

一株厌氧嗜热杆菌生长及发酵特性的初步研究

陈盛杰 龚信芳 朱明军*

(华南理工大学生物科学与工程学院 广东 广州 510006)

摘要: 论文对筛选并鉴定为 *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* 菌株的生长、底物利用情况、产物生成以及酒精耐受性进行了研究。结果表明, 该菌在以甘露糖、葡萄糖和木糖为碳源时生长较好, 同时能够较好的利用木聚糖和木薯淀粉; 最适底物浓度为 15 g/L; 不同的葡萄糖: 木糖比例对其生长无显著影响; 能耐受的培养基最高初始酒精浓度为 3% (V/V)。在 5 g/L 的木聚糖、木糖和木薯淀粉培养基中发酵 60 h 后, 产物主要有乙醇、乳酸和乙酸, 乙醇产量分别为 0.824、0.867 和 0.916 g/L。

关键词: 厌氧嗜热杆菌, 木糖, 木聚糖, 淀粉, 酒精发酵

The Growth and Fermentation Characteristics of *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*

CHEN Sheng-Jie GONG Xin-Fang ZHU Ming-Jun*

(School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510006, China)

Abstract: This paper studied on the growth, fermentation characteristics and ethanol tolerance of the strain identified as *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*. The result showed that mannose, glucose and xylose were preferable to other carbon sources for its growth, while xylan and cassava starch could be consumed by the strain. Optimum concentration of substrate was 15 g/L. The ratio of glucose: xylose did not show significant influence on the growth. The highest tolerance on ethanol was 3% (V/V). Cultured on the medium of 5 g/L xylan, xylose and cassava starch for 60 h separately, lactic acid, ethanol and acetic acid were detected, and the ethanol concentration was 0.824, 0.867, 0.916 g/L, respectively.

Keywords: *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*, Xylose, Xylan, Starch, Ethanol fermentation

随着能源及环境问题越来越突出, 开发可再生能源已经成为人类的共识。其中生物质能源的开发越来越受到各国政府的重视。以纤维素和半纤维素为主要成分的植物生物质是地球上含量最丰富的可再生资源, 利用微生物技术对纤维素进行转化生产燃料乙醇具有重要的现实意义和发展前景。如何提

高纤维素和半纤维素酶的转化效率以及转化的六碳糖和五碳糖的发酵效率是提高纤维素燃料乙醇竞争力的关键因素。因此发掘新的纤维素和半纤维素高效降解微生物及五碳糖发酵菌株对于纤维素燃料乙醇的开发具有重要意义^[1-2]。一些嗜热菌能够产生纤维素酶或者半纤维素酶, 能直接利用纤维素或者半

纤维素发酵产生乙醇^[3-4],这一特性如能应用于工业生产,将大大降低纤维素燃料乙醇的成本^[5-6]。

厌氧嗜热杆菌(*Thermoanaerobacterium saccharolyticum*)能够在 30°C–66°C, pH 3.85–6.35 的条件下生长^[7]。能够直接利用半纤维素、木聚糖聚合物以及纤维素物质中所包含的糖类发酵产乙醇^[8]。利用酸解或酶解的方法将木质纤维素转化为还原性糖,会产生大量的五碳糖(木糖、阿拉伯糖)和六碳糖(葡萄糖、半乳糖、甘露糖),其中六碳糖约占 2/3,五碳糖约占 1/3。而在半纤维素的水解产物中木糖约占 90%^[9]。因此,木糖发酵是决定植物纤维资源生产酒精经济可行的关键因素之一^[10]。本论文对 *T. saccharolyticum* 生长及发酵特性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 实验菌种

华南理工大学发酵工程研究室保存的厌氧嗜热杆菌 *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*。

1.2 培养基

1.2.1 主要成分: 培养基 A, B, C, D, E 按 45: 2: 1: 1: 1 (V/V) 比例混合。不需调 pH, 混匀后 pH 为 6.4。种子液使用 5 g/L 的木糖培养基。

1.2.2 培养基 A 成分: 生长所需碳源, 根据实验需要调整。分装 45 mL 于 100 mL 血清瓶中, 抽真空并充氮气, 115°C 灭菌 20 min。

1.2.3 培养基 B 成分^[8]: 柠檬酸三钾盐 50 g/L, 一水柠檬酸 31.25 g/L, Na₂SO₄ 25 g/L, KH₂PO₄ 25 g/L, NaHCO₃ 31 g/L。分装于 100 mL 血清瓶中, 抽真空并充氮气, 115°C 灭菌 20 min。

1.2.4 培养基 C 成分^[8]: NH₄Cl 75 g/L, 尿素 250 g/L, 酵母抽提物 50 g/L。分装于 100 mL 血清瓶中, 抽真空并充氮气, 115°C 灭菌 20 min。在配制摇瓶发酵培养基时, 培养基 C 未加入酵母提取物成分。

1.2.5 培养基 D 成分^[8]: 六水氯化镁 50 g/L, 四水氯化亚铁 5 g/L, 二水氯化钙 10 g/L, 一水半胱氨酸盐酸 50 g/L。分装于 100 mL 血清瓶中, 抽真空并充氮气, 115°C 灭菌 20 min。

1.2.6 培养基 E 成分: 二盐酸吡哆胺 1 g/L, 对氨基苯甲酸 0.2 g/L, D-生物素 0.1 g/L, 维生素 B₁₂ 0.1 g/L, 维生素 B₁ 0.2 g/L。过滤灭菌后, 分装于已抽真空、充氮气并灭过菌的 100 mL 血清瓶中。

1.3 测定方法

1.3.1 细胞生长的测定: 使用美国 Thermo Scientific 公司生产的 Genesys 10 VIS 分光光度计在 600 nm 处测定装有菌液的西林瓶。西林瓶直径为 2 cm。

1.3.2 pH 的测定: 用上海虹益仪器仪表有限公司生产的 PHS-3C 精密 pH 计测定 pH 值。测定范围 0–14, 分辨率为 0.01 pH。

1.3.3 发酵产物及木糖含量的测定: 使用 Waters2695 液相高效色谱仪, 色谱柱为美国 Bio-Rad 公司生产的 HPX-87H 柱, 流动相为用去离子水配制的 0.0025 mol/L 的硫酸溶液, 流速为 0.6 mL/min。

2 结果与讨论

2.1 生长曲线的测定

菌液以 10% 的接种量接种于 50 mL 种子培养基中, 混匀后用无菌注射器抽取 5 mL 于 10 mL 西林瓶中, 放置于 55°C、150 r/min 摇床中培养 72 h, 每隔 2 h 测定 OD₆₀₀, 得到 *T. saccharolyticum* 的生长曲线测定结果, 如图 1 所示。从图 1 的生长曲线可以看出, 延滞期较短, 2–16 h 为 *T. saccharolyticum* 的对数生长期, 比生长速率达到 0.18 /h; 18 h 后进入稳定期。

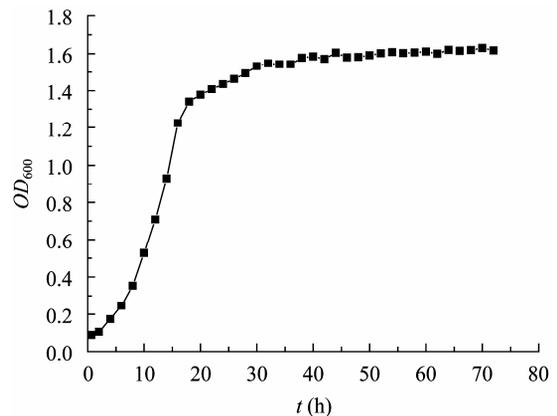


图 1 厌氧嗜热杆菌的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of *T. saccharolyticum*

2.2 不同单一碳源对生长的影响

分别在 15 g/L 的葡萄糖、木糖、半乳糖、甘露糖、纤维二糖、蔗糖、阿拉伯糖、果糖、木薯淀粉培养基中培养 *T. saccharolyticum*。接种方式及培养

条件同 2.1。培养 16 h, 每隔 2 h 测定 OD_{600} 值, 以时间为横坐标, OD_{600} 为纵坐标作图, 结果如图 2 所示。由图 2 可知, 该菌在以甘露糖、葡萄糖和木糖为碳源时生长较好。在以蔗糖和阿拉伯糖单独为碳源培养时, 16 h 内未见生长。在以木薯淀粉为唯一碳源时, 由于木薯淀粉本身在 OD_{600} 处有一定的吸光值, 所以在培养开始时 OD_{600} 值较高; 但由于该菌在生长过程中能分泌淀粉酶, 直接水解利用木薯淀粉, 随着木薯淀粉被水解利用 OD_{600} 值迅速下降(4 h 内从 0.7 下降到 0.3), 说明该菌能够很好的水解木薯淀粉; 随后, 由于菌体增殖使 OD_{600} 值随之升高。

能够直接利用木糖、木薯淀粉和木聚糖(数据没有显示)是该菌的底物利用特色, 具有研究价值。

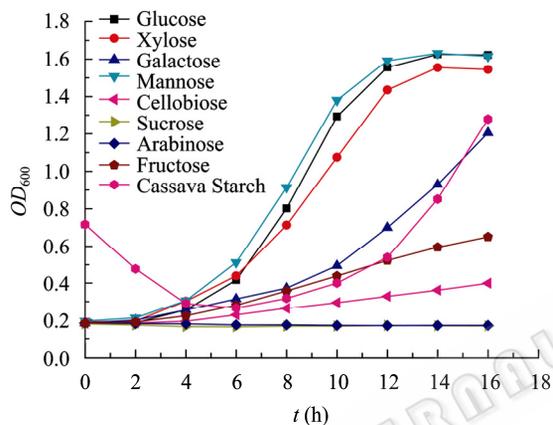


图 2 不同碳源对 *T. saccharolyticum* 生长的影响
Fig. 2 Effects of different carbon sources on the growth of *T. saccharolyticum*

2.3 不同底物浓度下的生长特性

分别在 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50 g/L 的木糖培养基中培养 *T. saccharolyticum* 16 h, 每隔 2 h 测定 OD_{600} , 以时间为横坐标, OD_{600} 值为纵坐标作图, 结果如图 3 所示。由图 3 可知, *T. saccharolyticum* 在以木糖为唯一碳源生长时, 0–15 g/L 浓度范围内, 随着底物浓度的升高, 菌体生长速度逐渐加快; 当底物浓度范围在 15–35 g/L 时, 随着底物浓度的升高, 菌体生长速度逐渐降低; 当木糖浓度大于 35 g/L 时, 生长受到明显的抑制。

2.4 葡萄糖、木糖混合培养下的生长特性

分别在 30 g/L 的葡萄糖、木糖培养基以及葡萄糖: 木糖(W/W)比例为 3:1、2:1、1:1、1:2、1:3, 总糖浓度为 30 g/L 的培养基中培养 *T. saccharolyticum* 72 h, 定期测 OD_{600} 。以 OD_{600} 值为纵坐标,

时间 t 为横坐标作图, 得到图 4。从图 4 可以看出, 不同的葡萄糖: 木糖比例并未对菌体生长造成显著影响。

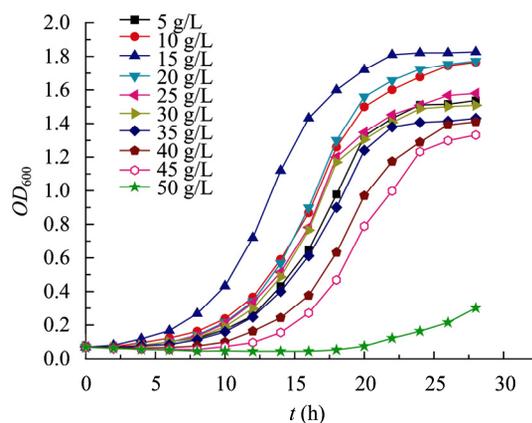


图 3 不同底物浓度对 *T. saccharolyticum* 生长的影响
Fig. 3 Effects of different carbon concentrations on the growth of *T. saccharolyticum*

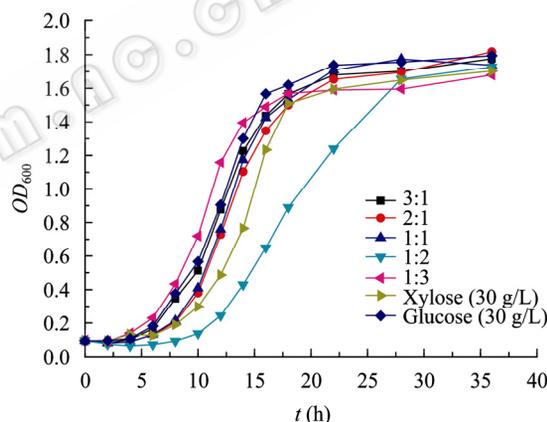


图 4 不同葡萄糖: 木糖比例对 *T. saccharolyticum* 生长的影响

Fig. 4 Effects of different ratios of glucose : xylose on the growth of *T. saccharolyticum*

2.5 不同初始酒精浓度对 *T. saccharolyticum* 生长的影响

分别在不含酒精以及含有 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%、4.0%和 4.5% (V/V)酒精和含有最适生长浓度 15 g/L 的木糖培养基中培养 *T. saccharolyticum*, 在此过程中监测 OD_{600} , 以 OD_{600} 值为纵坐标, 时间为横坐标作图得到图 5。由图 5 可以看出, 随着培养基初始酒精浓度的提高, 菌体生长受到明显的抑制。其中 2.0%和 2.5%酒精浓度下, 菌体直到 36 h 才开始生长, 3%酒精浓度下, 菌体直到 48 h 才开始生长, 而 3.5%、4.0%和 4.5%酒精

浓度下培养的菌体, 直至 72 h 仍未生长。该菌所能耐受的最高酒精浓度为 3%, 因此有必要对其酒精耐受性进行进一步驯化。

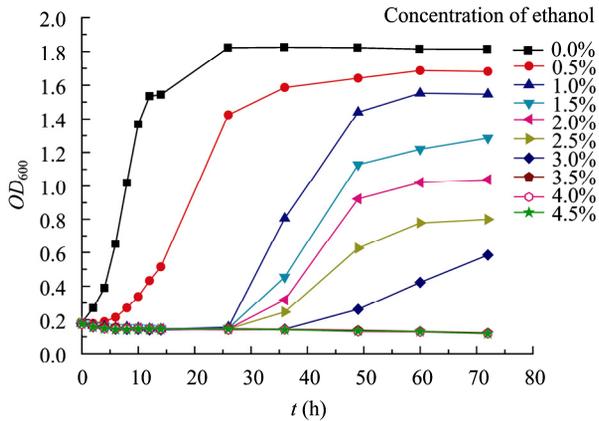


图 5 不同初始酒精浓度对 *T. saccharolyticum* 生长的影响

Fig. 5 Effects of initial ethanol concentrations on the growth of *T. saccharolyticum*

2.6 *T. saccharolyticum* 发酵产物的分析

将 *T. saccharolyticum* 种子液接种至装有 50 mL、5 g/L 的木聚糖、木糖和木薯淀粉培养基中, 接种量 10%。连续培养 60 h, 每 12 h 取样测定样品中的乳酸、乙酸和乙醇的含量以及 OD_{600} , 结果如图 6、7 和 8 所示, 无论以木聚糖、木糖还是木薯淀粉为底物发酵, 乳酸的产量较高, 60 h 后分别达到了 0.920、1.841 和 1.267 g/L。乙醇的产量其次, 分别为 0.824、0.867 和 0.916 g/L, 乙酸的产量最少, 分别为 0.606、0.492 和 0.461 g/L。由于该菌生长代谢时产较多的乳酸和乙酸, 故发酵液的 pH 下降较快。发酵液的初始 pH 均为 6.4, 经过 60 h 发酵后木聚糖、木糖和木薯淀粉培养液的 pH 分别下降为 5.1、4.6 和 4.9。低的 pH 抑制该菌的生长代谢, 不利于底物的进一步利用和代谢产物的积累。同时, 由于大量的底物转化为乳酸和乙酸, 也不利于乙醇的积累。

此外, 由于木聚糖与淀粉本身在 OD_{600} 处有一定的吸光值, 故以这两者为底物培养时, 初始的 OD 值较高, 特别是木聚糖, 达到了 1.774。但该菌生长代谢会分泌出木聚糖酶与淀粉酶, 将这两种底物水解利用。这也就是为什么以这两种底物培养时, 一开始 OD 值会有所下降(由于这一过程相对较短, 图 8 并未显示出这一过程)。此后, 随着菌体浓度的增加, OD 值开始上升, 直至菌体生长的稳定期。

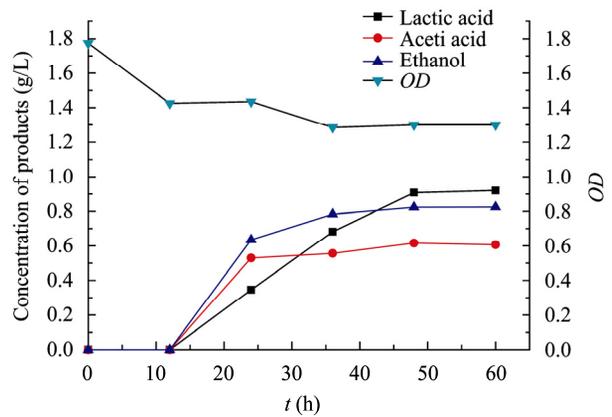


图 6 木聚糖摇瓶发酵

Fig. 6 Fermentation with 5 g/L xylan

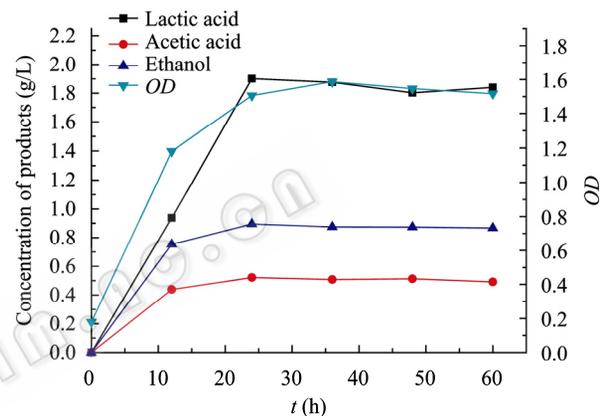


图 7 木糖摇瓶发酵

Fig. 7 Fermentation with 5 g/L xylose

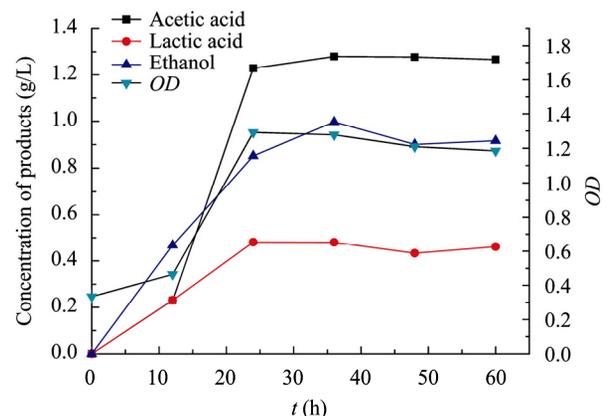


图 8 木薯淀粉摇瓶发酵

Fig. 8 Fermentation with 5 g/L cassava starch

3 结论和展望

(1) *T. saccharolyticum* 底物利用具有广泛性, 能够在以葡萄糖、半乳糖、甘露糖、纤维二糖和果糖为唯一碳源时生长, 特别是能够在以木糖、木薯

淀粉和木聚糖为唯一碳源的培养基中生长是其突出的特点;

(2) *T. saccharolyticum* 在以木糖为底物生长的最适浓度为 15 g/L, 葡萄糖和木糖混合培养时, 葡萄糖与木糖的比例对该菌的生长并无显著影响;

(3) *T. saccharolyticum* 酒精耐受性为 3% (V/V);

(4) *T. saccharolyticum* 以木聚糖, 木糖和木薯淀粉为底物时, 发酵产物主要为乙醇, 乳酸和乙酸, 60 h 后乙醇产量分别为 0.824、0.867 和 0.916 g/L。

(5) 由于该菌在发酵过程中产生乳酸与乙酸, 这样一方面使得发酵过程中发酵液的 pH 不断降低, 另一方面大量的碳源流向了乳酸与乙酸。在未来的工作中可考虑通过基因敲除改变该菌代谢途径以提高某些代谢产物的积累。

(6) 该菌酒精耐受性较低, 仅为 3%, 这是限制其作为工业酒精生产菌的一个重要因素。可考虑通过酒精耐受性驯化的方法, 提高该菌的酒精耐受性。

致谢: 黄泽杰、薛文斌、蔡友华等参加了部分研究和讨论。

参 考 文 献

[1] 邓良伟. 纤维素类物质生产燃料酒精研究进展. 食品与

发酵工业, 1995(5): 69-72.

[2] Lin Yin, Tanaka S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, **69**(6): 627-642.

[3] Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2002(66): 506-577.

[4] Bhat MK, Bhat S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnol Adv*, 1997(15): 583-620.

[5] Lynd LR, van Zyl WH, McBride JE, et al. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Curr Opin Biotechnol*, 2005(16): 577-583.

[6] Demain AL, Newcomb M, Wu JH. Cellulase, clostridia, and ethanol. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2005(69): 124-154.

[7] Shao W, Deblois S, Wiegel J. A high-molecular-weight, cell-associated xylanase isolated from exponentially growing *Thermoanaerobacterium* sp. strain JW/SL-YS485. *Appl Environ Microbiol*, 1995(61): 937-940.

[8] A Joe Shawa, Francis E Jenney Jr, Michael WW Adams, et al. End-product pathways in the xylose fermenting bacterium, *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2008(42): 453-458.

[9] 刘健, 陈洪章, 李佐虎. 木糖发酵生产乙醇的研究. 工业微生物, 2001, **31**(2): 36-41.

[10] Hagerdal H, Jeppsson SH. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. *Enzyme Microb Technol*, 1994, **16**(11): 933-943.

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在实践中具有重要意义学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。