

粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)木糖发酵的研究

张 潇¹ 朱冬青¹ 王 丹^{1,2} 林建强¹ 曲音波^{1*} 余世袁²

(¹ 山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

(² 南京林业大学化工学院 南京 210037)

摘 要 研究了不同通氧条件和培养基初始 pH 等对粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*) AS 3.1602 木糖发酵的影响。结果表明,粗糙脉孢菌具有较强的发酵木糖产生乙醇及木糖醇的能力。通气量对木糖发酵有较大的影响。乙醇发酵适合在半好氧条件下进行,此时乙醇的转化率达到 63.2%。木糖醇发酵适合在微好氧的条件下进行,转化率达到 31.8%。木糖醇是在培养基中乙醇达到一定浓度后才开始积累。培养基的初始 pH 对木糖发酵产物有较大的影响,乙醇产生最适 pH5.0,木糖醇产生最适 pH4.0。在培养基 pH 为碱性条件时,木糖发酵受到很大的抑制。初始木糖浓度对产物乙醇及木糖醇的产率有很大的影响。葡萄糖的存在会抑制木糖的利用,对乙醇和木糖醇的产生也有很大的影响。

关键词 粗糙脉孢菌,木糖,乙醇,木糖醇

中图分类号:Q815 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2003)04-0466-07

地球上每年植物光合作用的生物量可达 1145 亿吨^[1],其中大部分为木质纤维素类,它是纤维素、半纤维素和木质素等聚合物的复合物。从总量上看,纤维素、半纤维素和木质素是最广泛的可再生性生物质资源。利用酸解或酶解的方法将纤维转化为还原糖会产生大量的五碳糖和六碳糖,其中最主要的五碳糖是 D-木糖。五碳糖在一些纤维物质中的含量可达到总碳水化合物含量的 35%^[2]。组成半纤维素的五碳糖如木糖、阿拉伯糖等可被细菌、酵母菌和丝状真菌转化为乙醇、木糖醇等产物。乙醇是来自可再生资源的最有发展前景的液态燃料,木糖醇由于其天然的甜味特性是理想的新型甜味剂,具有较高的商业价值。因此,微生物木糖发酵的研究具有重要的意义。

80 年代以来有关酵母菌木糖发酵的研究日益增多,在酶学及基因工程研究方面开展了大量工作,但对丝状真菌的木糖发酵的研究报道较少。在直接发酵纤维性物质产生乙醇的研究中表明,丝状真菌对纤维素、半纤维素发酵可产生乙醇,并有报道表明粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)可发酵木糖产生乙醇^[3]。本文以粗糙脉孢菌为研究对象,对影响木糖发酵的有关条件如通氧量、培养基初始 pH、初始木糖浓度等进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂和仪器 木糖,中国医药集团上海化学试剂公司;木糖醇标准样和木糖准标

基金项目:山东省自然科学基金(Y2001D11),国家自然科学基金(30270044)

* 通讯作者。Tel 86-531-8564429;Fax 86-531-856234;E-mail:lifezds@sdu.edu.cn

作者简介:张 潇(1976-)女,陕西咸阳人,硕士研究生,主要从事纤维素及半纤维素降解方面的研究。E-mail:zhangxiao@life.sdu.edu.cn

收稿日期:2002-10-14,修回日期:2003-01-30

样 Sigma 公司 ;其它试剂均为国产分析纯 ;Waters HPLC 246-E 型高压液相色谱仪 ;Amines HPX-87H(300 mm × 7.8 mm)糖柱。

1.1.2 菌种 粗糙脉孢菌 AS 3.1602。

1.1.3 培养基 斜面培养基 :马铃薯 200g 煮汁 ,蔗糖 20g 琼脂 20g ,定容至 1L ,pH 5.0。种子培养基 : KH_2PO_4 2g , MgSO_4 0.3g , CaCl_2 0.3g , 蛋白胨 5g , 酵母浸膏 3g , 麦芽汁 3mL , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005g , ZnSO_4 0.0014g , $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.0016g , CoCl_2 0.002g , 定容至 1L , pH5.0。生长培养基 木糖 10g , KH_2PO_4 2g , MgSO_4 0.3g , CaCl_2 0.3g , 蛋白胨 5g , 酵母浸膏 3g , 麦芽汁 3mL , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005g , ZnSO_4 0.0014g , $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.0016g , CoCl_2 0.002g , 定容至 1L , pH 5.0。

1.2 培养方法

斜面 30℃ 培养 7 ~ 10d。将菌种转接于种子培养基中 ,500mL 三角瓶中装 100mL 培养基 ,30℃ 150r/min 培养 2d。再转入生长培养基中 ,500mL 三角瓶中装 100mL 培养基 ,接种量 10% ,30℃ 150r/min 培养 2d。两天后 ,将菌分别全部转入不同体积的发酵摇瓶中并补加 2g 木糖(溶于 5mL 蒸馏水中) ,37℃ 150r/min 培养。

1.3 残糖和产物的测定

采用高效液相色谱法(HPLC) ,分析所用为糖柱(Amines HPX-87H 300mm × 7.8mm) ,柱温 55℃ ,流动相为 0.005mol/L 的 H_2SO_4 (以三蒸水配制) ,流速 0.4mL/min。测定用样品先经 10000 r/min 离心 10min ,上清液经 0.2 μm 的滤膜过滤。

1.4 细胞浓度测定

采用高氯酸法^[4] ,取细胞悬液 3mL 于比色管中加入 1mol/L 的高氯酸 3mL ,盖塞 ,沸水浴 20min ,转至离心管中 10000r/min 离心 10min ,取上清液 0.5mL 定容至 10mL 于 260nm 处比色。同时作对照 ,将细胞悬液 10000r/min 离心后取上清液 3mL 于比色管中加入 3mL 1mol/L 的高氯酸 ,其它步骤同前。标准曲线 :将菌悬液进行系列稀释 ,分别取等量菌悬液 ,一份按上述步骤测定 OD_{260} ;另一份在烘箱中 105℃ 烘至恒重 ,称重。以菌体干重对光吸收作标准曲线。

2 结果和讨论

2.1 通氧量对粗糙脉孢菌木糖发酵的影响

实验中采用不同体积的发酵摇瓶 ,500mL、200mL、100mL 三角瓶、100mL 血清瓶和 100mL 充氮血清瓶 ,装液量都为 100mL ,以达到好氧(500mL 三角瓶) ,半好氧条件(200mL 三角瓶) ,微好氧(100mL 三角瓶、100mL 血清瓶)及厌氧(100mL 血清瓶充氮)的培养条件。摇瓶在 150r/min ,37℃ 条件下培养 ,定期取样 ,测定细胞浓度 ,剩余样品于 10000r/min 离心 10min ,取上清液测定木糖、木糖醇和乙醇浓度。图 1 ~ 图 5 分别表示 500、200、100ml 三角瓶及 100mL 血清瓶、100ml 充氮血清瓶的实验结果。

由图 1 ~ 图 5 可知 ,随着供氧的减少木糖利用逐渐减慢 ,在 500mL 三角瓶中培养一天后 ,木糖基本消耗完 ,而在 100mL 充氮血清瓶中 ,第 10 天还有很高浓度的木糖存在。另

外,在好氧的条件下 粗糙脉孢菌 AS 3.1602 的菌丝体生长较快,木糖大部分用于菌体生长。在厌氧条件下菌丝体的生长受到限制,菌几乎不长,菌浓增加幅度很小。

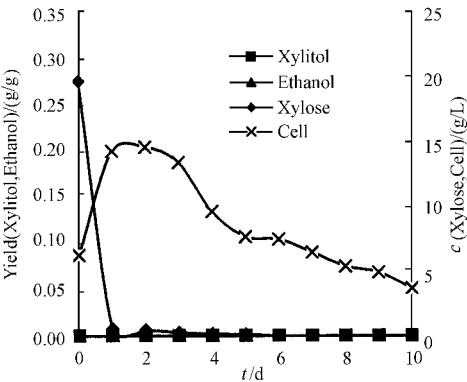


图 1 好氧条件下的木糖发酵
(500mL 三角瓶盛 100mL 发酵液)

Fig.1 The xylose fermentation under aerobic condition(100mL medium contained in 500mL shaking flask)

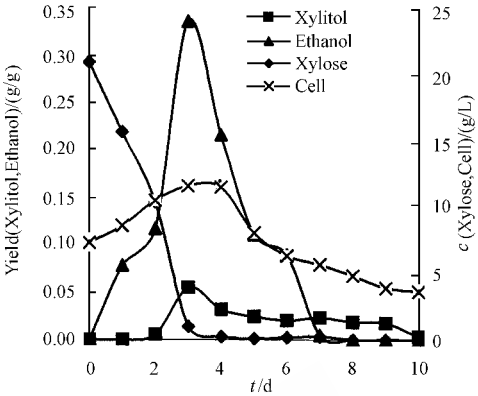


图 2 半好氧条件下的木糖发酵
(200mL 三角瓶盛 100mL 发酵液)

Fig.2 The xylose fermentation under semi-aerobic condition(100mL medium contained in 200mL shaking flask)

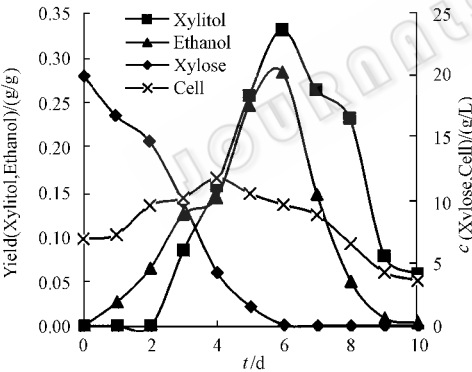


图 3 微好氧条件下的木糖发酵
(100mL 三角瓶盛 100mL 发酵液)

Fig.3 The xylose fermentation under micro-aerobic condition
(100mL medium contained in 100mL shaking flask)

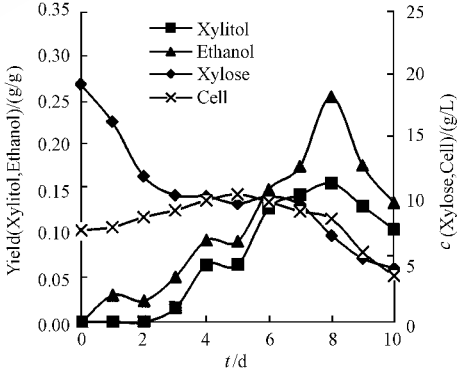


图 4 微量氧条件下的木糖发酵
(100mL 血清瓶盛 100mL 发酵液)

Fig.4 The xylose fermentation under micro-aerobic condition
(100mL medium contained in 100mL capped serum flask)

由图 1 ~ 图 5 还可看到通氧量对乙醇及木糖醇的产生有很大的影响。表 1 显示,在 200mL 三角瓶发酵到第 3 天时,乙醇的转化率最高,达到 61.6%,乙醇浓度达到 6.45g/L。此外,在其它限制氧条件下乙醇的转化率都比较高。而木糖醇生产则在 100mL 三角瓶发酵到第 6 天时达到最大浓度 6.35g/L,转化率达到 31.4%。在其它实验条件下,转化率都

比较低,说明木糖醇发酵比乙醇发酵对供氧的敏感性更高。在对酵母菌发酵的研究中也发现乙醇和木糖醇的比例与通氧量有很密切的关系。乙醇转化率与限氧的程度密切相关^[5~7],但报道的结果不一致。最明显的是 Schvester 对管囊酵母(*Pachysolen tannophilus*)发酵木糖的研究发现:只有在培养基中的氧完全耗至零时,才有乙醇出现^[8];但 Slininger 对此菌的研究结果说明,在好氧和厌氧条件下产生乙醇的量是一样的^[9]。对粗糙脉孢菌发酵木糖的研究显示,菌体的生长随供氧的增加而增加,半好氧条件有利于木糖醇的生成,而微好氧条件更适合乙醇的生成。

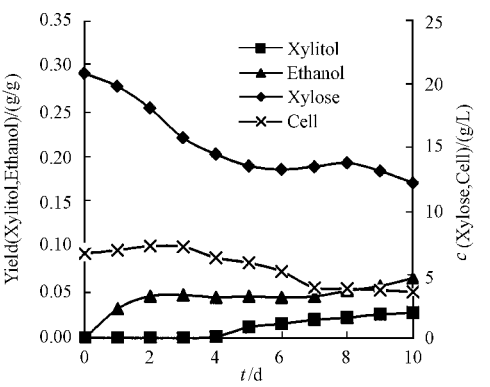


图5 厌氧条件下的木糖发酵
(100mL血清瓶盛100mL发酵液并充氮气)
Fig.5 The xylose fermentation under anaerobic condition(100mL medium contained in 100mL capped serum flask filled with nitrogen)

表1 通氧量对粗糙脉孢菌木糖发酵的影响

Table 1 The influence of oxygen limitation on xylose fermentation by *N. crassa*

Shaking flask	t/d	Ethanol		Xylitol	
		Concentration	Conversion rate	Concentration	Conversion rate
		(g/L)	/%	(g/L)	/%
500mLFlask	1	0	0	0	0
200mLFlask	3	6.45	63.2	1.06	5.3
100mLFlask	6	5.45	53.4	6.35	31.8
100mL Serum flask	8	4.91	48.1	3.00	15.0
100mL Serum flask (filled nitrogen)	10	0.54	5.3	1.27	6.4

Ethanol conversion rate was calculated according to 1 mol xylose producing 1.67 mol ethanol , and 1 g of xylose produces about 0.51 g ethanol.

由图1~图5还可看到,木糖醇产生总是发生在乙醇产生后1~2d,有关这方面的机理研究还在进行中。

另外,在木糖浓度降到较低时,培养基中乙醇浓度下降很快,但HPLC测定并没有乙酸、乳酸等副产物出现,这说明,在木糖浓度降到较低浓度时,乙醇被细胞吸收利用。与之相类似,在培养基中存在较高浓度乙醇时木糖醇的降解速度较慢,当乙醇浓度降到较低值时,木糖醇利用速度明显加快,这也从另一方面验证了上述乙醇对木糖醇降解的抑制作用说法。

2.2 初始pH对粗糙脉孢菌木糖发酵的影响

前面结果显示,微好氧条件下木糖转化率最高,达85.2%。其中,乙醇转化率为53.4%,木糖醇转化率为31.8%。以NaOH、HCl调节培养基的初始pH值分别为3、4、5、6、7和8,初始木糖浓度为40g/L,使用100mL三角瓶,37℃150r/min进行培养,到第6天取样测定木糖、乙醇和木糖醇浓度(表2)。

直至发酵结束,培养基的 pH 值几乎不变。由表 2 可知,初始 pH 在 4.0 ~ 6.0 的范围内,粗糙脉孢菌发酵木糖产生乙醇的转化率比较稳定,而当 pH 升至 7.0 时,乙醇的转化率下降非常明显。产生乙醇的最适 pH 为 5.0,此时乙醇转化率最高达到 56.2%,培养基中乙醇浓度达到 11.47g/L,得率达到了 0.29g/g。在 pH4.0 ~ 5.0 之间木糖醇的产生也比较稳定,最适 pH 为 4.0,木糖醇的转化率达到 34.7%,浓度达到 13.89g/L,得率达到了 0.35g/g。木糖醇的产生对 pH 的升高比较敏感,在 pH8.0 时转化率降到 8.2%。由以上结果可知,粗糙脉孢菌木糖发酵生产乙醇、木糖醇适合在酸性条件下进行,最适 pH 与酵母的比较接近,如 *P. tannophilus* 的最适 pH 在 2.5 ~ 5.0 之间^[10,11],范围偏酸且较宽;树干毕赤酵母(*Pichia stipitis*)的 pH 在 4.0 ~ 5.5;休哈塔假丝酵母(*Candida shehatae*)的 pH 在 3.5 ~ 5.5^[12]。

表 2 培养基初始 pH 对粗糙脉孢菌木糖代谢的影响

Table 2 Influence of initial pH on xylose fermentation of *N. crassa*

Initial pH	Ethanol			Xylitol			Xylose consumption /%	Final pH
	Concentration (g/L)	Conversion rate/%	Yield (g/g)	Concentration (g/L)	Conversion rate/%	Yield (g/g)		
3.0	4.12	20.2	0.11	7.24	18.1	0.18	63	3.5
4.0	8.26	40.5	0.21	13.89	34.7	0.35	88	4.0
5.0	11.47	56.2	0.29	12.12	30.3	0.30	100	5.0
6.0	7.78	38.1	0.19	8.61	21.5	0.22	78	6.0
7.0	5.23	25.6	0.13	6.11	15.3	0.15	61	7.0
8.0	2.41	11.8	0.06	3.29	8.2	0.82	37	7.5

Ethanol conversion rate was calculated according to 1mol xylose producing 1.67mol ethanol, and 1g of xylose produces about 0.51g ethanol.

2.3 初始木糖浓度对粗糙脉孢菌木糖发酵的影响

采用 100mL 的发酵摇瓶,装液量为 60mL。生长培养基培养两天后,转入 100mL 发酵瓶中并分别补加木糖,使培养基的木糖浓度分别达到 20、40、60、80、100、120g/L。37℃ 150r/min 培养。每天定时取样,测定发酵液中木糖、木糖醇、乙醇的浓度(表 3)。

表 3 初始木糖浓度对粗糙脉孢菌木糖发酵的影响

Table 3 Influence of initial concentration of xylose on xylose fermentation by *N. crassa*

Xylose concentration (g/L)	t/d	Maximum Ethanol			Xylitol			Xylose consumption /%
		Concentration (g/L)	Conversion rate/%	Yield (g/g)	Concentration (g/L)	Conversion rate /%	Yield (g/g)	
20	4	5.9	58	0.30	2.3	11.7	0.12	100
40	5	12.1	60	0.31	6.6	16.6	0.17	100
60	5	16.0	52	0.27	14.4	24.1	0.24	100
80	8	19.6	48	0.24	22.7	28.4	0.28	100
100	10	13.2	26	0.13	26.8	26.8	0.27	83
120	10	9.6	16	0.08	31.9	26.6	0.27	76

Ethanol conversion rate was calculated according to 1mol xylose producing 1.67mol ethanol, and 1g of xylose produces about 0.51g ethanol.

表 3 所示 ,当初始木糖浓度低于 80g/L 时 ,随着木糖浓度的提高 ,乙醇的最高浓度不断提高。木糖初始浓度从 20g/L 升至 80g/L ,乙醇的最高浓度从 5.9g/L 上升到 19.6g/L ,但乙醇的转化率却不断降低。木糖醇的浓度随木糖浓度升高而升高 ,木糖醇的转化率也同时升高。当木糖初始浓度从 80g/L 升至 120g/L ,乙醇的最高浓度却不断下降 ,在木糖浓度为 120g/L ,乙醇的浓度仅达到 9.6g/L ,产率为 0.08g/g。同时 ,木糖醇的浓度随木糖浓度的升高还在不断升高 ,但其转化率却在不断下降。Schvester 等^[8]有关酵母的研究发现高的底物浓度抑制细胞的生长 ,当木糖浓度从 50g/L 升至 200g/L ,*P. tannophilus* 发酵乙醇的得率从 0.32g/g 降到 0.14g/g ;*C. sheatae* 发酵乙醇的得率从 0.45g/g 降到 0.13g/g。这可以解释为 随着木糖浓度的增加 ,木糖的吸收和木糖还原酶活性也随之增加 ,但是对木糖醇脱氢酶影响不大。如果木糖的浓度超过 30% ,渗透压将影响木糖醇的产生^[13]。

2.4 葡萄糖对木糖发酵的影响

前面的实验都是以纯木糖为底物 ,但在实际应用中 ,葡萄糖和木糖同时存在 ,如 :玉米芯和蔗渣的酸水解液。本实验采用 100mL 的发酵摇瓶 ,装液量为 60mL ,生长培养基培养两天后 ,转入 100mL 发酵瓶中并补加木糖、葡萄糖使其浓度都达到 40g/L。37℃ 150r/min 摇床培养。每天定时取样 ,测定发酵液中葡萄糖、木糖、木糖醇、乙醇的浓度(图 6)。

如图 6 所示 ,*N. crassa* AS 3.1602 在葡萄糖-木糖的混合糖培养基中生长时存在着明显的底物顺序利用现象 ,葡萄糖抑制或阻遏木糖利用。培养的前两天 ,培养基中葡萄糖浓度在 10g/L 以上 ,仅有极少量木糖被利用 ,发酵液中有微量木糖醇浓度为 0.16g/L。当葡萄糖浓度降到 10g/L 以下 ,木糖才开始大量被利用。培养到第 3 天 ,培养基中的葡萄糖完全消耗完 ,此时发酵液中的乙醇浓度达到最大 ,为 18.7g/L。之后 ,乙醇的浓度先有所下降 ,但随着木糖利用的加快乙醇浓度又回升到 16.3g/L ,但仍低于 18.7g/L。第 5 天木糖醇的产量达到最大 ,为 14.2g/L ,远远高于单纯以 4% 木糖为底物时的 6.6g/L。

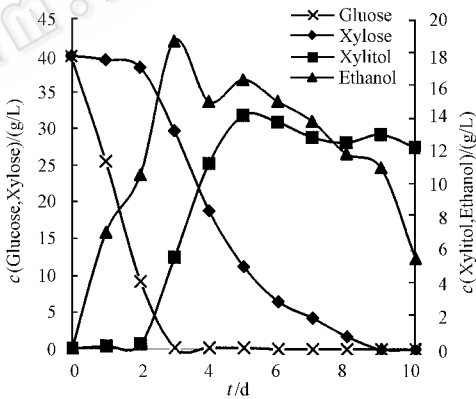


图 6 葡萄糖对木糖发酵的影响

Fig.6 The influence of glucose on xylose fermentation

对葡萄糖、木糖混合碳源的利用 *N. crassa* AS 3.1602 与酵母菌有所不同 ,酵母菌在葡萄糖浓度降至零并经一段时间延迟之后才开始利用木糖^[14] ,而 *N. crassa* AS 3.1602 在葡萄糖降到较低浓度后便开始利用木糖。

参 考 文 献

[1] 陈洪章 ,李佐虎 . 纤维素原料微生物于生物量全利用 . 生物技术通报 ,2002 2 : 25 ~ 29 .
[2] Rosenberg S L . Fermentation of pentose sugars to ethanol and other neutral products by microorganisms . *Enzyme Microbiol Technol* ,1980 2 :185 ~ 193 .
[3] Skoog K , Hahn-Hagerdal B . Xylose fermentation . *Enzym Microb Technol* ,1988 10 :66 ~ 88 .
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [4] Lin J Q , Lee S M , Koo Y M . Modeling of typical microbial cell growth in batch culture . *Biotechnol Bioprocess Eng* , 2000 , **5** : 382 ~ 385 .
- [5] Gong C H , Chen L F , Tsao G T . Quantitative production of xylitol from D-xylene by a high-xylitol producing yeast mutant *Candida tropicalis*HXP2 . *Biotechnol Lett* , 1981 **3** :130 ~ 135 .
- [6] Suikko M L , Drazic M . Pentose fermentation by Yeasts . *Biotechnol Lett* . 1983 **5** :107 ~ 112 .
- [7] Jeffries T W . Fermentation of xylulose to ethanol using xylose isomerase and yeasts . *Biotechnol Bioeng Symp* , 1981 **11** :5 ~ 324 .
- [8] Schvester P , Robinson C W , Moo-Yong M . Xylose fermentation to ethanol by *Pachysolen tannophilus* . *Biotechnol Bioeng Symp* , 1983 **13** :131 ~ 152 .
- [9] Slininger P J , van Cauwerberg J E , Kurtzman C P . Conversion of D-xylene by the yeast *Pachysolen tannophilus* . *Biotechnol Bioeng* , 1982 **24** :371 ~ 384 .
- [10] Debus D , Methner H , Schulze D , *et al* . Fermentation of xylose with the yeast *Pachysolen tannophilus* . *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* , 1983 , **17** :287 ~ 291 .
- [11] Slininger P J , Bolen P L , Kurtzman C P . *Pachysolen tannophilus* : properties and process consideration for ethanol production from D-xylene . *Enzyme Microb Technol* , 1987 , **9** :5 ~ 15 .
- [12] Du Preez J C , Van der Walt J P . Fermentation of D-xylene to ethanol by a strain of *Candida shehatae* . *Biotechnol Lett* , 1983 , **5** :357 ~ 362 .
- [13] 冯 婕 张利平 , 黄雪松 . 发酵生产木糖醇的影响因素 . *食品与发酵工业* , 2001 **27** (9) :66 ~ 70 .
- [14] Smiley K L , Bolen P L , Demonstration of D-xylene reductase and D-xylitol dehydrogenase in *Pachysolen tannophilus* . *Biotechnol Lett* , 1982 , **4** :607 ~ 610 .

Study on Xylose Fermentation by *Neurospora crassa*

Zhang Xiao¹ Zhu Dongqing¹ Wang Dan^{1 2} Lin Jianqiang¹ Qu Yinbo¹ Yu Shiyuan²

(¹ State Key Laboratory of Microbial Technology , Shandong University , Jinan 250100 , China)

(² Chemical Engineering College , Nanjing Forest University , Nanjing 210037 , China)

Abstract : The influence of oxygen limitation and medium initial pH on xylose fermentation by *Neurospora crassa* AS 3.1602 was investigated . *N. crassa* AS 3.1602 has high ability of xylose fermentation producing ethanol and xylitol . Oxygen limitation has big influence on ethanol and xylitol production . The maximum conversion rate of ethanol was 63.2% obtained under semi-aerobic conditions . The maximum conversion rate of xylitol was 31.8% obtained under micro-aerobic conditions . Xylitol accumulation is behind the accumulation of ethanol . The optimal pH is 5.0 for ethanol fermentation , and 4.0 for xylitol fermentation , respectively . Xylose fermentation is greatly inhibited at high pH . The yields of ethanol and xylitol are greatly influenced by the initial concentration of xylose . The addition of glucose inhibits both the xylose utilization and the ethanol and xylitol production .

Key words : *Neurospora crassa* , Xylose , Ethanol , Xylitol

Foundation item : Chinese National Natural Science Foundation(30270044) ; Shandong Provincial Natural Science Foundation (Y2001D11)

* Corresponding author . Tel 86-531-8564429 ; Fax 86-531-856234 ; E-mail lifezds@sdu.edu.cn

Received date : 10-14-2002

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn