醇发酵的影响很大,温度过高会增加乙醇的蒸发,温度过低影响菌体生长,从而影响乙醇产量。试验结果(图 7)表明:随着温度的升高,乙醇产量逐渐升高,温度为 30 ℃ 时乙醇产量最高,随后逐渐下降。

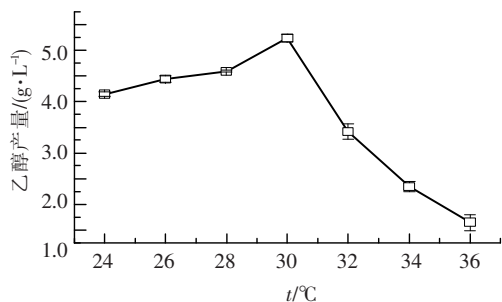


图 7 不同温度对 cs-28 乙醇产量的影响

2.2.4 初始 pH 值对乙醇发酵的影响

初始 pH 值分别设为 5.4、5.6、5.8、6.0、6.2,随着 pH 值的升高乙醇产量呈上升趋势,pH 为 6.0 时乙醇产量最高,为 5.51 g·L⁻¹,随后又急剧下降(图 8)。

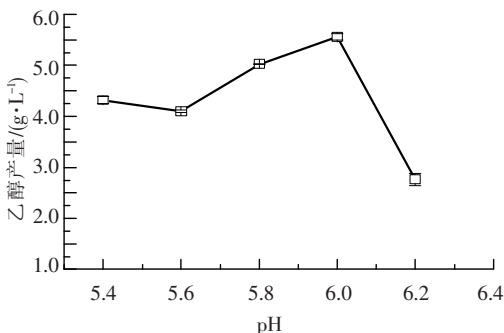


图 8 不同 pH 对 cs-28 乙醇产量的影响

2.2.5 初始木糖质量浓度对乙醇发酵的影响

初始木糖质量浓度对乙醇产量的影响极大,随着木糖质量浓度的增加,乙醇产量也逐渐增加,但是乙醇产率却逐渐下降(图 9),初始木糖质量浓度为 20 g·L⁻¹,乙醇产率最高,即木糖转化率最高。

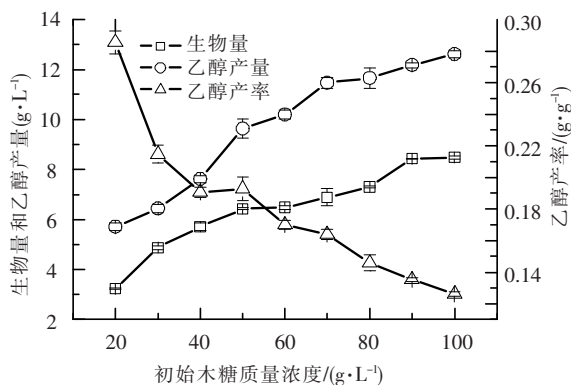


图 9 初始木糖质量浓度对 cs-28 乙醇产量的影响

3 讨论

本试验筛选到的发酵木糖产乙醇的菌种为尖孢镰刀菌,据文献[11-12]报道,尖孢镰刀菌不仅能产生多种纤维素酶系和半纤维素酶系,同时还具有降解多环芳烃蒽和苯酚的能力^[13-14],这为环境固体废弃物和多环芳烃物质的降解提供了优良菌种。Panagiotou G 等^[15]利用尖孢镰刀菌 F3 实现纤维素的同时糖化和发酵。尖孢镰刀菌利用硝态氮的能力优于铵态氮,这与 Naim M S 等^[16]研究的结果一致。同样是丝状真菌,最适的发酵初始 pH 值不近相同,虽然都在微酸性条件下,尖孢镰刀菌最适 pH 为 6.0,而粗糙脉孢霉的最适 pH 为 5.0^[17]。不同菌种对糖质量浓度的适应能力不一样,酿酒酵母在高糖溶液(300 g·L⁻¹)中仍然可以进行发酵,而尖孢镰刀菌的最适木糖质量浓度(20 g·L⁻¹),比 *Pachysolen tannophilus* 的最适木糖质量浓度^[18]低,这可能与细胞膜透性和渗透压有关^[19]。

4 结论

1) 筛选到一株发酵木糖产乙醇的菌种 cs-28,经过形态学和生物学鉴定为尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)。

2) 最适的发酵条件温度为 30 ℃; pH 值为 6.0; 最适有机碳源为酵母提取物,无机碳源为 NaNO₃。

3) 尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)具有发酵多种碳源的特性,为秸秆的资源化利用和能源的生产提供了新的菌种资源。

参考文献:

- [1] OLESKOWICZ - POPIEL P, LISIECKI P, HOLM - NIELSEN J B, et al. Ethanol production from maize silage as lignocellulosic biomass in anaerobically di-

- gested and wet - oxidized manure [J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(13): 5327 - 5334.
- [2] CARDONA ALZATE C A, SANCHEZ TORO O J. Energy consumption analysis of integrated flowsheets for production of fuel ethanol from ligocellulosic biomass [J]. *Energy*, 2006, 31(13): 2447 - 2459.
- [3] 牟建楼,王颢,张伟,等. 木糖发酵微生物的研究进展[J]. *纤维素科学与技*, 2004, 12(2): 35 - 40.
- [4] CHU B C H, LEE H. Genetic improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation [J]. *Biotechnology Advances*, 2007, 25(5): 425 - 441.
- [5] ZHANG Xiaomei, CHEN Guanjun, LIU Weifeng. Reduction of xylose to xylitol catalyzed by glucose - fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis* [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2009, 293(2): 214 - 219.
- [6] WANG Zhanchao, CHEN Ming, XU Yuquan, *et al.* An ethanol - tolerant recombinant *Escherichia coli* expressing *Zymomonas mobilis* *pdc* and *adhB* genes for enhanced ethanol production from xylose [J]. *Biotechnology Letters*, 2008, 30(3): 657 - 663.
- [7] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1979: 487 - 642.
- [8] J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉赛尔. 分子克隆实验指南[M]. 3版. 北京:科学出版社, 2002: 492 - 499.
- [9] 牟建楼,王颢,张伟,等. 乙醇的测定方法综述[J]. *酿酒*, 2006, 33(2): 45 - 48.
- [10] ZHAO Lei, ZHANG Xu, TAN Tianwei. Influence of various glucose/xylose mixtures on ethanol production by *Pachysolen tannophilus* [J]. *Biomass and Bioenergy*, 2008, doi: 10.1016/j.biombioe.2008.02.011.
- [11] CALERO - NIETO F, HERA C, DI PIETRO A, *et al.* Regulatory elements mediating expression of xylanase genes in *Fusarium oxysporum* [J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2008, 45(1): 28 - 34.
- [12] XIROS C, KATAPODIS P, CHRISTAKOPOULOS P. Evaluation of *Fusarium oxysporum* cellulolytic system for an efficient hydrolysis of hydrothermally treated wheat straw [J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(21): 5362 - 5365.
- [13] 陈芳艳,毛莉,唐玉斌,等. 外加碳源对尖镰孢菌降解蕙的影响[J]. *水处理技术*, 2007, 33(8): 54 - 58.
- [14] PARK J Y, HONG J W, GADD G M. Phenol degradation by *Fusarium oxysporum* GJ4 is affected by toxic catalytic polymerization mediated by copper oxide [J]. *Chemosphere*, 2009, 75(6): 765 - 771.
- [15] PANAGIOTOU G, CHRISTAKOPOULOS P, OLSSON L. Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose by *Fusarium oxysporum* F3 - growth characteristics and metabolite profiling [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2005, 36(5/6): 693 - 699.
- [16] NAIM M S, SHAROUBEEM H H. Carbon and nitrogen requirements of *Fusarium oxysporum* causing cotton wilt [J]. *Mycopathologia*, 1964, 22(1): 59 - 64.
- [17] ZHANG Xiao, ZHU Dongqing, WANG Dan, *et al.* Study on xylose fermentation by *Neurospora crassa* [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2003, 43(4): 466 - 472.
- [18] BRAVO V, CCMACHO F, SANCHEZ S, *et al.* Influence of the concentrations of D - xylose and yeast extract on ethanol production by *Pachysolen tannophilus* [J]. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1995, 79(6): 566 - 571.
- [19] 郑美娟,余华顺. 酵母菌耐高渗机理研究[J]. *酿酒科技*, 2008, 172(10): 37 - 40.

(编辑 刘 彤)