

孙曼钰,李栋梁,舒月力,等.尖孢镰刀菌诱导产酶及同步糖化发酵产纤维素乙醇[J].江苏农业科学,2019,47(2):277-281.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.02.067

尖孢镰刀菌诱导产酶及同步糖化发酵产纤维素乙醇

孙曼钰,李栋梁,舒月力,贾士儒,钟 成

(天津科技大学生物工程学院,天津 300457)

摘要:以尖孢镰刀菌为研究对象,探究其诱导产酶及同步糖化发酵产纤维素乙醇的影响。选取不同诱导底物、产酶培养基以及发酵时间,通过测定发酵液中羧甲基纤维素酶活性和木聚糖酶活性,确定最佳诱导产酶条件。最佳诱导产酶培养基:底物 30 g/L,羧甲基纤维素钠(CMC-Na) 5 g/L,蛋白胨 10 g/L,磷酸二氢钾 1 g/L,硫酸镁 0.2 g/L,硫酸铵 3 g/L,pH 值 6.0。最佳诱导产酶的底物为小麦秸秆,发酵 4 d 羧甲基纤维素酶活性达到 12.40 U/mL,木聚糖酶活性达到 930.9 U/mL。尖孢镰刀菌诱导所产纤维素酶具有较好的 pH 值稳定性和温度稳定性,在一定程度上能弥补真菌纤维素酶耐碱性差和细菌纤维素酶活性低的不足。将其作为乙醇发酵菌种进行木质纤维素同步糖化发酵,在 3% 葡聚糖负荷下,96 h 生成乙醇 12.23 g/L,乙醇得率为 71.81%。将其与酿酒酵母混菌同步糖化发酵,48 h 添加木糖利用率最高,96 h 生成乙醇 19.11 g/L,乙醇得率 82.11%。

关键词:尖孢镰刀菌;纤维素酶;同步糖化发酵;乙醇

中图分类号: S188⁺.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)02-0277-05

木质纤维素是地球上最丰富的可再生资源,占地球总生物量的 40% 左右,高效、廉价地利用木质纤维素转化为如燃料乙醇等化工产品,是由石油基向生物基经济社会转型的基础^[1]。木质纤维素的主要成分是纤维素、木质素、半纤维素。在植物组织中木质素与半纤维素以共价键形式结合,并将纤维素分子包埋其中,形成一种坚固的天然屏障^[2]。

纤维素酶是一类能够将纤维素降解为寡糖和纤维二糖并最终水解为葡萄糖的多组分酶系,广泛存在于自然界的生物如真菌、细菌、少数动物体内,不同微生物所产纤维素酶系组成差别较大:木霉纤维素酶的 β -葡萄糖苷酶活性较低,而黑曲霉纤维素酶的外切葡聚糖酶活性较低^[3]。尖孢镰刀菌具

有较高的纤维素酶产量,而且前人对其纤维素分解系统的各个成分有较具体的研究^[4]。同时,尖孢镰刀菌也是一种能够利用己糖和戊糖发酵生产乙醇的丝状真菌。此外,它能够产生大量的纤维素酶和半纤维素酶,使之能够在深层液体或者固态培养条件下附着在木质纤维素底物上。尖孢镰刀菌的强致病性与其所产纤维素酶有密切关系。由于植物病原菌通过渗入外细胞层和侵入不同的植物组织而感染宿主,感染期间病原菌会完全破坏细胞壁结构中纤维素等多聚物,对纤维素降解能力很强,因此对该菌纤维素降解系统的研究最初是基于防治的目的。随着研究的深入,尖孢镰刀菌的高产纤维素酶的性能逐渐被认识,其所产纤维素酶为胞外酶,且酶系完全^[5]。纤维素酶发酵生产过程包括原料预处理、发酵过程 2 个阶段,原料主要包括麸皮、秸秆、酒糟、废纸浆等^[6]。在进行纤维素酶发酵生产时,选择合适的发酵原料很关键。纤维素酶是诱导酶,碳源对菌种的产酶能力影响特别大。同时,培养基和发酵时间对菌种产酶能力也有影响。

同步糖化发酵(simultaneous sacchrification and fermentation,SSF)采用纤维素酶对木质纤维素进行水解,同时加入乙醇发酵菌,使水解与发酵在同一反应器内进行,且酶水

收稿日期:2017-09-26

基金项目:公益性行业(农业)科研专项(编号:201503135-15)。

作者简介:孙曼钰(1993—),女,湖南南县人,硕士研究生,主要从事木质纤维素生物质降解研究。Tel:(022)60601606;E-mail:sunmanyu24@163.com。

通信作者:钟 成,博士,教授,主要从事纤维素的生物合成与降解机理研究。Tel:(022)60601606;E-mail:czhong@tust.edu.cn。

Society of America Journal,2010,74(6):2039-2048.

[26] Dawar S, Wahab S, Tariq M, et al. Application of *Bacillus* species in the control of root rot diseases of crop plants[J]. Archives of Phytopathology and Plant Protection,2010,43(4):412-418.

[27] Jiang Z Q, Guo Y H, Li S M, et al. Evaluation of biocontrol efficiencies of different *Bacillus* preparations and different field application methods against *Phytophthora* bight of bell pepper[J]. Biological Control,2006,36(2):216-223.

[28] 彭 震,王春娟,陈庆河,等.生物肥料“宁盾”对大豆疫霉病的防效及对毛豆的促生作用[J].上海农业学报,2014,30(6):95-98.

[29] 韩 哲,刘守伟,潘 凯,等.不同栽培模式对黄瓜根际土壤酶

活性及细菌群落结构的影响[J].植物营养与肥料学报,2012,18(4):922-931.

[30] 姜 飞,刘业霞,艾希珍,等.嫁接辣椒根际土壤微生物及酶活性与根腐病抗性的关系[J].中国农业科学,2010,43(16):3367-3374.

[31] 李发虎,李 明,刘金泉,等.生物炭对温室黄瓜根际土壤真菌丰度和根系生长的影响[J].农业机械学报,2017,48(4):265-270,341.

[32] Di Pietro A, Gut - Rella M, Pachlatko J P, et al. Role of antibiotics produced by *Chaetomium globosum* in biocontrol of *Pythium ultimum*, a causal agent of damping - off[J]. Phytopathology,1992,82(2):131-135.

解过程中得到的糖类能迅速被微生物利用生产乙醇。由于酶解过程中产生的葡萄糖和纤维二糖会很快积累,会对纤维素酶产生非常显著的终端产物反馈抑制作用,抑制酶解,使得最终的糖的转化率降低。同步糖化发酵可以消除纤维素酶受葡萄糖和纤维二糖的终产物抑制,提高纤维素酶解的效果并能降低酶制剂的用量,具有染菌风险小、转化率高、获得乙醇浓度较高等优点^[7]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料、试剂与仪器 柠条锦鸡儿(以下简称柠条)采自内蒙古凉城县,小麦秸秆采自山东省枣庄市;水稻秸秆采自湖南省永州市。试验地点为天津科技大学生物工程学院,试验时间为 2017 年 3—4 月,主要试剂包括羧甲基纤维素钠(CMC-Na)、蛋白胨、酵母提取物、柠檬酸、硫酸镁、磷酸二氢钾、硫酸铵、氯化钙、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、无水乙醇。主要仪器:微型植物粉碎机(DF-15),购自温岭市林大机械有限公司;立式压力蒸汽灭菌器(LDZX-50KBS),购自上海申安医疗器械厂;循环水式真空泵[SHZ-D(Ⅲ)],购自巩义市予华仪器有限责任公司;水分仪(MJ33),购自瑞士梅特勒-托利多仪器(中国)有限公司;高效液相色谱(1260LC),购自安捷伦科技(中国)有限公司;恒温水浴锅(HH-2),购自常州市凯航仪器有限公司;电热鼓风干燥箱(DH-101),购自天津市中环实验电炉有限公司;超净工作台(VS-1300L-U),购自苏州安泰空气技术有限公司;恒温培养振荡器(ZWYR-D2401),购自上海智城分析仪器制造有限公司;水浴振荡器(HZS-H),购自哈尔滨市东联电子技术开发有限公司;精密电子天平(MS204S),购自瑞士梅特勒-托利多仪器(中国)有限公司;pH 计(Delta 320),购自梅特勒-托利多仪器(中国)有限公司。

1.1.2 菌种与培养基 尖孢镰刀菌菌种由天津科技大学生物工程学院应用微生物与酶工程实验室提供;酵母由笔者所在实验室提供。马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA):马铃薯 200 g/L,葡萄糖 20 g/L,若制固体培养基加琼脂 20 g/L,不调节 pH 值。酵母浸出粉胨葡萄糖培养基(YPD):酵母膏 10 g/L,蛋白胨 20 g/L,葡萄糖 20 g/L,若制固体培养基加琼脂 20 g/L,不调节 pH 值。发酵产酶培养基 A:底物 30 g/L,CMC-Na 5 g/L,蛋白胨 10 g/L,磷酸二氢钾 1 g/L,硫酸镁 0.2 g/L,硫酸铵 3 g/L,pH 值 6.0。发酵产酶培养基 B:底物 40 g/L,磷酸二氢钾 1.0 g/L,氯化钙 0.3 g/L,硫酸镁 0.3 g/L,磷酸氢二铵 10 g/L,磷酸二氢钠 6.94 g/L,磷酸氢二钠 9.52 g/L,pH 值 6.0。

1.2 方法

1.2.1 尖孢镰刀菌产酶培养基的确定 在 PDA 平板上接种菌丝,28 ℃ 培养 4 d,平板中长出的菌丝接种 PDA 培养基中,28 ℃、150 r/min 摇床振荡培养 2 d,得到菌液。取 3 mL 菌液分别转接于发酵产酶培养基 A 和 B,28 ℃、150 r/min 摇床振荡培养。在培养后 3、4、5 d 分别取发酵液 12 000 r/min 离心 20 min,上清即为粗酶液。

1.2.2 尖孢镰刀菌产酶诱导底物的确定 选取 3 种诱导底物,分别为柠条、麦秆和水稻秸秆。以上原料自然风干,剪成

2~3 cm 小段,用植物试验粉碎机粉碎,过 20 mm 筛。用于成分分析的秸秆原料在空气中干燥至水分低于 10%。

在 PDA 平板上接种菌丝,28 ℃ 培养 4 d,平板上长出的菌丝接种于 PDA 培养基中,28 ℃、150 r/min 摇床振荡培养 2 d,得到菌液转接于发酵产酶培养基 A,28 ℃、150 r/min 摇床振荡培养。在培养后 3、4、5 d 分别取发酵液 12 000 r/min 离心 20 min,上清即为粗酶液。

1.2.3 尖孢镰刀菌产酶发酵时间的确定 在 PDA 平板上接种菌丝,28 ℃ 培养 4 d,平板中长出的菌丝接种于 PDA 培养基中,28 ℃、150 r/min 摇床振荡培养 2 d,得到菌液。取 3 mL 菌液转接于发酵产酶培养基 A,28 ℃、150 r/min 摇床振荡培养。在培养后 3、4、5 d 分别取发酵液 12 000 r/min 离心 20 min,上清即为粗酶液。

1.2.4 酶活性的测定 酶活性定义^[8]:在 50 ℃、pH 值 4.8 条件下,1 min 内由 1 mL 酶液催化底物水解生成 1 μg 葡萄糖(木糖)所需的酶量,定义为 1 个酶活性单位,以 U/mL 表示。

CMC-Na 酶活性测定:于试管中加入 2 mL 由 pH 值为 4.8 的柠檬酸缓冲溶液配制的 1% CMC-Na,预热 5 min,再向试管中加入 0.5 mL 粗酶液,对照管中加入底物作空白对照。50 ℃ 水浴 30 min,向试管和对照管中分别加入 3 mL DNS,沸水浴 10 min,迅速冷却至室温,定容至 25 mL,混匀,于 540 nm 下测吸光度。酶活计算公式如下:

$$x = D \times (1/0.5) \times n \times 2.$$

式中: x 为羧甲基纤维素(还原糖)酶活性,U/mL; D 为吸光度在标准曲线上查得的还原糖量,mg;1/0.5 为换算成酶液 1 mL; n 为酶样的稀释倍数;2 为时间换算系数。

木聚糖酶活性测定^[9]:与 CMC-Na 酶活性测定过程基本相似,将底物换成木聚糖,柠檬酸缓冲液换成 pH 值为 4.4 的乙酸-乙酸钠缓冲液。于试管中加入 2 mL 由 pH 值为 5.5 的乙酸-乙酸钠缓冲液配制的 1% 木聚糖,预热 5 min,再向试管中加入 2 mL 经适当稀释的酶液,对照管中加入底物作空白对照。40 ℃ 水浴 30 min,向试管和对照管中分别加入 5 mL DNS,沸水浴 10 min,冰浴 5 min,定容至 25 mL,混匀,于 540 nm 处测吸光度。酶活计算公式如下:

$$x_D = \frac{(D_a - D_b) \times K + C_0}{M \times t} \times 1\,000;$$

$$x' = X_D \times D_i.$$

式中: x_D 为稀释酶液中木聚糖酶的活性, X_D 值应在 0.04~0.10 U/mL 之间; D_a 为酶反应吸光度; D_b 为酶空白样吸光度; K 为标准曲线斜率; C_0 为标准曲线截距; M 为木糖的摩尔质量; t 为酶解反应时间,min;1 000 为转化因子,1 mmol = 1 000 μmol; x' 为试样中木聚糖酶的活力,U/mL; D_i 为试样稀释倍数。

1.2.5 同步糖化发酵 尖孢镰刀菌不仅可以诱导产酶,还可以用来进行木质纤维素同步糖化发酵。将麦秆与 0.5 mol/L NaOH 溶液按料液比 1:20(g:mL)混合,于高压蒸汽灭菌锅中 121 ℃ 预处理 1 h,固体残渣水洗至中性,烘干,粉碎,过 20 mm 筛。将上述经 NaOH 处理后的物料按 30 mg/mL 葡聚糖固体负荷进行同步糖化发酵,反应体积为 100 mL。纤维素酶(celluclast) 1.5 L 和 β-葡萄糖苷酶用量按照 25 FPU/g 葡聚糖加入酶解体系中,木聚糖酶按照 10 mg/g 葡聚糖加入酶

体系中,于 50 ℃、200 r/min 下预酶解 6 h。

将酵母接种的时间定义为同步糖化发酵开始起点,按照 5% 接种量将尖孢镰刀菌种子液接入降解液中,于 35 ℃、150 r/min 下培养 120 h。在接种后 6、12、24、48、72、96、120 h 取样,样品 12 000 r/min 下离心 5 min,取上清,用高效液相色谱法测葡萄糖、木糖和乙醇含量。所使用的色谱柱为 Aminex HPX-87P (Bio-Rad) 有机酸分析柱,5 mmol/L 稀硫酸为流动相,使用前经 0.22 μm 滤膜过滤并超声脱气 30 min。测定时柱温 60 ℃,流速 0.6 mL/min^[10]。

2 结果与分析

2.1 尖孢镰刀菌产酶诱导底物和培养时间的确定

纤维素酶是诱导酶,碳源对菌种的产酶能力影响很大,不同碳源对纤维素酶的合成有不同的诱导作用,一般天然纤维素原料更有利于纤维素酶的合成。选取水稻秸秆、小麦秸秆

和柠条为尖孢镰刀菌诱导底物,分别在发酵后 3、4、5 d 取样测定其羧甲基纤维素(CMC)酶活性和木聚糖酶活性。由图 1 可知,木本植物柠条诱导产酶效果远不如草本植物水稻和小麦秸秆。发酵后 4 d 水稻秸秆和小麦秸秆的 CMC 酶活性是柠条的 10 倍,木聚糖酶活性在 300~931 U/mL 之间,高于柠条,同时也高于其他文献研究。葛春辉等从垃圾堆肥中分离出能用羧甲基纤维素钠为唯一碳源的降解菌,能产生胞外纤维素酶,最佳酶活仅达到 376 U/mL^[11]。这是由于不同植物种类中木质素、纤维素、半纤维素的分布和含量不一样。木本类植物具有较高的纤维素和木质素含量,纤维素以微纤维形式存在,纤维素链之间氢键相互连接^[12]。木质素缠绕在纤维素周围,且与半纤维素成分紧密相连,共同维持着纤维素的完整性及结构的刚性,这种结构阻碍了微生物与纤维素的接触。草本类植物中的半纤维素含量较高^[13],内部纤维素结晶结构相对较疏松,所以诱导产酶效果优于木本植物。

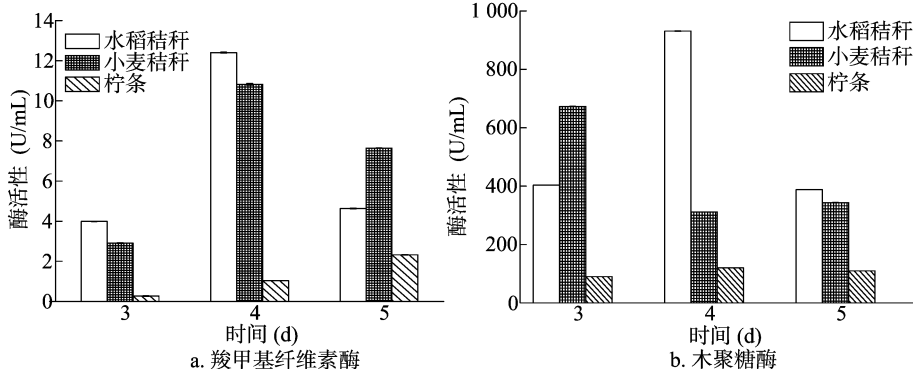


图1 3种底物诱导下尖孢镰刀菌产酶活性情况

对于尖孢镰刀菌产酶而言,无论是 CMC 酶活性还是木聚糖酶活性都是发酵后 4 d 远高于发酵后 3、5 d。

2.2 尖孢镰刀菌产酶培养基的确定

纤维素酶是诱导酶,碳源对菌种的产酶能力影响特别大。同时,培养基和发酵时间的选择对菌种产酶能力也有影响。如图 2 所示,分别选取水稻秸秆和小麦秸秆为底物,选取 A、B、C 3 种不同培养基诱导产酶,在发酵后 4 d 取样测其 CMC 酶和木聚糖酶活性。水稻和小麦秸秆诱导下 A 培养基 CMC

酶活分别为 12.40、10.82 U/mL,木聚糖酶活为 930.92、311.49 U/mL;而 B 培养基中 CMC 酶活为 2.41、3.43 U/mL,木聚糖酶活为 158.86、78.65 U/mL;C 培养基中 CMC 酶活为 6.23、5.64 U/mL,木聚糖酶活为 423.65、145.78 U/mL。本试验所用 3 种培养基所产纤维素酶活都要高于其他文献报道。其中,2 种底物诱导下 A 培养基产酶效果都要优于 B、C 2 种培养基,由于 A 培养基中氮源含量高于 B 种培养基,丰富的氮源有利于尖孢镰刀菌的生长,同时有利于其产酶。

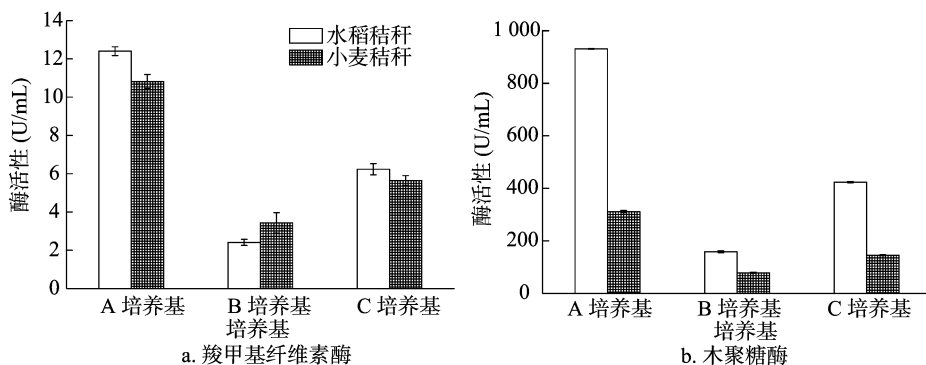


图2 不同培养基诱导下尖孢镰刀菌产酶活性情况

对于同是草本植物的水稻秸秆和小麦秸秆,水稻秸秆诱导产酶效果明显优于小麦秸秆。同时,尖孢镰刀菌诱导产酶具有较好的 pH 值稳定性和温度稳定性,尤其对强碱环境的耐受力在一定情况下弥补了真菌纤维素酶耐碱性差和细菌纤

维素酶活力不足等缺点。因此,该菌有进一步研究的意义。

2.3 尖孢镰刀菌同步糖化发酵

根据再生能源实验室(NREL)2步酸水解法对未处理小麦秸秆和碱处理小麦秸秆进行成分分析,结果表明,纤维素含

量由 32.73% 增加到 62.81%, 半纤维素含量由 22.18% 变为 22.66%。经过 NaOH 预处理后, 小麦秸秆中纤维素和半纤维素的含量明显升高, 木质素含量明显降低, 表明 NaOH 预处理去除了秸秆中的大量木质素, 从而使得纤维素和半纤维素比例相对升高。有效的预处理方式能提高剩余多聚糖的酶可及性及可利用糖的浓度, 从而最终提高乙醇产量^[14]。

图 3-a 为尖孢镰刀菌同步糖化发酵葡萄糖利用情况, 与传统酿酒酵母相比, 0~12 h 内酿酒酵母迅速利用葡萄糖, 12 h 后基本利用完全; 尖孢镰刀菌试验组原料继续酶解, 葡萄糖浓度增加; 12~48 h, 尖孢镰刀菌开始利用葡萄糖, 但是相比于酿酒酵母, 其利用周期较长, 利用速率较慢; 48~96 h 基本趋于平稳。

如图 3-b 所示, 尖孢镰刀菌对于 2 种菌的木糖利用率稍高于酿酒酵母。酿酒酵母基本上不利用木糖, 酿酒酵母作为传统的乙醇发酵菌株具有耐受能力强、不易染菌等优点, 但是天然的酿酒酵母不具有木糖代谢能力, 木糖发酵是利用纤维素类物质生产乙醇的关键技术难点之一^[15]。24~48 h 内尖孢镰刀菌试验组木糖浓度由 12 h 的 12.78 g/L 降低到 6 g/L 左右, 48 h 后基本趋于平稳。但是 2 种菌的木糖利用率都较

低, 五碳糖与六碳糖的共利用是目前同步糖化发酵存在的最大问题。对于木糖的利用, 目前最常见的手段是通过人工构建木糖代谢途径和构建可以利用木糖的基因工程酿酒酵母^[16]。但研究者发现, 即使成功构建木糖代谢途径, 在葡萄糖和木糖共发酵中, 酿酒酵母的木糖利用能力仍然很弱^[17]。

图 3-c 为尖孢镰刀菌同步糖化发酵乙醇生成情况, 酿酒酵母 12 h 内迅速利用葡萄糖生成乙醇, 达 16 g/L 左右, 之后基本趋于平稳; 尖孢镰刀菌生成乙醇周期较长, 12~60 h 内同时利用葡萄糖和木糖, 一部分用于维持菌体自身活力, 另一部分用于产乙醇, 可生产乙醇 12 g/L 左右。范金霞等以尖孢镰刀菌为研究对象, 设置不同比例的葡萄糖木糖混合发酵生产乙醇, 结果表明, 葡萄糖在混合糖中被优先利用^[18]。葡萄糖的存在限制了木糖的利用, 并且当葡萄糖消耗完, 尖孢镰刀菌对木糖的利用周期较长。虽然尖孢镰刀菌用于同步糖化发酵不如传统的酿酒酵母产量高, 但其对木糖的利用以及诱导产酶都具有较大的研究意义。Paschos 等使用预处理小麦秸秆为原料, 由尖孢镰刀菌生产木质纤维素酶液降解, 酿酒酵母 F12 发酵生产燃料乙醇, 减少成本的同时得到较高的乙醇产量^[19]。

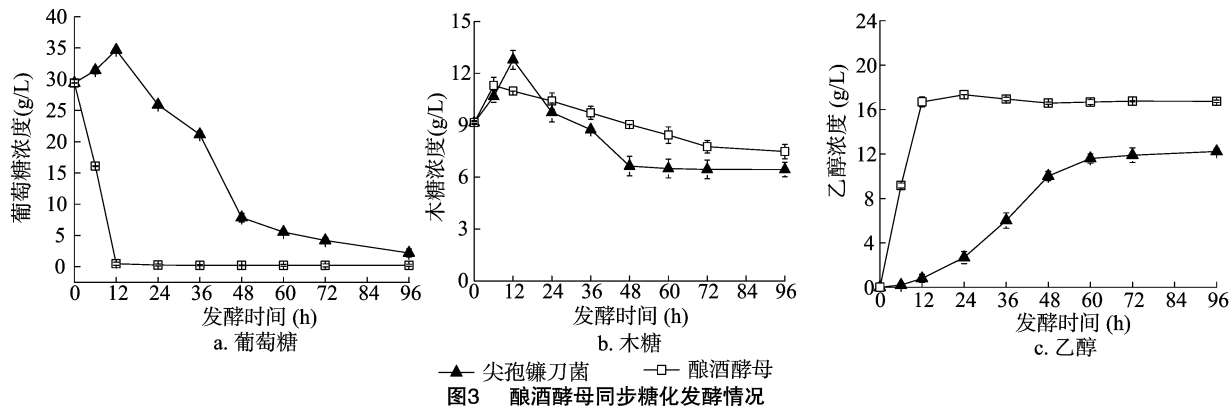


图3 酿酒酵母同步糖化发酵情况

2.4 混菌培养同步糖化发酵

酿酒酵母作为传统的乙醇发酵菌株具有耐受能力强、不易染菌等优点, 但是天然的酿酒酵母不具有木糖代谢能力, 而上述试验证明尖孢镰刀菌能利用少量木糖, 提高木糖利用率和乙醇生成率。所以, 将酿酒酵母和尖孢镰刀菌共培养进行同步糖化发酵。以碱处理小麦秸秆为原料, 在 3% 葡聚糖负荷下进行同步糖化发酵, 在发酵初始阶段接入酿酒酵母, 分别在发酵 24、48、72 h 后接入尖孢镰刀菌, 葡萄糖、木糖和乙醇利用情况如图 4 所示。图 4-a 为葡萄糖利用情况, 3 种情况下葡萄糖利用情况基本一致, 12 h 内酿酒酵母基本上将葡萄糖全部利用完。

对于木糖利用情况如图 4-b 所示, 当葡萄糖存在时, 木糖基本不被利用, 所以 0~24 h 继续酶解, 木糖继续生成; 当葡萄糖消耗完全, 接入尖孢镰刀菌, 木糖开始逐渐被利用, 3 个时间段分别接入尖孢镰刀菌, 木糖都会开始被利用, 其中, 24、48 h 时接入木糖利用率稍高于 72 h 接入, 可能是由于发酵后期发酵液中营养成分越来越少, 菌种活性降低。尖孢镰刀菌的接入为起止时间, 48 h 后基本上不利用木糖。其中, 48 h 添加尖孢镰刀菌试验组木糖利用率最高, 3 组试验中仍有 8 g/L 木糖未被利用。

图 4-c 为乙醇生成情况, 前 24 h 3 组试验乙醇生成趋势基本一致, 基本达到 15 g/L 左右; 24~96 h, 48 h 加入尖孢镰刀菌试验组乙醇继续生成, 96 h 达到 19.11 g/L, 其他 2 组乙醇生成量最终达到 17 g/L 左右。2 种菌混合发酵乙醇浓度 19.11 g/L 高于仅用酿酒酵母进行同步糖化发酵 13.75 g/L。2 种菌分不同时间段添加避免了菌种之间的拮抗作用^[20], 但是由于同步糖化发酵过程会产生一些抑制物如糠醛、甘油等, 这些物质会影响尖孢镰刀菌对木糖的利用, 所以, 木糖的利用仍是木质纤维素同步糖化发酵的一个难题。

3 结论

纤维素酶是诱导酶, 碳源、培养基和发酵时间对菌种的产酶能力影响特别大。本研究对尖孢镰刀菌诱导产酶底物、培养基以及发酵时间进行分析, 确定了水稻秸秆为最佳诱导产酶底物, 最佳诱导产酶培养基为: 底物 30 g/L, CMC-Na 5 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 磷酸二氢钾 1 g/L, 硫酸镁 0.2 g/L, 硫酸铵 3 g/L, pH 值 6.0。在发酵后 4 d 羧甲基纤维素酶活性 12.40 U/mL, 木聚糖酶活性达到 930.92 U/mL。尖孢镰刀菌同样用于木质纤维素的同步糖化发酵产纤维素乙醇, 可以同时利用葡萄糖和木糖, 木糖利用率达到 49.53%, 96 h 生成乙

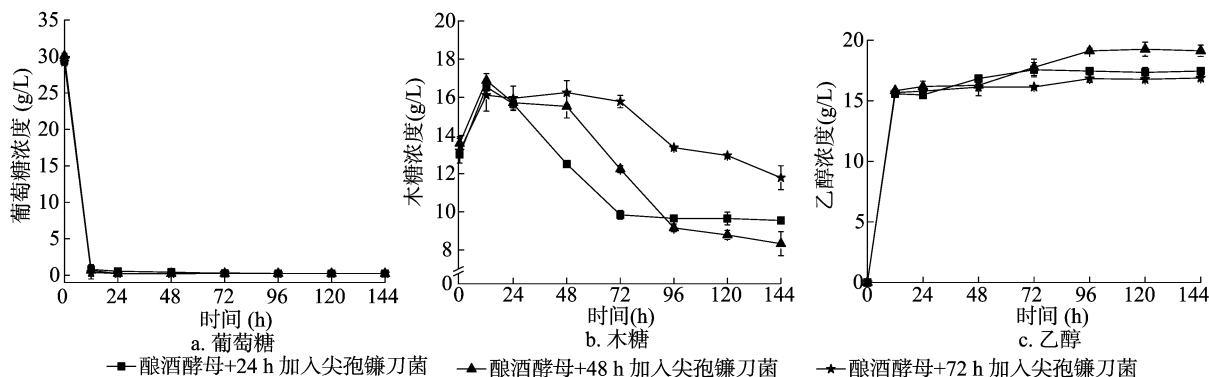


图4 混菌同步糖化发酵情况

醇 12.23 g/L。

尖孢镰刀菌诱导所产纤维素酶具有较好的 pH 值稳定性和温度稳定性,在一定程度上能弥补真菌纤维素酶耐碱性差和细菌纤维素酶活性低的不足。在纤维乙醇研究中,2 种菌分不同时间段添加,避免了菌种之间的拮抗作用,相比于单一菌种发酵,木糖利用率提高,乙醇浓度由 13.75 g/L 提高到 19.11 g/L。尖孢镰刀菌虽利用木糖产乙醇周期较长,但是对于利用纤维素类物质和木糖发酵生产乙醇这一难点的解决以及利用基因工程技术培育新的菌株具有重要的研究意义。

参考文献:

- [1] 徐丽丽,沈煜,鲍晓明. 酿酒酵母纤维素乙醇统合加工(CBP)的策略及研究进展[J]. 生物工程学报,2010,26(7):870-879.
- [2] 王敏,王倩,吴荣荣. 木质纤维素生产燃料乙醇预处理技术研究进展[J]. 衡水学院学报,2010,12(4):106-109.
- [3] 韩寒冰,程水明,刘杰凤,等. 一株产纤维素酶镰刀菌的筛选、鉴定与酶学性质[J]. 现代化工,2014(7):61-65.
- [4] Amore A, Faraco V. Potential of fungi as category I consolidated bioprocessing organisms for cellulosic ethanol production[J]. Renewable & Sustainable Energy Reviews,2012,16(5):3286-3301.
- [5] 王玮. 尖孢镰刀菌高产纤维素酶菌株的筛选鉴定及发酵条件优化[D]. 呼和浩特:内蒙古大学,2011.
- [6] 任恒星,冷云伟,李浩,等. 纤维素酶生产研究进展[J]. 安徽农学通报,2010,16(15):63-64,79.
- [7] 张强. 干法生物炼制技术生产高浓度纤维素乙醇的同步糖化与共发酵研究[D]. 上海:华东理工大学,2017.
- [8] 中华人民共和国国家发展和改革委员会. 纤维素酶制剂:QB 2583—2003[S]. 北京:中国标准出版社,2003.
- [9] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 饲料添加剂木聚糖酶活力的测定 分光光度法:GB/T 23874—2009[S]. 北京:中国标准出版社,2009.
- [10] Qin L, Liu Z H, Li B Z, et al. Mass balance and transformation of corn stover by pretreatment with different dilute organic acids[J]. Bioresource Technology,2012,112:319-326.
- [11] 葛春辉,徐万里,邵华伟,等. 两株产纤维素酶芽孢杆菌的筛选及其纤维素酶部分特性[C]//中国土壤学会. 第十一届全国会员代表大会暨第七届海峡两岸土壤肥科学术交流研讨会,2008:76-80.
- [12] Sticklen M B. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol[J]. Nature Reviews Genetics, 2010,11(4):308.
- [13] Zhao X E, Zhang L H, Liu D H. Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose[J]. Biofuels, Bioproducts and Biorefining,2012,6(4):465-482.
- [14] Brar K K, Kaur S, Chadha B S. A novel staggered hybrid SSF approach for efficient conversion of cellulose/hemicellulosic fractions of corncob into ethanol[J]. Renewable Energy,2016,98:16-22.
- [15] Demeke M M, Dietz H, Li Y Y, et al. Development of a *D*-xylose fermenting and inhibitor tolerant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain with high performance in lignocellulose hydrolysates using metabolic and evolutionary engineering[J]. Biotechnology for Biofuels,2013,6:89.
- [16] Zha J, Shen M H, Hu M L, et al. Enhanced expression of genes involved in initial xylose metabolism and the oxidative pentose phosphate pathway in the improved xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* through evolutionary engineering[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology,2014,41(1):27-39.
- [17] Jin M J, Gunawan C, Balan V, et al. Simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) of AFEXTM pretreated corn stover for ethanol production using commercial enzymes and *Saccharomyces cerevisiae* 424A (LNH-ST)[J]. Bioresource Technology,2012,110:587-594.
- [18] 范金霞,杨谦,陈忠祥,等. 尖孢镰刀菌发酵混合糖产乙醇[J]. 东北林业大学学报,2010,38(9):113-115.
- [19] Paschos T, Xiros C, Christakopoulos P. Ethanol effect on metabolic activity of the ethanogenic fungus *Fusarium oxysporum*[J]. BMC Biotechnology,2015,15:15.
- [20] 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.