

稀酸水解抑制物对尖孢镰刀菌生长与乙醇发酵的影响*

范金霞¹ 李文哲¹ 郑国香¹ 关正军¹ 姜 成²

(1. 东北农业大学工程学院, 哈尔滨 150030;

2. 哈尔滨工业大学生命科学与技术学院, 哈尔滨 150001)

摘要: 采用摇瓶发酵法,研究了尖孢镰刀菌乙醇发酵对甲酸、乙酸、糠醛、香草醛、邻苯二酚等水解抑制物的耐受能力,结果显示:尖孢镰刀菌乙醇发酵时对各种抑制物的敏感程度顺序为甲酸、乙酸、香草醛、邻苯二酚、糠醛,乙酸在pH值为6.5,而甲酸则在pH值为7.5的培养基中,酸质量浓度均为0.6 g/L,乙醇产量与对照组产量相当。低质量浓度的甲酸和乙酸促进菌体的生长,高质量浓度时则抑制菌体生长,香草醛、邻苯二酚、糠醛对菌体的生长抑制作用强于甲酸和乙酸。尖孢镰刀菌对于单一抑制物的耐受能力强于混合抑制物,当培养液中甲酸、乙酸、香草醛、邻苯二酚质量浓度均为0.05 g/L,乙醇产量为对照组的78%。

关键词: 尖孢镰刀菌 木质纤维素 水解产物 乙醇 抑制作用

中图分类号: TK6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2014)05-0155-05

引言

木质纤维原料作为来源丰富的可再生资源,其能源转化备受关注^[1-4]。预处理是木质纤维素能源转化很重要的工艺步骤,其作用可以去除部分木质素,使木质纤维素结构更松散,提高后续酶水解的效率^[5]。酸化木质纤维素预处理技术是木质纤维素预处理过程中最原始、研究最深入、技术很成熟的方法,其处理效率高,所需时间较短,糖量可达到原料的90%的理论值^[6],适合工业化应用。但在水解过程中有副产物如甲酸、乙酸、糠醛、羟甲基糠醛等形成,其具体产生途径参见文献[7],这些副产物被称为抑制物,这些水解抑制物将对微生物的生长起到抑制作用,影响后续微生物的代谢过程。

尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)不仅可以利用葡萄糖和木糖为底物进行乙醇发酵^[8],同时还可能分泌多种酶类^[9-10],是木质纤维素转化乙醇极具潜力的微生物菌种资源。对于尖孢镰刀菌对水解抑制物的耐受能力研究国内还未见报道,本文以糠醛、有机酸、香草醛、邻苯二酚等物质为抑制物,研究其对尖孢镰刀菌的生长和乙醇发酵的影响,为利用木质纤维水解产物为原料进行乙醇生物转化提供技术参数。

1 材料与方法

1.1 菌种和试剂

尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)cs-28,哈尔滨工业大学生命科学与技术学院微生物实验室分离保存。

浓硫酸、3,5-二硝基水杨酸、糠醛、甲酸、乙酸、香草醛、邻苯二酚、酵母提取物、硫酸镁、硝酸钠、磷酸二氢钾、乙醇、氯化钙等试剂均使用化学分析纯。

1.2 培养基

保存培养基:马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g、蒸馏水 1 000 mL,pH值自然。将马铃薯去皮后,切成1 cm³的小块煮沸30 min,用纱布过滤后,加入葡萄糖和琼脂,并补水至1 000 mL,加热使琼脂溶化后,分装,于1.05 kg/cm²、121℃条件下灭菌20 min。

活化培养基:马铃薯 200 g/L、葡萄糖 20 g/L。

发酵培养基:葡萄糖 30 g/L、酵母提取物 10 g/L、KH₂PO₄ 2 g/L、CaCl₂·2H₂O 0.1 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.2 g/L、NaNO₃ 2 g/L。

1.3 试验方法

1.3.1 菌种活化和扩大培养

将实验室分离保藏的尖孢镰刀菌菌种接种于固体活化培养基中,28℃恒温培养箱中培养3 d,活化备用。

收稿日期:2013-07-29 修回日期:2013-09-15

*“十二五”国家科技支撑计划资助项目(2011BAD15B04)、黑龙江省教育厅科学技术研究资助项目(12531046、12511062)和东北农业大学博士科研启动基金资助项目(2012RCB95)

作者简介:范金霞,讲师,主要从事生物质资源化利用研究,E-mail: fanjinxia781112@126.com

使用打孔器将活化的尖孢镰刀菌平皿进行打孔,取菌片放于无菌液体培养基中 28℃ 恒温摇床培养 2 d,备用。

1.3.2 发酵试验

将扩大培养的菌种按照 10% 的接种量接种于含有不同抑制物的发酵培养基中,28℃ 恒温摇床静止培养,取样分析。每个处理 3 次重复。

1.3.3 分析方法

乙醇产量测定:乙醇含量应用气相色谱(美国 Agilent 公司 4890GC)测定。色谱条件:FID 检测器,温度 300℃;H₂ 40 mL/min;Air 400 mL/min,进样口 200℃;分流进样,进样为 1 μL,分流比为 20:1。Agilent 公司 Inwax 毛细柱,30 m × 0.53 mm × 1 μm, N₂ 做载气,柱流速 4 mL/min,炉温 70℃。

葡萄糖含量测定:采用 DNS 法^[11]。将发酵上清液稀释若干倍备用;5 mL 离心管加入 0.75 mL DNS 溶液,0.25 mL 稀释后糖液,1 mL 水;沸水反应 10 min,冷水冷却 5 min;以 0.75 mL DNS + 1.25 mL 水为对照,将对照及反应产物稀释 6 倍,在 OD₅₃₀ 下测定吸光值。

菌体质量:采用干重法。

1.3.4 数据处理

数据处理和分析采用 Excel 2003 和正交设计助手软件。

2 结果与分析

2.1 不同抑制物对尖孢镰刀菌乙醇产量、糖利用及菌体质量的影响

随着 5 种不同抑制因子质量浓度的加大,乙醇产量均呈下降趋势,但不同的抑制因子对乙醇产量的影响程度有很大差异。从图 1 中可以清晰看到,随着甲酸和乙酸抑制物质量浓度增加,乙醇产量下降迅速,说明甲酸对尖孢镰刀菌乙醇发酵的影响较大,而甲酸与乙酸相比,甲酸抑制作用远远大于乙酸。相对而言,糠醛、香草醛、邻苯二酚对乙醇产量影响较小。

在不同种类、不同质量浓度抑制因子作用下,尖孢镰刀菌对糖的利用率是不同的。由图 2 可以看出,抑制物会造成微生物对糖利用量的降低,表现为含有甲酸和乙酸的培养基中残留的葡萄糖量大于含有香草醛、邻苯二酚、糠醛培养基中葡萄糖量,抑制性要远远强于其他 3 种物质的情况,说明甲酸和乙酸对尖孢镰刀菌的葡萄糖转化率低,抑制作用显著。低质量浓度糠醛、邻苯二酚、香草醛对糖的转化率影响不大。

由图 3 中可知,菌体干物质变化并不完全呈下

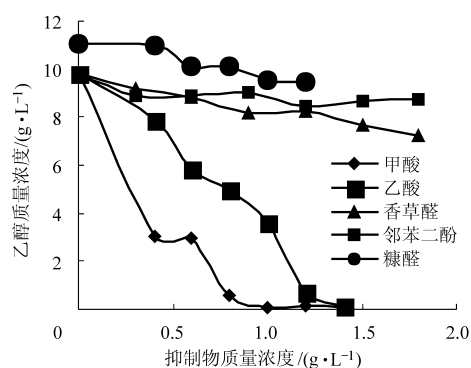


图 1 不同抑制物对尖孢镰刀菌乙醇产量的影响曲线

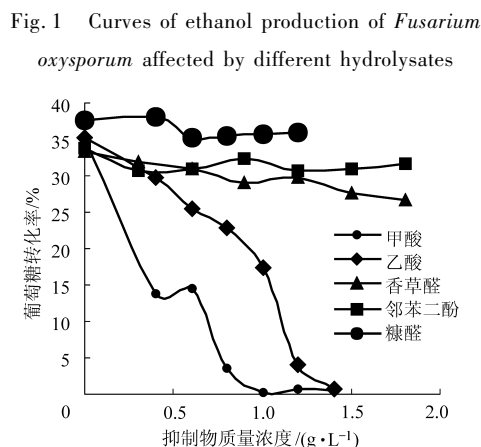


图 2 不同抑制物对尖孢镰刀菌糖转化率的影响曲线

Fig. 2 Curves of glucose conversion of *Fusarium oxysporum* affected by different hydrolyzates

降趋势,甲酸和乙酸在低质量浓度时会促进菌体生长,随着质量浓度的升高对菌体生长抑制作用增强,而香草醛、糠醛和邻苯二酚对菌体生产的抑制作用明显低于甲酸和乙酸。

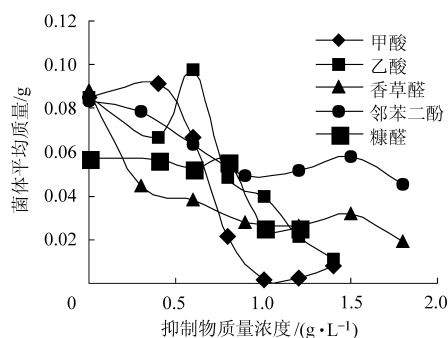


图 3 不同抑制物对尖孢镰刀菌菌体质量的影响曲线

Fig. 3 Curves of dry weight of *Fusarium oxysporum* affected by different hydrolyzates

木质纤维素稀酸水解副产物(抑制物)很多,不同的微生物对抑制物的耐受种类和浓度也不同,运动单胞菌(*Zymomonas mobilis*)的生长受糠醛的影响较大,树干毕赤酵母(*Pichia stipitis*)对 4-羟基苯甲酸较为敏感,而酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)则对糠醛、羧甲基糠醛的耐受能力更强^[12],有机酸对尖孢镰刀菌生长和发酵影响最大,这与 Xiros 等^[13]

的研究结果一致。

2.2 不同 pH 值下甲酸、乙酸抑制作用

由于甲酸、乙酸同时存在酸性和脂肪酸碳骨架，这 2 部分对菌体生长和产乙醇都存在影响，从以上试验可以得到酸有较大抑制作用，用阴离子积聚理论和解偶联理论可以进行一定的解释，但无法排除酸性的抑制作用，需要在不同 pH 值下对菌体进行培养并测定其生长状况及乙醇产量。

随着 pH 值升高，乙醇产量不断增加(图 4、5)，而加入的酸根离子不会有很大差异，因此可以证实酸的抑制作用主要来自于氢离子。

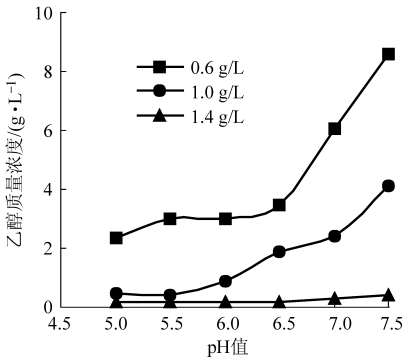


图 4 不同 pH 值下甲酸对乙醇产量的影响曲线
Fig.4 Curves of ethanol production of *Fusarium oxysporum* affected by formic acid under different pH values

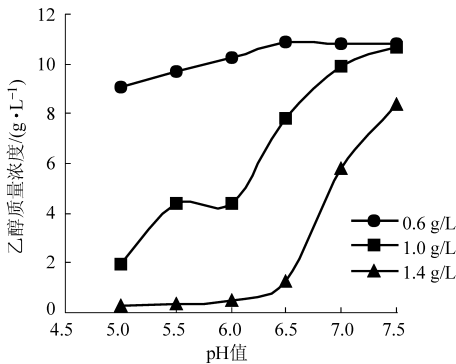


图 5 不同 pH 值乙酸对乙醇产量的影响曲线
Fig.5 Curves of ethanol production of *Fusarium oxysporum* affected by acetic acid under different pH values

而从图 4、5 比较来看，菌体对乙酸耐受性要远远强于甲酸，乙酸 pH 值为 6.5、质量浓度为 0.6 g/L 时，乙醇产量基本达到对照组水平，而甲酸要在 pH 值为 7.5 的培养基中才可使质量浓度为 0.6 g/L 的酸溶液失去效力，甲酸质量浓度为 1.4 g/L 的酸溶液则一直表现很强的抑制作用。

乙酸对菌体生产的抑制作用小于甲酸对菌体的生长作用(图 6、7)，在不同 pH 值条件下甲酸质量浓度为 1.4 g/L 时菌体质量变化较小，说明其对菌体生长抑制作用强。

随着 pH 值的增加，菌体对糖的转化率升高

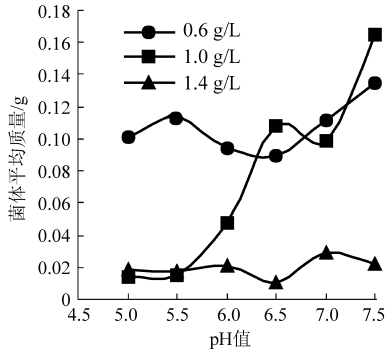


图 6 不同 pH 值甲酸对菌体生长的影响曲线
Fig.6 Curves of growth of *Fusarium oxysporum* affected by formic acid under different pH values

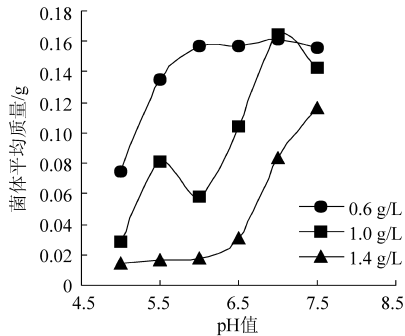


图 7 不同 pH 值乙酸对菌体生长的影响曲线
Fig.7 Curves of growth of *Fusarium oxysporum* affected by acetic acid under different pH values

(图 8、9)。甲酸质量浓度在 0.6 g/L 和 1.0 g/L 时，糖转化率上升，当甲酸质量浓度为 1.4 g/L 时，转化率最低(图 8)。同时乙酸在质量浓度为 1.0 g/L 和 1.4 g/L 时，糖转化率显著上升，质量浓度为 0.6 g/L 时受 pH 值影响较小(图 9)。

乙醇生成受生物量及 ATP 高需求的影响。在一定质量浓度范围内，羧基酸对乙醇生成有促进作用，所消耗的糖更多的转化为乙醇，而对菌体生长的抑制较强，胞内阴离子的积聚及与酸的直接接触也都有可能影响到菌的生长^[14]。本试验也得到相同的结果。

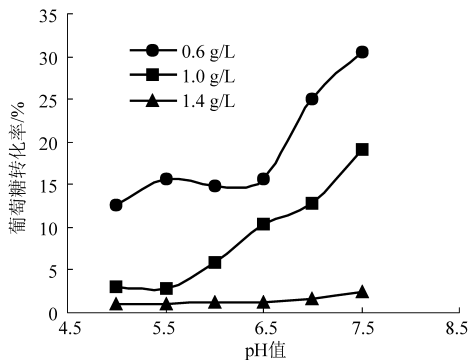


图 8 不同 pH 值下甲酸对糖转化率的影响曲线
Fig.8 Curves of glucose transposition of *Fusarium oxysporum* affected by formic acid under different pH values

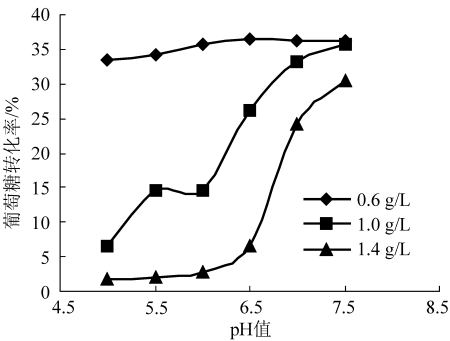


图9 不同 pH 值乙酸对糖转化率的影响曲线

Fig.9 Curves of glucose transportation of *Fusarium oxysporum* affected by acetic acid under different pH values

2.3 尖孢镰刀菌乙醇发酵抑制物耐受浓度分析

木质纤维素稀酸水解物中含有多种抑制物,为研究各因素对尖孢镰刀菌乙醇发酵过程的影响程度及对不同抑制物的耐受质量浓度,采用正交试验设计,得到表1。从极差*R*可以看出4种抑制因子对发酵乙醇产量的影响顺序为:甲酸、乙酸、邻苯二酚、香草醛,耐受质量浓度分别为甲酸0.05 g/L、乙酸0.05 g/L、香草醛0.05 g/L、邻苯二酚0.05 g/L。

表1 正交试验设计及响应值(乙醇产量)

Tab.1 Design of orthogonal test and response values (ethanol yield) g/L

试验 序号	甲酸质量 浓度	乙酸质量 浓度	香草醛 质量浓度	邻苯二酚 质量浓度	乙醇 产量
1	0.05	0.05	0.05	0.05	8.599
2	0.05	0.10	0.10	0.10	6.160
3	0.05	0.15	0.15	0.15	5.180
4	0.10	0.05	0.10	0.15	5.153
5	0.10	0.10	0.15	0.05	5.270
6	0.10	0.15	0.05	0.10	4.366
7	0.15	0.05	0.15	0.10	3.898
8	0.15	0.10	0.05	0.15	4.233
9	0.15	0.15	0.10	0.05	3.614
均值1	6.646	5.883	5.733	5.827	
均值2	4.929	5.221	4.975	4.808	
均值3	3.915	4.387	4.783	4.855	
极差	2.731	1.496	0.95	1.019	

由于在预处理过程中得到的均为多种抑制物的混合液,由于不同抑制物之间的相互作用,会使得在实际应用中适合生长并发酵的质量浓度发生改变。有研究结果显示:多种抑制物混合比单一抑制物对发酵的抑制作用大。正交试验得出尖孢镰刀菌乙醇产量对4种抑制因子的负效应表现大小依次为甲酸、乙酸、邻苯二酚、香草醛,耐受质量浓度均为0.05 g/L,与单一抑制物试验相比,其耐受质量浓度低,这可能是多种抑制物相互作用叠加的结果。为了提高尖孢镰刀菌的水解抑制物的耐受浓度,可应用紫外光(UV)诱变和原生质体融合、亚硝酸处理等技术提高菌种的耐受能力^[15-16],或是利用转基因技术,提高微生物微生物NADPH含量,来提高细胞的生长率和产物产率^[17-18]。从发酵工程的角度看,应用细胞再循环分批发酵(Cell recycle batch fermentation)可降低水解抑制物对细胞生长的影响,提高木质纤维水解产物的乙醇转化率^[19]。

3 结论

- (1)单因子试验证实羧基酸抑制作用大于酚醛类物质,同时得出结论,酚醛类物质在低质量浓度(0.5~1.5 g/L)时对尖孢镰刀菌产乙醇发酵并无明显抑制。
- (2)不同 pH 值试验结果表明,羧基酸的抑制作用不仅来自于阴离子,在低质量浓度时(0.6~1.4 g/L),酸性的抑制作用同样明显。
- (3)正交试验结果表明:对乙醇产量,4种抑制因子的负效应大小依次为甲酸、乙酸、邻苯二酚、香草醛,适宜质量浓度为越低越好,实际操作中可以依据去除成本选取抑制作用不是很强烈的,同时允许抑制物残留一定质量浓度的试验组(质量浓度为0.05 g/L)。
- (4)尖孢镰刀菌是纤维素乙醇转化的优良菌种,可应用现代生物学手段及发酵工程技术提高菌种对抑制物的耐受性,提供其工程应用的潜力。

参 考 文 献

1 袁旭峰,高瑞芳,李培培,等.复合菌系 MC1 预处理对玉米秸秆厌氧发酵产甲烷效率的提高[J].农业工程学报,2011,27(9):266-270.

Yuan Xufeng, Gao Ruifang, Li Peipei, et al. Improvement of anaerobic biogasification efficiency by pretreatment of corn straw with composite microbial system of MC1[J]. Transactions of the CSAE, 2011, 27(9):266-270. (in Chinese)

2 Zhan Hanhui, Huang Lilin. Recent advances in lignocellulosic ethanol[J]. Transactions of the CSAE, 2011, 27(Supp.1):218-222.

3 Ren N Q, Cao G L, Guo W Q, et al. Biological hydrogen production from corn stover by moderately thermophile *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2010, 35(7):2708-2712.

4 Qureshi N, Saha B C, Hector R E, et al. Production of butanol (a biofuel) from agricultural residues: part II—use of corn stover and switchgrass hydrolysates[J]. Biomass Bioenergy, 2010, 34(4):566-571.

5 Sun Y, Cheng J J. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production[J]. Bioresource Technology, 2005, 96(14):1599-1606.

6 田双起,王振宇,左丽丽,等. 木质纤维素预处理方法的最新研究进展[J]. 资源开发与市场,2010, 26(10):903–908.
Tian Shuangqi, Wang Zhenyu, Zuo Lili, et al. Recent advances progress in pretreatment techniques of lignocellulosic [J]. Resource Development & Market, 2010, 26(10): 903–908. (in Chinese)

7 李洪兴, 张笑然, 沈煜, 等. 纤维素乙醇生物加工过程中的抑制物对酿酒酵母的影响及应对措施[J]. 生物工程学报, 2009, 25(9): 1321–1328.
Li Hongxing, Zhang Xiaoran, Shen Yu, et al. Inhibitors and their effects on *Saccharomyces cerevisiae* and relevant countermeasures in bioprocess of ethanol production from lignocellulose—a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2009, 25(9): 1321–1328. (in Chinese)

8 Fan J X, Yang Q, Liu Z H, et al. Heterologous expression of transaldolase gene TAL from *Saccharomyces cerevisiae* in *Fusarium oxysporum* for enhanced bioethanol production[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2011, 164:1023–1036.

9 Esperanza G G, Isabel M, Roncero G. Molecular characterization of a novel endo-β-1,4-xylanase gene from the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum*[J]. Current Genetics, 2001, 40(4):268–275.

10 Christakopoulos P, Goodenough P W, Kekos D, et al. Purification and characterization of an extracellular β-glucosidase with transglycosylation and exo-glucosidase activities from *Fusarium oxysporum*[J]. European Journal of Biochemistry, 1994, 224(2): 379–385.

11 Meinke A, Damude H G, Tomme P, et al. Enhancement of the endo-beta- 1,4-glucanase activity of an exocellobiohydrolase by deletion of a surface loop[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1995, 270(9): 4383–4386.

12 Paulova L, Patakova P, Jaisamut K, et al. Cellulose ethanol influence of inhibitors on production strains[J]. Listy Cukrovarnicke a Reparske, 2012, 128(7–8):229–232.

13 Xiros C, Vafiadi C, Paschos T, et al. Toxicity tolerance of *Fusarium oxysporum* towards inhibitory compounds formed during pretreatment of lignocellulosic materials[J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2011, 86(2): 223–230.

14 Russell J B. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling [J]. The Journal of Applied Bacteriology, 1992, 73(5): 363–370.

15 Hou X R, Yao S. Improved inhibitor tolerance in xylose-fermenting yeast *Spathaspora passalidarum* by mutagenesis and protoplast fusion[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(6): 2591–2601.

16 Zarif B R, Azin M, Amirmozafari N. Increasing the bioethanol yield in the presence of furfural via mutation of a native strain of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. African Journal of Microbiology Research, 2011, 5(6):651–656.

17 Park S E, Koo H M, Park Y K, et al. Expression of aldehyde dehydrogenase 6 reduces inhibitory effect of furan derivatives on cell growth and ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Bioresource Technology, 2011,102(10):6033–6038.

18 Wang X, Miller E N, Yomano L P, et al. Increased furfural tolerance due to overexpression of NADH-dependent oxidoreductase FucO in *Escherichia coli* strains engineered for the production of ethanol and lactate[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(15):5132–5140.

19 Landaeta R, Aroca G, Acevedo F, et al. Adaptation of a flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain to lignocellulosic inhibitors by cell recycle batch fermentation [J]. Applied Energy, 2013, 102: 124–130.

Effects of Hydrolysates from Acid-base Process on the Growth and Ethanol Fermentation of *Fusarium oxysporum*

Fan Jinxia¹ Li Wenzhe¹ Zheng Guoxiang¹ Guan Zhengjun¹ Jiang Cheng²

(1. College of Engineering, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

2. School of Life Science and Technology, Harbin Institute of Technology, Harbin 150001, China)

Abstract: The tolerance of *Fusarium oxysporum* on formic acid, acetic acid, furfural, vanillin and catechol, which are hydrolysis inhibitor, during ethanol fermentation process was investigated by shake flask method. The results showed that the order of sensitivity to various inhibitors for *Fusarium oxysporum* was formic acid, acetic acid, vanillin, catechol and furfural during ethanol fermentation. The production of ethanol was similar with that of the control when the acid concentration was 0.6 g/L at pH value 6.5 of acetic acid and pH value 7.5 of formic acid, respectively. Low concentrations of formic acid and acetic acid promoted cell growth, but high concentrations inhibited cell growth. And the inhibitory effect of vanillin, catechol and furfural on cell growth was stronger than that of the formic acid and acetic acid. The tolerance of *Fusarium oxysporum* for a single inhibitor was stronger than that for mixed inhibitor. The ethanol production was 78% of the control when the concentrations of formic acid, acetic acid, vanillin and catechol were 0.05 g/L, respectively.

Key words: *Fusarium oxysporum* Lignocelluloses Hydrolysates Ethanol Inhibition