

工业用糖蜜酿酒酵母菌株耐受性分析研究

郭 亭* 梁达奉

(广州甘蔗糖业研究所 广东省甘蔗改良与生物炼制重点实验室 广州 510316)

摘 要: 采用休止细胞梯度生长法, 对工业糖蜜酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)菌株进行高浓度酒精、高温和高渗透压, 以及糠醛毒性、苯酚毒性、乙酸毒性和抗生素 G418 毒性的耐受性分析。结果表明, 所测定的工业酵母菌株对这些逆境条件的耐受性有明显的差别; 其中 AS2.1189 和 AS2.1190 对测定的胁迫条件均表现出相对较好的耐受性; 396 对乙酸毒性和 G418 毒性具有很好的耐受性; 2610 对高温表现出较强的耐受性。

关键词: 酿酒酵母, 耐受性, 燃料乙醇

Research on the Stress Resistance of *Saccharomyces cerevisiae* Industrial Strains for Molasses

GUO Ting* LIANG Da-Feng

(Guangdong Key Laboratory of Sugarcane Improvement and Biorefinery, Guangzhou Sugarcane Industry Research Institute, Guangzhou 510316)

Abstract: The stress resistance of *Saccharomyces cerevisiae* industrial strains for molasses to high-concentration ethanol, high temperature, high osmotic pressure, furfural toxicity, phenol toxicity, acetic acid toxicity and G418 toxicity were analyzed by the spot dilution growth assays in this paper. The results showed that the stress resistances among these industrial strains were obviously different. The strains AS2.1189 and AS2.1190 are more resistant to the tested stress factors than any others. The strain 396 is the most resistant to the acetic acid toxicity and G418 toxicity, and the strain 2610 is the most resistant to the high temperature.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, Stress resistance, Fuel ethanol

燃料乙醇是最有发展前景的新型可再生能源之一, 其生产和应用越来越受到各国政府的重视。拓展酒精生产原料范围, 以木质纤维素原料替代淀粉类和糖类原料进行乙醇生产, 是未来燃料乙醇的发展方向^[1]。但是, 其生产成本还不能达到有经济效益的水平, 主要的技术难题: 一是木质纤维预处理与

酶解效率较低, 二是缺少对木质纤维水解糖液中的毒性物质具有耐受性的、能充分利用水解液中各种糖类成分的、具有良好乙醇生产性能的微生物菌株^[2]。

酿酒酵母作为传统乙醇生产菌株, 具有许多优良特性: 如厌氧条件下具有良好的生长能力, 较高

的乙醇得率,对一些生长抑制因子如乙醇、乙酸等具有较高的耐受性等。酿酒酵母在乙醇发酵过程中不可避免地受到胁迫条件(如乙醇毒性、高温胁迫等)的影响,其对这些胁迫条件的耐受性影响到发酵工艺、发酵设备和发酵效率,进而影响到经济效益^[3]。提高菌株对胁迫条件的耐受性是酿酒酵母工业菌株改良的重要目标之一。本文利用休止细胞梯度生长法,对酿酒酵母进行乙醇发酵相关因素和木质纤维水解液中的一些毒性物质的耐受性分析,为木质纤维乙醇生产菌株的改造与选育提供参考^[4]。

1 材料与方法

1.1 菌株

实验用酿酒酵母菌株见表 1。

它们是由中科院、广州甘蔗糖业研究所等研究单位选育,具有耐酒精、耐酸、发酵速率快、高发酵率等优良特性,广泛应用于我国南方蔗区糖厂的糖蜜酒精发酵车间。

表 1 实验用菌株

Table 1 Strains used in this study

菌株 Yeast strain	遗传性状和特征 Genotype	来源 Source
AS2.1189	2n 酿酒酵母	本实验室保存
AS2.1190	2n 酿酒酵母	本实验室保存
2610	2n 酿酒酵母	中科院选育
396	2n 酿酒酵母	台湾396号酵母
HW-52	2n 酿酒酵母	本实验室选育

1.2 培养基

酵母YPD培养基: 酵母提取粉 1%, 蛋白胨 2% 及葡萄糖 2%, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

1.3 酵母耐受性测定

酵母各项耐受性的测定是根据其在含有不同抑制物的YPD 固体平板培养基上的生长状况测定的。测定方法为休止细胞梯度生长实验,酵母接种于 20 mL 的YPD 液体培养基中,30 °C 培养 12 h(OD_{600}

0.7),离心收集菌体,制备休止细胞。调节菌液浓度为 $OD_{600}=1.0$,10 倍梯度稀释,依次取 4 μ L 点滴于测试平板,30 °C 培养 1 d–3 d。观察菌落生长情况^[4, 5]。

1.3.1 酒精耐受性测定: 在含 8%、10%和 12%(V/V)乙醇的 YPD 固体平板上进行梯度生长实验,以生长状况表征其酒精耐受性。

1.3.2 高温耐受性测定: 在 37 °C、40 °C 和 42 °C 下,YPD 固体平板上进行梯度生长实验,以生长状况表征其高温耐受性。

1.3.3 高渗透压耐受性测定: 在含 0.7 mol/L 和 1.0 mol/L KCl 的YPD固体平板上进行梯度生长实验^[6],以生长状况表征其渗透胁迫耐受性。

1.3.4 糠醛耐受性测定: 在含 0.8 g/L 和 1.2 g/L 糠醛的 YPD 固体平板上进行梯度生长实验,以生长状况表征其糠醛耐受性。

1.3.5 苯酚耐受性测定: 在含 1.2 g/L 和 2.0 g/L 苯酚的 YPD 固体平板上进行梯度生长实验,以生长状况表征其苯酚耐受性。

1.3.6 乙酸耐受性测定: 在含 3.0 g/L 和 4.0 g/L 乙酸的 YPD 固体平板上进行梯度生长实验,以生长状况表征其乙酸耐受性。

1.3.7 G418 耐受性测定: 在含 100 μ g/mL 和 200 μ g/mL G418 的 YPD 固体平板上进行梯度生长实验,以生长状况表征其 G418 耐受性。

2 结果

2.1 酵母高浓度酒精、高渗透和高温胁迫耐受性测定

在甘蔗糖蜜酒精发酵过程中,酒精度、温度和浓醪是影响其发酵效率的最主要的因素^[7]。浓醪发酵技术是发展发酵工业的有效途径之一,不仅是一个重要的技术经济指标,而且也是体现发酵水平的标志。进行浓醪发酵提高设备利用率、节能降耗、提高酒精产量等优点,其中的一个关键问题是选育出耐高酒精浓度、耐高渗透压、产酒精能力强的菌种^[8]。

酒精对酵母细胞的抑制作用很复杂,主要表现在抑制细胞生长、细胞存活性和发酵力^[9]。利用梯度生长测定各菌株在 8%、10%和 12%(V/V)酒精平板上的生长状况见图 1(A)。图 1(A)显示 8%酒精浓度时,各被测菌株间酒精耐受性差异不大;当酒精浓度升至 10%和 12%时,各被测菌株间酒精耐受性差异较大。AS2.1189 和 AS2.1190 在 12%的高浓度酒精平板上仍能表现出较强的生长,而 396 对高酒精浓度比较敏感,在 8%的酒精平板上表现出较弱的生长状态,在 10%和 12%的酒精平板上基本上不生长。

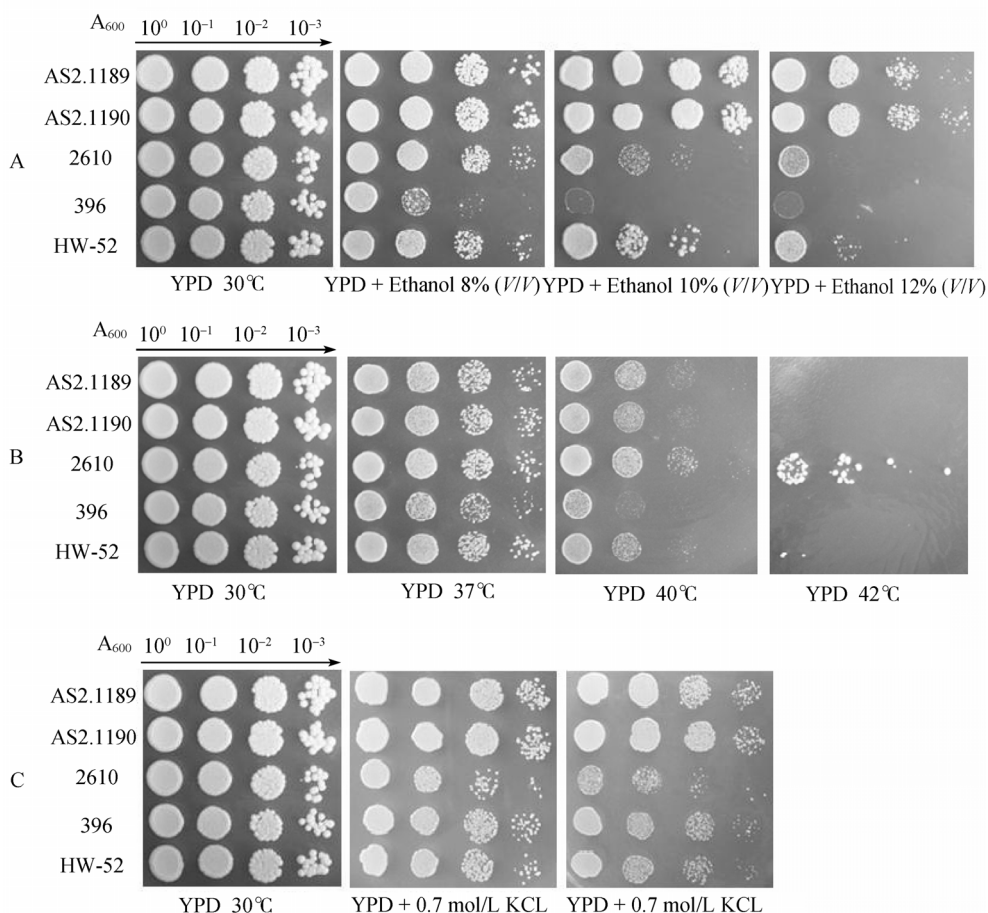


图 1 各菌株对酒精、温度和渗透压的抗性测定结果

Fig. 1 Stress resistance of yeast strains to ethanol, temperature, osmotic pressure

利用梯度生长测定各菌株在 37、40 和 42 下的生长状况见图 1(B), 图中显示各菌株在 37 时生长无明显抑制作用, 温度达到 40 时均呈现热敏感性, 升至 42, 只有 2610 能够维持生长, 其它菌株均不能生长。

利用梯度生长测定各菌株在 0.7 mol/L 和 1.0 mol/L KCl 平板上的生长状况见图 1(C)。图 1(C) 显示各检测菌株渗透压耐受性差异不大, 均表现出较好的生长状态, 其中 AS2.1189 和 AS2.1190 生长状态最好。

2.2 酵母糠醛、苯酚、乙酸耐受性测定

依据代谢途径工程理念, 对酿酒酵母进行木糖代谢途径理性设计, 构建全糖(葡萄糖、木糖、纤维二糖等)发酵产酒精的超级酵母菌株, 是当前纤维素原料生产燃料乙醇的研究热点之一^[10]。由于木质纤维素稀酸水解液中糠醛、酚类化合物、脂肪酸类等抑制物的存在, 对酵母酒精发酵产生抑制作用, 使发酵液中的糖转化乙醇受到严重

限制^[11]。

据LARSSONS报道^[12], 蔗渣纤维水解液中含有糠醛类物质 4.5 g/L, 酚类化合物 2.8 g/L, 脂肪酸类物质 10.1 g/L。本文选择糠醛、苯酚和乙酸作为抑制剂, 对各菌株进行耐受性检测; 根据初步试验结果(结果未显示), 选择抑制剂糠醛、苯酚和乙酸的最高浓度分别为 1.2 g/L、2.0 g/L 和 4.0 g/L。

利用梯度生长测定各菌株在含 0.8 g/L 和 1.2 g/L 糠醛平板的生长状况见图 2(A), 图中显示糠醛对各被测菌株均有较强的抑制作用; 当糠醛浓度达到 1.2 g/L 时, 除 HW-52 生长状况较好外, 其它菌株均受到较强抑制, 培养 72 h 才有微弱的生长。

在含有 1.2 g/L 和 2.0 g/L 苯酚的平板上测定各菌株对苯酚的耐受性, 其生长状况见图 2(A), 图中可以看出 AS2.1189 和 AS2.1190 在含 2.0 g/L 苯酚的平板上仍然能够较好生长, 而 2610 和 396 的受到苯酚的强烈抑制, 表现出微弱的生长。

在含有 3.0 g/L 和 4.0 g/L 乙酸的平板上测定各

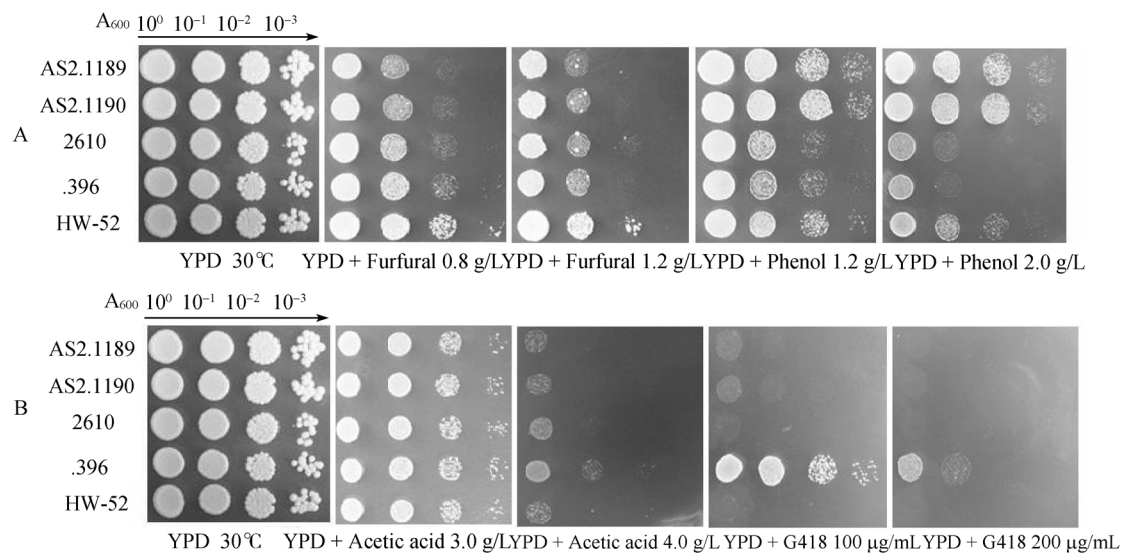


图 2 各菌株对糠醛、苯酚、乙酸和 G418 的抗性测定结果

Fig. 2 Stress resistance of yeast strains to furfural toxicity, acetic acid toxicity, phenol toxicity, and G418 toxicity

菌株对乙酸的耐受性, 其生长状况见图 2(B); 图中显示各菌株都能在 3.0 g/L 乙酸的平板上保持较好的生长状态, 但在 4.0 g/L 乙酸的平板上均受到严重抑制; 只有 396 表现出微弱生长。

2.3 酵母抗生素 G418 耐受性测定

依据代谢途径工程理论, 引入显性标记是实现对酿酒酵母工业菌株分子改造的基础, G418 抗性基因是广泛用于酵母转化系统的方便实用的显性标记^[13]。利用梯度生长试验测定各菌株在含 100 µg/mL 和 200 µg/mL 平板上的生长状况, 见图 2(B)。图 2(B) 显示, 除 396 仍能在 200 µg/mL 的平板上保持微弱生长外, 各菌株在含有 G418 的平板上均不能生长。

综上所述, 所测定的工业酵母菌株对这些逆境条件的耐受性有显著的差别(见表 2), AS2.1189 和

AS2.1190 对测定的乙醇胁迫和高渗胁迫, 以及苯酚毒性表现出较强耐受性; 396 对乙酸毒性和 G418 毒性具有很好的耐受性; 2610 和 HW-52 分别对高温胁迫和糠醛毒性表现出较好的耐受性。

3 讨论

木质纤维原料生产乙醇是未来燃料乙醇的发展方向; 由于木质纤维原料预处理与酶解效率偏低和乙醇生产微生物选育两个瓶颈问题的存在, 使其生产成本较高, 没有经济竞争力。酿酒酵母是传统的乙醇生产菌株, 具有较高的乙醇得率、对一些生长抑制因子具有较高抗性等许多优良特性; 但是, 酿酒酵母不能发酵木糖生产酒精, 需要对其进行代谢途径改造才可以满足需求。基于此, 科研工作者对利用木质纤维原料生产乙醇的工业菌种提出了以下标准: 1、高乙醇产率与得率; 2、高酒精耐受性; 3、生长条件简单, 容易培养; 4、对纤维水解液中的毒性物质有较强的耐受性; 5、在高温或者低 pH 下正常发酵产酒精; 6、能够利用葡萄糖、木糖等纤维水解液中的全糖发酵生产乙醇。

基于以上标准, 瑞典Lund大学的Barbel组对酿酒酵母进行木糖代谢途径改造, 构建得到能够利用葡萄糖和木糖共发酵生产乙醇的重组酵母菌株TMB3001^[14]; 并对其进行驯化、诱变, 选育得到性能比较优良的突变菌株TBM3400^[15]。同时, 美国普渡大学的Nancy Ho.组也进行了相似的研究工作^[16],

表 2 不同工业酵母菌株间耐受性比较	
Table 2 Comparison of the stress resistance among different industrial yeast strains	
胁迫条件 Stress factor	高耐受性菌株 High-resistant strain
乙醇胁迫	AS2.1189、AS2.1190
高温胁迫	2610
高渗胁迫	AS2.1189、AS2.1190
糠醛毒性	HW-52
乙酸毒性	396
苯酚毒性	AS2.1189、AS2.1190
G418 毒性	396

并且对重组菌株申报了专利^[17]。Sonderegger^[18]等对不同的基因重组和突变酿酒酵母菌株,进行了发酵木质纤维素水解糖液产乙醇的特性比较,发现酿酒酵母TMB3400具有强的木糖代谢能力,工业菌株F12对纤维水解液中的毒性物质具有较好的耐受力。总体来说,重组和突变酵母菌株对木糖的利用率偏低,并伴有木糖醇的积累,还达不到商业需求。近些年,乙醇生产微生物选育的重心已经从分子育种转向传统育种,通过驯化、诱变、细胞融合等技术,筛选符合标准的菌种成为研究热点^[19]。

本文所用的糖蜜酿酒酵母,具有耐高渗、耐酒精、耐酸、产酒率高、稳定发酵时间长等优点,一直应用于糖蜜酒精发酵车间,符合木质纤维素生产乙醇的菌株的基本要求。通过平板点滴生长试验测定,结果显示在不同逆境条件下,不同菌株显示出不同的耐受性,为木质纤维生产乙醇的菌株选育提供了详细的表型背景。鉴于以上研究结果,可以把耐受性较好的菌株(如AS2.1189、AS2.1190等)作为出发菌株,进行木糖代谢途径改造,再与其他耐受性较好的酵母菌株(如396、HW-52等)经细胞融合和诱变育种,利用表型差异等方法筛选突变株;选育出集多种耐受性为一体,符合以上标准的商业化工业菌株。

致 谢: 感谢山东大学微生物技术国家重点实验室鲍晓明教授的指导与帮助。

参 考 文 献

- [1] Lee J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Journal of Biotechnology*, 1997, **56**(1): 1–24.
- [2] Sharma SK, Kalra KL, Kocher GS. Fermentation of enzymatic hydrolysate of sunflower stalks for ethanol production and its scale-up. *Biomass and Bioenergy*, 2002, **85**(1): 31–33.
- [3] Sreenath HK, Jeffries TW. Production of ethanol from wood hydrolyzate by yeasts. *Bioresour Technol*, 2000, **72**(2): 253–260.
- [4] 刘向勇, 张小华, 鲍晓明. 酿酒酵母工业菌株胁迫条件耐受性分析. *中国酿造*, 2006, **154**(1): 8–11.
- [5] ATTFIELD PV. Stress tolerance: the key to effective strains of Industrial baker's yeast. *Nat Biotechnol*, 1997, **15** (13): 1351–1357.
- [6] CHEN CS. Water activity-concentration models for solutions of sugars, salts and acids. *Journal of Food Science*, 1989, **54**: 1318–1321.
- [7] 李善斌. 浅谈甘蔗糖蜜酒精发酵生产中值得注意的几个问题. *广西蔗糖*, 2000, **19**(2): 39–42.
- [8] 黄 平, 曹健君, 张肖克, 等. 应用浓醪发酵技术推动酒精行业科学发展. *酿酒科技*, 2005, **131**(5): 108–113.
- [9] 王 滨, 张国政, 路福平, 等. 酵母酒精耐性机制的研究进展. *天津轻工业学院学报*, 2001, **36**(1): 18–22.
- [10] 沈 煜, 王 颖, 鲍晓明, 等. 酿酒酵母木糖发酵酒精途径工程的研究进展. *生物工程学报*, 2003, **19**(5): 636–640.
- [11] Wahlbom CF, Hahn-Hägerdal B. Furfural, 5-hydroxymethyl furfural, and acetoin act as external electron acceptors during anaerobic fermentation of xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng*, 2002, **78**(2): 172–178.
- [12] Larsson S, Cassland P, Jonsson LJ. Development of a *Saccharomyces cerevisia* strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by heterologous expression of laccase. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**(3): 1163–1170.
- [13] Gola S, Martin R, Walther A, et al. New heterologous modules for classical or PCR based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisia*. *Yeast*, 1994, **10**(13): 1793–1808.
- [14] Eliasson A, Christensson C, Wahlbom CF, et al. Anaerobic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* carrying *XYL1*, *XYL2*, and *XKS1* in mineral medium chemostat cultures. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**(8): 3381–3386.
- [15] Wahlbom CF, van Zyl WH, Jonsson LJ, et al. Generation of the improved recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400 by random mutagenesis and physiological comparison with *Pichia stipitis* CBS6054. *FEMS Yeast Res*, 2003, **3**(3): 319–326.
- [16] Ho NWY, Chen ZD, Brainard AP. Genetically engineered *Saccharomyces cerevisiae* yeast capable of effective cofermentation of glucose and Xylose. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**(5): 1852–1859.
- [17] Ho NWY, Chen ZD. Stable recombinant yeasts capable of effective fermentation of both glucose and xylose. PCT Patent No. WO97/42307.
- [18] Sonderegger M, Jeppsson M, Larsson C, et al. Fermentation performance of engineered evolved xylose-fermentation *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Biotechnology and Bioengineering*, 2004, **87**(1): 90–98.
- [19] Martín C, Marcet M, Almázan O, et al. Adaptation of a recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strain to a sugarcane bagasse hydrolysate with high content of fermentation inhibitors. *Bioresour Technology*, 2007, **98**(3): 1767–1773.