

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
55 (8) :1026 – 1035; 4 August 2015  
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn  
doi:10.13343/j.cnki.wsxb.20140560

## 五株木糖利用酵母的生理代谢特性

范贺超, 张梁\*, 李赢, 李由然, 顾正华, 丁重阳, 石贵阳

江南大学粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

**摘要:** 【目的】木质纤维素是地球上最丰富的可再生资源, 筛选具有高抗逆和高效利用木糖能力的菌株对纤维素类可再生资源综合利用具有重大意义。【方法】论文以 5 株利用木糖的酵母, 即树干毕赤酵母 (*Scheffersomyces stipitis*, *S. stipitis*)、*Candida tenuis* (*C. tenuis*)、*Spathaspora passalidarum* (*S. passalidarum*)、*Candida amazonensis* (*C. amazonensis*) 和 *Candida jeffriesii* (*C. jeffriesii*) 为研究对象, 研究了其对温度、乙醇浓度、渗透压的耐受性, 采用杜氏小管实验研究了其对常用碳源和氮源的利用能力, 另外通过木糖发酵实验初步研究了被测试酵母在有氧和限氧条件下的木糖发酵性能。【结果】结果表明, *S. passalidarum* 能够耐受 44 °C 左右的高温, 对多种碳源和氮源具有较强的利用能力, 此外, *S. passalidarum* 在有氧与限氧条件下均能快速代谢木糖, 限氧条件下乙醇得率高达 0.43 g/g。 *C. amazonensis* 对纤维二糖具有较强发酵能力, 代谢木糖产生木糖醇和少量乙醇, 同时该酵母耐受温度在 42 °C 左右。综合比较, 其他酵母在实验过程中没有表现出明显优势。【结论】*S. passalidarum* 在纤维素工业化应用中是一株良好的生产候选菌株。此外, *C. amazonensis* 具有较强的木糖醇生产能力, 有望成为一株优良的木糖醇生产菌株。

**关键词:** 树干毕赤酵母, *Spathaspora passalidarum*, *Candida amazonensis*, *Candida jeffriesii*, *Candida tenuis*, 木糖, 生理代谢特性, 木质纤维素

中图分类号: Q935 文章编号: 0001-6209 (2015) 08-1026-10

随着社会的发展及人口的迅猛增长, 能源需求、资源危机、粮食短缺等社会问题越来越严重地困扰人类社会, 引起了人们的广泛关注, 促使人们寻找开发新型能源资源<sup>[1]</sup>。地球上每年产生大量的植物纤维物质, 广泛存在于农林业废弃物中, 是最丰富的可再生生物质资源。若以木质纤维素为原料生产燃料乙醇、木糖醇、乳酸等化工产品, 不仅可以缓解人类社会能源资源短缺的难题, 而且对社会经济的发展会起到极大的促进作用。

木质纤维素主要由纤维素、半纤维素和木质素

组成。纤维素约占木质纤维素总量的 35% – 50%, 主要由葡萄糖通过  $\beta$ -1,4-糖苷键连接而成; 半纤维素约占木质纤维素总量的 20% – 35%, 水解产物主要是木糖, 另外还含有甘露糖、葡萄糖、半乳糖、L-阿拉伯糖和糖酸等多种成分<sup>[2]</sup>。传统的工业微生物如酿酒酵母能够很好地代谢葡萄糖, 但不能利用木糖、L-阿拉伯糖等五碳糖。因此五碳糖的利用, 成为纤维质原料转变成可利用性资源的关键问题, 而选育高效木糖发酵菌株对开发可再生纤维质资源具有重大意义。

基金项目: 教育部新世纪优秀人才支持计划 (NCET-11-0665); 霍英东基金 (131020); 江苏省杰出青年基金 (BK20140002)

\* 通信作者。 Fax: +86-510-85918235; E-mail: zhangl@jiangnan.edu.cn

作者简介: 范贺超 (1989 -), 男, 河北衡水, 硕士研究生, 微生物代谢调控与代谢产物。 E-mail: fanhechao163@163.com

收稿日期: 2014-11-26; 修回日期: 2015-01-16

迄今为止已经发现多种微生物能代谢木糖生成乙醇等化工产品,包括细菌、真菌、酵母等。在木糖发酵微生物中,酵母发酵能力最强,具有底物消耗速率快、产物如酒精耐受能力强、副产物少、不易被细菌和病毒污染的优点,且多数酵母发酵过程中不产生有毒副产物,可以放心应用于工业生产中。目前国内外研究较为广泛的木糖酵母主要有嗜鞣管囊酵母 (*Pachysolen tannophilus*, *P. tannophilus*)、树干毕赤酵母 (*Scheffersomyces stipitis*, *S. stipitis*) 和休哈塔假丝酵母 (*Candida shehatae*, *C. shehatae*) 等,其中 *S. stipitis* 木糖发酵性能尤为突出。Dellweg 等<sup>[3]</sup>报道 *S. stipitis* 可在有氧或无氧条件下发酵木糖,具有较高的乙醇产率,几乎不积累木糖醇,并且发酵过程中不需要添加生物素、硫胺素等生长因子;同时该酵母可发酵葡萄糖、甘露糖、半乳糖、纤维二糖<sup>[4]</sup>、木聚糖<sup>[5]</sup>等多种糖类,可有效用于纤维素材料水解物的高效酒精发酵。

然而较低の木糖转化效率,严格的限氧发酵条件以及葡萄糖效应成为目前木糖酵母工业应用的瓶颈问题。鉴于此,科研工作者一方面通过诱变育种<sup>[6-8]</sup>、原生质体融合<sup>[9-11]</sup>等传统方法改良现有木糖酵母,一方面通过基因工程等手段对工业酵母和野生木糖酵母的代谢途径、木糖转运过程等方面进行改造<sup>[12-14]</sup>。尽管取得了一定成效,但现有酵母的木糖发酵能力仍然不能满足工业化生产的需要。2006年,Nguyen 等<sup>[15]</sup>从木生甲虫体内分离到一株木糖酵母 *Spathaspora passalidarum* (*S. passalidarum*),该酵母能够在厌氧条件下有效利用木糖,同时有氧条件下能够实现木糖与葡萄糖的共发酵<sup>[16]</sup>。Long 等<sup>[17]</sup>研究发现,*S. passalidarum* 在 30 g/L 葡萄糖存在下,能够同时发酵木糖与纤维二糖,表现出较好的木糖转运能力,乙醇产率达 0.42 g/g 总糖。可见,从自然界中继续筛选性能优良木糖发酵菌种是开发高效木糖发酵菌株的有效手段。

本文以近年来新分离的木糖酵母 *S. passalidarum*、*Candida jeffriesii* (*C. jeffriesii*)<sup>[15]</sup>、*Candida amazonensis* (*C. amazonensis*)<sup>[18]</sup> 以及先前广泛研究的 *S. stipitis*、*Candida tenuis* (*C. tenuis*) 作为出发菌株,比较了 5 株酵母对胁迫的耐受性(温度、乙醇,渗透压);就碳源、氮源等方面研究了 5 株酵母的生理特性;并初步研究了其木糖发酵性能,为选育性能优良的高效木糖发酵菌株及之后的菌种改造奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 试剂与仪器:**木糖购于中国医药集团上海化学试剂公司,木糖和木糖醇标准品购于 SIGMA 试剂公司,酵母粉、蛋白胨购于 OXOID 试剂公司,其他试剂均为国产分析纯。HYL-C 多功能摇床购于太仓市强乐实验设备有限公司,BSP-150 恒温培养箱购于上海博讯实业有限公司,V-1200 型可见分光光度计购于上海美普达仪器有限公司。

**1.1.2 菌株:**酵母 *S. passalidarum* NRRL Y-27907 由路易斯安那州立大学 Meredith Blackwell 博士馈赠,*C. jeffriesii* NRRL Y-27738, *S. stipitis* NRRL Y-7124 和 *C. tenuis* NRRL Y-1498 购自美国农业研究菌种保藏中心(NRRL),*C. amazonensis* CBS 12363 购自荷兰真菌菌种保藏中心(CBS)。

**1.1.3 培养基:**YPX 培养基(g/L):酵母粉 10,蛋白胨 20,木糖 20,pH 自然,固体培养基添加 1.5% 琼脂;发酵培养基(g/L):木糖 30,酵母粉 5,蛋白胨 5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  2,  $\text{MgSO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0.3,pH 自然;无氮基础培养基(g/L):葡萄糖 20,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5,酵母粉 0.1,待测氮源 0.5%,pH 自然;无碳基础培养基(g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1, NaCl 0.1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01,待测碳源 2%,pH 自然。

### 1.2 菌株耐受性比较

将待测酵母接种于 YPX 培养基中,置 30 ℃、200 r/min 摇床培养 24 h,吸取适量菌液并将菌体细胞用生理盐水洗涤 2 次。

**1.2.1 温度耐受性:**将经生理盐水洗涤的菌体接种于 YPX 液体培养基,使菌体初始  $OD_{600}$  在 0.5 左右。分别于 30、34、37、40、42、44 和 46 ℃ 下 200 r/min 摇床培养 48 h,观察待测酵母的生长情况,并以  $OD_{600}$  表征待测酵母的温度耐受性。

**1.2.2 乙醇耐受性:**将经生理盐水洗涤的菌体接种于不同乙醇浓度的 YPX 液体培养基中,使菌体初始  $OD_{600}$  在 0.5 左右。于 30 ℃、200 r/min 摇床培养 48 h,观察待测酵母的生长情况,并以  $OD_{600}$  表征待测酵母的乙醇耐受性。

**1.2.3 木糖高渗耐受性:**将经生理盐水洗涤的菌体接种于不同木糖浓度的 YPX 液体培养基中,使菌体初始  $OD_{600}$  在 0.5 左右。于 30 ℃、200 r/min 摇床培

养 48 h, 观察待测酵母的生长情况, 并以  $OD_{600}$  表征待测酵母的木糖高渗耐受性。

### 1.3 同化碳源能力

将 10 mL 加入不同碳源的培养基加入装有杜氏小管的试管中, 同时将菌液如 1.2 洗涤后接种于试管中, 使菌体初始  $OD_{600}$  在 0.5 左右。于 30 °C 静置培养 72 h, 观察并记录杜氏小管中气泡的产生情况和酵母生长情况。

### 1.4 氮源利用能力

将 10 mL 加入不同氮源的培养基加入装有杜氏小管的试管中, 同时将菌液如 1.2 洗涤后接种于试管中, 使菌体初始  $OD_{600}$  在 0.5 左右。于 30 °C 静置培养 72 h, 观察并记录杜氏小管中气泡的产生情况和酵母生长情况。

### 1.5 木糖发酵特性测定

**1.5.1 待测木糖酵母的活化:** 用接种环挑取平板中适宜大小的待测木糖酵母单菌落到 40 mL 的 YPX 培养基中, 于 100 mL 三角瓶, 30 °C、200 r/min 摇床培养 24 h。

**1.5.2 生长曲线的测定:** 将活化的待测木糖酵母接种在 40 mL YPX 培养基中, 使菌体初始  $OD_{600}$  在 0.5 左右, 并于 100 mL 三角瓶, 30 °C、200 r/min 摇床培养, 定时取样测定菌液  $OD_{600}$ , 绘制待测酵母的生长曲线, 根据生长曲线选择最佳种子培养时间。

**1.5.3 供氧对酵母木糖发酵的影响:** 将种子液接种于发酵培养基中, 初始  $OD_{600}$  在 0.5 左右, 分别置于有氧和限氧条件下发酵培养。其中有氧条件为持液量 50 mL/100 mL 三角瓶, 转速 200 r/min, 8 层纱布封口; 限氧条件为持液量 50 mL/100 mL 三角瓶, 转速 100 r/min, 硅胶塞封口。定时取样测定菌液  $OD_{600}$  及相关物质含量, 分析不同供氧条件下 5 株木糖酵母生长及木糖代谢情况。

**1.5.4 木糖和代谢产物分析:** 木糖、木糖醇、乙醇、甘油和乙酸用高效液相色谱法 (HPLC) 测定, 色谱仪为 DIONEX P680; 泵为 Agilent 1100; 检测器为示差折光检测器 (RID); 色谱柱为 SUGAR SH1011, 条件: 0.01 mol/L  $H_2SO_4$ , 流速 0.8 mL/min, 进样量 20  $\mu$ L, 柱温 50 °C。取发酵上清液加入等体积 10% 的三氯乙酸, 沉淀蛋白 3 h 以上, 12000 r/min 离心 20 min, 经 0.45  $\mu$ m 水膜过滤处理后, 取 20  $\mu$ L 进样, 采用示差检测器检测相关物质。

## 2 结果和分析

### 2.1 酵母耐受性比较

**2.1.1 温度耐受性:** 传统工业酵母较适合繁殖的温度不高, 一般为 25–30 °C, 而高温发酵有助于提高生产效率, 缩短工业生产周期, 并且可有效节约能源。从图 1 中可知, 被测试的 5 株木糖酵母中, *S. passalidarum*、*C. amazonensis* 和 *S. stipitis* 具有相对较高的温度耐受性, 其中 *S. passalidarum* 和 *C. amazonensis* 能够生长的极限温度分别在 44 °C 和 42 °C 左右。*C. jeffriesii* 和 *C. tenuis* 温度耐受性一般。

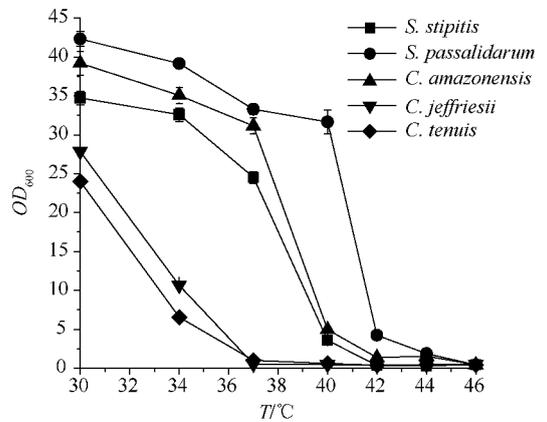


图 1. 温度对 5 株木糖利用酵母生长的影响

Figure 1. Effect of temperature on growth of five xylose utilizing yeasts. Error bars indicate the standard deviations of two parallel experiments.

**2.1.2 乙醇耐受性:** 木糖酵母的生长情况如图 2 所示。由图可知, 本实验条件下, *S. passalidarum* 和 *C. amazonensis* 具有相对较高的乙醇耐受性, 在 6% (V/V) 乙醇浓度下具有较高的菌体产量, *S. stipitis* 在 6% (V/V) 乙醇浓度下仅有微弱生长, 而 *C. tenuis* 的生长则受到严重抑制, *C. jeffriesii* 乙醇耐受能力最差, 乙醇浓度 4% (V/V) 时生长已受到严重影响。在工业乙醇发酵中, 发酵终点的乙醇浓度越高, 对于整个发酵行业是有利的。所以, 选择耐乙醇能力高的酵母菌株是高浓度乙醇发酵的关键。

**2.1.3 高渗透压耐受性:** 酵母对高渗透压的耐受性是能否用于发酵工业特别是酒精发酵中的重要特性。高浓度的糖分对酵母菌体的生长产生很大的负

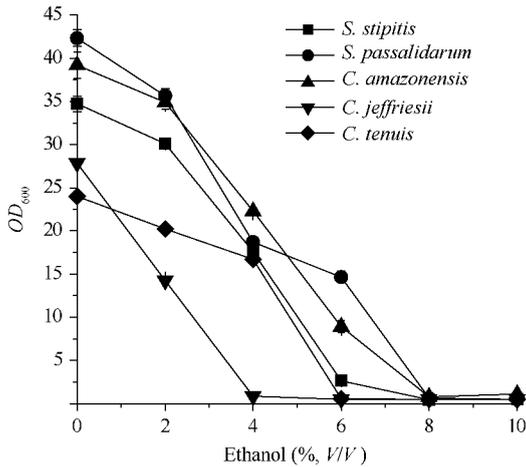


图 2. 乙醇浓度对 5 株木糖利用酵母生长的影响

Figure 2. Effect of ethanol on growth of five xylose utilizing yeasts. Error bars indicate the standard deviations of two parallel experiments.

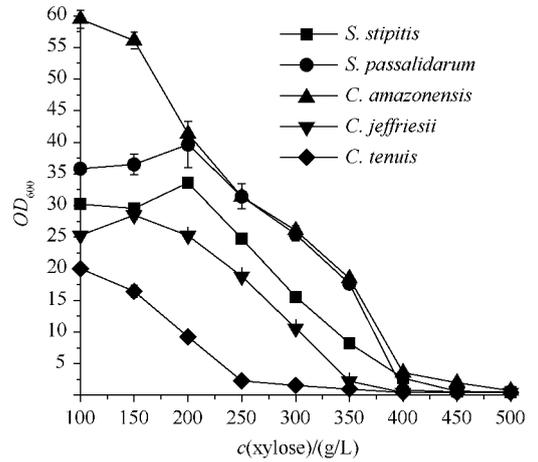


图 3. 木糖浓度对 5 株木糖利用酵母生长的影响

Figure 3. Effect of xylose on growth of five xylose utilizing yeasts. Error bars indicate the standard deviations of two parallel experiments.

面影响, 5 株待测酵母在木糖梯度培养基中的生长情况如图 3 所示。在木糖浓度低于 250 g/L 时, *S. stipitis*、*S. passalidarum*、*C. amazonensis* 和 *C. jeffriesii* 仍能维持较高的菌体产量, 而随着培养基中木糖浓度进一步提高, 被测试酵母的菌体量均有不同程度的降低, 表明高糖渗透压对被测酵母的生长造成较大影响。

## 2.2 同化碳源能力测定

碳源是发酵培养基的主要成分之一, 它除了满足微生物的生长以外, 还能为细胞提供能量。本实验选取 9 种常用碳源测定 5 株被测酵母的发酵产气情况和菌体生长情况, 如表 1 和图 4 所示。被测试酵母在利用葡萄糖、木糖、麦芽糖、甘露糖、半乳糖、纤维二糖和蔗糖等碳源方面具有一定差异。杜氏小

表 1. 5 株木糖利用酵母同化碳源能力比较

Table 1. Comparison of assimilation capability of different carbon sources

Strain	t/h	Carbon sources								
		glucose	xylose	maltose	mannose	galactose	L-arabinose	cellobiose	sucrose	lactose
<i>S. stipitis</i>	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	36	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	72	+	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>S. passalidarum</i>	24	++	++	+	+	+	-	-	-	-
	36	++++	++++	++++	+++	++++	-	-	-	-
	48	++++	++++	++++	++++	++++	-	-	-	-
	72	++++	++++	++++	++++	++++	-	-	-	-
<i>C. amazonensis</i>	24	+	-	-	+	-	-	+	-	-
	36	+++	-	-	+++	+	-	++++	-	-
	48	++++	-	-	++++	+	-	++++	-	-
	72	++++	-	-	++++	+++	-	++++	-	-
<i>C. jeffriesii</i>	24	+	-	-	-	+	-	-	-	-
	36	+++	-	-	+	+++	-	-	-	-
	48	++++	-	-	+++	++++	-	-	-	-
	72	++++	+	-	++++	++++	-	-	-	-
<i>C. tenuis</i>	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	36	+	-	-	+	-	-	-	-	-
	48	+	-	-	+	-	-	-	-	-
	72	++	-	-	+	-	-	-	-	-

++++, tubes filled with 100% gas; +++, tubes filled with 75% gas; ++, tubes filled with 50% gas; +, tubes filled with 25% gas; -, tubes filled with no gas.

管实验表明, *S. passalidarum* 对葡萄糖、木糖、麦芽糖、甘露糖和半乳糖的发酵能力要强于其他被测试菌株, 而 *C. amazonensis* 对纤维二糖具有较强的同化能力。生长实验表明, *S. passalidarum*、*C. amazonensis* 和 *C. jeffriesii* 三株酵母均无法代谢 L-阿拉伯糖, 而 *C. tenuis* 则具有较强的 L-阿拉伯糖同化能力。

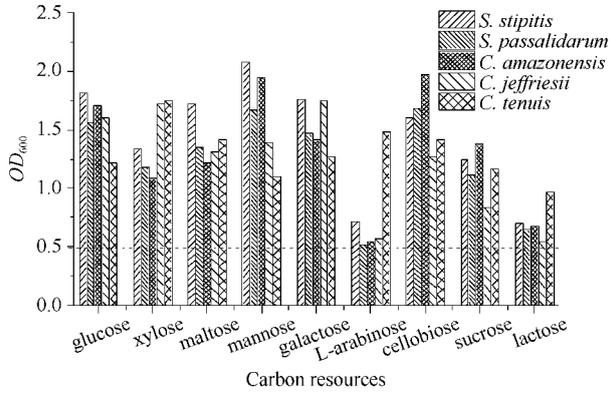


图 4. 不同碳源对 5 株酵母生长的影响

Figure 4. Effect of different carbon resources on growth of five xylose utilizing yeasts.

### 2.3 氮源利用能力测定

氮素是微生物细胞中的一种重要组成元素, 用

于合成细胞内蛋白质、核酸等成分, 不同微生物对氮素的需求不尽相同。本试验选用蛋白胨、酵母粉、尿素、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{KNO}_3$ 、 $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ 、乙酸铵等 9 种氮源测试酵母的生长与发酵产气情况。结合菌株发酵产气情况(表 2)和生长情况(图 5)可知, 除  $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$  外, 5 株木糖酵母均能够较高效的利用待测氮源生长。在杜氏小管实验中, *S. passalidarum*、*C. amazonensis* 和 *C. jeffriesii* 利用待测氮源产气较快, 表现出较高的发酵强度, 其中 *C. amazonensis* 和 *C. jeffriesii* 更是能以廉价的尿素为氮源进行发酵产气。而尽管 *S. stipitis* 和 *C. tenuis* 能够利用多种待测氮源, 但发酵产气能力较差。

### 2.4 供氧对酵母木糖发酵的影响

**2.4.1 生长曲线的测定:** 种子液中酵母的数量和活力直接决定了发酵进程的快慢和代谢产物的产量。本实验对种子液中酵母菌体浓度随时间的变化进行了研究, 绘制了生长曲线, 以确定最佳种子培养时间。从图 6 可以看出, 5 株酵母在繁殖过程中呈现二次生长的现象。首先被测试酵母在经过 2 h 的短

表 2. 5 株木糖利用酵母氮源利用能力比较

Table 2. Comparison of assimilation capability of different nitrogen resource

Strain	t/h	Nitrogen sources								
		yeast extract	peptone	urea	$\text{NH}_4\text{Cl}$	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	$(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$	$\text{KNO}_3$	$\text{NH}_4\text{Ac}$
<i>S. stipitis</i>	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	36	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48	+	+	-	+	+	-	-	-	-
	72	++++	+++	-	+++	++	-	-	-	-
<i>S. passalidarum</i>	24	+	+++	-	+	++	-	-	++	-
	36	+++	++++	-	+++	++++	-	-	+++	+
	48	++++	++++	-	++++	++++	+	-	+++	+++
	72	++++	++++	-	++++	++++	+++	-	++++	++++
<i>C. amazonensis</i>	24	++	+	-	++	++	-	-	++	++
	36	++++	+++	++	++++	++++	+	-	+++	++++
	48	++++	++++	++++	++++	++++	+++	-	++++	++++
	72	++++	++++	++++	++++	++++	++++	-	++++	++++
<i>C. jeffriesii</i>	24	++	++	+	+	++	-	-	+	+
	36	+++	++++	++	+++	++++	-	-	++	++
	48	++++	++++	++++	++++	++++	-	-	+++	+++
	72	++++	++++	++++	++++	++++	++	-	++++	++++
<i>C. tenuis</i>	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	36	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48	+	+	-	-	+	-	-	-	-
	72	+++	+	-	-	+	-	-	-	-

++++, tubes filled with 100% gas; +++, tubes filled with 75% gas; ++, tubes filled with 50% gas; +, tubes filled with 25% gas; -, tubes filled with no gas

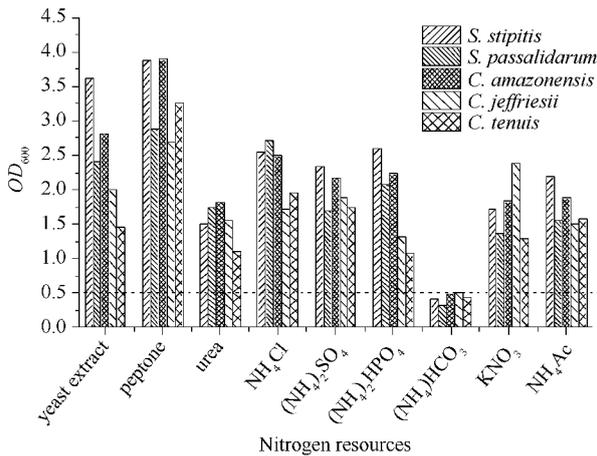


图 5. 不同氮源对 5 株酵母生长的影响

Figure 5. Effect of different nitrogen resources on growth of five xylose utilizing yeasts.

暂适应后, 进入对数生长期, 其中 *S. stipitis*、*S. passalidarum*、*C. amazonensis* 和 *C. jeffriesii* 在 12 h 左右经过一个短暂停滞期后快速进入第二个对数生长期, 直至 60 h 左右最终达到稳定期, 而 *C. tenuis* 生长较为缓慢, 在 36 h 时达到第一个稳定期后才进入第二个对数生长期。因此兼顾种子液培养时间、菌体浓度和种子发酵活力, 确定 5 株木糖利用酵母的最佳种子培养时间为 18–24 h。

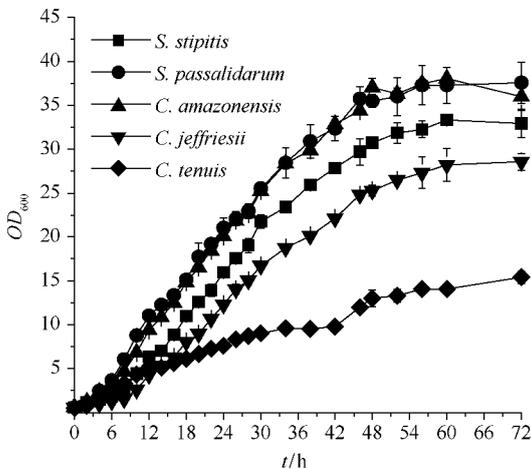


图 6. 5 株木糖利用酵母生长曲线测定

Figure 6. Growth curve of five xylose utilizing yeasts under xylose medium. Error bars indicate the standard deviations of two parallel experiments.

**2.4.2 木糖发酵情况测定:** 木糖是木质纤维素中的一种重要单糖, 实现木糖的高效转化与利用是木质纤维素资源综合利用的关键之一。本实验采用摇瓶发酵考查了 5 株木糖酵母在有氧和限氧条件下的木糖发酵性能。

有氧条件下, 如图 7 所示, 在 30 g/L 木糖发酵培养基中, 5 株酵母均能够较好的利用木糖进行发酵。首先, 5 株被测试酵母在生长过程中均表现出明显的二次生长现象, 发酵初期, 菌体量随着木糖的逐步消耗而逐渐增长, 在消耗完木糖后, 经过短暂的适应, 相关代谢产物开始被消耗, 进入第二个菌体生长阶段。在降糖方面, *S. passalidarum* 表现出显著优势, 30 g/L 木糖在 18 h 内被完全消化, 而 *S. stipitis* 则需要 24 h 左右。此外, 新近分离的 *C. amazonensis* 和 *C. jeffriesii* 也具有较好的降糖能力。通过对 5 株酵母木糖代谢产物分析发现, *S. passalidarum*、*C. jeffriesii* 和 *S. stipitis* 均以乙醇作为主要代谢产物, 仅产生少量木糖醇, 其中 *S. passalidarum* 乙醇产率最高, 为 0.35 g/g, 达到理论转化值的 76%, 而 *S. stipitis* 产率仅为 0.28 g/g; *C. amazonensis* 发酵木糖产生木糖醇和一定量的乙醇, 发酵 30 g/L 木糖生成 8.14 g/L 的木糖醇和 4.86 g/L 的乙醇; *C. tenuis* 代谢木糖主要用于木糖醇的生产, 产率为 0.30 g/g, 没有检测到乙醇的生成。

限氧条件下, 如图 8 所示, 在 30 g/L 木糖发酵培养基中, 5 株酵母均能够发酵木糖, 但降糖速率和产物产率与有氧条件下相比, 表现出显著差异。首先, 在降糖方面, *S. passalidarum* 仍能够快速代谢木糖, 30 g/L 木糖能够在 36 h 内消耗完全; 而 *S. stipitis*、*C. amazonensis* 和 *C. jeffriesii* 在发酵 48 h 后仍然分别有 5.66、2.09 和 5.29 g/L 残糖; *C. tenuis* 木糖代谢效率较差, 发酵 120 h 后仍然有 14.25 g/L 残糖。通过对 5 株酵母代谢产物的转化效率显著提高。*S. passalidarum* 代谢木糖产生 12.10 g/L 乙醇, 乙醇产率达 0.43 g/g, 为理论产率的 93.47%; *S. stipitis* 的乙醇产率尽管有一定提高, 达到 0.39 g/g, 但仍低于 *S. passalidarum*; 限氧条件下, *C. amazonensis* 代谢木糖生成 14.99 g/L 木糖醇和 3.91 g/L 乙醇, 木糖醇产率达 0.51 g/g, 可见氧供应情况能显著影响 *C. amazonensis* 的木糖醇生产。尽管 *C. tenuis* 发酵后期仍残余大量木糖, 但木糖醇转化率较高, 达到 0.55 g/g。

### 3 讨论

本文研究了 5 株木糖酵母对温度、乙醇浓度、渗透压的耐受性, 同时采用杜氏小管实验研究了被测试酵母对常用碳源和氮源的利用能力, 另外通过木

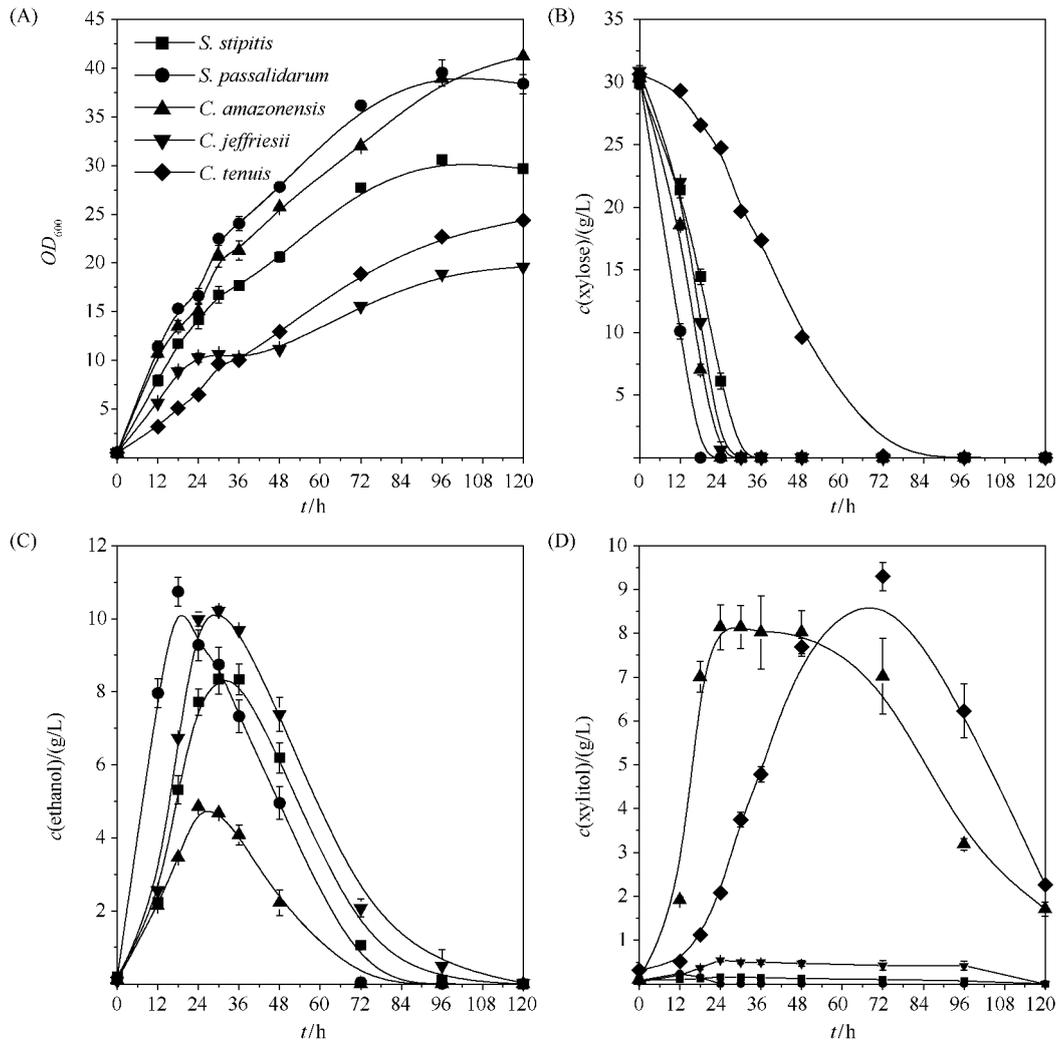


图 7. 5 株木糖利用酵母有氧条件下木糖发酵性能比较

Figure 7. The xylose fermentation of five xylose utilizing yeasts under aerobic condition. Dates presented in (A) (B) (C) (D) are the variation of  $OD_{600}$ , xylose consumption, ethanol production and xylitol production with time respectively. Error bars indicate the standard deviations of two parallel experiments.

糖发酵实验初步研究了被测试酵母在有氧和限氧条件下的木糖发酵性能。

作为重要的发酵微生物,酵母菌在医药、化工等各个行业都有着广泛的应用,而在实际生产中,经常面临高浓度乙醇、高温、高渗透压等胁迫的影响,严重制约了发酵工业的生产效率,因此筛选抗性强的菌株对工业生产具有重大意义。在耐受性方面,5株酵母均能耐受较高浓度的木糖,其中,*S. passalidarum*和*C. amazonensis*在350 g/L木糖浓度下仍能生成较高的生物量,表现出高糖发酵的潜能。在耐温实验中,*S. passalidarum*和*C. amazonensis*能够生长的极限温度分别在44 °C和42 °C左右,表现出良好的耐高温性能。一般利用木糖的酵母生长与

发酵的适宜温度在30 °C左右,而耐高温菌株由于更具有生产成本优势,并且更适于同步糖化发酵工艺(SSF),成为国内外科研工作者共同关注的热点<sup>[19-20]</sup>。此外,*S. passalidarum*和*C. amazonensis*在6% (V/V)乙醇浓度下仍有较好的生长状态,尽管耐乙醇性能低于用于传统乙醇发酵的酿酒酵母,但其乙醇耐受性要高于其他大多数利用木糖的酵母<sup>[21]</sup>。作为能够利用木糖的天然野生酵母,*S. passalidarum*和*C. amazonensis*对高温和乙醇所具有的较高耐受力使其在进一步的菌种选育及工业应用中表现出良好的应用前景和价值。

碳源和氮源是酵母生长过程中重要的营养物质。同化碳源实验中,5株酵母均能利用多种糖类

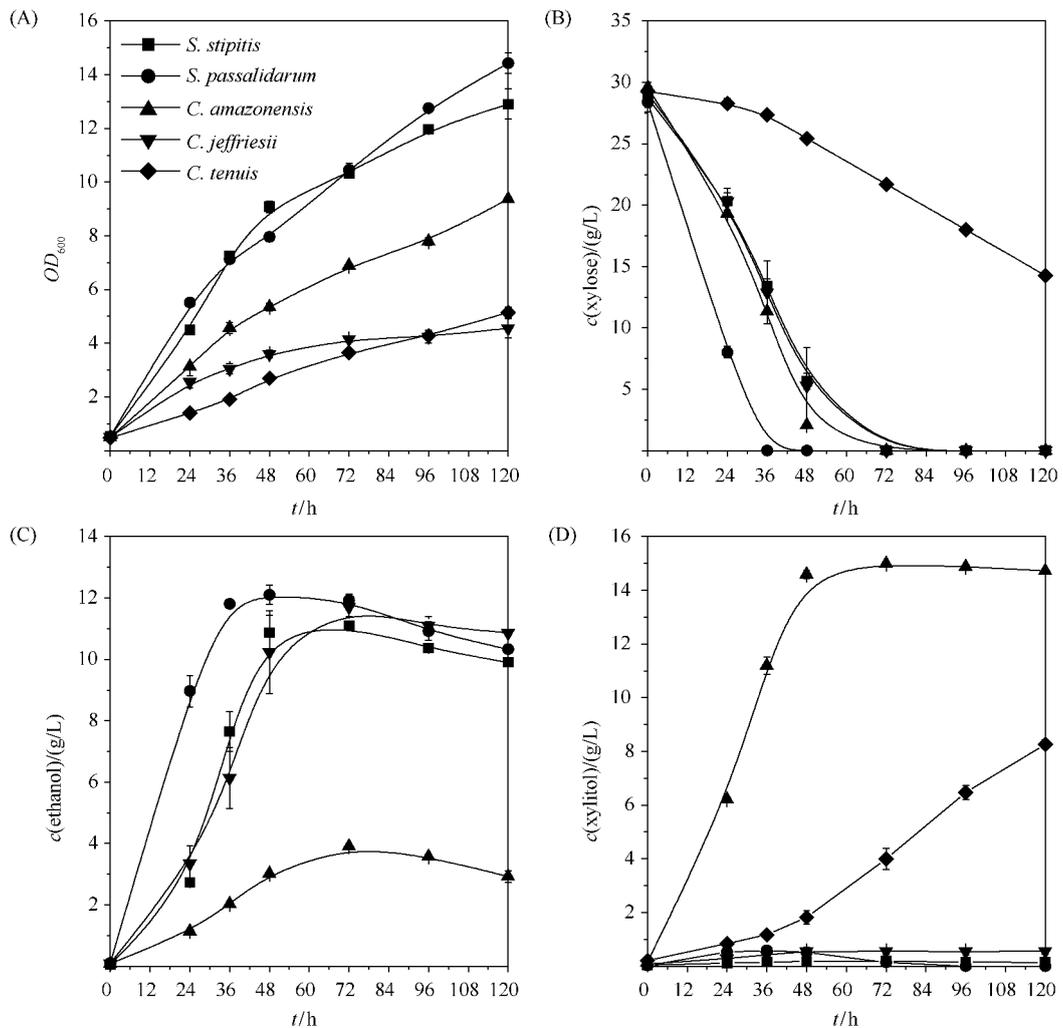


图 8. 5 株木糖利用酵母限氧条件下木糖发酵性能比较

Figure 8. The xylose fermentation of five xylose utilizing yeasts under oxygen limiting condition. Dates presented in (A) (B) (C) (D) are the variation of  $OD_{600}$ , xylose consumption, ethanol production and xylitol production with time respectively. Error bars indicate the standard deviations of two parallel experiments.

进行生长与发酵,其中 *S. passalidarum* 对葡萄糖、木糖、麦芽糖、甘露糖和半乳糖的发酵能力要强于其他被测试菌株,而 *C. amazonensis* 对纤维二糖具有较强的同化能力,有望成为纤维二糖代谢相关基因的优良供体。然而,生长实验表明,*S. passalidarum*、*C. amazonensis* 无法利用在木质纤维素中占有一定比例的 L-阿拉伯糖,*C. tenuis* 则对 L-阿拉伯糖具有较好的同化能力。目前,*S. passalidarum* 和 *C. tenuis* 的全基因组测序工作已经初步完成<sup>[22]</sup>,给 *S. passalidarum* 的分子生物学改造和高效利用多种糖类的基因工程菌的构建带来极大便利。氮源利用方面,*S. passalidarum*、*C. amazonensis* 和 *C. jeffriesii* 在多种氮源下表现出较高的发酵强度,其中 *C.*

*amazonensis* 和 *C. jeffriesii* 能以廉价的尿素为氮源进行发酵产气,在工业生产中具有显著优势。而尽管 *S. stipitis* 和 *C. tenuis* 能够利用多种待测氮源,但发酵产气能力较差。

筛选高效利用木糖的菌株是实现木质纤维素资源综合利用的关键之一,而目前已经分离到的能够利用木糖的酵母中仅有 *S. stipitis*、*C. shehatae*、*C. tenuis* 等少数酵母具有发酵木糖的能力<sup>[23]</sup>。在本次木糖发酵实验中,5 株木糖酵母均能够良好地代谢木糖,其中,*S. passalidarum*、*S. stipitis* 和 *C. jeffriesii* 均以乙醇作为主要代谢产物,而 *C. amazonensis* 能够生产木糖醇和一定量的乙醇,*C. tenuis* 则主要生产木糖醇。在纤维素乙醇工业中,严格的限氧条件

和较高的生产成本严重制约了木糖酵母的工业化应用。上述 5 株木糖酵母中, *S. passalidarum* 在有氧和限氧条件下快速的降糖能力,在一定程度上突破了发酵过程中供氧条件的限制,同时发酵过程中,转化木糖的乙醇产率能够达到 0.43 g/g,表现出优良的生产潜能。

由此可见, *S. passalidarum* 较其他 4 株木糖酵母,具有耐高温,碳源、氮源广泛,生长旺盛并且营养要求简单,木糖利用速率及产物产率较高等优良性状。这些特性使其具有良好的工业应用价值和广阔的发展前景。此外, *C. amazonensis* 具有良好的纤维二糖代谢能力,同时有较强的木糖醇生产能力,有望成为一株优良的木糖醇生产菌株。

## 参考文献

- [1] Ragauskas AJ, Williams CK, Davison BH, Britovsek G, Cairney J, Eckert CA, Frederick WJ, Jr., Hallett JP, Leak DJ, Liotta CL, Mielenz JR, Murphy R, Templer R, Tschaplinski T. The path forward for biofuels and biomaterials. *Science*, 2006, 311 (5760): 484-489.
- [2] Saha BC. Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2003, 30 (5): 279-291.
- [3] Dellweg H, Rizzi M, Methner H, Debus D. Xylose fermentation by yeasts. *Biotechnology Letters*, 1984, 6 (6): 395-400.
- [4] Parekh S, Wayman M. Fermentation of cellobiose and wood sugars to ethanol by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. *Biotechnology Letters*, 1986, 8 (8): 597-600.
- [5] Lee H, Biely P, Latta RK, Barbosa MFS, Schneider H. Utilization of xylan by yeasts and its conversion to ethanol by *Pichia stipitis* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 1986, 52 (2): 320-324.
- [6] Geiger M, Gibbons J, West T, Hughes SR, Gibbons W. Evaluation of UV-C mutagenized *Scheffersomyces stipitis* strains for ethanol production. *Journal of Laboratory Automation*, 2012, 17 (6): 417-424.
- [7] Watanabe T, Watanabe I, Yamamoto M, Ando A, Nakamura T. A UV-induced mutant of *Pichia stipitis* with increased ethanol production from xylose and selection of a spontaneous mutant with increased ethanol tolerance. *Bioresource Technology*, 2011, 102 (2): 1844-1848.
- [8] Han LL, TU ZD, YE K, LI YF, CHEN GY, ZHAO Y, LIU M. Breeding of higher ethanol fermentation of xylose strain with protoplast fusion and mutagenesis. *Liquor Making*, 2008, 35 (2): 38-41. (in Chinese)
- 韩丽丽, 涂振东, 叶凯, 李勇峰, 陈高云, 赵媛, 刘敏. 高效代谢木糖产乙醇的酵母菌株的选育. *酿酒*, 2008, 35 (2): 38-41.
- [9] Dziuba E. CJ. Fermentative activity of somatic hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida shehatae* or *Pachysolen tannophilus*. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 2002, 5 (1): 1-12.
- [10] Hou X, Yao S. Improved inhibitor tolerance in xylose-fermenting yeast *Spathaspora passalidarum* by mutagenesis and protoplast fusion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93 (6): 2591-2601.
- [11] Kahar P, Tanaka S. A xylose-fermenting yeast hybridized by intergeneric fusion between *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida intermedia* mutants for ethanol production. *Sustainable Chemical Processes*, 2014, 2 (1): 1-12.
- [12] Jeffries TW, Shi NQ. Genetic engineering for improved xylose fermentation by yeasts // Prof. Dr. GT, Tsao AP, Brainard HR, Bungay NJ, Cao P, Cen Z, Chen J, Du B, Foody CS, Gong P, Hall N WY, Ho DC, Irwin P, Iyer TW, Jeffries CM, Ladisch MR, Ladisch YY, Lee NS, Mosier HM, Mühlemann M, Sedlak NQ, Shi GT, Tsao JS, Tolan RW, Torget DB, Wilson LX. Recent progress in bioconversion of lignocellulosics. Online: Springer, 1999: 117-161.
- [13] Matsushika A, Inoue H, Kodaki T, Sawayama S. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 84 (1): 37-53.
- [14] Wang FQ, Xu P. Progress on engineered strains for ethanol production. *Acta Microbiologica Sinica*, 2006, 46 (4): 673-675. (in Chinese)  
王凡强, 许平. 产乙醇工程菌研究进展. *微生物学报*, 2006, 46 (4): 673-675.
- [15] Nguyen NH, Suh SO, Marshall CJ, Blackwell M. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesii* sp. nov.. *Mycological Research*, 2006, 110 (Pt 10): 1232-1241.
- [16] Hou X. Anaerobic xylose fermentation by *Spathaspora passalidarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 94 (1): 205-214.
- [17] Long TM, Su YK, Headman J, Higbee A, Willis LB, Jeffries TW. Cofermentation of glucose, xylose, and cellobiose by the beetle-associated yeast *Spathaspora passalidarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78 (16): 5492-5500.

- [18] Cadete RM, Melo MA, Lopes MR, Pereira GM, Zilli JE, Vital MJ, Gomes FC, Lachance MA, Rosa CA. *Candida amazonensis* sp. nov., an ascomycetous yeast isolated from rotting wood in the Amazonian forest. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2012, 62 (Pt 6) : 1438-1440.
- [19] Tanimura A, Nakamura T, Watanabe I, Ogawa J, Shima J. Isolation of a novel strain of *Candida shehatae* for ethanol production at elevated temperature. *Springer Plus*, 2012, 1 (1) : 1-7.
- [20] Liu XY, He XP, Lu Y, Zang BR. Improvement of thermal adaptability and fermentation of industrial ethanologenic yeast by genomic DNA mutagenesis-based genetic recombination. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2011, 27 (7) : 1049-1056. (in Chinese)  
刘秀颖, 何秀萍, 卢莹, 张博润. 基于基因组 DNA 诱变的遗传重组改造乙醇工业酵母的耐热性及发酵性能. *生物工程学报*, 2011, 27 (7) : 1049-1056.
- [21] Jeffries TW, Jin Y-S. Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts. *Advances in Applied Microbiology*, 2000, 47: 221-268.
- [22] Wohlbach DJ, Kuo A, Sato TK, Potts KM, Salamov AA, Labutti KM, Sun H, Clum A, Pangilinan JL, Lindquist EA, Lucas S, Lapidus A, Jin M, Gunawan C, Balan V, Dale BE, Jeffries TW, Zinkel R, Barry KW, Grigoriev IV, Gasch AP. Comparative genomics of xylose-fermenting fungi for enhanced biofuel production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108 (32) : 13212-13217.
- [23] Toivola A, Yarrow D, Van Den Bosch E, Van Dijken JP, Scheffers WA. Alcoholic fermentation of D-xylose by yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, 1984, 47 (6) : 1221-1223.

## Physiological and metabolic characteristics of five xylose utilizing yeasts

Hechao Fan, Liang Zhang<sup>\*</sup>, Ying Li, Youran Li, Zhenghua Gu, Zhongyang Ding, Guiyang Shi

National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

**Abstract:** [Objective] It is of great significance to improve the utilization of lignocellulosic material, the most abundant renewable resource on earth. [Methods] We studied the stress tolerance (temperature, ethanol and osmotic tolerance) of five xylose utilizing yeasts, *Scheffersomyces stipitis*, *Candida tenuis*, *Spathaspora passalidarum*, *Candida amazonensis* and *Candida jeffriesii*. We also tested their utilization ability of multiple carbon and nitrogen sources. [Results] *S. passalidarum* could tolerate at 44 ° C and utilize various carbon and nitrogen sources effectively. *S. passalidarum* could metabolism xylose rapidly to produce ethanol, with an ethanol yield of 0.43 g/g under oxygen limiting condition. *C. amazonensis* could also tolerate at 42 ° C. Moreover, *C. amazonensis* could converse xylose to xylitol with ethanol as the main by-product. [Conclusion] *S. passalidarum* is a potentially valuable workhorse in industrial utilization of lignocellulosic for its excellent characteristics. In addition, *C. amazonensis* may be a promising xylitol producer.

**Keywords:** *Scheffersomyces stipitis*, *Spathaspora passalidarum*, *Candida amazonensis*, *Candida jeffriesii*, *Candida tenuis*, xylose, physiological and metabolic characteristics, lignocellulosic

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Program for New Century Excellent Talents in University (NCET-11-0665), by the Fok Ying-Tong Education Foundation (131020) and by the Jiangsu Science Fund for Distinguished Young Scholars (BK20140002)

<sup>\*</sup> Corresponding author. Fax: +86-510-85918235; E-mail: zhangl@jiangnan.edu.cn

Received: 26 November 2014 / Revised: 16 January 2015