

一株高效降解木糖的耐酸、嗜热厌氧杆菌的生理特性及产物分析

张文静¹, 马诗淳^{1,2}, 邓宇^{1,2}, 张辉^{1,2*}

¹农业部沼气科学研究所, ²农业部能源微生物与利用重点开放实验室, 成都 610041

摘要: 【目的】分离高效降解木糖的嗜热厌氧杆菌菌株,用于发酵生产生物燃料乙醇,为后继的构建基因工程菌株及联合生物工艺提供材料。【方法】运用亨盖特厌氧操作技术从胜利油田油层采出液两年的富集样中分离到一株嗜热厌氧杆菌 xyl-d。采用形态学观察、生理生化指标鉴定及基于 16S rRNA 的系统发育学分析确定其分类地位。【结果】菌株 xyl-d 为革兰氏阴性厌氧杆菌,菌体大小为 (1.35 - 5.08) μm \times (0.27 - 0.40) μm ,单生、成对或成簇生长,芽胞圆形,端生。温度生长范围 30 - 85 $^{\circ}\text{C}$ (最适温度 65 $^{\circ}\text{C}$); pH 范围 3.0 - 10.0 (最适 pH 7.5); NaCl 浓度范围 0% - 4% (最适 NaCl 浓度 2.0%)。发酵 D-木糖的产物是乙醇、乙酸、CO₂ 及少量的异丁醇、丙酸。菌株 xyl-d 的 (G + C) mol% 含量为 45.6%,与热厌氧杆菌属模式菌株威吉利热厌氧杆菌 (*Thermoanaerobacter wiegeli*) DSM10319^T 及嗜热乙醇杆菌 (*Thermoanaerobacter ethanolicus*) DSM 2246^T 的 16S rRNA 序列相似性均为 99.3%。菌株利用 D-木糖产乙醇的最佳初始 pH 为 8.5;少量酵母粉能刺激生长并显著提高发酵 D-木糖的产醇率,使乙醇成为主要的发酵产物;培养基中乙醇浓度达到 7% (V/V) 时菌体生长受到抑制,最佳生长条件下 D-木糖的降解率可达 91.37%,最佳产醇条件下发酵 1 摩尔 D-木糖可产生 1.29 摩尔的乙醇。【结论】菌株 xyl-d 是从特殊生境(油藏)中分离到的一株高效降解 D-木糖的耐酸、嗜热的厌氧杆菌,其为半纤维素降解产乙醇的联合生物工艺提供了菌源。

关键词: 热厌氧杆菌,乙醇,木糖,木质纤维素,联合生物工艺

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2011) 11-1510-10

植物光合作用的生物量是世界上最广泛的可再生性生物资源,它由纤维素、半纤维素和木质素构成,三者分别约占生物量干重的 45%、30% 和 25%^[1]。半纤维素水解产物中 D-木糖约占 90%,木糖的乙醇发酵是燃料乙醇开发中最有前景的技术之一^[2-6]。但是,D-木糖难以被微生物直接利用,以秸秆半纤维素为原料直接生产乙醇,转化率低;若先用理化法或生物酶法对原料进行预处理,过程复杂且

成本较高,这些技术瓶颈成为纤维乙醇工业化生产的主要屏障^[7-8]。因此,获得高效发酵木糖产乙醇的功能菌株,是简化半纤维素乙醇生产过程、降低生产成本的关键^[9-11]。部分厌氧微生物不仅可以产生纤维素酶水解纤维素、半纤维素,还可将其水解产物戊糖直接转化为乙醇。这种以天然或工程化微生物而非纤维素酶一步实现纤维素、半纤维素转化为乙醇的技术称为联合生物工艺 (consolidated

基金项目:国家自然科学基金(40973059)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-28-85258573;E-mail:zhanghuits@yahoo.com.cn

作者简介:张文静(1983-),女,山东东营人,硕士研究生,从事厌氧微生物研究。E-mail:101wenjing@163.com

收稿日期:2011-05-03;修回日期:2011-06-08

bioprocessing ,CBP) ,CBP 技术将成为未来解决燃料乙醇成本问题的重要手段。

梭菌、热厌氧杆菌和瘤胃球菌等厌氧微生物能够直接将秸秆类纤维素、半纤维素转化为乙醇。从热力学角度考虑,耐热或嗜热微生物与中温微生物相比,转化纤维素生产乙醇具有产率和底物转化率高、不易染菌、产物易回收和可利用底物范围广等优势^[12-13],因此利用嗜热厌氧微生物转化秸秆半纤维素产乙醇是降低燃料乙醇生产成本的有效途径之一。笔者从胜利油田油层采出液中分离到一株热厌氧杆菌属 *xyl-d*,该菌株能以多种戊糖、己糖为碳源,且能以 D-木糖为唯一碳源发酵生产乙醇,耐酸、嗜热,其对 D-木糖的降解率可达 91.37%,生长的 pH 范围为 3.0-10.0,最适生长温度为 65 °C。初始 pH 8.5,温度 60 °C,添加 0.45% yeast extract 条件下发酵 1 mol D-木糖可产生 1.29 mol 乙醇。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品:样品源自胜利油田罗 801 区块的油层采出液的厌氧富集物,油藏埋深 1680 m-1800 m,平均孔隙度 28.1%,平均空气渗透率 $215.2 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2$,地层水矿化度 9794 mg/L,压力系数约为 1.0,饱和压力 9.24 MPa,原油密度 0.932-0.937 g/cm³,粘度 230-465 mPa·s,地层温度 75 °C-80 °C。

1.1.2 主要试剂和仪器:D-木糖购于 SIGMA 试剂公司,酵母粉购 OXOID 试剂公司,胰蛋白胨、酪蛋白胨、peptone 购于北京奥博星生物技术有限公司,BBL 购于 BD 公司,乙醇购于天津市致远化学试剂有限公司(分析纯),16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit 试剂盒和 Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 试剂盒均购于 TaKaRa 公司。Nikon 80i 荧光相差显微镜购于 Nikon 公司,DU® 730 型分光光度计、DU800 spectrophotometer 购于 Beckman 公司。气相色谱 GC-2010 购于日本岛津(Shimadzu)公司,气相色谱 7820A 购于 Agilent 公司,离子色谱 ICS-3000 购于 DIONEX 公司。

1.2 菌种分离培养

富集和分离纯化培养基成分如下:0.5 g NaCl, 0.5 g MgCl₂ · 6H₂O, 0.1 g CaCl₂ · 2H₂O, 0.3 g NH₄Cl, 0.2 g KH₂PO₄, 0.5 g KCl, 0.1 g 酵母粉,

0.5 g L-半胱氨酸盐酸盐,1.0 mg 刃天青,1 L 蒸馏水 5 mol/L KOH 调 pH 至 7.0,灭菌后补加木糖(终浓度 1%),维生素 JCM (Japan Collection of Microorganisms) 284,微量元素(JCM284),NaHCO₃(终浓度 0.2%),60 °C 培养。基础培养基成分同分离纯化培养基但不添加酵母粉。

1.3 形态观察

采用扫描电子显微镜观察菌体形态,制作步骤见文献[14]。

1.4 生理生化特性鉴定

采用分离纯化培养基,D-木糖(1%)作为碳源,其中 pH 实验分别采用 0.2 mol/L HCl、1 mol/L HCl、0.2 mol/L NaOH 和 1 mol/L NaOH 溶液调灭菌后的培养基至 pH 2.5-10.5;对于生长 NaCl 浓度范围,灭菌前调整 NaCl 浓度为 0%-5.0%。最适生长条件下菌株的倍增时间测定采用监测菌体密度和测产气、产酸量,取对数生长期菌体密度作非线性回归,计算得倍增时间。底物实验采用不含微量酵母粉的培养基,用各种不同碳源代替 D-木糖(终浓度均为 5 g/L)^[15],转培 3 代后测 OD₆₀₀。培养基灭菌后加入不同抗生素(终浓度为 200 μg/mL),测定菌体密度以确定菌株对不同抗生素的抗性。

1.5 不同培养条件对代谢产物成分及含量的影响以及代谢产物对菌体生长的影响

1.5.1 小分子有机酸和醇的检测:采用基础培养基,以 D-木糖为唯一碳源,5% 接种量,酵母粉添加量为 0.45%,培养(pH7.5,65 °C)72 h 后,Agilent 气相色谱 7820A 对代谢产物进行定量检测(气相色谱条件:FFAD 柱,FID 检测器,柱温为 250 °C,载气为氦气,流速为 1 mL/min,定量测定方法为外标法)^[16],采用 DIONEX ICS-3000 离子色谱测定 D-木糖降解率(离子色谱条件:PA1 柱,0.05 mol/L 的 NaOH 为流动性,流速为 1 mL/min,电化学检测器,柱温为 30 °C,定量测定方法为外标法)。

1.5.2 代谢产物对菌株生长的影响:配制 100% 的无菌无氧的乙醇,通过控制添加到分离纯化培养基中的乙醇量使培养基中乙醇的初始浓度分别达到 0%-10%,1% D-木糖,5% 接种量接种于无机盐培养基,pH7.0,60 °C 培养 72 h 后测定 OD₆₀₀,采用 DIONEX ICS-3000 离子色谱测定 D-木糖降解率,确定不同浓度的乙醇对菌株 *xyl-d* 生长的影响^[17]。

1.5.3 不同培养条件对代谢产物的影响:配制不同

初始 pH 的分离纯化培养基 (D-木糖 1%) ; 配制基础培养基 , 加入不同碳源 , 转培 3 代 , 测其主要代谢产物的成分及含量 ; 配制基础培养基 , 补加酵母粉至终浓度为 0% - 0.05% , 1% 接种量 , 60 °C 培养 5 d 后测代谢产物成分及含量。

1.6 刺激因子对 xyl-d 代谢产物成分及含量的影响

以 D-木糖为唯一碳源 , 在基础培养基中分别添加酵母、BBL、peptone、胰蛋白胨、酪蛋白胨 (无刺激因子的培养基做对照) , 使终浓度为 0.02% 。 分别接种 1% xyl-d , 培养 5 d 后 Agilent 气相色谱 7820A 测代谢产物成分及含量。

1.7 16S rRNA 序列扩增、测序、系统发育树构建及 (G + C) mol% 含量的测定

1.7.1 PCR 扩增: 提取 xyl-d 纯化菌株基因组 , 分别以 27F (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')、1492R (5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3') 扩增出细菌的 16S rRNA , PCR 扩增体系为 50 μ L : 25 μ L 2 \times Taq PCR Master Mix (TaKaRa 公司) , 25 pmol 引物 0.1 mg/L 模板 , 补加灭菌 ddH₂O (双蒸水) 至 50 μ L。PCR 扩增条件: 94 °C 5 min ; 94 °C 1 min , 55 °C 1 min , 72 °C 2 min , 30 个循环 ; 72 °C 10 min。回收 PCR 产物 , 由大连宝公司测序。

1.7.2 构建系统发育树: 提交菌株 xyl-d 的 16S rRNA 序列在 EMBL 数据库中进行比对 , 选取与之相似性最高的 19 株热厌氧杆菌模式种 16S rRNA 序列 , 进行 Clustalx 比对 , MEGA4.1 分析 , 采用 Neighbor - Joining 构建系统发育树 , Bootstrap 1000 次进行稳定性验证^[18]。

1.7.3 (G + C) mol% 含量的测定: 根据热变性温度法^[19] (T_m 值法) 测定基因组 (G + C) mol% 。 测定菌株 DNA 的热变性温度 (T_m 值) , 同时测定 *E. coli* K12 的 T_m 值。根据公式 $(G + C) \text{ mol} \% = 51.2 + 2.08 \times [T_m (X) - T_m (K12)]$ 计算出 (G + C) mol% 。

2 结果和分析

2.1 菌株形态学

菌株 xyl-d 是严格厌氧菌 , 呈直杆状 , 革兰氏染色呈阴性 , 不运动 , 长为 1.35 μ m - 5.08 μ m , 宽为 0.27 μ m - 0.40 μ m , 单生、成对或成簇生长 , 产芽胞 端生 圆形 (图 1) 。 菌株在 D-木糖为唯一碳源

的固体培养基中滚管、培养 7 d 后形成白色菌落 , 圆形、表面干燥 , 边缘整齐 , 直径大约 1 mm - 1.5 mm 。

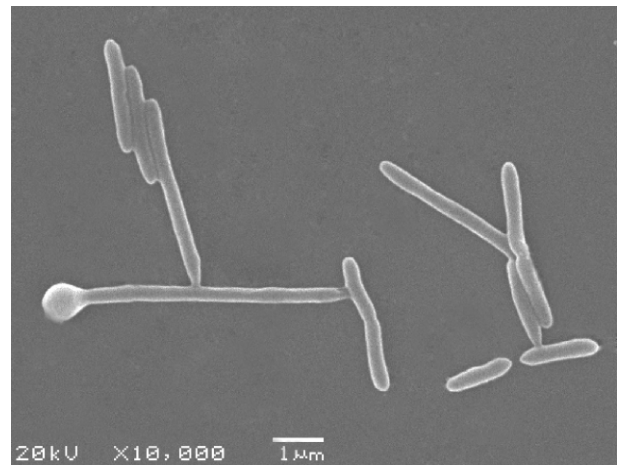


图 1 菌株 xyl-d 扫描电镜照片 (10000 \times)

Fig. 1 Electron micrograph of strain xyl-d (10000 \times).

2.2 生理生化特征

2.2.1 生理特征: 菌株 xyl-d 的温度范围为 30 °C - 85 °C , 最适生长温度为 65 °C 。 pH 范围为 3.0 - 10.0 , 最适 pH 为 7.5 。 能耐受 4% 的 NaCl , 最适 NaCl 浓度为 2% (图 2) 。 菌株 xyl-d 在 pH 7.5、温度 65 °C 时 , 菌株的比生长速率 (μ_m) 为 0.72/h , 倍增时间为 58 min 。

2.2.2 生化特征: 底物实验结果 (见表 1) 表明 , 菌株 xyl-d 能利用的底物包括 tryptone、D-氨基葡萄糖盐酸盐、糖原、山梨糖、树胶醛糖、甘露醇、蔗糖、D-葡萄糖、D-乳糖、纤维二糖、D-木糖、D-果糖、明胶、麦芽糖、棉子糖、葡糖酸钠、甘油、水杨酸。在 peptone、十六酸、L-鼠李糖、覃糖、丁酸钠、木聚糖、L-Glu、乙酸钠、山梨醇上表现出弱生长。不能利用淀粉、对甲苯磺酸钠、DL-苹果酸、L-Tyr、L-丙氨酸、正丙醇、丙酸钠、纤维素粉。

抗生素实验结果表明 , 菌株对氨苄青霉素钠、氯霉素、硫酸新霉素有一定抗性 ; 对四环素盐酸盐、硫酸链霉素、红霉素、利福平、硫酸卡那霉素敏感。结果见图 3 。

2.3 菌株 xyl-d 代谢产物分析及不同培养条件对代谢产物成分及含量的影响、代谢产物对菌体生长的影响

2.3.1 菌株 xyl-d 代谢 D-木糖的产物分析: 由气相色谱测得菌株 xyl-d 最佳菌体生长条件下代谢 D-木糖的产物主要为乙醇、乙酸、异丁醇和少量的丙酸。

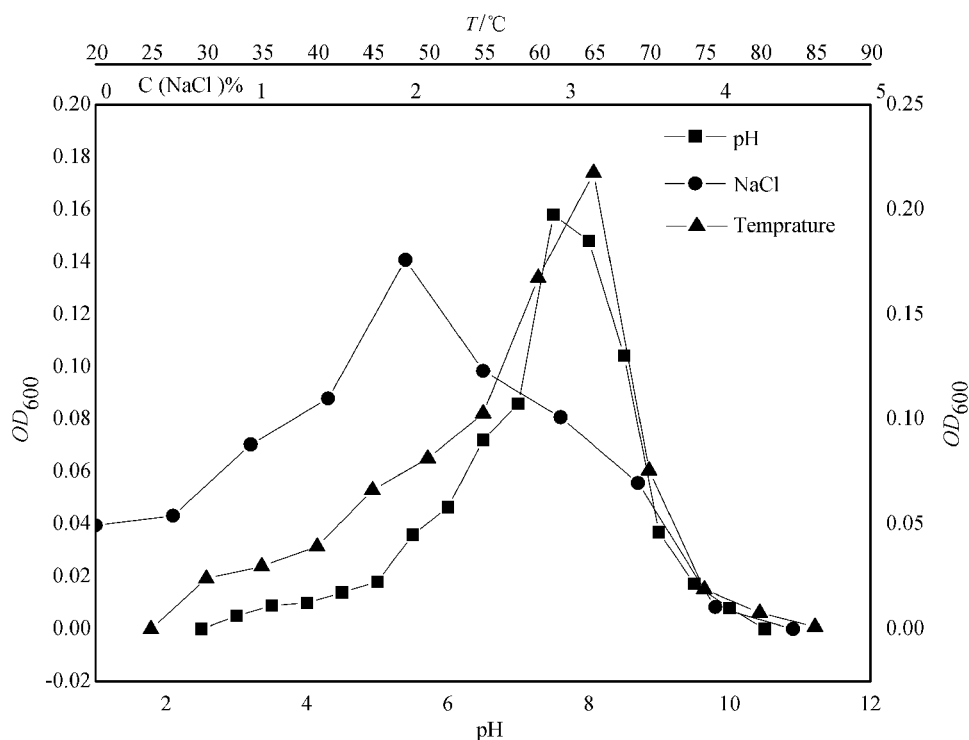


图2 温度、pH及盐浓度对菌株 xyl-d 生长的影响

Fig. 2 The effect of temperature , pH and salinities on the growth of strain xyl-d.

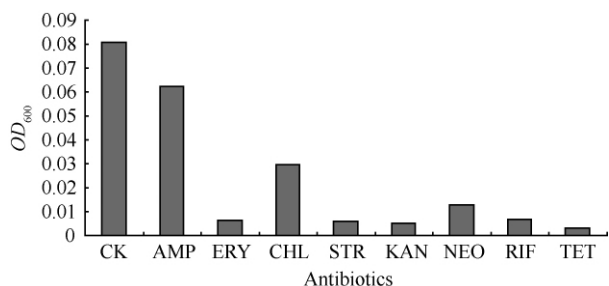
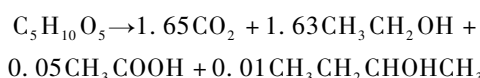


图3 抗生素对菌株 xyl-d 生长的影响

Fig. 3 Effect of antibiotics on the growth of strain xyl-d.

具体含量见表2。表2中异戊酸和戊酸可能来自酵母而非D-木糖^[20]。由离子色谱测得数据计算出菌株 xyl-d 对D-木糖的降解率为91.37%。

以D-木糖为碳源时的代谢方程式：



2.3.2 代谢产物对菌株生长及D-木糖降解率的影响：乙醇是菌株 xyl-d 发酵D-木糖的主要代谢产物，由于产物的反馈抑制作用，乙醇能够影响菌株的生长。从图4可知，培养基中添加乙醇初始浓度达到7% (V/V)时菌体生长受到抑制，菌株对D-木糖的降解率由83.08%下降至6.76%。

2.3.3 不同培养条件对代谢产物成分及含量的影响：(1) 不同初始 pH 对代谢产物成分及含量的影响：接种不同初始 pH (3.0 - 10.0) 的培养基 (D-木糖 1% ,接种量 1.5% ,酵母粉 0.045%) ,60 °C 培养 5 d后测定发酵液中最终的乙酸和乙醇量。实验结果表明 (图 5) ,初始 pH 为 3.0 - 5.0 及 10.0 时代谢产物以乙酸为主 ,初始 pH 为 5.5 - 9.5 时 ,代谢产物以乙醇为主 ,pH 8.5 时乙醇含量达到最大值 ,此时发酵 1 摩尔木糖可产生 1.29 摩尔乙醇 ,随着初始 pH 值的增加 ,产乙醇量先升高后降低 ,产乙酸量先升高再降低再升高再降低 ,初始 pH 3.5 时乙酸含量最大。

(2) 不同氮源对代谢产物成分及含量的影响：分别接种菌株 xyl-d 于含有 0.02% 和不含有酵母粉、胰蛋白胨、酪蛋白胨、BBL、peptone 的培养基中 (接种量 1%) ,60°C 培养 5 d 后测定发酵液中的产物量。分析结果显示 ,培养基中加入 0.02% 的酵母粉能显著刺激菌株的产乙醇量同时减少产乙酸量 (图 6) ,使产乙醇量由 3.37×10^{-3} mol/L 增加到 3.515×10^{-2} mol/L ,产乙酸量由 9.99×10^{-3} mol/L 减少到 7.36×10^{-3} mol/L ,并且加入酵母粉可以改

表 1 不同碳源及能源对菌株 xyl-d 菌体生长的影响

Table 1 The effect of carbon and energy sources on the growth of strain xyl-d

Classification and names of carbon and energy sources		Glycerin
Pentose	arabinose	+++
	D-xyllose	++++
	L-rhamnose	+
	sorbose	+++
hexoses	D-glucose	++++
	D-fructose	+++
	mannite	+++
	sorbierite	++
sugar alcohol	glycerin	+++
	trehalose	+
	gluconic acid sodium salt	+++
Sugar acid		
amino sugar	D-glucosamine hydrochloride	+++
	starch	-
polysaccharide	glycogen	+++
	cellulose powder	-
	xylan	+
	maltose	++++
oligosaccharide	cellobiose	++++
	sucrose	++++
	D-lactose	++++
	raffinose	+++
amino acid	L-glutamic acid	+
	L-tyrosine	-
	L-alanine	-
	butyrate	++
acid	salicylic acid	++
	sodium acetate	+
	hexadecanoic acid	+
	Sodium propionate	-
	DL-malic acid	-
	p-toluenesulfonic acid	-
others	Peptone	+
	Tryptone	+++
	isinglass	+++
	normal propyl alcohol	-

“-”: $OD_{600} = 0$, “+”: $0 < OD_{600} \leq 0.04$, “++”: $0.04 < OD_{600} \leq 0.08$, “+++”: $0.08 < OD_{600} \leq 0.12$, “++++”: $OD_{600} > 0.12$.

表 2 菌株 xyl-d 代谢产物

Table 2 The production of xyl-d growing on D-xyllose

Products	H ₂	CO ₂	ethanol	acetic	isobu- tanol	prop- ionic	isova- leric	Val
Content	0.000	0.069	3.148	0.118	0.031	0.004	0.007	0.002
	mol/L	mol/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L

变菌株利用 D-木糖的代谢产物中各组分的比例,使乙醇成为主要的代谢产物。加入胰蛋白胨也能提高菌株的产醇量(约提高 2 倍)和减少产乙酸量,peptone 及酪蛋白胨、BBL 对菌株的生长及代谢影响不大。

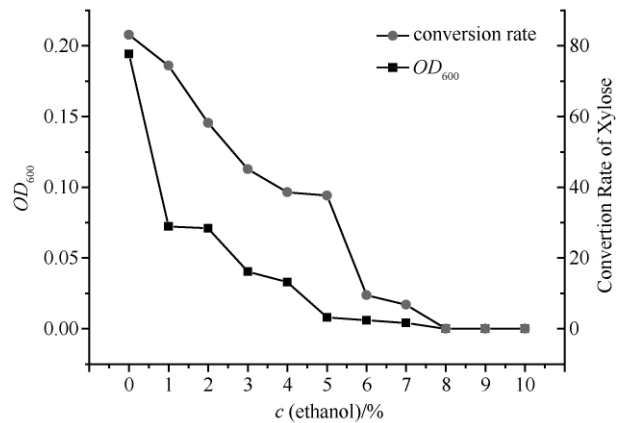


图 4 不同初始乙醇浓度对菌株 xyl-d 生长代谢的影响

Fig. 4 The effect of initial ethanol concentrations on the growth and metabolism of strain xyl-d.

(3) 不同碳源对代谢产物成分及含量的影响: 配制不含酵母的培养基, 分别接入不同碳源, 终浓度均为 1%, 转培 3 代后测其主要代谢产物的成分及含量。部分底物的主要代谢产物成分及含量见图 7, 由图 11 可知, 在无酵母粉等刺激因子的条件下, 菌株 xyl-d 发酵碳水化合物主要产生乙酸, 其中利用 D-木糖的乙酸产量最大, 且同时产生乙醇。

(4) 不同浓度酵母提取物对代谢产物成分及含量的影响: 分别接种菌株 xyl-d 于含有 0‰、0.05‰、0.10‰、0.15‰、0.20‰、0.25‰、0.30‰、0.35‰、0.40‰、0.45‰、0.50‰ 酵母粉的培养基中(接种量 1%) pH 8.5, 60℃ 培养 5 d 后测定发酵液中的产物成分及含量。分析结果显示, 加入 0.15‰ - 0.50‰ 的酵母粉能显著刺激菌株的产乙醇量、减少产乙酸量(图 8), 使乙醇成为主要的代谢产物, 添加 0.45‰ 的酵母粉时乙醇含量达到最大值。酵母粉刺激菌体生长的实例很多^[17, 20, 22], 酵母粉刺激菌株发酵糖产醇的报道也不少^[17, 22], 但是厌氧条件下酵母粉显著刺激菌株发酵木糖产乙醇的基因水平的调控机制还不清楚, 有待于进一步探索。

2.4 菌株 xyl-d 的系统发育学分析

2.4.1 16S rRNA 序列的测定及系统发育树构建: 菌株 xyl-d 的 16S rRNA 部分序列长 1465 bp, 在 GenBank 核酸登录号为 HQ 710549。根据菌株 xyl-d 的 16S rRNA 测序结果进行 BLASTn 分析, 菌株 xyl-d 与 *Thermoanaerobacter wiegeli* DSM10319^T (X92513) 及 *T. ethanolicus* DSM 2246^T (L09163) 的 16S rRNA 序列相似性均为 99.3%。菌株 xyl-d 与

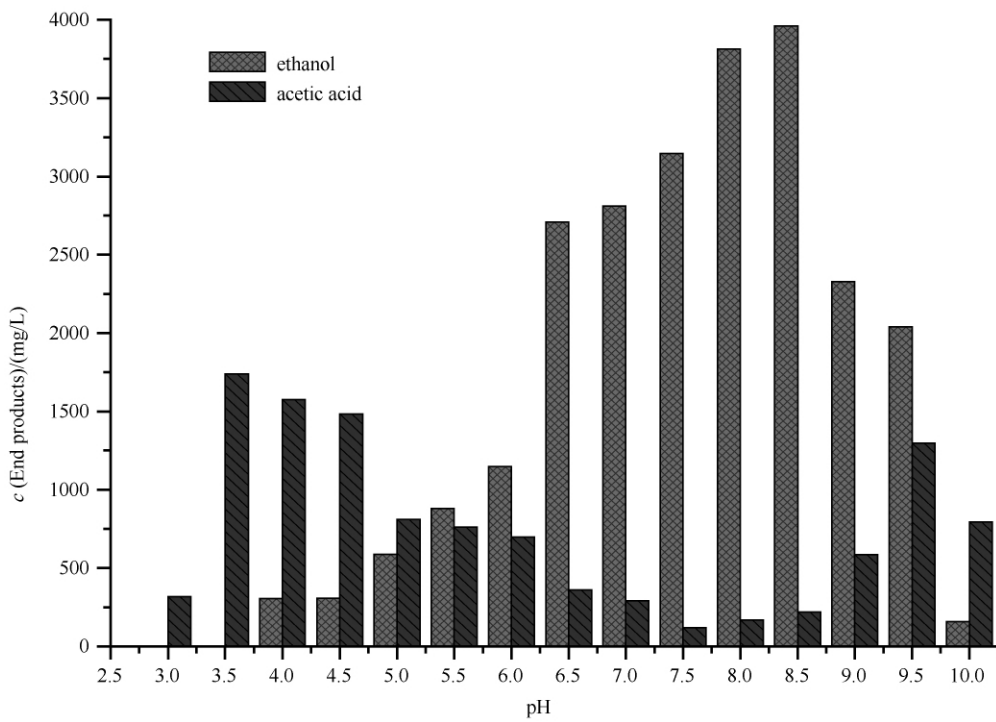


图5 不同初始 pH 对代谢产物的影响

Fig.5 The effect of different initial pH on end products.

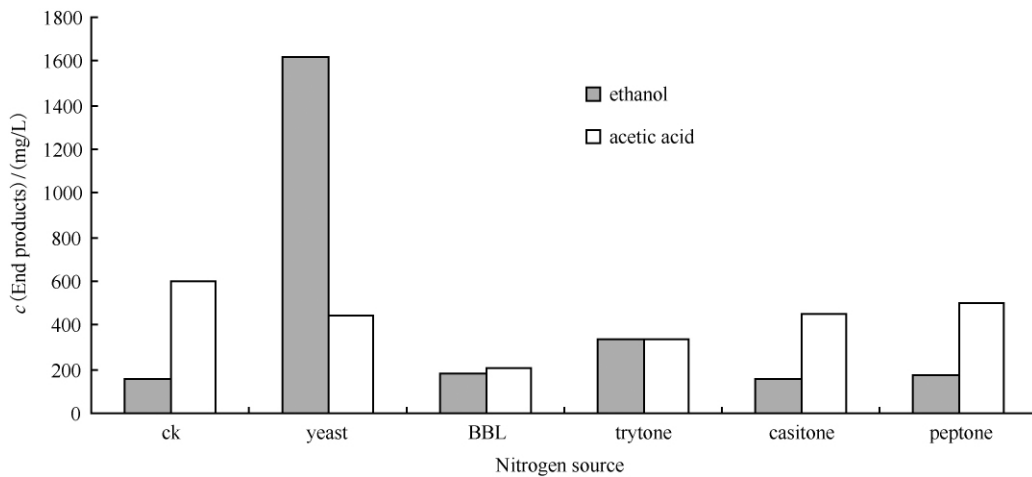


图6 不同氮源对代谢产物的影响

Fig.6 The effect of different nitrogen sources on strain xyl-d.

热厌氧杆菌属 (*Thermoanaerobacter*) 其他菌株的系统发育分析结果见图 9。

2.4.2 菌株 xyl-d (G + C) mol% 含量结果: (G + C) mol% 含量的测定结果显示, 菌株 xyl-d 的含量为 45.6%。

2.5 菌株 xyl-d 与亲缘关系密切的热厌氧杆菌菌株的比较

菌株 xyl-d 与 *T. ethanolicus* DSM 2246^T 的细胞

形态及产孢能力方面有很大差别, 与 *T. wiegelii* DSM10319^T 的 pH 生长范围及菌体大小差异较大, 且 3 株菌的 G + C 含量差别较大。虽然 xyl-d 单位糖发酵产乙醇能力低于 DSM 2246 (JW200), 但单位糖发酵产乙醇的实际值占理论值的比例及乙醇在末端产物中的比值是表 3 中六株菌中最大的。菌株 xyl-d 与分离自本实验室的 SC-2 及 HL-3 在单位糖厌氧发酵产乙醇的能力上差异较大, 前者分别是后

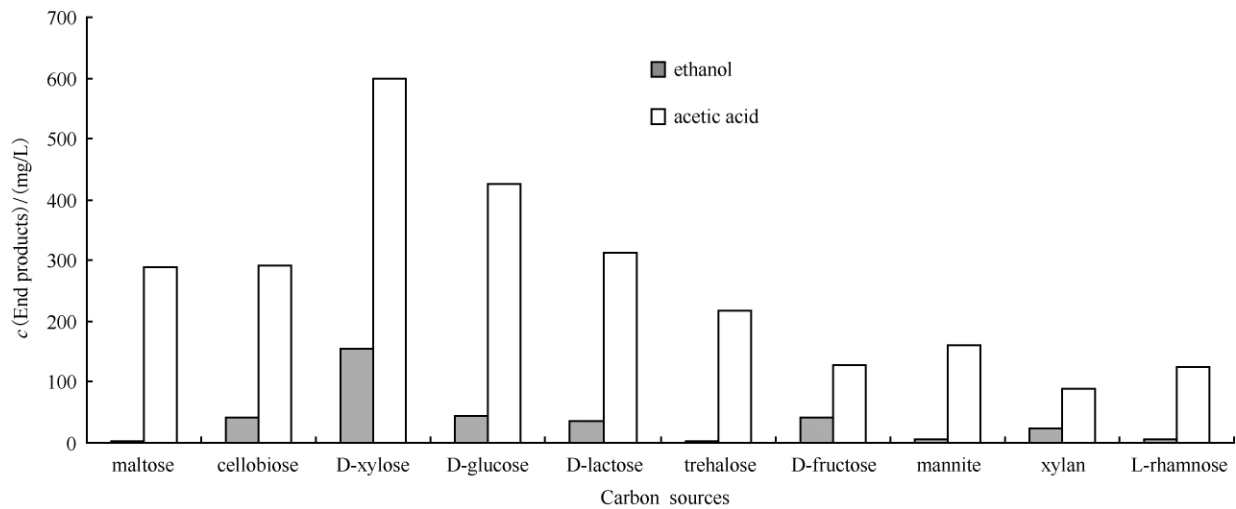


图7 不同碳源为底物的产醇、产酸量

Fig.7 Yields of ethanol and acetic acid from different carbon sources.

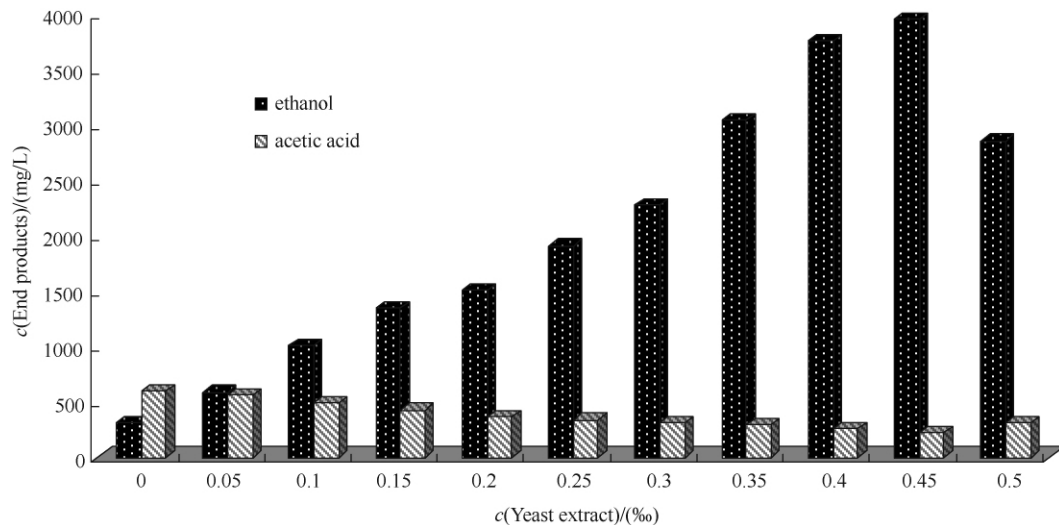


图8 酵母粉对菌株的刺激作用

Fig.8 The effect of yeast extract on strain xyl-d.

两者的 22.8 倍和 11.4 倍。

3 讨论

热厌氧杆菌 (*Thermoanaerobacter*) 分解 D-木糖产乙醇的研究已有报道,但是野生菌株的乙醇产率相对较低,副产物较多^[17, 22-23]。笔者从我国高温油田中分离的热厌氧杆菌属菌株 xyl-d 可高效转化 D-木糖产生乙醇,乙酸等副产物少。本研究从菌株的形态及生理生化特征、产乙醇条件的优化等方面进行了探讨,研究结果讨论如下:

(1) xyl-d 可以发酵纤维素酶解或水解后的多种

五碳糖(D-木糖、树胶醛糖等)和六碳糖(D-葡萄糖、D-果糖、山梨糖等),发酵 D-木糖主要产生乙醇和乙酸,最佳生长条件下,D-木糖降解率可达 91.37%。由此,我们可以将 xyl-d 与降解纤维素的复合菌系进行组配,获得厌氧降解纤维素产乙醇的最优方案。

(2) 菌株 xyl-d 为耐酸、嗜热菌株,可以克服工业生产环境中可能遇到的高温 and 低 pH 等环境,但是,其乙醇产量尚不能满足工业化生产的需要。基因工程技术的不断发展使得构建高产乙醇的热厌氧杆菌工程菌株成为可能。Shaw AJ 等^[24]通过敲除乙酸激酶、磷酸乙酰转移酶、乳酸脱氢酶构建的基因工程菌株 ALK2,乙醇产率高达 37 g/L,是目前已报道

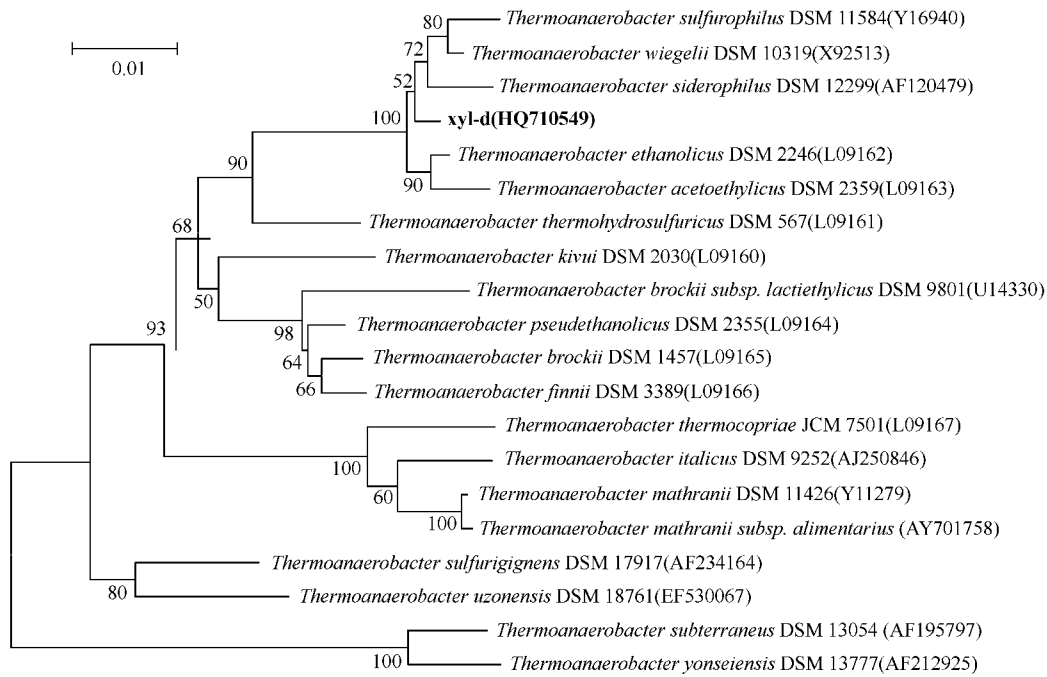


图9 基于 16S rRNA 序列相似性构建的系统发育树

Fig.9 Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences. The tree rooted was constructed by the neighbor-joining method with bootstrap values calculated from 1000 resampling. The numbers at each node indicate the percentage of bootstrap supporting. The numbers in the brackets after each bacterial name are 16S rRNA gene sequence accession numbers in GenBank. Bar 0.01 sequence divergence.

表3 菌株 xyl-d 与亲缘关系密切的细菌的特征比较

Table 3 Characteristics differentiating strain xyl-d from most closely strains

Characteristics	xyl-d	<i>T. ethanolicus</i> DSM 2246 ^{T[20]}	<i>T. wiegelii</i> DSM 10319 ^{T[21]}	<i>T. mathranii</i> subsp. <i>mathranii</i> SC-2 ^[17]	<i>Thermoanaerobacter</i> HL-3 ^[22]
Cell size	(0.27 - 0.40) μm × (1.35 - 5.08) μm	(0.3 - 0.8) μm × (4 - 8) μm ⁽¹⁾	(0.4 - 0.6) μm × (4 - 1) μm	0.38 μm × (1.7 - 3.9) μm	0.50 μm × (3.5 - 4.2) μm
Gram staining	negative	variable	ND	negative	negative
Spores	terminal	non-spore-forming	terminal	terminal	non-spore-forming
Temperature range (optimum) / °C	30 - 85 °C (65 °C)	37 - 78 °C (69 °C)	38 - 78 °C (65 - 68 °C)	40 °C - 75 °C (70 °C)	40 °C - 75 °C (60 °C)
pH range (optimum)	3.0 - 10 (7.5)	4.4 - 9.8 (5.8 - 8.5)	5.5 - 7.2 (6.8)	5.5 - 9.5 (6.5)	5.0 - 8.0 (6.5)
Tolerance of NaCl (optimum) / (% ; w/v)	0 - 4.0 (2)	ND	0 - 5.8	0 - 5 (0)	0 - 3.2 (0.25)
Isolated from	Oil reservoir water	hot springs	a freshwater pool	oil-production water	oil reservoir ^[22]
Doubling time under optimal condition/h	0.97	ND	1.2	1.08	1.25
Ethanol conversion experimental value of ethanol/theoretical value of ethanol	1.14 mol/mol xylose ⁽²⁾ 0.684	1.8 mol/mol glucose ⁽³⁾ 0.45	(1.1 - 1.7) mol/mol glucose 0.275 - 0.425	0.05 mol/mol glucose 0.0125	0.10 mol/mol glucose 0.025
DNA G + C content / (mol%) - Tm	45.6	31.9	35.6 ± 1.2	30.8	33.9
the major end products from xylose or glucose	ethanol, acetic acid, isobutanol, H ₂ , CO ₂ (ethanol: acetic acid: isobutanol = 163:5:1)	ethanol, CO ₂ , acetic acid, lactic acid (ethanol: acetic acid: lactic acid = 18:1:1)	ethanol, acetate, lactate, propionate, CO ₂ , and H ₂	ethanol, acetic acid, propionic acid, H ₂ , CO ₂ (ethanol: acetic acid = 2.2:1)	CO ₂ , ethanol, acetic acid (ethanol: acetic acid = 1.1:1)

(1) It is measured in the early logarithmic growth phase. (2) Fermentation balance of xylose by strain xyl-d. The fermentation was performed in a 10 ml culture of prereduced medium containing 0.35% yeast extract with a starting pH of 7.5, and under an atmosphere of N₂ at 60 °C. (3) Fermentation balance of glucose by strain JW 200. The fermentation was performed in a 10 ml culture of prereduced medium containing 0.5% yeast extract with a starting pH of 7.5, and under an atmosphere of Ar at 72 °C.

的嗜热厌氧菌中乙醇产量最高的基因工程菌株。因此,可利用基因工程手段对 *xyl-d* 进行基因改造,改变菌株的代谢通路,获得高转化率工程菌株,为 CBP 工艺生产纤维乙醇提供菌种资源,降低燃料乙醇的生产成本。

(3) 微量的酵母粉 (0.2% - 0.45%) 能显著刺激菌株 *xyl-d* 的乙醇产量、降低乙酸产量。在多数嗜热厌氧微生物中,有机酸(如乙酸和乳酸)常伴随乙醇产生。糖酵解过程中产生的丙酮酸通过丙酮酸脱羧酶和乙醇脱氢酶催化产生乙醇,乙酸由丙酮酸通过丙酮酸铁氧化还原蛋白氧化还原酶(POR)、磷酸乙酰转移酶(PTA)和乙酰激酶(ACK)催化形成。酵母粉或其中间代谢产物可能抑制或减弱与乙醇脱氢酶竞争底物的酶基因的表达,使碳源流向产乙醇代谢途径。2004年,司马迎春等证实了在核黄素合成过程中,添加一定浓度的酵母粉,可加速葡萄糖的酵解^[25]。Ingram等^[26]将丙酮酸脱羧酶(Pyruvate decarboxylase, PDC)和乙醇脱氢酶II(Alcohol dehydrogenase II, ADH II)编码基因 *adh II* 和 *pdc* 克隆到 *E. coli* 中,得到的重组菌几乎专一地发酵生产乙醇。但是厌氧条件下酵母粉显著刺激菌株发酵 D-木糖的乙醇产量、减少乙酸产量的基因水平调控机制还不清楚,有待于进一步探讨。

参考文献

- [1] Brigham JS, Adney WS, Himmel ME. Hemicellulose: diversity and applications In Wyman CE. Eds. Handbook on Bioethanol Production and Utilization. Washington DC: Taylor and Francis, 1996: 119-142.
- [2] Goldemberg J. Ethanol for a sustainable energy future. *Science*, 2007, 315 (5813): 808-810.
- [3] 洪解放, 张敏华, 刘成, 邹少兰, 吴经才. 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 (Food and Fermentation Industries)*, 2005, 31: 114-118.
- [4] 张颖. 木糖利用重组运动发酵单胞菌的构建及乙醇胁迫下大肠杆菌表达谱分析. 中国农业科学院博士学位论文, 2009.
- [5] Lee JH, Patel P, Sankar P, Shanmugam KT. Isolation and characterization of mutant strains of *Escherichia coli* altered in H₂ metabolism. *Journal of Bacteriology*, 1985, 162(1): 344-52.
- [6] 刘健, 陈洪章, 李佐虎. 木糖发酵生产乙醇的研究. *工业微生物 (Industrial Microbiology)*, 2001, 31(2): 36-41.
- [7] Himmel ME, Ding SY, Johnson DK, Adney WS, Nimlos MR, Brady JW, Foust TD. Biomass recalcitrance: Engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*, 2007, 315: 804-807.
- [8] Lynd LR, Laser MS, Bransby D, Dale BE. How biotech can transform biofuels. *Nature Biotechnology*, 2008, 26: 169-172.
- [9] 赵心清, 白凤武, 李寅. 系统生物学和合成生物学研究在生物燃料生产菌株改造中的应用. *生物工程学报 (Chinese Journal of Biotechnology)*, 2010, 26(7): 880-887.
- [10] 王风芹, 楚乐然, 谢慧, 宋安东. 纤维燃料丁醇研究进展. *生物加工过程 (Chinese Journal of Bioprocess Engineering)*, 2009, 7(1): 1-6.
- [11] 刘健, 陈洪章, 李佐虎. 木糖发酵生产乙醇的研究. *工业微生物 (Industrial Microbiology)*, 2001, 31(2): 36-41.
- [12] 任红妍. 嗜热微生物. *生物学通报 (Bulletin of Biology)*, 1995, 30(3): 18.
- [13] 马诗淳, 罗辉, 尹小波, 张辉, 邓宇. 厌氧产氢微生物研究进展. *微生物学通报 (Microbiology)*, 2009, 36(8): 1244-1252.
- [14] 仇天雷, 承磊, 罗辉, 张辉, 吴晓磊, 邓宇. 一株近海沉积物中产甲烷菌的分离及鉴定. *中国沼气 (China Biogas)*, 2006, 25(2): 3-6.
- [15] Larsen L, Nielsen P, Ahring BK. *Thermoanaerobacter mathranii* sp. nov., an ethanol-producing, extremely thermophilic anaerobic bacterium from a hot spring in Iceland. *Archives of Microbiology*, 1997, 168(2): 114-119.
- [16] 伍晓林, 侯兆伟, 陈坚, 伦世仪. 采油微生物发酵液中有有机酸(醇)的 GC-MS 分析. *大庆石油地质与开发 (Petroleum Geology & Oilfield Development in Daqing)*, 2005, 24(1): 93-95.
- [17] 黎霞, 承磊, 汪卫东, 邓宇, 尹小波, 张辉. 一株油藏嗜热厌氧杆菌的分离、鉴定及代谢产物特征. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2008, 48(8): 995-1000.
- [18] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406-425.
- [19] Mandel M, Marmur J. Use of ultraviolet absorbance temperature profile for determining the guanine plus cytosine content of DNA. *Methods in Enzymology*, 1968, 12: 195-206.
- [20] Jirgen W, Lars G. Ljungdahl. *Thermoanaerobacter ethanolicus* gen. nov., spec. nov., a new, extreme thermophilic, anaerobic bacterium. *Archives of Microbiology*, 1981, 128(4): 343-348.
- [21] Cook GM, Rainey FA, Patel BK, Morgan HW. Characterization of a new obligately anaerobic thermophile, *Thermoanaerobacter wiegelii* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1996, 46(1): 123-127.

- [22] 刘海昌, 兰贵红, 刘全全, 曹毅, 邓宇, 张辉. 一株油藏嗜热厌氧杆菌的分离鉴定和代谢特征的分析. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2010, 50 (11): 1525-1531.
- [23] Kim BC, Grote R, Lee DW, Antranikian G, Pyun YR. *Thermoanaerobacter yonseiensis* sp. nov., a novel extremely thermophilic, xylose-utilizing bacterium that grows at up to 85°C. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, 51: 1539-1548.
- [24] Shaw AJ, Podkaminer KK, Desai SG, Bardsley JS, Rogers SR, Thorne PG, Hogset DA, Lynd LR. Metabolic engineering of a thermophilic bacterium to produce ethanol at high yield. *Proceeding of the National Academy Sciences*, 2008, 105 (37): 13769-13774
- [25] 司马迎春. 酵母粉的作用及氮源对 *Bacillus subtilis* 24/pMX45 核黄素发酵的影响. 天津大学优秀硕士学位论文, 2004.
- [26] Ingram LO, Conway T, Clark DP, Sewell GW, Preston JF. Genetic engineering of ethanol production in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1987, 53 (10): 2420-2 425.

Characterization of an acidotolerant, thermophilic *Thermoanaerobacter* sp. xyl-d with a high xylose conversion

Wenjing Zhang¹, Shichun Ma^{1 2}, Yu Deng^{1 2}, Hui Zhang^{1 2*}

¹ Biogas Institute of Ministry of Agriculture, ² Key Laboratory of Energy Microbiology and Application, Chengdu 610041, China

Abstract: [Objective] We screened a thermophilic xylolytic bacterium that produced fuel ethanol from a high-temperature oil reservoir, and provided microbial resources to genetic engineering strains construction and consolidated bioprocessing.

[Methods] We adopted Hungate anaerobic technique to isolate strain xyl-d from oil reservoir water sample enriched for two years from Shengli Oilfield in China, and we identified strain xyl-d with morphological, physiological, biochemical and phylogenetic analysis. [Results] Strain xyl-d was gram-negative, rod-shaped, spore-forming and strictly anaerobic.

The growth temperature ranged from 30 °C to 85 °C (optimum 65 °C) and the pH ranged from 3.0 to 10.0 (optimum 7.5) and salt concentration was 0% - 4% (optimum at 2.0%). It converted D-xylose into ethanol, acetate, CO₂, trace amount of iso-butanol and propionate. The genomic DNA G + C contents of strain xyl-d was 45.6 mol%. Based on 16S rRNA gene sequence, strain xyl-d was most close to *Thermoanaerobacter wiegeli* DSM10319^T and *Thermoanaerobacter ethanolicus* DSM 2246^T both with the 99.3% similarity. It produced more ethanol and less acetate at initial pH 8.5 than other pH. Ethanol yield was increased significantly with yeast extract, and ethanol became the main end product. In addition, growth of strain xyl-d was inhibited obviously with ethanol concentration more than 7% (V/V). In the optimum growth conditions, xylose degradation rates reached to 91.37%. [Conclusion] Strain xyl-d was thermophilic, high xylose conversion rate, acidotolerant anaerobe. It was a potential bacterium that can be used for consolidated bioprocessing.

Keywords: *Thermoanaerobacter ethanolicus*, ethanol, D-xylose, lignocellulose, consolidated bioprocessing (CBP)

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Key Science Foundation of China (40973059)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-28-85258573; E-mail: zhanghuits@yahoo.com.cn

Received: 3 May 2011 / Revised: 8 June 2011