

研究报告

混合糖发酵重组酿酒酵母的菌株构建和菊芋秸秆同步糖化发酵研究

程诚^{1Δ} 熊亮^{1Δ} 李勇昊¹ 徐友海³ 孟庆山¹ 刘晨光¹ 赵心清^{2*} 白凤武^{1,2}

(1. 大连理工大学生命科学与技术学院 辽宁 大连 116024)

(2. 上海交大学生命科学技术学院 上海 200240)

(3. 中国石油天然气股份有限公司 吉林石化公司研究院 吉林 吉林 132021)

摘要:【目的】构建可用于纤维素乙醇高效生产的混合糖发酵重组酿酒酵母菌株,并利用菊芋秸秆为原料进行乙醇发酵。【方法】筛选在木糖中生长较好的酿酒酵母 YB-2625 作为宿主菌,构建木糖共代谢菌株 YB-2625 CCX。进一步通过 rDNA 位点多拷贝整合的方式,以 YB-2625 CCX 为出发菌株构建木糖脱氢酶过表达菌株,并筛选得到优势菌株 YB-73。采用同步糖化发酵策略研究 YB-73 的菊芋秸秆发酵性能。【结果】YB-73 菌株以 90 g/L 葡萄糖和 30 g/L 木糖为碳源进行混合糖发酵,乙醇产量比出发菌株 YB-2625 CCX 提高了 13.9%,副产物木糖醇产率由 0.89 g/g 降低至 0.31 g/g,下降了 64.6%。利用重组菌 YB-73 对菊芋秸秆进行同步糖化发酵,48 h 最高乙醇浓度达到 6.10% (体积比)。【结论】通过转入木糖代谢途径以及 rDNA 位点多拷贝整合过表达木糖脱氢酶基因可有效提高菌株木糖发酵性能,并用于菊芋秸秆的纤维素乙醇生产。这是首次报道利用重组酿酒酵母进行菊芋秸秆原料的纤维素乙醇发酵。

关键词: 酿酒酵母, rDNA 位点整合, 纤维素乙醇, 同步糖化发酵, 生物质, 菊芋秸秆

Foundation item: National High-Tech Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2012AA021205, 2012AA101805); National Natural Science Foundation of China (No. 21376043)

***Corresponding author:** Tel: 86-21-34206673; E-mail: xqzhao@sjtu.edu.cn

^ΔThese authors equally contributed to this work

Received: July 29, 2015; **Accepted:** September 26, 2015; **Published online** (www.cnki.net): December 31, 2015

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划) (No. 2012AA021205, 2012AA101805); 国家自然科学基金项目(No. 21376043)

***通讯作者:** Tel: 86-21-34206673; E-mail: xqzhao@sjtu.edu.cn

^Δ共同第一作者

收稿日期: 2015-07-29; **接受日期:** 2015-09-26; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2015-12-31

Construction of mixed-sugar fermenting recombinant *Saccharomyces cerevisiae* and ethanol production from Jerusalem artichoke stalk by simultaneous saccharification and fermentation

CHENG Cheng^{1Δ} XIONG Liang^{1Δ} LI Yong-Hao¹ XU You-Hai³
MENG Qing-Shan¹ LIU Chen-Guang¹ ZHAO Xin-Qing^{2*} BAI Feng-Wu^{1,2}

(1. School of Life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian, Liaoning 116024, China)

(2. School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

(3. Research Institute of Jilin Petrochemical Company, China Petroleum Natural Gas Co. Ltd., Jilin, Jilin 132021, China)

Abstract: [Objective] This study aimed to construct highly efficient recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain for cellulosic bioethanol production from Jerusalem artichoke stalk (JAS). [Methods] *S. cerevisiae* strain YB-2625 was selected as a host strain to construct xylose co-fermenting strain YB-2625 CCX, after which multicopies of xylitol dehydrogenase (XDH) encoding gene were integrated into the rDNA locus of YB-2625 CCX, and the most efficient strain named YB-73 was obtained. Finally, ethanol production from JAS was investigated by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) using YB-73. [Results] YB-73 showed improved ethanol production by 13.9% compared with that of YB-2625 CCX and the xylitol yield of YB-73 was reduced to 0.31 g/g xylose from 0.89 g/g xylose by YB-2625 CCX when fermenting with 90 g/L glucose and 30 g/L xylose. Meanwhile, flocculation of YB-73 was observed in the presence of xylose, and the strain also showed high tolerance towards 5 g/L acetic acid and high temperature. The highest ethanol titer of 6.10% (V/V) was achieved from JAS in the process of SSF using YB-73. [Conclusion] Combination of host selection, introduction of xylose-consuming pathway and multi-copy overexpression of XDH in rDNA locus is a rational strategy to improve cellulosic bioethanol production performance of *S. cerevisiae* using JAS. This is the first report using recombinant *S. cerevisiae* to produce cellulosic ethanol from JAS.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, rDNA locus integration, Cellulosic ethanol, Simultaneous saccharification and fermentation, Biomass, Jerusalem artichoke stalk (JAS)

近年来,利用可再生木质纤维素原料生产燃料乙醇受到全世界范围内的广泛关注。木质纤维素的主要水解产物是葡萄糖,而木糖是水解液中含仅次于葡萄糖的可发酵糖,其在总糖中的比例可达近1/3。但是,常用于乙醇发酵的酿酒酵母缺少有效的木糖利用相关代谢途径^[1]。因此,赋予酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)利用木糖的能力,是实现纤维素乙醇工业化生产的重要环节^[1-2]。过表达木糖还原酶(XR)-木糖醇脱氢酶(XDH)途径是混合糖发酵重组酿酒酵母菌株构建的有效方法^[2]。已有研究表明,适度提高XDH酶活性是提高纤维素乙醇发酵性能的关键^[3-4],而提高XDH编码基因的拷贝数是提高酶活的有效策略。酿酒酵母基因组中具有100-200个核糖体DNA(rDNA)的重复单元^[5],与其

他多拷贝基因过表达所不同的是,rDNA整合多拷贝过表达是一种整合拷贝数可变的过表达方式,可以通过筛选得到性能提高的菌株。

菊芋(Jerusalem artichoke)具有耐寒和耐旱等优点,可在非耕地种植,并可作为生物炼制研究的原料来源^[6-7]。但是,目前还没有利用重组酿酒酵母发酵菊芋秸秆中的混合糖生产乙醇的研究报道。同步糖化发酵(SSF)可以有效降低纤维素乙醇的生产周期,提高纤维素乙醇发酵的生产强度^[8]。提高终点乙醇浓度是降低纤维素乙醇发酵生产成本的关键^[8-9],因此SSF过程中水解出可发酵糖的含量及速率至关重要,一方面需要提供足够的底物浓度,另一方面也需要在发酵过程中保证足够的酶活性。为使SSF的乙醇浓度达到5%-10%(体积比)的工业

化生产要求, SSF 所用的预处理物料浓度通常要接近 30% (质量体积比)^[9]。分批补料是实现高浓度纤维素高效水解及 SSF 的有效方式^[10], 此外, 适当的预酶解也能有效提高菌株的乙醇发酵效率^[11]。

本研究利用从甘蔗渣中分离的酿酒酵母 YB-2625 作为宿主菌株, 构建了混合糖发酵重组酿酒酵母菌株, 研究了 rDNA 多拷贝整合表达 XDH 编码基因对木糖发酵的副产物木糖醇得率的影响。此外, 采用分批补料结合短时间预酶解的方式, 进行了高浓度菊芋秸秆物料同步糖化发酵研究。本研究为高效纤维素乙醇生产菌株的构建以及纤维素乙醇的生产提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒及物料

大肠杆菌 DH5 α 由本实验室保存; 从甘蔗渣中分离的酿酒酵母菌株 YB-2625 由美国农业研究菌种保藏中心(The ARS Culture Collection, USDA)赠送; 工业酿酒酵母 Sc6525 由加拿大滑铁卢大学 Jana Otrubo 教授馈赠; 工业酿酒酵母 Sc4126 以及自絮凝酵母 SPSC01 均为本实验保藏菌株; pRS425-Gh1 质粒为 Jamie H. D. Cate 教授馈赠^[12], 酵母穿梭载体 pUGR 为本实验室保藏。

木糖代谢途径的串联表达载体 pAUR-*PsXR*-*PsXDH*-*ScXK* (以下简称 pAUR-ZQ01) 包含 XR 编码基因 *XYL1* 和 XDH 编码基因(来源于 *Scheffersomyces stipitis* JCM10742) *XYL2* 以及木酮糖激酶 XK 编码基因 *XKS1* (来源于 *S. cerevisiae*) 共 3 个关键酶基因。表达载体的构建参考文献[13]进行。

菊芋秸秆产自江苏盐城, 纤维素含量 31.92%, 半纤维素含量 17.52%; 汽爆-NaOH 联合预处理后菊芋秸秆物料纤维素含量 54.57%, 半纤维素含量 6.54%。

1.2 主要仪器及试剂

瞬间汽爆用 QBS-80B 型工艺试验台, 河南鹤壁正道生物能源公司; Tomy SSX-500 高压蒸汽灭

菌锅, 日本 Tomy Digital Biology 公司; Multiskan GO 分光光度计, Thermo Fisher Scientific 科技公司; Eppendorf 5804R 高速冷冻离心机, 德国艾本德股份公司; 振荡培养箱, 上海知楚仪器有限公司; 2.5 L 发酵罐, 韩国 KoBioTech 公司; 高效液相色谱分析仪, 美国 Waters 公司。

Phusion[®] 高保真 DNA Polymerase 和限制性内切酶购自 New England Biolabs Inc.; 抗生素 Aureobasidin A (AbA) 购自 TaKaRa Biotechnology 有限责任公司; 同步糖化发酵所用纤维素酶 (UTC-AE80) 由山东尤特尔生物科技有限公司惠赠; 蛋白检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; 其他试剂购自上海生工生物工程有限公司。

1.3 培养基

LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母浸粉 5, NaCl 10, 固体培养基添加琼脂粉至 20, 大肠杆菌转化子筛选时添加 100 mg/L 氨苄青霉素; YPD 培养基和 YPGal 培养基参考文献[13]配制; YPD_{X5} 为 YPD 培养基添加 5 g/L 木糖; 种子培养基(g/L): 酵母粉 4, 蛋白胨 3, 葡萄糖 40; 发酵培养基 YPD40_{X20} (g/L): 酵母粉 4, 蛋白胨 3, 葡萄糖 40, 木糖 20; 发酵培养基 YPD90_{X30} (g/L): 酵母粉 4, 蛋白胨 3, 葡萄糖 90, 木糖 30; 酿酒酵母菌转化子的筛选采用 Aureobasidin A (AbA) 或 G418, 终浓度分别为 2.5 mg/L 和 200 mg/L^[13]。

1.4 rDNA 位点整合过表达 XDH 载体的构建

以 rDNA 为整合位点, 过表达木糖醇脱氢酶 (XDH) 的多拷贝载体 pUGR-*XYL2* 的构建引物序列及模板 DNA 见表 1。以 *XYL2*-F-1 和 *XYL2*-R-1 为正、反向引物 PCR 扩增目的基因 *XYL2*, 经 *Spe* I 和 *Hind* III 酶切后与经相同酶切的 pRS425-Gh1 载体连接, 得到 *XYL2* 基因两端分别带有 *PGK1* 组成型强启动子和 *CYC1* 终止子的质粒 pRS425-*XYL2*。然后, 以引物 *XYL2*-F-2 和 *XYL2*-R-2 为正、反向引物, 以 pRS425-*XYL2* 载体为模板, PCR 扩增后得到 *PGK1_p*-*XYL2*-*CYC1_t* 片段; 最后将经 *EcoR* V 单酶切

表 1 pUGR-XYL2 载体构建所用引物
Table 1 Primers used in construction of pUGR-XYL2

引物名称 Primer name	模板 DNA Template DNA	引物序列 Primer sequence (5'→3')
XYL2-F-1	pAUR-ZQ01	GGACTAGTCC ATGACTGCTAACCCTTCCT
XYL2-R-1		CCCAAGCTTGGG TTAATCAGGGCCGTCAATGA
XYL2-F-2	pRS425-XYL2	TCCCGCGGGGACCGCGTGAGTAAGGAAATCT
XYL2-R-2		TCCCGCGGGGATAGGGCGAATTGGGTACCG

和去磷酸化处理的 pUGR 载体与上述 XYL2 表达盒平末端连接, 得到 pUGR-XYL2 载体。所构建载体均经过测序验证。

1.5 重组酵母的构建及筛选

以 YB-2625 菌株为宿主, 采用电转化的方法^[14]将 *Spe* I 线性化的整合载体 pAUR-ZQ01 转化到 YB-2625 基因组中, 经 YPD-AbA 抗性平板和 YPGal 平板二次筛选后^[13], 将所得转化子在 YPD 培养基中活化, 提取基因组后进行 PCR 验证, 验证引物为 XYL2-F 和 XYL2-R (表 1), 验证正确的转化子命名为 YB-2625 CCX。随后将 *Pac* I 酶切线性化的载体 pUGR-XYL2 电转至 YB-2625 CCX 感受态细胞中, 在 G418 抗性平板上进行筛选, 随机挑选 90 个 rDNA 整合过表达 XYL2 基因的转化子, 分别命名为 YB-1-YB-90。转化子于 50 mL 离心管的 5 mL YPD 种子培养基中, 30 °C、200 r/min 培养 24 h 后 3 000×g 离心 3 min, 弃上清后加入 5 mL YPD90X30, 30 °C、200 r/min 发酵 4 d 后, 8 000×g 离心 3 min 取上清检测残余木糖含量。

1.6 蛋白提取及 XDH 酶活测定

取活化的酵母菌培养液 1 mL, 4 °C、8 000×g 离心 5 min 收集菌体, 用 100 mmol/L pH 7.0 PBS 清洗 2 遍, 4 °C、8 000×g 离心 5 min 收集菌体; 用冰预冷的 Extraction buffer (100 mmol/L pH 7.0 PBS, 1 mmol/L PMSF, 0.5 mmol/L DTT, 0.5 mmol/L EDTA) 使细胞重悬; 加入 1/2-2/3 体积的 5 mm 玻璃珠, 用漩涡振荡器以最大转速振荡 1 min, 冰上冷却 1 min, 重复 4-5 次。4 °C、12 000×g 离心 10 min 得粗酶液。参照文献[3]方法测定 XDH 酶活。

1.7 重组菌株的混合糖摇瓶发酵性能比较

将斜面保藏菌种接种至 50 mL YPD 培养基中, 30 °C、150 r/min 培养 24 h 后, 取 2 mL 转接至 100 mL 种子培养基中, 于相同条件培养 24 h; 3 000×g 离心 3 min 收集菌体。将收集的菌体接种至含 90 g/L 葡萄糖和 30 g/L 木糖的 100 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, 30 °C、200 r/min 发酵 60 h, 过程中取样测定发酵液中各组分的浓度。共进行 2 次独立的实验, 每次 3 个平行, 得到可重复性结果。

1.8 重组菌株的混合糖摇瓶发酵性能比较

将-80 °C 甘油保藏菌株在 YPD 培养基中二次活化 24 h 达到稳定期, 调整 OD₆₀₀ 一致后进行 10 倍梯度稀释, 分别取 2 μL 初始菌液以及梯度稀释后的菌液进行点板。YPD 培养基中分别添加 5 g/L 乙酸以及 9% (体积比) 乙醇作为耐性条件, 30 °C 培养, 在 40 h 和 72 h 时观察菌落的生长并拍照比较菌株的乙酸及乙醇耐性差别, 高温耐性比较时采用 40 °C 条件下进行培养, 实验重复 3 次, 结果具有重现性。

1.9 碱处理菊芋秸秆同步糖化发酵

粉碎后的菊芋秸秆物料首先在蒸汽爆破装置中进行汽爆预处理^[15], 物料在 2.8-3.0 MPa 高压饱和水蒸气下维持 90 s。随后, 烘干的汽爆菊芋秸秆物料按固液比 10.0% 在 2.0% NaOH 溶液中于 110 °C 处理 1 h, 再用去离子水洗至 pH 中性, 于 45 °C 烘箱干燥后使用。碱预处理后的菊芋秸秆在 2.5 L 发酵罐中进行预酶解及同步糖化发酵, 工作体积为 1.0 L。采用分批补料方式进行物料预酶解, 初始物料量为 75 g, 分别在预酶解第 4、8、12 和 24 h 补

加物料, 每次补加物料 50 g, 到预酶解 24 h 时加入总物料量为 275 g。酶解过程在 50 °C、400 r/min 条件下进行, 并通过流加 1 mol/L NaOH 控制 pH 为 4.8。为控制工作体积为 1.0 L, 初始加入去离子水及酶液总体积为 900 mL。按 20 FPU/g 总物料量加入纤维素酶开始酶解。预酶解 24 h 后, 将温度冷却至 37 °C, 转速降至 300 r/min, 以 0.01 vvm 通气量通入无菌空气, 补加 20×氮源至酵母浸粉终浓度为 4 g/L, 蛋白胨 3 g/L。将经种子培养基活化 12 h 的酿酒酵母细胞于 3 000×g 离心 5 min, 去除培养基后接入发酵罐中, 接种后初始细胞浓度约为 1.0 g/L。同步同化发酵时间为 60 h。每 12 h 取样并用高效液相色谱 (HPLC) 进行样品组分分析测定。木糖利用率计算方法为: 水解液中木糖最高浓度与发酵结束时的木糖浓度的差值与水解液中木糖最高浓度的比值。乙醇生产强度计算方法为发酵过程中最高乙醇产量与达到这一产值所需时间的比值。该实验重复 2 次, 结果具有重现性。

1.10 发酵样品组分分析

发酵样品组分分析采用高效液相色谱, 色谱柱为有机酸分析柱 (300 mm×7.8 mm Aminex HPX-87H, Bio-Rad, Hercules, CA), 进样量 20 μL, 以 5 mmol/L 硫酸溶液为流动相, 流速为 0.5 mL/min, 示差检测器温度和柱温均为 50 °C。

2 结果与分析

2.1 重组菌株的构建及 XDH 酶活检测

以 YB-2625 菌株为宿主, 将 *XYL1*、*XYL2* 和 *XKS1* 三个基因通过串联整合方式插入到 YB-2625 基因组的 *YPRCdelta15* 位点, 得到混合糖发酵重组

酵母 YB-2625 CCX, 经过 PCR 验证证明为正确的转化子。YB-2625 CCX 在 YPD40X20 培养基发酵 6 d 后木糖利用率可达到 93.72%, 但其木糖醇产率高达 0.91 g/g 木糖。进一步将 pUGR-*XYL2* 载体转化到 YB-2625 CCX 宿主中, 得到了 90 个 rDNA 整合过表达 *XYL2* 基因的转化子。经过发酵初筛, 得到一株木糖代谢能力优于其他转化子的重组酿酒酵母 YB-73。对 YB-73 以及初始木糖重组菌株 YB-2625 CCX 的 XDH 的酶活进行了检测, 结果表明, 通过多拷贝整合 XDH 酶活由 0.098 U/mg 增加至 0.215 U/mg 总蛋白, XDH 酶活是对照菌株的 2.19 倍, 证明 rDNA 整合有效提高了木糖醇还原酶的酶活。

2.2 重组菌株的混合糖发酵性能比较

对野生型菌株 YB-2625、木糖重组菌株 YB-2625 CCX 以及 YB-73 菌株的混合糖摇瓶发酵性能进行了比较(表 2)。发酵 60 h 时 YB-73 菌株的乙醇产量可达到 39.21 g/L, 高于出发菌株 YB-2625 和初始木糖重组菌 YB-2625 CCX, 其乙醇产量分别为 34.95 g/L 和 34.44 g/L。YB-73 菌株木糖利用率达 52.67%, 总糖利用率可达 88.15%。值得指出的是, YB-73 的副产物木糖醇产率比初始重组菌 YB-2625 CCX 下降了 64.6%, 表明过表达 XDH 显著降低了木糖醇的得率。

2.3 YB-2625 菌株环境胁迫耐性和絮凝性

在发酵罐中, YB-73 菌株以 YPX90X30 的混合糖发酵培养基进行发酵时, 菌液有明显的絮凝现象, 取发酵终点 72 h 的菌液置于试管中检测菌体悬浮液的絮凝沉降情况如图 1 所示, 大部分菌体可于

表 2 不同基因改造阶段菌株 60 h 混合糖发酵性能比较
Table 2 Comparison of mixed-sugar fermentation in 60 h for strains with different gene modification

菌株 Strains	木糖消耗量 $X_{consumed}$ (g/L)	总糖消耗率 R_{total} (%)	木糖消耗率 R_{xylose} (%)	木糖醇产率 $Y_{xylitol}$ (g/g)	木糖醇产量 $P_{xylitol}$ (g/L)	乙醇产量 P_{EtOH} (g/L)
YB-2625	14.10±0.35	86.16±0.28	44.7±1.11	0.91±0.01	12.79±0.14	34.95±0.18
YB-2625 CCX	14.84±0.08	86.75±0.06	47.07±0.25	0.89±0.01	13.18±0.16	34.44±0.11
YB-73	16.61±0.15	88.15±0.12	52.67±0.48	0.31±0.01	5.21±0.09	39.21±0.24

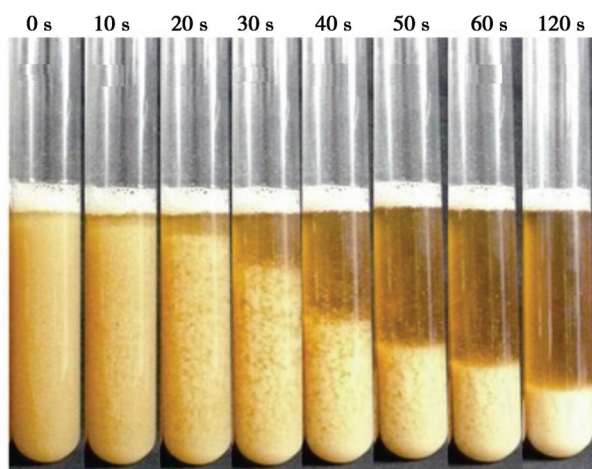


图1 YB-73 菌株在发酵罐中的 72 h 发酵样品絮凝沉降性能检测

Figure 1 Determination of the flocculation ability of YB-73 at 72 h in the bioreactor

2 min 时迅速沉降,说明该菌种具有良好的絮凝性。

本实验室早期研究结果表明,絮凝特性对于酿酒酵母的乙醇耐受性具有促进作用^[16],近期研究也表明,絮凝基因的过表达可明显提高工业酿酒酵母 CE6 在乙酸胁迫条件下的发酵能力^[17]。为验证具有一定絮凝性的 YB-2625 菌株是否具有良好的环境胁迫耐受性,将野生型菌株 YB-2625 与本实验室保藏的工业酵母 *Sc4126* 和 *Sc6525* 以及自絮凝酵母

SPSC01 在 5 g/L 乙酸、9%乙醇以及 40 °C 高温平板上的耐性进行比较。如图 2 所示, YB-2625 与其他菌株相比,在 5 g/L 乙酸平板上的生长明显好于具有较高耐性的工业酿酒酵母菌株 *Sc4126* 和 *Sc6525*,仅略弱于絮凝酵母 SPSC01,且 40 °C 高温耐性优于乙醇工业菌株 *Sc4126* 和 *Sc6525*,与自絮凝酵母 SPSC01 基本一致。不同菌株在 9% (体积比)乙醇平板上的生长差别不大(结果未显示)。以上研究结果证明, YB-2625 野生型酵母是进行进一步工业应用研究的良好宿主。

2.4 菊芋秸秆同步糖化发酵生产乙醇的研究

采用重组酿酒酵母 YB-73 对汽爆-碱预处理的菊芋秸秆进行同步糖化乙醇发酵,结果如图 3 所示。通过分批补料,发酵体系中加入的总物料量达到了 27.5% (质量体积比),实现了高固液比的同步糖化发酵。预糖化过程的起始阶段,水解液中糖浓度迅速上升,随后增加速率稍有降低,经过 24 h 预酶解,水解液中葡萄糖浓度达到 60.01 g/L,木糖浓度为 11.08 g/L,但此时仍有大部分物料未被酶解。向发酵罐中接入酵母细胞后,进入同步糖化发酵阶段。接种后 12 h 内,葡萄糖被迅速消耗并生成 36.73 g/L 乙醇,而木糖浓度在发酵过程中持续降低,木糖浓

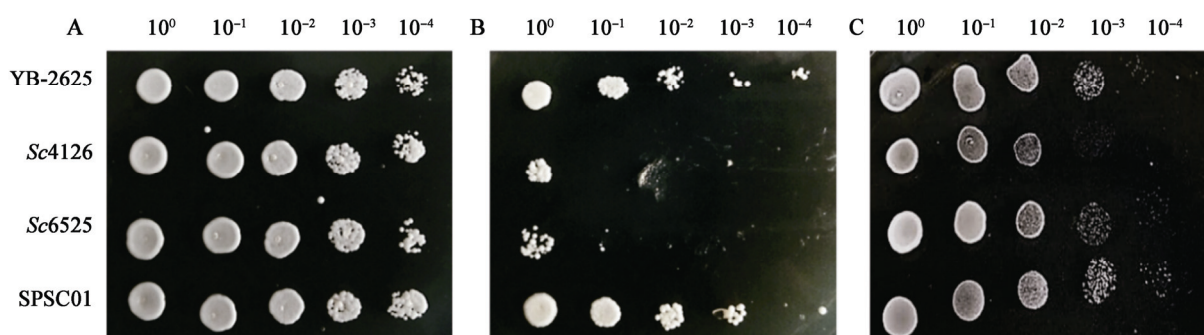


图2 不同酿酒酵母菌株的乙酸和高温耐性比较

Figure 2 Comparison of the acetic acid and thermo-tolerance of different *S. cerevisiae* strains

注: 平板依次为对照(A)、5 g/L 乙酸中培养 72 h (B)和 40 °C 培养 36 h (C)条件下各菌株的生长情况。梯度稀释依次为原液的 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 倍。

Note: Cell growth of the investigated strains at the control condition (A), with 5 g/L acetic acid supplementation for 72 h (B), and at 40 °C for 36 h (C), respectively on agar plates was presented. Serial dilutions stand for 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} and 10^{-4} fold of the original solution, respectively.

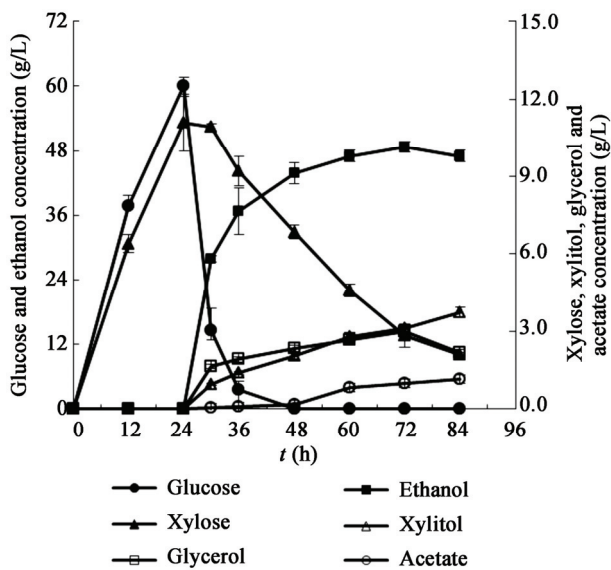


图3 碱预处理菊芋秸秆同步糖化发酵结果

Figure 3 Simultaneous saccharification and fermentation of alkali-pretreated Jerusalem artichoke stalk

注: 图中 24 h 为预糖化过程。

Note: Time before 24 h indicates pre-hydrolysis period.

度较最高点下降了 81.02%。乙醇浓度从发酵开始到 48 h 持续上升, 并在 48 h 达到最高点 48.67 g/L, 乙醇生产强度达 1.01 g/(L·h)。60 h 木糖浓度降至最低 (2.10 g/L), 发酵 60 h 木糖醇浓度达到 3.74 g/L。主要副产物甘油也有少量积累, 其中 60 h 甘油浓度为 2.19 g/L。

3 讨论

宿主的遗传背景对重组酵母的木糖发酵性能具有深刻的影响^[13,18-19], 因此, 选择性能优良的宿主对纤维素乙醇发酵效率至关重要。性能良好的宿主除可在混合碳源中具有较快的生长速率外, 还具有较强的胁迫耐受能力, 有助于维持其在水解液中良好的发酵活性^[20-21]。YB-2625 菌株是从甘蔗渣中分离的酿酒酵母菌株^[22], 本文首次对该菌株的胁迫耐受性进行了研究, 并发现该菌株具有较高的乙酸耐受能力, 在含 5 g/L 的平板上生长良好。高浓度乙酸对细胞的生长以及发酵都有一定的抑制作用^[23], YB-73 较好的耐性有利于该菌株在含有乙酸、糠醛和羟甲基糠醛等抑制物的木质纤维素水解液中发

酵生产乙醇。此外, 我们还发现 YB-2625 菌株在以葡萄糖为唯一碳源培养和以葡萄糖-木糖混合糖进行发酵时均有具有一定的絮凝性。文献[24]报道导入带有不同突变的 *FLO1* 基因获得的具有较强絮凝性能的 CEN.PK113-5D 菌株对纤维素水解液中的抑制物糠醛具有更高的耐性, 其己糖的消耗速率也快于非絮凝对照菌株。因此, 本文构建的新型混合糖发酵菌株具有良好的应用前景。

采用多拷贝整合 *XDH* 基因可提高重组菌株的木糖代谢能力^[25], 本文通过在 rDNA 位点多拷贝整合 *XDH* 也得到同样的结果。重组菌株 YB-73 的 *XDH* 酶活和混合糖发酵能力相对于出发菌株均有明显提高, 而副产物木糖醇产率则下降了 64.6%。值得指出的是, 以往的 rDNA 多拷贝整合载体序列通常很长且带有多余的载体骨架, 如将 *XI* 和 *XKS1* 基因或者单独将 *XYL1* 基因与 rDNA 相连所构建的载体分别为 14 kb 和 10 kb^[26-27], 本研究设计构建的多拷贝载体 pUGR-*XYL2*, 可在转化前通过限制性内切酶切除载体骨架。

韩国学者以菊芋块茎和稀酸处理的菊芋秸秆 (全植株) 为原料, 以 *Kluyveromyces marxianus* 为发酵菌株, 在菊芋秸秆含量和菊芋块茎加料量分别为 10% (质量体积比) 和 8% (质量体积比) 时, 发酵 30 h 乙醇产量可达 45.3 g/L, 乙醇产率为 0.252 g/g^[7]。由于目前菊芋块茎已被开发成重要的果糖基保健食品原料来源^[6], 因此不适宜作为生物能源生产的原料, 将菊芋秸秆转化为生物能源才更具有实际应用价值。本研究构建了重组酿酒酵母 YB-73 菌株, 并对汽爆-碱联合预处理的菊芋秸秆进行了同步糖化发酵, 首次尝试了将能利用木糖的重组酿酒酵母用于菊芋秸秆的燃料乙醇生产。通过采用分批补料结合预酶解的方式进行高浓度物料的 SSF, 保证了纤维素水解效率, 乙醇发酵的终点浓度和生产强度分别达 48.67 g/L (6.10%, 体积比) 和 1.01 g/(L·h)。值得指出的是, 由于使用了能利用木糖的重组酿酒酵母菌株, 不仅获得了高浓度的乙醇, 还有效提高了底物中可发酵糖的利用率, 木糖的利用率超过

80%，而韩国学者没有研究木糖的利用^[7]。此外，韩国学者采用分步糖化发酵的方法利用菊芋秸秆中的葡萄糖^[7]，而本研究采用了同步糖化发酵策略，节省了水解液大量制备的成本和人力消耗。本文的研究结果为进一步利用所构建的重组菌株进行玉米秸秆、稻草等其他纤维素原料的乙醇发酵提供了基础。致谢：感谢山东尤特尔生物科技有限公司和诺维信(中国)生物技术有限公司提供纤维素酶。感谢课题组硕士研究生马翠、陈洪奇和于欣水在酿酒酵母菌株环境胁迫耐受性研究中的协助。

参考文献

- [1] Matsushika A, Inoue H, Kodaki T, et al. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 84(1): 37-53
- [2] Kim SR, Park YC, Jin YS, et al. Strain engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced xylose metabolism[J]. Biotechnology Advances, 2013, 31(6): 851-861
- [3] Kim SR, Skerker JM, 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] Zha J, Hu ML, Shen MH, et al. Balance of *XYL1* and *XYL2* expression in different yeast chassis for improved xylose fermentation[J]. Frontiers in Microbiology, 2012, 3: 355
- [5] Petes TD. Yeast ribosomal DNA genes are located on chromosome XII[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1979, 76(1): 410-414
- [6] Li YH, Zhang XY, Cheng C, et al. Exploration of the process for fuel ethanol production from Jerusalem artichoke whole plant [J]. Biotechnology & Business, 2014(6): 23-29 (in Chinese) 李勇昊, 张晓月, 程诚, 等. 菊芋全植株生产燃料乙醇的工艺探讨[J]. 生物产业技术, 2014(6): 23-29
- [7] Kim S, Kim CH. Evaluation of whole Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) for consolidated bioprocessing ethanol production[J]. Renewable Energy, 2014, 65: 83-91
- [8] Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2002, 66(3): 506-577
- [9] Zhang J, Chu DQ, Huang J, et al. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation at high corn stover solids loading in a helical stirring bioreactor[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2010, 105(4): 718-728
- [10] Yang MH, Li WL, Liu BB, et al. High-concentration sugars production from corn stover based on combined pretreatments and fed-batch process[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(13): 4884-4888
- [11] Jin MJ, 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
- [12] Ha SJ, Galazka JM, Kim SR, et al. Engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of simultaneous cellobiose and xylose fermentation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(2): 504-509
- [13] Zuo Q, Zhang MM, Cheng C, et al. Comparison of glucose/xylose cofermentation in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains using different hosts[J]. Microbiology China, 2014, 41(7): 1270-1277 (in Chinese) 左颀, 张明明, 程诚, 等. 不同宿主来源的重组酿酒酵母混合糖代谢比较[J]. 微生物学通报, 2014, 41(7): 1270-1277
- [14] Thompson JR, Register E, Curotto J, et al. An improved protocol for the preparation of yeast cells for transformation by electroporation[J]. Yeast, 1998, 14(6): 565-571
- [15] Liu CG, Liu LY, Zi LH, et al. Assessment and regression analysis on instant catapult steam explosion pretreatment of corn stover[J]. Bioresource Technology, 2014, 166: 368-372
- [16] Hu CK, Bai FW, An LJ. Effect of flocculence of a self-flocculating yeast on its tolerance to ethanol and the mechanism[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2005, 21(1): 123-128 (in Chinese) 胡纯铿, 白凤武, 安利佳. 絮凝特性对自絮凝颗粒酵母耐酒精能力的影响及作用机制[J]. 生物工程学报, 2005, 21(1): 123-128
- [17] Du ZL, Cheng YF, Zhu H, et al. Improvement of acetic acid tolerance and fermentation performance of industrial *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of flocculent gene *FLO1* and *FLO1c*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2015, 31(2): 231-241 (in Chinese) 杜昭励, 程艳飞, 朱卉, 等. 絮凝基因 *FLO1* 及 *FLO1c* 高表达提高工业酿酒酵母乙酸耐受性及发酵性能[J]. 生物工程学报, 2015, 31(2): 231-241
- [18] Feng XY, Zhao HM. Investigating host dependence of xylose utilization in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains using RNA-seq analysis[J]. Biotechnology for Biofuels, 2013, 6: 96
- [19] Li HX, Wu ML, Xu LL, et al. Evaluation of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains as the chassis cell for second-generation bioethanol production[J]. Microbial Biotechnology, 2015, 8(2): 266-274
- [20] Demeke MM, Dietz H, Li YY, 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(1): 89
- [21] Zhao XQ, Bai FW. Yeast flocculation: new story in fuel ethanol production[J]. Biotechnology Advances, 2009, 27(6): 849-856
- [22] Hector RE, Dien BS, Cotta MA, et al. Engineering industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for xylose fermentation and comparison for switchgrass conversion[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2011, 38(9): 1193-1202
- [23] Giannattasio S, Guaragnella N, Ždralević M, et al. Molecular mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* stress adaptation and programmed cell death in response to acetic acid[J]. Frontiers in Microbiology, 2013, 4: 33
- [24] Westman JO, Mapelli V, Taherzadeh MJ, et al. Flocculation causes inhibitor tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* for second-generation bioethanol production[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(22): 6908-6918
- [25] Ma TY, Lin TH, Hsu TC, et al. An improved method of xylose utilization by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2012, 39(10): 1477-1486
- [26] Li M, Ma T, Sheng JZ, et al. Construction of the industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain expressing xylose reductase gene efficiently and primary study on its xylitol fermentation[J]. Food and Fermentation Industries, 2006, 32(1): 1-5 (in Chinese) 李敏, 马涛, 生举正, 等. 稳定高效表达木糖还原酶基因工业酿酒酵母的构建及木糖醇发酵的初步研究[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(1): 1-5
- [27] Shen Y, Wang Y, Shi WL, et al. Construction of industrial *Saccharomyces cerevisiae* expressing xylose-metabolizing genes in XI pathway[J]. China Biotechnology, 2005, 25(9): 69-73 (in Chinese) 沈煜, 王颖, 史文龙, 等. 酿酒酵母工业菌株中 XI 木糖代谢途径的建立[J]. 中国生物工程杂志, 2005, 25(9): 69-73