

发酵木糖高产乙醇树干毕赤酵母菌株的 Co⁶⁰ 诱变选育 * Breeding of High-yield *Pichia stipitis* Strains by Co⁶⁰ Mutagenesis for Ethanol Fermentation from Xylose

吴仁智^{1,2}, 陈东^{1,2}, 芦志龙¹, 陆琦¹, 张穗生¹, 黄日波^{1,2}

WU Ren-zhi^{1,2}, CHEN Dong^{1,2}, LU Zhi-long¹, LU Qi¹, ZHANG Sui-sheng¹, HUANG Ri-bo^{1,2}

(1. 广西科学院, 非粮生物质酶解国家重点实验室, 国家非粮生物质能源工程技术研究中心, 广西生物质产业化工程院, 广西生物炼制重点实验室, 广西南宁 530007; 2. 广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530004)

(1. Guangxi Academy of Sciences, State Key Laboratory of Non-Food Biomass and Enzyme Technology, National Engineering Research Center for Non-food Biorefinery, Guangxi Biomass Industrialization Engineering Institute, Guangxi Key Laboratory of Biorefinery, Nanning, Guangxi, 530007, China; 2. College of Life Science & Technology of Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China)

摘要:【目的】选育能够利用木糖高产乙醇的酵母菌株。【方法】采用 Co⁶⁰ 诱变树干毕赤酵母 (*Pichia stipitis*), 筛选乙醇产量高的突变菌株, 并对原始菌株、突变菌株的生长发酵特性和两个菌株对高浓度木糖、乙醇的耐受性进行比较。【结果】在 YPX 培养基上筛选获得 1 株能够高效发酵木糖的突变菌株 1K-9。该菌株在 50mL 15% FM 发酵 84h, 发酵液乙醇含量最高达 (51.034 ± 0.112) g/L, 比原始菌株提高 10.05%; 在 500mL 15% FM 发酵 96h, 乙醇含量最高达 (51.390 ± 0.119) g/L; 在 500mL 20% FM 发酵 156h, 乙醇含量最高达 (52.496 ± 0.513) g/L。菌株 1K-9 在 HSM 培养基或含 4%~5% 乙醇的 YPX 培养基中生长良好, 在含 6%~7% 乙醇的 YPX 培养基中生长缓慢。【结论】Co⁶⁰ 诱变对于树干毕赤酵母 (*Pichia stipitis*) 菌株是有效的, 能选育出木糖高产乙醇酵母菌株 1K-9。

关键词: 诱变 树干毕赤酵母 乙醇 木糖 选育

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-9164(2014)01-0047-07

Abstract: 【Objective】 To breed high-yield ethanol strains, which can use xylose in fermentation,

【Method】 xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis* was mutated by Co⁶⁰ rays. The growth and fermentation characteristics of original and mutant strains were analyzed, and their tolerances against relatively high concentrations of xylose and ethanol were compared. 【Result】 The mutant 1K-9, which shows superior xylose utilizing, growing and ethanol producing efficiency was screened on YPX. After fermenting in 15% FM for 84h, the concentration of ethanol reached (51.034 ± 0.112) g/L, increased by 10.05% comparing to the original strain. When amplifying fermentation with strain 1K-9 was conducted in 500mL medium, 15% FM and 20% FM could produce the concentration of ethanol reaching (51.390 ± 0.119) g/L and (52.496 ± 0.513) g/L after fermenting for 96h and 156h, respectively. The mutant strain 1K-9 could grow easily

收稿日期: 2013-07-29

修回日期: 2013-09-30

作者简介: 吴仁智 (1984-), 男, 硕士, 主要从事木质纤维素燃料乙醇等生物质能源方面的研究。

* 国家 973 项目 (2010CB736209, 2012CB723605), 国家 863 项目 (2012AA022106, 2012AA023406, 2012AA022302, 2013AA050701), 国家国际合作项目 (2010DFB63590, 2011DFA61910), 广西科学研究与技术开发计划项目 (桂科合 10100019-21, 桂科攻 1099071, 桂科合 1140010-15), 广西科技创新能力与条件建设计划项目 (桂科能 12237022), 广西自然科学基金项目 (2012GXNSFAA053062), 广西科学院基本科研业务费项目 (10YJ25SW15, 12YJ25SW04), 八桂学者建设工程专项经费项目, 广西生物质产业化工程院建设 (桂科能 12237022), 广西生物炼制重点实验室项目 (13-051-08) 资助。

and quickly in HSM or in YPX containing 4%~5% ethanol, but hard in YPX containing 6%~7% ethanol. **【Conclusion】**Mutagenesis of *Pichia stipitis* can be effectively conducted by Co^{60} rays, through which the mutant strain 1K-9 was breed out and it can yield high production of ethanol from fermenting xylose.

Key words: mutagenesis, *Pichia stipitis*, ethanol, xylose, breeding

【研究意义】木质纤维素类物质是世界上最为丰富的可再生资源。采用微生物发酵将其转化为燃料乙醇可以缓解人类对石油等化石能源的依赖,意义重大。不过,利用木质纤维生产燃料乙醇尚存在一系列技术瓶颈,利用其中的半纤维素组分的主要水解产物木糖发酵生产乙醇为技术难题之一。**【前人研究进展】**对此已经开展了广泛研究,主要有两个方向:(1)利用基因工程技术改造酿酒酵母菌株^[1~4];(2)挖掘和选育能够利用木糖高产乙醇的酵母菌株。目前已知有3种酵母菌能够利用木糖发酵生产乙醇,分别为管囊酵母(*Pachysolen tannophilus*)、树干毕赤酵母(*Pichia stipitis*)和休哈塔假丝酵母(*Candida shehatae*)^[5]。以树干毕赤酵母利用木糖发酵产乙醇的能力最强^[6,7]。已经有学者利用该菌种开展了各种木质纤维材料的乙醇发酵研究^[8~12],但是该菌种木糖乙醇发酵的醪液乙醇含量仅达到47g/L左右^[7,13],利用麦秆半纤维素水解液发酵生产乙醇的转化率只有理论值的80%^[14],仍未能达到产业化的要求。**【本研究切入点】**利用诱变育种的办法来提高毕赤酵母菌株的木糖乙醇发酵性能仍不失为一种可行的办法,现已有一些报道,如Grabek等^[15]采用紫外线诱变选育树干毕赤酵母和多形汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*)菌株,Watanabe等^[16]采用紫外线诱变选育树干毕赤酵母菌株NBRC1687,任佳等人^[17]采用 Co^{60} 诱变选育管囊酵母发酵木糖产乙醇。采用 Co^{60} 诱变方法选育树干毕赤酵母菌株国内外至今未见报道。**【拟解决的关键问题】**为了选育能够利用木糖高产乙醇的酵母菌株,本文采用 Co^{60} 诱变方法选育树干毕赤酵母菌株,获得了较好的结果,选育的1K-9菌株其木糖乙醇发酵醪液乙醇含量最高达(52.496±0.513)g/L。

1 材料与amp;方法

1.1 菌种和培养基

菌种为树干毕赤酵母1960菌株,购自中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC)。

培养基有YPX培养基、发酵培养基及耐高糖培养基(HSM)。YPX培养基含木糖2%,蛋白胨2%,酵母粉1%,121℃灭菌20min,自然pH值,固体培养基添加2%的琼脂。发酵培养基为15%FM和20%

FM。15%FM含木糖15%,其余与YPX培养基相同;20%FM含木糖20%,其余与YPX培养基相同。耐高糖培养基含木糖30%,其余与YPX培养基相同。

1.2 菌株选育

Co⁶⁰诱变:将活化的菌株接种于YPX培养基,培养至对数期,取菌液12000r/min离心5min,用无菌生理盐水洗涤3次,收集菌体,悬浮在生理盐水中,控制菌数约为10⁸个/mL,以不同的剂量 Co^{60} 对菌体细胞进行诱变。 Co^{60} 照射在广西辐射照射中心进行。

菌株筛选:将经 Co^{60} 诱变的菌液稀释至10⁻⁵后涂板接种于YPX平板培养基,30℃培养3d,挑单菌落接种于15%FM培养基,30℃,130r/min培养72h,取样测定培养液中的乙醇含量,筛选乙醇产量高的菌株。

菌株纯化:将筛选得到的酵母菌株在YPD平板划线,连续纯化3代,得到纯化菌株,于25%甘油-80℃保存^[18]。

1.3 菌株活化

将甘油保存的菌株在实验前接种于YPX培养基,30℃,180r/min培养过夜,再转接1次,同条件培养至菌数约2×10⁸个/mL,4℃下保存,2d内使用。

1.4 菌株生长曲线测定

将活化的菌株用YPX培养基于30℃,180r/min培养至对数期(菌数约2×10⁸个/mL),接种于YPX培养基,接种量1%,定时取样测定OD₆₀₀,以YPX培养基做空白。

1.5 木糖乙醇发酵试验

将活化的菌株接种于FM培养基,30℃,130r/min下进行木糖乙醇发酵120h,定时抽样检测乙醇含量、残留木糖含量、菌体生物量和pH值等指标,按下列公式计算发酵的糖醇转化率、发酵效率和乙醇产率。糖醇转化率=[最终醪液乙醇含量(g/L)/发酵初始醪液木糖含量(g/L)]×100%;发酵效率=[糖醇转化率/0.46]×100%;乙醇产率=最终醪液乙醇含量(g/L)/发酵时间(h)。进行扩大化发酵:接种量10%,500mL装液量。

1.6 菌株遗传稳定性检验

将选育的高产菌株活化后接种于YPX培养基培养至对数期,再以1%的接种量转接YPX培养基,

30℃, 180r/min 下进行传代培养, 每天 1 代, 培养至 15 代。取 0 代和 15 代菌株进行木糖乙醇发酵, 观察菌株的遗传稳定性。

1.7 菌株耐受性试验

将菌株活化后培养至对数期, 转接 HSM 培养基和含不同乙醇的 YPX 培养基, 30℃, 180r/min 下培养, 定时取样检测菌液的 OD_{600} , 考察菌株对高浓度木糖、乙醇的耐受性。

1.8 乙醇含量测定

用气相色谱法测定乙醇含量, 以乙腈为内标, 具体参照文献[19]。

1.9 木糖含量、菌体生物量及 pH 值测定

木糖含量测定: 取培养基或发酵液 12000r/min 离心 5min, 取上清稀释后吸取 100 μ L, 用 DNS 法测定。DNS 法测定按美国能源部的方法^[20]和 Ghose^[21]方法结合进行。

菌体生物量测定: 按文献[22]进行, 略作修改。取 2mL 发酵液于已恒重的 EP 管中, 12000r/min 离心 5min, 用无菌水洗 2 次, 弃上清, 80℃ 下干燥至恒重, 称量、计算菌体的生物量。

发酵液 pH 值用 pH 计测定, 校正为 25℃ 的 pH 值。

2 结果与分析

2.1 菌株选育

采用 9 个梯度剂量的 Co^{60} 对毕赤酵母 1960 菌株进行诱变, 挑选 100 个不同剂量诱变的菌落进行 72h 木糖乙醇发酵, 通过初筛和复筛, 发现 8 个发酵管的乙醇产量显著高于对照菌株, 最高为 (51.034 \pm 0.112)g/L (表 1, 表 2), 对该发酵管的菌株进一步分离纯化, 得到 1 株能够利用木糖高产乙醇的树干毕赤酵母菌株, 命名为 1K-9。此菌株乙醇含量比原始菌株提高了 10.05%, 而 Watanabe 等^[16]采用紫外线诱变选育树干毕赤酵母菌株 NBRC1687, 突变菌株 PXF58 利用 11.4% 木糖发酵酒度达到 4.3%, 比原始菌株 (酒度 3.1%) 提高了 38.71%, 由此看出紫外线诱变提高幅度比 Co^{60} 理想。 Co^{60} 诱变毕赤酵母造成染色体上的 DNA 片段发生碱基突变, 产生的结果有 3 种可能: 正突变、负突变 (本研究也筛选到酒度下降的菌株, 数据未列出) 以及无义突变。正负突变所造成的碱基变化应该与木糖乙醇代谢途径中关键的代谢途径有关, 此途径中关键的代谢途径有: ①木糖通过木糖还原酶 (XR) 催化生成木糖醇; ②木糖醇经过木糖醇脱氢酶 (XDH) 催化生成木酮糖^[23]。为此, 我们推测正突变菌株 1K-9 的木糖还原酶和木糖醇

脱氢酶都比原始菌株的强, 尤其是木糖醇脱氢酶, 也就是说木糖醇脱氢酶/木糖还原酶的值更高, 从而将更多的木糖醇转化为木酮糖, 减少木糖醇的积累, 更有利于下游代谢途径——戊糖磷酸途径 (PPP) 的进行, 从而生成更多的乙醇。张凌燕等^[24,25]通过过量表达木糖醇脱氢酶基因提高了乙醇产量。当然, 突变子乙醇产量提高有诸多原因, 仍有待于进一步研究。

表 1 Co^{60} 诱变初筛结果

Table 1 The results of the first screening of Co^{60} mutation

菌株	乙醇含量
Strains	Concentration of ethanol (g/L)
1960	48.190
1K-9	55.142
0.4K-5	50.560
0.6K-10	56.248
1K-1	54.194
0.4K-6	58.855
1K-5	53.799
1K-8	56.090
0.4K-4	50.797

表 2 Co^{60} 突变株复筛结果

Table 2 The results of repeat screening of Co^{60} mutants

菌株	乙醇含量	乙醇含量提高
Strains	Concentration of ethanol (g/L)	Concentration of ethanol increased by (%)
1960	46.373 \pm 0.223	—
1K-9	51.034 \pm 0.112	10.05
0.4K-5	50.402 \pm 0.237	8.69
0.6K-10	49.059 \pm 0.435	5.79
1K-1	49.296 \pm 0.198	6.30
0.4K-6	48.032 \pm 0.553	3.58
1K-5	49.217 \pm 0.316	6.13
1K-8	48.585 \pm 0.119	4.77
0.4K-4	48.585 \pm 0.593	4.77

* 二次试验的平均值和标准差。Average and standard deviation of duplicate duplication.

2.2 菌株生长速率及遗传稳定性

2.2.1 菌株生长速率

在相同条件下培养, 突变菌株 1K-9 与原始菌株 1960 在 YPX 培养基中的生长情况差别不大, 从接种开始就能迅速增长, 突变株增殖速度稍微快一些, 约 24h 两者均进入平稳期 (图 1)。

2.2.2 菌株遗传稳定性

考察高产菌株的遗传稳定性, 结果 (表 3) 表明, 15 代菌株发酵 84h, 菌株 1K-9 乙醇含量达到最高值 (50.916 \pm 0.059)g/L, 糖醇转化率为 0.339g/g, 占理论值的 73.70%, 乙醇产率为 0.606 g/(L·h), 残留木糖为 (1.304 \pm 0.144)g/L, 木糖利用率为 99.13%, 而原始菌株 1960 的相应为 (46.057 \pm 0.670)g/L, 0.307 g/g, 66.74%, 0.548 g/(L·h), (2.240 \pm 0.517)g/L 和 98.51%。由此可以看出, 菌株 1K-9 具有较稳定产乙醇的遗传特性。

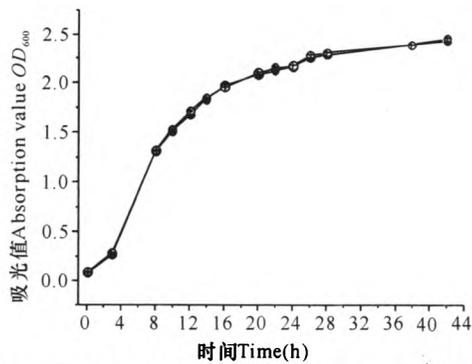


图1 原始菌株与突变菌株在 YPX 培养基的生长曲线比较(二次试验的平均值和标准差)

Fig.1 Comparison of the growth curves of the original strain and mutant strain in YPX(Average and standard deviation of duplication)

●:1960,○:1K-9.

表3 遗传稳定性实验*

Table 3 The stable experiment of the Co⁶⁰ genetic attributes

菌株 Strains	乙醇含量 Ethanol concentration(g/L)	
	0代	15代
	0 generation	15 generation
1960	46.373±0.223	46.057±0.670
1K-9	51.034±0.112	50.916±0.059

* 二次试验的平均值和标准差。Average and standard deviation of duplication.

2.3 菌株木糖乙醇发酵特性

2.3.1 突变菌株与原始菌株发酵特性比较

将活化的菌株 1K-9 接种 15% FM 培养基进行木糖乙醇发酵,并以出发菌株 1960 为对照。发酵 84h,突变株和原始菌株的乙醇含量(图 2)和生物量(图 3)均达到最高值。突变株的乙醇含量高于原始菌株,而生物量前者明显低于后者,这是由于后者将木糖更多消耗在细胞增殖上。突变株木糖消耗速率更快一些(图 4),且发酵后期突变株的 pH 值较原始的高(图 5),对于发酵所带来的废水处理更为有利。

2.3.2 突变菌株扩大化发酵

将筛选出的菌株 1K-9 经 1L 三角瓶进行扩大化培养发酵从而检验发酵特性。在 15% FM 中,发酵 84h 时发酵液乙醇含量达(49.375±0.316)g/L,发酵 96h 时乙醇产量达到最高值(51.390±0.119)g/L(图 6),相比复筛时的 50mL 装液量的乙醇含量(51.034g/L±0.112g/L)稍有提高,但是发酵时间延长了 12h。此时糖醇转化率提高到 0.343g/g,占理论值的 74.57%,乙醇产率下降为 0.535 g/(L·h),残留木糖增加至(18.809±0.072)g/L,木糖利用率下降至 87.46%,120h 发酵结束时木糖仍有(11.945±0.524)g/L 残留,此时木糖利用率为 92.04%。生物量在发酵 48h 时达到最大值(14.225±0.175)g/L,随着发酵时间的延长生物量在不断下降,发酵 96h 下

降到最低值(8.875±0.025)g/L,往后缓慢增长,基本持平。pH 值随着发酵进行不断下降,可能是产乙醇的同时产 CO₂、产乙酸所致,发酵 94h 时发酵液 pH 值为 4.92。

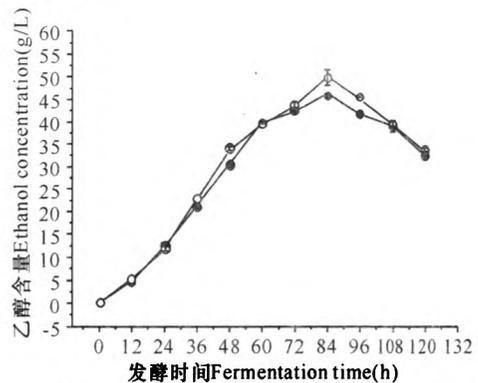


图2 突变菌株与原始菌株乙醇含量比较(二次试验的平均值和标准差)

Fig.2 Comparison of the ethanol concentration of the original strain and mutant strain in 15% YPX(Average and standard deviation of duplication)

●:1960,○:1K-9.

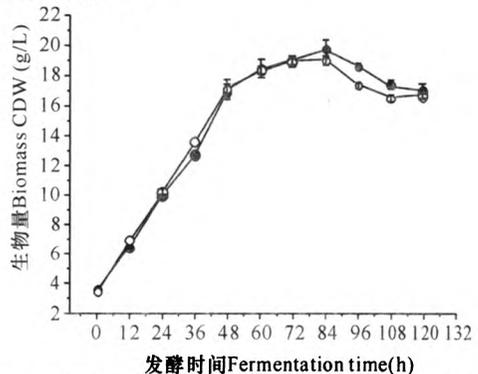


图3 突变菌株与原始菌株生物量比较(二次试验的平均值和标准差)

Fig.3 Comparison of the biomass of the original strain and mutant strain in 15% YPX(Average and standard deviation of duplication)

●:1960,○:1K-9.

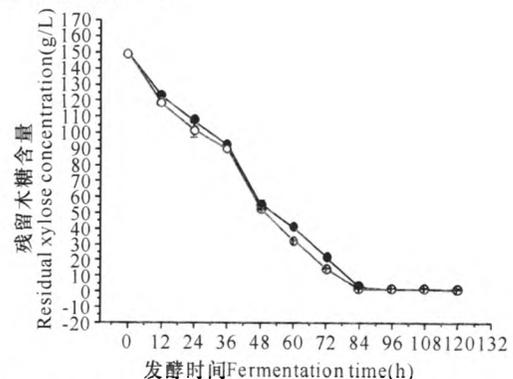


图4 突变菌株与原始菌株残留木糖比较(二次试验的平均值和标准差)

Fig.4 Comparison of the residual xylose of the original strain and mutant strain in 15% YPX(Average and standard deviation of duplication)

●:1960,○:1K-9.

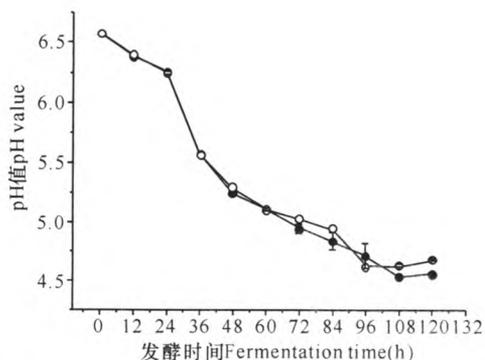


图5 突变菌株与原始菌株 pH 值比较(二次试验的平均值和标准差)

Fig. 5 Comparison of the pH value of the original strain and mutant strain in 15% YPX (Average and standard deviation of duplication)

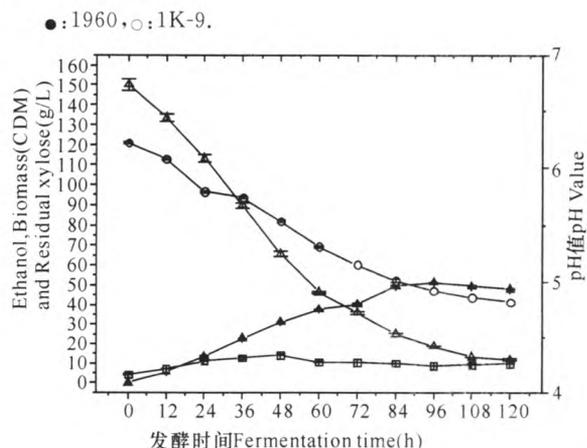


图6 500mL 15%FM 对突变菌株 1K-9 发酵的影响(二次试验的平均值和标准差)

Fig. 6 Effects of 500mL 15% FM on fermentation of mutant strain 1K-9 (Average and standard deviation of duplication)

▲:乙醇, □:生物量, ●:残留木糖, △:pH 值。

▲: Ethanol, □: Biomass (CDW), ●: Residual xylose, △: pH value.

另外,利用 20%FM 发酵培养基,在相同条件下进行发酵。相比 150g/L 木糖的发酵情况,当木糖增加至 200g/L 时,细胞生长较为迅速,发酵 48h 时生物量也达到最高值,为(17.150±0.250)g/L,此后不断下降。而乙醇含量不断增长,发酵 96h 达到(46.373±0.237)g/L,发酵 156h 达到最高值(52.496±0.513)g/L,糖醇转化率为 0.262g/g,占理论值的 56.96%,乙醇产率为 0.337g/(L·h),残留木糖为(37.321±0.977)g/L,木糖利用率为 81.34%,此时生物量为(10.057±0.025)g/L。同样的,随着发酵的进行 pH 值也在不断下降,初始时 pH 值为 6.30,发酵 96h pH 值 5.00,发酵 132h pH 值下降到最低值 4.77,此后缓慢增加,发酵 156h pH 值增为 4.84,180h 发酵结束时 pH 值为 4.87(图 7),与 15%

FM 扩大化发酵结束的 pH 值类似都接近 5.0。由此可知,利用高浓度的木糖进行发酵,其发酵周期大大变长,乙醇产率不高,糖利用率也不高,可以考虑进行分批补料发酵。目前,利用木糖发酵产乙醇含量较高的菌种为拟青霉(*Paecilomyces* sp.)NF1,其分别利用 150g/L、200g/L 的木糖,乙醇含量分别达到 59.7g/L 和 73.5g/L^[26],糖醇转化率分别为 0.398g/g 和 0.368g/g,但是发酵周期过长,各需要 12d 和 13d,乙醇产率分别为 0.207 g/(L·h) 和 0.236 g/(L·h)。与之相比较,菌株 1K-9 更为优良。本研究所选育的菌株 1K-9 发酵木糖的乙醇含量在国内同类研究中处于前列水平。

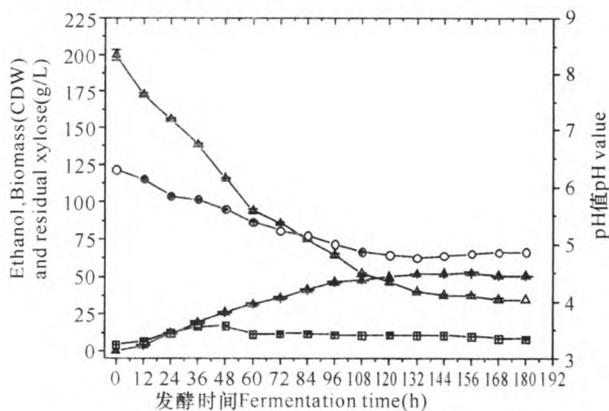


图7 500mL 20%FM 对突变菌株 1K-9 发酵的影响(二次试验的平均值和标准差)

Fig. 7 Effects of 500mL 20% FM on fermentation of mutant strain 1K-9 (Average and standard deviation of duplication)

▲:乙醇, □:生物量, ●:残留木糖, △:pH 值。

▲: Ethanol, □: Biomass (CDW), ●: Residual xylose, △: pH value.

2.4 菌株耐受性

2.4.1 高木糖耐受性

将突变菌株 1K-9 与原始菌株 1960 在 YPX 培养基和耐高糖培养基培养。300g/L 的木糖均对两个菌株的生长存在一定的抑制作用。在 YPX 培养基培养 24h 左右,两者达到平稳期;而在耐高糖培养基中培养,两者达到平稳期需要培养 72h(数据未列出)。突变株高木糖耐受性比原始菌株稍好一些,但相差不大(图 8)。

2.4.2 乙醇耐受性

培养 48h 后,突变菌株和原始菌株乙醇耐受性结果见图 9。在低浓度乙醇(4%~5%)中细胞均能增殖,尤其是在含 4%乙醇的培养基中,约 60h 就能达到平稳期,而在含 5%乙醇的培养基中,酵母细胞存在一个约 60h 的适应期,过了此适应期,细胞开始快速增殖,但是突变菌株增殖速度稍快一些,144h 左右

两者均达到平稳期;当乙醇含量达到 6% 以上时,突变菌株和原始菌株均生长缓慢(数据未列出)。这两个菌株乙醇耐受性与 PET41^[16] 类似,都在 5% 左右。

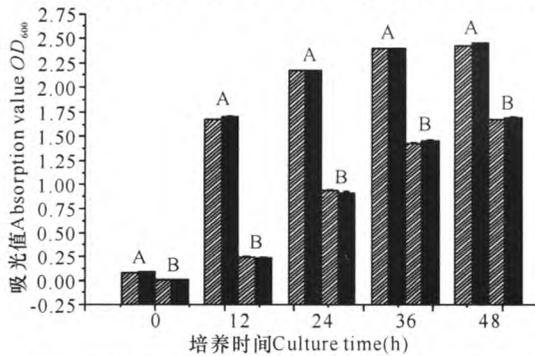


图 8 原始菌株与突变菌株在 YPX 培养基或 HSM 培养基的生长情况比较(二次试验的平均值和标准差)

Fig. 8 Comparison of the growth of the original strain and mutant strain in YPX or HSM (Average and standard deviation of duplication)

A: YPX, B: HSM; ▨: 1960, ■: 1K-9.

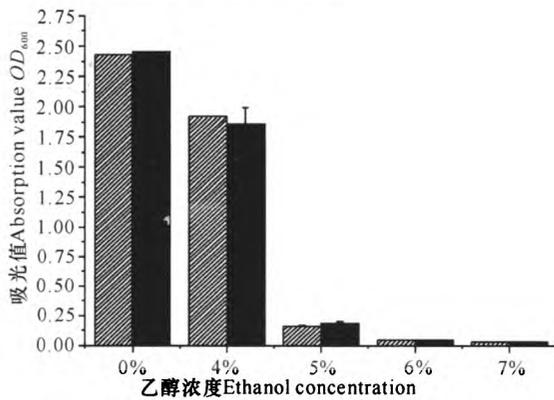


图 9 突变菌株与原始菌株在不同乙醇含量的 YPX 培养基中的生长情况比较(二次试验的平均值和标准差)

Fig. 9 Comparison of the growth of the original strain and mutant strain culturing in YPX including different ethanol content after 48 h (Average and standard deviation of duplication)

▨: 1960, ■: 1K-9.

3 结论

本研究通过 Co⁶⁰ 诱变树干毕赤酵母以期获得较为优良的菌株。通过多批次筛选,获得 1 株较为优良的菌株 1K-9,经 15% FM 发酵 84h,发酵液乙醇含量达到(51.034±0.112)g/L,与原始菌株相比,提高了 10.05%,糖醇转化率为 0.340g/g,占理论值的 73.91%,乙醇产率为 0.608g/(L·h),残留木糖为(0.980±0.017)g/L,木糖利用率达到 99.35%,而且发酵性能稳定。通过采用 500mL 装液量分别以 15% FM 和 20% FM 进行扩大化发酵,在 15% FM 发酵 96h,发酵液中乙醇含量达到最高值(51.390±

0.119)g/L,与 50mL 装液量比较,糖醇转化率提高到 0.343g/g,占理论值的 74.57%,但是发酵时间延长了 12h,乙醇产率下降至 0.535g/(L·h),残留木糖增加至(18.809±0.072)g/L,木糖利用率下降至 87.46%,120h 发酵结束时木糖仍有(11.945±0.524)g/L 残留,此时木糖利用率为 92.04%;而在 20% FM 须发酵 156h 乙醇含量才达到最高值(52.496±0.513)g/L,糖醇转化率为 0.262g/g,占理论值的 56.96%,乙醇产率为 0.337g/(L·h),残留木糖为(37.321±0.977)g/L,木糖利用率为 81.34%。高浓度糖发酵由于渗透压过高,影响乙醇的产生从而造成发酵周期变长,乙醇产率低,可以考虑分批补料发酵。此外,菌株 1K-9 在含 300g/L 木糖的培养基和含 5% 乙醇的 YPX 培养基中均生长良好,但是乙醇浓度达到 6% 时,生长缓慢。此菌株与原始菌株相比,发酵液中乙醇含量虽提高到 51 g/L,但其糖醇转化率不高,仅占理论值的 73.91%,乙醇产率也不高,离商业化生产燃料乙醇仍有一定距离。

参考文献:

- [1] 王靖,安明泉. 木糖发酵菌种研究进展[J]. 化学与生物工程,2007,24(11):1-4.
Wang J, An M Q. Research progress in microorganisms of fermenting xylose[J]. Chemistry and Bioengineering, 2007,24(11):1-4.
- [2] Zhang W, Geng A L. Improved ethanol production by a xylose-fermenting recombinant yeast strain constructed through a modified genome shuffling method[J]. Biotechnology for Biofuels, 2012, 5:46.
- [3] Kim S R, Skerker J M, Kang W, et al. Rational and evolutionary engineering approaches uncover a small set of genetic changes efficient for rapid xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Plos One, 2013, 8(2): e57048.
- [4] 王青艳,杨登峰,孙靓,等. 酿酒酵母中的嗜热细菌木糖异构酶活性表达及木糖代谢研究[J]. 广西科学, 2009, 16(4):446-450.
Wang Q Y, Yang D F, Sun L, et al. Active expression of xylose isomerase from *Thermobifida fusca* in *Saccharomyces cerevisiae* and its influence on xylose metabolism[J]. Guangxi Sciences, 2009, 16(4):446-450.
- [5] Jeffries T W. Engineering yeasts for xylose metabolism [J]. Curr Opin Biotechnol, 2006, 17: 320-326.
- [6] Van Dijken J P, Van Den B E, Hermans J J, et al. Alcoholic fermenting by "non-fermentative" yeasts [J]. Yeast, 1986, 2:123-127.
- [7] Jeffries T W, Grigoriev I V, Grimwood J, et al. Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis* [J]. Nature Biotechnology, 2007, 25:319-326.
- [8] Joseph B B, Ronald T R. Fermentable sugars by chemi-

- cal hydrolysis of biomass[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010,107:4516-4521.
- [9] Jeffries T W. Emerging technology for fermenting D-xylose[J]. Trends Biotechnol,1985,3:208-212.
- [10] Agbogbo F K, Haagenen F D, Milam D, et al. Fermentation of acid-pretreated corn stover to ethanol without detoxification using *Pichia stipitis* [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2008,145:53-58.
- [11] Agbogbo F K, Coward-Kelly G. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis* [J]. Biotech Lett, 2008,30:1515-1524.
- [12] Wohlbach D J, Kuo A, Sato T K, et al. Comparative genomics of xylose-fermenting fungi for enhanced biofuel production[J]. PNAS, 2011,108(32):13212-13217.
- [13] Du Preez J C, Van Driessel B, Prior B A. Ethanol tolerance of *Pichia stipitis* and *Candida shehatae* strains in fed-batch cultures at controlled low dissolved-oxygen levels[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1989,30:53-58.
- [14] Nigam J N. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis* [J]. Journal Biotechnol, 2001,87:17-27.
- [15] Grabek-lejko D, Ryabova O B, Oklejewicz B, et al. Plate ethanol-screening assay for selection of the *Pichia stipitis* and *Hansenula polymorpha* yeast mutants with altered capability for xylose alcoholic fermentation [J]. Journal of Industry Microbiology and Biotechnology, 2006,33(11):934-940.
- [16] Watanabe T, Watanabe I, Yamamoto M, et al. A UV-induced mutant of *Pichia stipitis* with increased ethanol production from xylose and selection of a spontaneous mutant with increased ethanol tolerance[J]. Bioresource Technology, 2011,102(2):1844-1848.
- [17] 任佳, 鲍杰, 张素平, 等. Co⁶⁰ 诱变管囊酵母发酵木糖产乙醇的研究[J]. 生物质化学工程, 2009,43(5):11-14.
Ren J, Bao J, Zhang S P, et al. Strain improvement of *Pachysolen tannophilus* by Co⁶⁰ mutagenesis for xylose alcoholic fermentation[J]. Biomass Chemical Engineering, 2009,43(5):11-14.
- [18] 安伯格. 酵母遗传学方法实验指南[M]. 霍克克, 译. 第2版. 北京: 科学出版社, 2009:171.
An B G. Methods in Yeast Genetics[M]. Huo K K, Translated. Second Edition. Beijing: Science Press, 2009:171.
- [19] 陆琦, 张穗生, 吴仁智, 等. 三株甘蔗糖蜜酒精发酵高产酵母菌株的筛选[J]. 广西科学, 2010,17(4):368-372, 376.
Lu Q, Zhang S S, Wu R Z, et al. Screening three high-yield *Saccharomyces cerevisiae* strains for alcohol fermentation of sugarcane molasses [J]. Guangxi Sciences, 2010,17(4):368-372,376.
- [20] National Renewable Energy Laboratory(NREL). Measurement of cellulose activities[M]. Laboratory Analytical Procedure, Lap-006, Golden Co, 1996.
- [21] Ghose T K, Bisaria V S. Measurement of hemicellulase activities part I: xylanases[J]. International Union of Pure and Applied Chemistry, 1987,59:1739-1752.
- [22] Liu E K, Hu Y. Construction of a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain by combined approaches of genetic engineering, chemical mutagenesis and evolutionary adaptation[J]. Biochemical Engineering Journal, 2010,48:204-210.
- [23] 张颖, 马瑞强, 洪浩舟, 等. 微生物木糖发酵产乙醇的代谢工程[J]. 生物工程学报, 2010,26(10):1436-1443.
Zhang Y, Ma R Q, Hong H Z, et al. Metabolic engineering for microbial production of ethanol from xylose; a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2010,26(10):1436-1443.
- [24] 张凌燕, 张梁, 丁重阳, 等. 代谢工程改善野生酵母利用木糖产乙醇的性能[J]. 生物工程学报, 2008,24(5):950-956.
Zhang L Y, Zhang L, Ding C Y, et al. Metabolic engineering for improving ethanol fermentation of xylose by wild yeast[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2008,24(5):950-956.
- [25] 张凌燕. 木糖产乙醇酵母的筛选及分子生物学改造[D]. 无锡: 江南大学, 2008.
Zhang L Y. Breeding *Candida tropicalis* for ethanol fermentation of xylose and molecular modification[D]. Wu Xi: Jiang Nan University, 2008.
- [26] Wu J F, Lastick S M, Updegraff D M. Ethanol production from sugars derived from plant biomass by a novel fungus[J]. Nature, 1986,321:887-888.

(责任编辑: 陈小玲)