

1株热带假丝酵母发酵木糖产乙醇的特性研究*

刘兰杰 葛向阳** 梁运祥

华中农业大学农业部微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 对1株热带假丝酵母 *Candida tropicalis* 在不同的发酵条件下发酵木糖产乙醇的特性进行研究。结果表明:溶氧浓度对乙醇的产量和产率有很大影响,适中的溶氧浓度有利于菌体生长和乙醇的积累;较高的起始菌体浓度和尿素添加量对乙醇的生产积累有促进作用;在碳源和氮源充足的情况下,延长发酵时间,乙醇的产量最高达到 25.58 g/L 的稳定状态,菌体生长也趋于平稳,浓度为 6.54×10^8 /mL。

关键词 木糖;乙醇;热带假丝酵母

中图分类号 TS 245.8 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)06-0727-05

以纤维素原料进行发酵生产乙醇不仅能够降低燃料乙醇的生产成本,同时在废物资源化处理和环境保护等方面具有积极的作用,因此是燃料乙醇生产的研究方向之一^[1]。纤维质原料主要由纤维素、半纤维素和木质素等组成,通过生物、物理、化学等单一或联合的方法进行逐步降解^[2];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%^[3]。选育高效的木糖发酵菌株对木糖进行有效的利用是木质纤维进行生物转化生产乙醇的关键环节之一。

从自然界中可分离到多种发酵木糖产生乙醇的菌种,常见的主要有树干毕赤酵母 *Pstipitis*、丝孢酵母 *Trichosporon* sp.、管囊酵母 *Pachysolen tannophilus*^[4]、耐热甲基营养酵母 *Hansenula polymorpha*^[5]、休哈塔假丝酵母 *Candida shehatae*^[6]、粗糙脉孢菌 *Neurospora crassa*^[7] 等微生物类群,但是上述菌种发酵木糖产乙醇的能力都不强^[4]。虽然构建木糖发酵重组菌株的研究工作进行较多,但始终未见明显的成效^[8-10]。

笔者对热带假丝酵母 *Candida tropicalis* 菌株 621^[11] 发酵木糖产乙醇特性进行了研究,为对该菌株进一步进行分子改造以及该菌株在纤维素乙醇发酵中的实际应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1) 菌株。热带假丝酵母 *Candida tropicalis* 621, 华中农业大学农业部微生物学国家重点实验室保藏。

2) 培养基。菌种保藏培养基(g/L):木糖 20,蛋白胨 5,酵母浸粉 3,琼脂粉 20,自来水定容至 1 L。液体种子培养基(g/L):木糖 20,蛋白胨 5,酵母浸粉 3,自来水定容至 1 L,pH 值自然。摇瓶发酵培养基(g/L):木糖 100,蛋白胨 5,酵母浸粉 3,自来水定容至 1 L,pH 值自然;0.1 MPa 灭菌 20 min。

1.2 试验方法

1) 发酵条件。接种量 10%,培养基装液量为 100 mL(250 mL 三角瓶),摇床转速为 180 r/min,温度为 30 °C,发酵 72 h^[11]。

2) 乙醇质量浓度测定。发酵液蒸馏后^[12],使用重铬酸钾比色法检测乙醇含量^[13]。本文中乙醇产量为乙醇的质量浓度(g/L);乙醇产率 = $\frac{\text{实际乙醇产量}/(\text{g/L})}{[\text{木糖消耗量}/(\text{g/L}) \times \text{理论产量}/(\text{g/g})]} \times 100\%$ 。

3) 还原糖测定。用 DNS(3,5-二硝基水杨酸)法测定发酵液中的还原糖含量^[14]。

4) 菌体浓度测定。发酵液稀释后采用血球计数板计数^[15]。

5) 高浓度接种对发酵木糖产乙醇的影响。将菌

收稿日期:2010-05-12;修回日期:2010-07-12

* 国家科技支撑计划(2008BAI63B04)资助

** 通讯作者。E-mail: gxy@mail.hzau.edu.cn

刘兰杰,女,1984年生,硕士研究生。研究方向:微生物产品及发酵工艺。E-mail: liulanjie1021@126.com

体接种到含 4% 木糖的液体种子液中,分别在摇瓶中培养 24 和 48 h 后添加 3% 的木糖,继续摇瓶培养至 72 h 后离心收集菌体,并调整菌体浓度进行接种。

6) 不同氮源对木糖发酵结果的影响。将摇瓶发酵培养基的复合氮源(蛋白胨和酵母浸粉)替换成单一氮源,蛋白胨(TP)、尿素(urea)、豆粕(SM)、玉米浆(CSL)、酵母浸粉(YE)和酵母氮源(YNB),调整各氮源质量浓度,使其含氮量均达到 1.71 g/L,进行摇瓶发酵。

7) 发酵木糖产乙醇极限值的确定。高浓度接种,摇瓶发酵 13 d,发酵第 3、7、9、11 天分别补加木糖 40 g/L,发酵第 7、11 天补加酵母氮源 3 g/L。对照(CK)不补加酵母氮源。

2 结果与分析

2.1 不同通氧情况对菌株 621 发酵木糖产乙醇的影响

在酵母的木糖需氧代谢中,*D*-木糖由 NADPH(还原型辅酶 II)依赖的木糖还原酶还原为木糖醇,再由 NAD^+ (氧化型辅酶 I)依赖的木糖脱氢酶氧化为木酮糖,然后木酮糖再被 ATP 依赖的木酮糖激酶磷酸化为 5-磷酸木酮糖从而进入磷酸戊糖途径,最终以中间产物 6-磷酸葡萄糖和 3-磷酸甘油醛进入 EMP 途径生成乙醇^[16]。从整个代谢途径分析,菌体的生长和木糖的利用需要在好氧条件下进行,而代谢后期的糖酵解则需要厌氧环境,因此发酵液中的溶氧浓度必须适中。在固定摇床转速的情况下,通过摇瓶的装液量控制发酵液的溶氧浓度。试验中采用 3 种装量进行发酵,分别为 500 mL 三角瓶装发酵液 50 mL,记作 50/500;250 mL 三角瓶装发酵液 100 mL,记作 100/250;250 mL 三角瓶装发酵液 200 mL,记作 200/250。

随着装液量的增大,菌体浓度逐渐减小,乙醇产率逐渐增大,但是当装液量为 100/250 时乙醇产量最高,达到 5.22 g/L(图 1),其产率也较高,达到 22.81%(图 2)。溶氧浓度过高导致木糖大量用于菌体生长,溶氧浓度过低导致木糖的利用率降低,均不利于乙醇的生产积累。

2.2 高浓度菌体接种对菌株 621 发酵木糖产乙醇的影响

酵母代谢木糖主要有 2 个方向,一是用于菌体生长,二是通过糖酵解途径生产乙醇,二者对于糖的利用可能存在竞争关系,乙醇的生产又需要一定浓

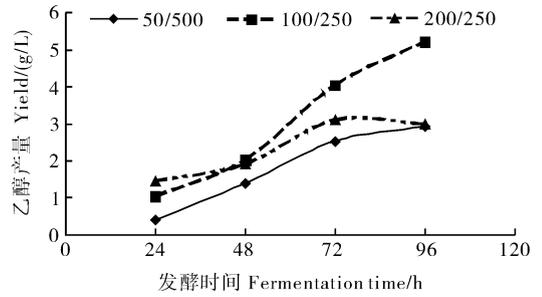


图 1 不同通氧情况下乙醇产量的变化

Fig. 1 Variation of ethanol yield in different aeration

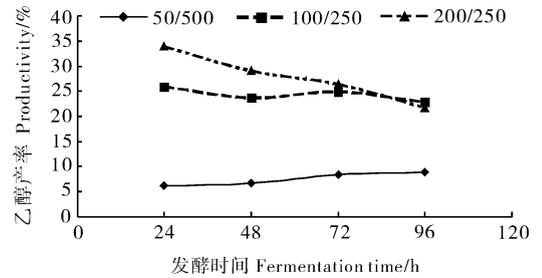


图 2 不同通氧情况下乙醇产率的变化

Fig. 2 Variation of ethanol productivity in different aeration

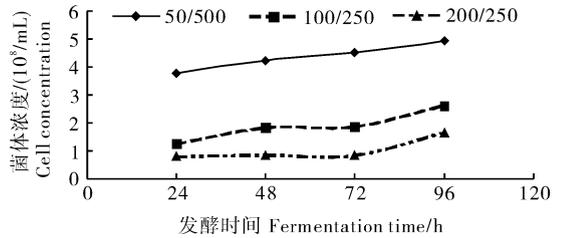


图 3 不同通氧情况下菌体浓度的变化

Fig. 3 Variation of cell concentration in different aeration 度的菌体,为了尽量控制菌体生长消耗过多的木糖,将离心收集的菌体接种到发酵液中,并调节发酵液起始菌体浓度分别为 1×10^8 /mL、 6×10^8 /mL、 12×10^8 /mL,进行摇瓶发酵,对照(CK)的起始菌体浓度为 0.3×10^8 /mL。从图 4 中可以看出,随着接种量

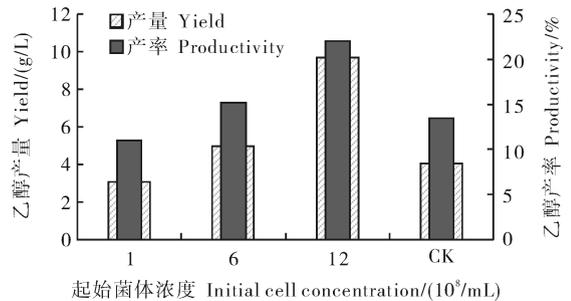


图 4 高浓度菌体接种对乙醇产量和产率的影响

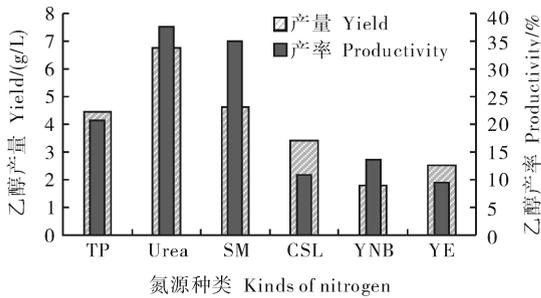
Fig. 4 Effects of high initial cell concentration to ethanol yield and productivity

的增加,乙醇的产量和产率也逐渐增加,因此较高的起始菌体浓度,有利于木糖向乙醇的转化。

2.3 不同氮源对菌株 621 发酵木糖产乙醇的影响

为了确定比较理想的氮源种类,选取蛋白胨(TP)、尿素(urea)、豆粕(SM)、玉米浆(CSL)、酵母氮源(YNB)、酵母浸粉(YE)等 6 种氮源进行试验。

由图 5 和图 6 可以看出,以尿素作为氮源的试验组发酵木糖产乙醇的产量和产率均达到最高值,乙醇产量达到 6.76 g/L(图 5),乙醇产率达到 37.60%(图 5),但是菌体的浓度却很低,只有 1.59×10^8 /mL(图 6),表明尿素对发酵木糖产乙醇有明显的促进作用。



TP:蛋白胨 Tryptone; Urea: 尿素; SM:豆粕 Soybean meal; CSL:玉米浆 Corn steep liquid; YNB:酵母氮源 Yeast nitrogen; YE:酵母浸粉 Yeast extract. 下同 The same as below.

图 5 不同氮源对乙醇产量和产率的影响
Fig.5 Effects of different nitrogen on ethanol yield and productivity

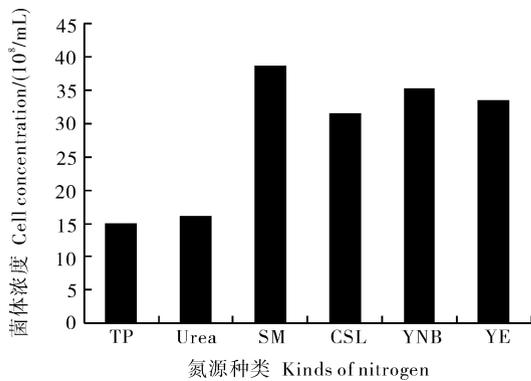


图 6 不同氮源对菌体浓度的影响

Fig.6 Effects of different nitrogen on cell concentration

2.4 菌株 621 发酵木糖产乙醇的极限值

为了确定发酵木糖产乙醇的终点状态,延长发酵时间,并根据发酵液残糖的含量适时补充木糖并于第 7 天补充酵母氮源,对照(CK)不补充氮源。随着发酵时间的延长,乙醇的产量和菌体浓度都趋于稳定,继续补充木糖,乙醇的产量和菌体的浓度没有

增长,由此推断发酵木糖产乙醇达到了终点状态。试验组发酵至第 13 天乙醇产量达到最高值,为 25.58 g/L,CK 组发酵至第 9 天的最高乙醇产量,为 16.28 g/L(图 7)。试验组发酵至第 11 天,菌体浓度达到最高,为 6.54×10^8 /mL,对照组发酵至第 7 天的最高乙醇产量,为 5.06×10^8 /mL(图 8)。由图 7 和图 8 可以看出补充酵母氮源之后,促进了菌体的生长,乙醇产量也有了明显的提高,同时也说明了更高浓度的酵母能提高乙醇的产量,但是乙醇不会无限制地增长。

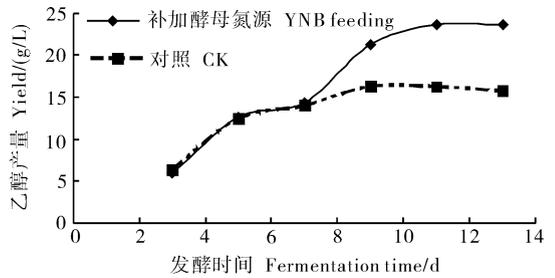


图 7 乙醇产量随时间的变化

Fig.7 Variation of ethanol yield through time

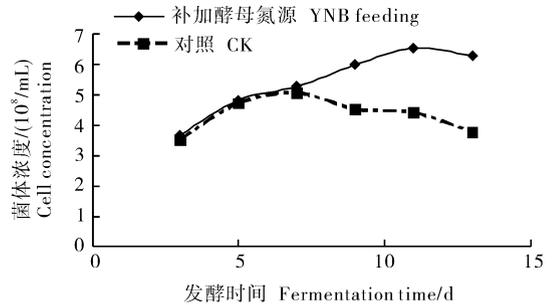


图 8 菌体浓度随时间的变化

Fig.8 Variation of cell concentration through time

2.5 乙醇浓度对菌株 621 发酵木糖产乙醇的抑制作用

乙醇是酵母的次级代谢产物,在碳源不充足的情况下,酵母会利用乙醇充当碳源来维持菌体的生长,而一定浓度的乙醇,对酵母也存在毒害作用,不利于酵母的生长繁殖。

为考察乙醇对木糖发酵的影响,分别向发酵液中添加体积百分比为 0、1、2、3、4、5 的乙醇进行发酵试验。

由图 9 和图 10 可以看出,随着添加的乙醇数量的增加,乙醇的产量逐渐降低,菌体生长浓度也随之降低,当乙醇添加量高于 2%(体积比)时,开始出现负增长,菌体浓度和耗糖速率急剧下降。这说明,在

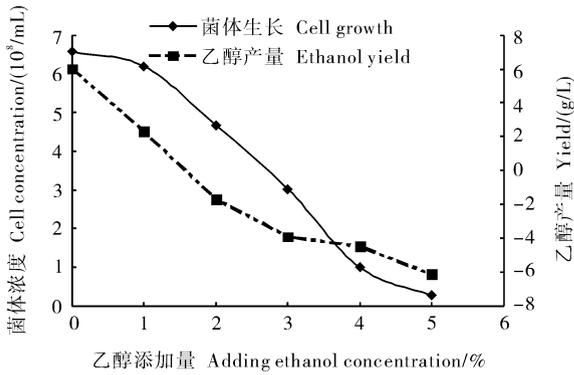


图9 添加乙醇对乙醇生产的影响

Fig. 9 Effects of adding ethanol to ethanol yield

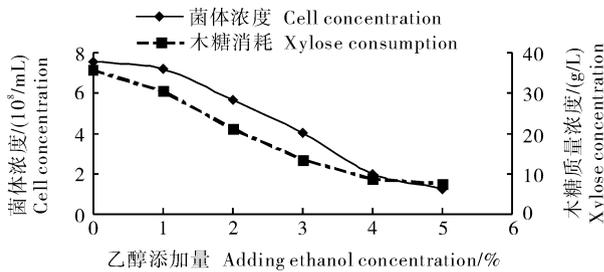


图10 添加乙醇对菌体浓度的影响

Fig. 10 Effects of adding ethanol to cell concentration

乙醇浓度较高环境下,酵母利用木糖产乙醇的速率低于酵母消耗乙醇的速率,不利于乙醇的生产积累。

3 讨论

对实验室保藏的1株热带假丝酵母菌株621 (*Candida tropicalis*)发酵木糖产乙醇的部分特性进行了研究。该菌株的生长和乙醇的生产都需要充足的溶氧,溶氧浓度过高导致木糖大量用于菌体生长,溶氧浓度过低导致木糖的利用率降低,均不利于乙醇的生产积累,因此应在菌体的对数生长期增加溶氧量来促进菌体生长,在稳定期降低溶氧量,促进乙醇的生成。如果条件允许,可通过在线控制溶氧量来检测乙醇产率和产量随溶氧浓度的变化情况,进而提高乙醇发酵的产量和产率。

尿素对发酵木糖产乙醇生产有明显的促进作用,以尿素作为氮源进行发酵,发酵液的菌体浓度只有 1.59×10^8 /mL,而乙醇产量则达到 6.76 g/L,乙醇产率达到 37.60%。从菌体浓度来看,豆粕是最适合菌体生长的氮源。一般情况下,菌体对无机氮源的吸收利用比有机氮源更快,而有机氮源营养丰富,它除了提供菌体代谢所必需的氮外,还可以提供有利于发酵的各种微量元素,因此可以考虑采用豆

粕和尿素作为复合氮源。

另外乙醇对木糖发酵有一定的抑制作用。乙醇是酵母的次级代谢产物,在碳源不充足的情况下,酵母会利用乙醇充当碳源来维持菌体的生长,而一定浓度的乙醇,对酵母也存在毒害作用,不利于酵母的生长。因此发酵木糖产乙醇存在一个动态平衡,当乙醇的产率和消耗速率一致时,发酵过程会达到平衡状态,此时的乙醇产量达最大值,为 25.58 g/L。可以考虑在酵母发酵木糖产乙醇的生产过程中,采取乙醇生产和收集同步进行的方式,以降低发酵液的乙醇含量,促进乙醇生产。

根据酵母木糖代谢途径以及以上发酵特性,下一步研究应针对代谢调控来提高菌株的乙醇发酵效率,包括构建基因工程菌或通过诱变的手段获得突变株。

参 考 文 献

- [1] 张君,刘德华.世界燃料酒精工业发展现状与展望[J].酿酒科技,2004(5):118-121.
- [2] BEATRIZ P A, PAVLA C B, GALBE M, et al. Ethanol production from non-starch carbohydrates of wheat bran [J]. *Bioresource Technology*, 2005, 96(7): 843-850.
- [3] 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[J].食品与发酵工业,2005(1):114-118.
- [4] 刘健,陈洪章,李佐虎.木糖发酵生产乙醇的研究[J].工业微生物,2001,31(2):36-41.
- [5] OLENA B M C, ANDRII A S. Xylose and cellobiose fermentation to ethanol by the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* [J]. *Yeast Research*, 2003(4): 157-164.
- [6] NIGAM J N. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis* [J]. *Journal of Biotechnology*, 2001, 87: 17-27.
- [7] NIGAM J N. Bioconversion of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to motor fuel ethanol by xylose-fermenting yeast [J]. *Journal of Biotechnology*, 2002, 97: 107-116.
- [8] GOVINDASWAMY S, LELAND M V. Kinetics of growth and ethanol production on different carbon substrates using genetically engineered xylose-fermenting yeast [J]. *Bioresource Technology*, 2007, 98: 677-685.
- [9] STEVE S H, ALLISON M A, LAM J, et al. Xylose fermentation by genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* 259ST in spent sulfite liquor [J]. *Bioresource Technology*, 2004, 92: 163-171.

- [10] LIMA K G C, TAKAHASHI C M, ALTERTHUM F. Ethanol production from corn cob hydrolysates by *Escherichia coli* K011[J]. *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[J]. *酿酒*, 2008(2): 58-60.
- [12] 吴国峰, 李国全, 马永强. 工业发酵分析[M]. 北京: 化工出版社, 2006: 56-57.
- [13] 蔡定域. 实用白酒分析[M]. 成都: 成都科技大学出版社, 1994: 543-544.
- [14] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 南京: 浙江大学出版社, 1994: 13-14.
- [15] 赵斌, 何绍江. 微生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 67-69.
- [16] JEFFRIES T W. Engineering yeasts for xylose metabolism[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2006, 17: 320-326.

Characterization of Ethanol Producing *Candida tropicalis* Yeast in Xylose Fermentation

LIU Lan-jie GE Xiang-yang LIANG Yun-xiang

Laboratory of Fermentation Engineering, State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract The characteristics of one *Candida tropicalis* yeast strain which can produce ethanol from xylose-fermenting was studied under different fermentation conditions. The results showed that dissolved oxygen concentration had a great influence on both the yield and productivity of ethanol, with moderate dissolved oxygen concentration being conducive to cell growth and ethanol accumulation. A higher initial cell concentration and urea are conducive to the yield of ethanol. In the condition of sufficient carbon and nitrogen source, extending the fermentation time, yield of ethanol can reach up to the steady-state of 25.58 g/L while the cell concentration tends to be stable, about 6.54×10^8 /mL. The steady state is a dynamic balance due to the equivalent of ethanol production and consumption.

Key words xylose; ethanol; *Candida tropicalis*

(责任编辑: 陆文昌)