

一株可发酵木糖产乙醇细菌的筛选

贺应龙^{1,2}, 胡秋龙^{1,2}, 苏小军², 熊兴耀^{1,2*}

(1.湖南农业大学 园艺园林学院, 湖南 长沙 410128; 2.生物质醇类燃料湖南省工程实验室, 湖南 长沙 410128)

摘要: 为获得高效利用木糖生产乙醇的菌株, 以木糖为唯一碳源, 从腐败的落叶层土壤采样进行分离筛选, 获得 1 株可发酵木糖生产乙醇的细菌, 初步鉴定其为阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*), 并对该菌株发酵木糖生产乙醇的工艺条件进行了优化。结果表明: 在微氧、发酵温度 35 °C、接种量 6%、初始 pH 值 6.5 的条件下, 用该菌株发酵 20 g/L 木糖 48 h 的乙醇产量可达 4.95 g/L, 乙醇得率为其理论值的 53.8%; 将 10 g/L 木糖和 10 g/L 葡萄糖混合发酵 48 h 的乙醇产量达到 4.41 g/L, 乙醇得率为其理论值的 45.5%, 表明该菌株具有较强的同时发酵木糖和葡萄糖的能力。

关键词: 阴沟肠杆菌; 木糖; 发酵; 乙醇

中图分类号: S216.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2011)04-0456-05

A bacteria for ethanol fermentation from xylose

HE Ying-long^{1,2}, HU Qiu-long^{1,2}, SU Xiao-jun², XIONG Xing-yao^{1,2*}

(1.College of Horticulture and Landscape Architecture, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China ; 2.Hunan Engineering Laboratory for Alcohol Fuels From Biomass, Changsha 410128, China)

Abstract : To obtain strains for efficient xylose fermentation, a bacteria strain which can convert xylose to ethanol was isolated from decomposed leaves with xylose as sole carbon substrate and was identified as *Enterobacter cloacae*. The process for converting xylose to ethanol was optimized. The yield of ethanol was 4.95 g/L which accounted for 53.8% of the yield predicted theoretically when *Enterobacter cloacae* was inoculated at a 6: 100 ratio and fermented in microaerophilic condition at 35 °C with initial pH 6.5 for 48 h using xylose(20 g/L) as sole carbon substrate. In the presence of a mixture of glucose (10 g/L) and xylose (10 g/L), microaerophilic cultures of the strain produced 4.41 g/L ethanol. The results showed that the strain can effectively co-ferment both glucose and xylose simultaneously to ethanol.

Key words: *Enterobacter cloacae*; xylose; fermentation; ethanol

伴随着化石能源不可逆地消耗, 寻找替代化石能源的新能源成了全世界不可避免的选择。燃料乙醇作为一种可再生的清洁能源, 是化石能源的理想替代物, 日益受到世界各国的高度重视^[1-4]。木质纤维素类物质丰富且价廉, 是最有潜力的乙醇生产原料。木质纤维素主要由纤维素、半纤维素和木质素三大部分组成, 其中半纤维素约占 30%, 它的水解产物中约有 90% 的木糖^[5-7], 因此, 木糖发酵生产

乙醇是纤维素原料制备乙醇的关键。自 Wang 等^[8] 1980 年提出木糖可被一些微生物发酵生成乙醇后, 研究者们对木糖转化生产乙醇予以重视, 并进行了大量的微生物筛选工作, 但目前所筛选出的菌株仍然难以满足工业化生产的需求^[9]。笔者以木糖为唯一碳源, 从自然界中筛选可发酵木糖生产乙醇的菌株, 并对其发酵工艺条件进行初步研究, 旨在探寻可生产乙醇的菌种资源。

收稿日期: 2011-03-13

基金项目: 国家“973”计划项目(2009CB226108); 作物种质创新与资源利用国家重点实验室培育基地重点项目(10KFXM02); 湖南农业大学青年科学基金项目(10QN01)

作者简介: 贺应龙(1985—), 男, 湖南宁乡人, 硕士研究生, 主要从事生物质能源研究, heyinlong8510@Yahoo.cn; *通信作者, xiongxingyao@126.com

1 材料与方 法

1.1 菌 种

菌种筛选自湖南农业大学浏阳河畔腐败的落叶层土壤。

1.2 培养基

增殖培养基：木糖 20 g，蛋白胨 15 g，酵母粉 10 g， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g， KH_2PO_4 1 g， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g， $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 g， H_2O 1 L。

微量元素溶液： ZnCl_2 70 mg， $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 100 mg， H_3BO_3 60 mg， $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 200 mg， $\text{NiCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 40 mg， $\text{Na}_2\text{M}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 35 mg， $\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 20 mg， $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 30 mg，浓盐酸(37%)0.9 mL， H_2O 1 L。

筛选培养基：木糖 20 g，蛋白胨 15 g，酵母粉 10 g， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g， KH_2PO_4 1 g， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g， $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 g，微量元素溶液 1 mL，琼脂 20 g， H_2O 1 L。

发酵培养基：木糖 20 g，蛋白胨 15 g，酵母粉 10 g， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g， KH_2PO_4 1 g， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g， $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 g，微量元素溶液 1 mL， H_2O 1 L。

TTC(2,3,5-氯化三苯基四氮唑)上层培养基：TTC 0.05 g，木糖 0.5 g，琼脂 1.5 g， H_2O 100 mL。

TTC 下层培养基：木糖 10.1 g，蛋白胨 2 g，酵母膏 1.5 g， KH_2PO_4 1 g， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g，枸橼酸 0.27 g，琼脂 20 g， H_2O 1 L。

1.3 发酵木糖菌株的筛选

1.3.1 增殖培养

分别取一小匙试样加入装有玻璃珠和 100 mL 生理盐水的三角瓶中，将三角瓶置于摇床中，于恒温 37 °C、150 r/min 培养 3 h，然后吸取 5 mL 悬浊液加入装有 150 mL 增殖培养基的三角瓶中，于恒温 37 °C、150 r/min 培养 24 h。

1.3.2 初 筛

将增殖培养样品培养液按 10^{-1} 、 10^{-2} 、...、 10^{-7} 进行梯度稀释，选择适宜稀释度的样品培养液分别涂布于固体培养基上，37 °C 恒温培养。待其长成彼此独立的菌落，挑取生长迅速的菌落进行平板

划线，37 °C 培养 1~2 d。如此反复，直至菌落纯化后，将其接入斜面培养，并编号。

将纯化的菌株接入 TTC 下层培养基平板，于 37 °C 倒置培养 1~2 d，待长出菌落时倒入 TTC 上层培养基覆盖菌落，于 37 °C 下避光保存 3 h，根据菌落颜色挑选出产乙醇能力强的菌落进行复筛，并接种至斜面，低温保存。

1.3.3 摇瓶复筛

将初筛得到的菌株接入装有 100 mL 发酵培养基的三角瓶中，在 37 °C、120 r/min 条件下进行发酵，48 h 后测定发酵液中乙醇的含量和木糖的残余量，选取乙醇产量和木糖利用率较高的菌株保存备用。

1.4 选定菌株的 16S rDNA 鉴定

选定菌株的 16S rDNA 鉴定步骤：①提取待测菌株 DNA；② PCR 扩增 16S rDNA；③纯化 PCR 产物并对其进行测序；④将所测序列结果在 GeneBank 数据库进行序列同源性比对。

1.5 菌株发酵木糖工艺条件的优化

1.5.1 菌株生长曲线的绘制

由于在对数生长期细菌生长最快，其细胞进行平衡生长，具有比较稳定的生理特性，酶活性较高，代谢旺盛，因此，在菌株的发酵试验中，每次都要接种对数生长期的菌液，为此，需要了解筛选所得菌株的生长情况。

菌株生长曲线的绘制步骤：①挑取两环待测菌落于 150 mL 液体培养基中，在 37 °C、120 r/min 条件下活化培养 18~24 h。②配制 1 800 mL YEPX 液体培养基，将其分装于 36 个三角瓶中，每瓶 50 mL，灭菌备用。③将活化好的菌液以 1 mL/瓶的接种量接种到每个三角瓶中，于 37 °C、120 r/min 的条件下恒温培养 72 h，每 2 h 取 1 次样，利用紫外分光光度计测定其在 600 nm 处的吸光度值。④根据测定的吸光度值绘制生长曲线。

1.5.2 供氧条件的确定

配制液体发酵培养基 300 mL，分装于 3 个三角瓶中，接种活化 12~18 h 的菌液，分别在厌氧、微

氧和好氧条件下,于 37 °C、120 r/min 恒温摇床中发酵 72 h,测定乙醇产量。

1.5.3 发酵条件的优化

以温度 37 °C、初始 pH 6.0、接种量 4%为基础,进行发酵条件优化试验,每次只改变其中 1 个条件,其中,温度的设定值分别为 25、30、35、37、40、45 °C;初始 pH 值分别为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0;接种量分别为 2%、4%、6%、8%、10%、12%、14%。将培养 12~18 h 的菌液接种到液体发酵培养基中,微氧下发酵 48 h,测定发酵液中乙醇的产量,确定最适发酵条件。

以木糖为碳源,以最适发酵温度、初始 pH、接种量和发酵时间设计四因素三水平的正交试验(表 1),确定发酵的最佳条件。

表 1 优化发酵条件的正交试验设计

Table 1 Design of orthogonal test

水平	因素			
	A(发酵温度/°C)	B(pH)	C(接种量/%)	D(发酵时间/h)
1	30	5.5	4	36
2	35	6.5	6	48
3	37	7.5	8	60

1.6 菌株对不同碳源的发酵性能

分别以 20 g/L 木糖(碳源 1)、20 g/L 葡萄糖(碳源 2)、10 g/L 木糖+10 g/L 葡萄糖(碳源 3)、10 g/L 木糖+20 g/L 葡萄糖(碳源 4)、20 g/L 木糖+10 g/L 葡萄糖(碳源 5)为碳源,在经正交试验确定的最佳条件下发酵 48 h,测定发酵液中的乙醇浓度,考察该菌株对木糖和葡萄糖的发酵性能。

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选结果

2.1.1 初筛结果

将经分离纯化的 55 株菌株进行 TTC 平板筛选,根据菌落的显色情况(TTC 是一种显色试剂,脱氢酶的多少或有无,直接影响红色的深浅或有无:发酵率越高的菌株,脱氢酶一般越多,TTC 接受氢也就越多,红色越深;反之越浅^[10-12]),筛选到 5 株颜色深红的产乙醇能力较强的菌株,将其分别编号为 4-4、7-3、10、17-3、21。

2.1.2 复筛结果

由表 2 可知,4-4 号菌株的乙醇产量和乙醇得率较高,产量为 4.05 g/L,乙醇得率达到其理论值的 44.02%,木糖利用较充分,可选取该菌株作为后续研究的出发菌株,并重新命名为 AFB4-4。

表 2 5 个菌株的木糖发酵结果

Table 2 The results of xylose fermentation by 5 strains

菌株编号	乙醇产量/(g·L ⁻¹)	木糖利用率/%	乙醇得率与其理论值的比率/%
4-4	4.05	85.35	44.02
7-3	1.94	81.25	21.09
10	2.71	78.30	29.46
17-3	2.36	72.20	25.65
21	1.84	65.65	20.00

2.2 菌种鉴定结果

将测得的序列在 GenBank 中进行序列同源性分析,得到与试验菌株序列最相近的菌株,绘制菌株 AFB4-4 的进化树如图 1 所示。菌株 AFB4-4 与 1 株 16S rDNA 登录号为 HM030748.1 (*Enterobacter cloacae* M-5)的菌株的亲缘关系最近,同源性达 99%,因此,初步判断菌株 AFB4-4 为阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)。

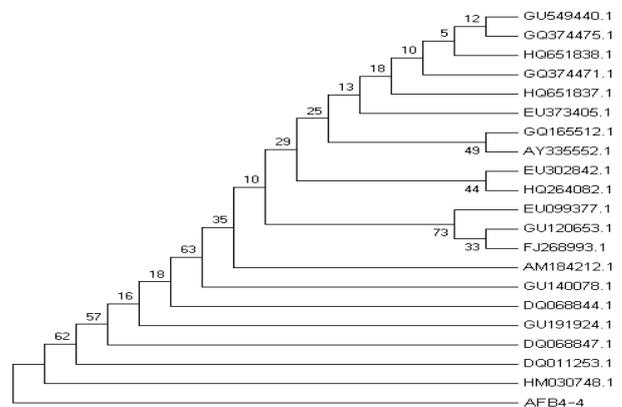


图 1 菌株 AFB4-4 的系统进化树

Fig.1 Phylogenetic tree of strain AFB4-4 homologs

2.3 菌株发酵木糖的最佳工艺条件

2.3.1 菌株的生长曲线

由图 2 可知,接种后 2 h,菌株进入对数生长期;接种后 22 h,菌体进入稳定生长期;64 h 后,菌体老化自溶进入衰退期,因此,要取得对数生长期菌液,菌种活化培养的时间需 12~18 h。

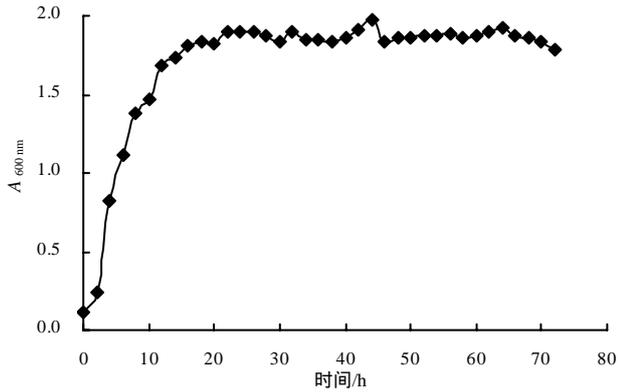


图 2 菌株 AFB4-4 的生长曲线

Fig.2 Growth curve of train AFB4-4

2.3.2 最适供氧条件

由图 3 可看出,微氧条件下的乙醇产量明显高于好氧和厌氧条件下的乙醇产量;菌株 AFB4-4 是一株兼性细菌,在无氧条件下也能较好地生长;通氧有利于菌体的生长,但会消耗过多的底物,不利于其产物乙醇的生成,而微氧条件有利于其产物的积累,因此,微氧为最适供氧条件。

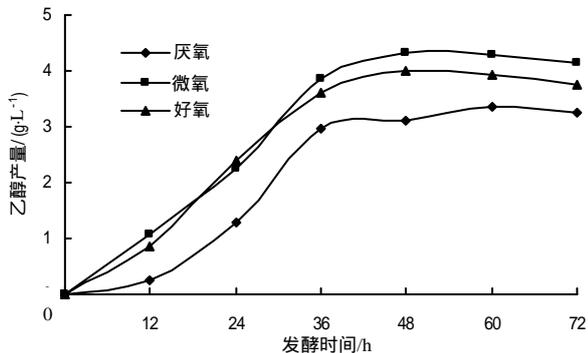


图 3 不同供氧条件下 AFB4-4 发酵木糖的乙醇产量

Fig.3 Ethanol yields of strain AFB4-4 in fermentation of xylose under different oxygen conditions

2.3.3 最佳发酵条件

1) 适宜温度。不同温度下菌株 AFB4-4 发酵木糖的乙醇产量:温度为 30~37 °C 时,发酵温度对乙醇产量的影响较小,且 30 °C 时乙醇产量最高,为 4.33 g/L,乙醇得率为 47%;温度为 40 °C 时,由于高温对细胞的伤害作用及对酶活性的影响,菌体的发酵能力下降,乙醇产量减少了 50% 以上,但此时菌体仍具有一定的生产乙醇能力,这为该菌应用于纤维素高温降解与同步发酵提供了可能^[13]。初步认为 30~37 °C 为适宜发酵温度。

2) 适宜初始 pH。不同初始 pH 值下菌株 AFB4-4 发酵木糖生产乙醇的产量:pH 为 5~8 时,该菌均能利用木糖较好地生产乙醇,乙醇产量为 4.20~4.36 g/L,且 pH 为 6~7 时发酵体系的乙醇产量较高,这说明菌株 AFB4-4 对酸碱的适应能力较强。初步认为 5~8 为适宜初始 pH。

3) 适宜接种量。当接种量为 6% 时,乙醇产量 (4.52 g/L) 达最高,乙醇得率为理论值的 49.1%;当接种量大于 6% 时,乙醇产量反而降低。这说明接种量对菌体发酵能力有一定的影响,接种量过小,因菌体基数过小而影响菌体的生长总量,导致乙醇产量降低;接种量过大,因菌株过多地消耗木糖用于菌体生长繁殖,导致乙醇产量降低,因此,初步认为 4%~8% 为适宜接种量。

4) 最佳发酵条件。由表 3 可见,各因子的最佳组合是 A₂B₂C₂D₂, 因此,最佳发酵条件为:温度 35 °C, 初始 pH6.5, 接种量 6%, 发酵时间 48 h。

表 3 发酵条件优化的正交试验结果

Table 3 Results of L₉(4³) orthogonal test

编号	A	B	C	D	乙醇产量/(g·L ⁻¹)
1	1	1	1	1	2.95
2	1	2	2	2	4.51
3	1	3	3	3	3.34
4	2	1	2	3	4.20
5	2	2	3	1	2.89
6	2	3	1	2	4.28
7	3	1	3	2	3.79
8	3	2	1	3	4.08
9	3	3	2	1	3.04
K1	3.600	3.647	3.770	2.96	
K2	3.790	3.827	3.917	4.193	
K3	3.637	3.553	3.340	3.873	
R	0.190	0.274	0.577	1.233	

2.4 AFB4-4 对木糖和葡萄糖发酵性能的比较

试验结果表明,菌株发酵 20 g/L 木糖的乙醇产量为 4.95 g/L,乙醇得率为其理论值的 53.8%;发酵 20 g/L 葡萄糖的乙醇产量为 2.44 g/L,乙醇得率为其理论值的 23.9%。这表明该菌利用木糖转化乙醇的能力优于葡萄糖。菌株同时发酵 10 g/L 木糖与 10 g/L 葡萄糖的乙醇产量为 4.41 g/L,乙醇得率为其理论值的 45.5%;菌株同时发酵 20 g/L 木糖与 10 g/L 葡萄糖的乙醇产量可达 6.28 g/L,乙醇得率为其

理论值的 43.9%。这表明该菌对葡萄糖也具有一定的发酵能力,是能同时发酵木糖和葡萄糖生产乙醇的天然菌株。

3 结论与讨论

从自然界中筛选到 1 株产乙醇能力较强的细菌,并被初步鉴定为阴沟肠杆菌。在菌株筛选过程中,发现运用 TTC 平板显色法进行初筛比摇瓶发酵法更加简单快捷,可缩短筛选时间,提高筛选效率。

菌株发酵木糖生产乙醇的最佳发酵条件为温度 35 ℃、接种量 6%、初始 pH7、发酵时间 48 h。在此条件下,该菌株发酵 20 g/L 木糖的乙醇产量可达 4.95 g/L,乙醇得率较高,为理论值的 53.8%,但其发酵高浓度木糖的乙醇得率明显下降,乙醇产量不高,与工业化生产目标差距较大。目前,生产效率最高的菌种毕赤酵母发酵 60 g/L 木糖的乙醇得率可达其理论值的 95.6%^[14],与之相比,该菌株产乙醇能力的差距较大,如何提高其乙醇产量还有待研究。

用该菌株对 20 g/L 木糖与 10 g/L 葡萄糖进行共发酵时,乙醇产量可达 6.28 g/L,表明用该菌株可以对木糖和葡萄糖进行共发酵生产乙醇。木质纤维素的降解产物主要是木糖和葡萄糖。该菌株的这一特性为直接用于发酵植物纤维素原料降解产物生产乙醇提供了可能。

参考文献:

- [1] Barbel H H, Torbhorn L, Thomas S, et al. Ethanol of fermentation pentoses in lignocellulose hydrolysates [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1991, 28 (1): 131-144.
- [2] 曹秀华, 阮奇城, 林海红, 等. 纤维燃料乙醇生产中木糖发酵的研究进展[J]. 中国麻业科学, 2010, 32(3):

166-169.

- [3] Jeewon L. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol[J]. Biotechnol, 1997, 56: 1-24.
- [4] Roca C, Olsson L. Increasing ethanol productivity during xylose fermentation by cell recycling of recombinant *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2003, 60(5): 560-563.
- [5] 张颖, 马瑞强, 洪浩舟, 等. 微生物木糖发酵产乙醇的代谢工程[J]. 生物工程学报, 2010, 26(10): 1436-1443.
- [6] Jeffries T W. Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts[J]. Advances in Applied Microbiology, 2000, 47: 221-268.
- [7] Shane G S, Eva L J, Noel W D, et al. Isolation and preliminary characterization of a *Zymomonas mobilis* mutant with an altered preference for xylose and glucose utilization[J]. Biotechnol Lett, 2000, 22: 257-264.
- [8] Wang P Y, Shopsis C, Schneider H. Fermentation of a pentose by yeasts[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1980, 94(1): 248-254.
- [9] 王罗琳, 丁长河, 王艳敏, 等. 发酵木糖生产乙醇的野生菌和转基因菌的研究进展[J]. 微生物学杂志, 2009, 29(4): 84-87.
- [10] 车勇平. 运动发酵单胞菌产乙醇的研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2008.
- [11] 赵彩云, 王异静, 关东明, 等. 发酵木糖产乙醇菌种筛选及应用[J]. 中国酿造, 2010(1): 64-67.
- [12] 黄海霞, 赵芸晨, 李建龙. 发酵木糖产乙醇酵母菌的选育及其发酵特性[J]. 城市环境与城市生态, 2008, 21(5): 13-17.
- [13] 吕福英, 闵航, 陈美慈. 嗜热性乙醇发酵的研究进展[J]. 工业微生物, 1997, 27(4): 37-43.
- [14] Frank K A, Guillermo C K, Mads T S, et al. Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichia stipitis*[J]. Proc Biochem, 2006, 41: 2333-2336.

责任编辑: 王赛群