

• 生物育种与工艺优化 •

耐高渗克鲁斯假丝酵母的耐受性

吴娜莎, 孙亚琴, 修志龙*

大连理工大学生物工程学院, 辽宁 大连 116024

吴娜莎, 孙亚琴, 修志龙. 耐高渗克鲁斯假丝酵母的耐受性[J]. 生物工程学报, 2024, 40(3): 908-920.

WU Nasha, SUN Yaqin, XIU Zhilong. Tolerance of hyperosmolar *Candida krusei*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(3): 908-920.

摘要: 利用工业微生物将木质纤维素转化为具有高附加值的化工原料, 是实现碳中和及可持续生物经济的重要途径。经预处理的木质纤维素酶解液中往往含有糖、盐、酚/醛等多种物质, 直接发酵需要微生物有较强的耐受性。本文通过考察克鲁斯假丝酵母(*Candida krusei*)对底物、盐、高温冲击的耐受性, 进一步验证耐高渗假丝酵母直接利用海水中预处理的巨菌草(*Pennisetum sinense* grasses)酶解液进行发酵的可能性。结果表明, 适应性驯化的克鲁斯假丝酵母可以耐受 200 g/L 的葡萄糖, 具有耐受高渗的能力; 用海水替代淡水、不灭菌发酵的甘油产量较淡水灭菌发酵提高了 109%; 发酵 32 h 时热冲击结合 48 h 时引入 10 g/L 亚硫酸钠, 葡萄糖转化为甘油的产率为 0.37 g/g, 比对照组提升了 225%; 用海水中预处理的巨菌草酶解液发酵, 葡萄糖生成甘油及乙醇的总转化率可达 0.45 g/g。耐高渗克鲁斯假丝酵母对底物、盐、温度表现出较强的适应性, 不仅能直接利用复杂的木质纤维素酶解液, 还对其表现出较强的耐受性, 为利用木质纤维素生产生物基化学品提供了候选菌株。

关键词: 耐高渗假丝酵母; 耐受性; 海水发酵; 木质纤维素; 甘油; 乙醇

Tolerance of hyperosmolar *Candida krusei*

WU Nasha, SUN Yaqin, XIU Zhilong*

School of Bioengineering, Dalian University of Technology, Dalian 116024, Liaoning, China

Abstract: The utilization of industrial microorganisms for the conversion of lignocellulose into high value-added chemicals is an essential pathway towards achieving carbon neutrality and promoting sustainable bioeconomy. However, the pretreated lignocellulase hydrolysate often contains various sugars, salts, phenols/aldehydes and other substances, which requires microorganisms to possess strong tolerance for direct fermentation. This study aims to investigate

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFA0911802)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFA0911802).

*Corresponding author. E-mail: zhixiu@dlut.edu.cn

Received: 2023-06-13; Accepted: 2023-09-26; Published online: 2023-11-03

the tolerance of *Candida krusei* to substrate, salt, and high temperature shock, in order to validate its potential for utilizing the enzymatic hydrolysate of *Pennisetum giganteum* in seawater for fermentation. The experimental results showed that the adaptively domesticated *C. krusei* exhibited tolerance to glucose at a concentration of 200 g/L and became a hypertonic strain. When seawater was used instead of freshwater without sterilization, the yield of glycerol in fermentation was 109% higher than that in freshwater with sterilization. Moreover, the combined thermal shock at 32 hours of fermentation and addition of 10 Na₂SO₃ at 48 hours resulted in a yield of glycerol to glucose 0.37 g/g, which was 225% higher than the control group. By fermenting the enzymatic hydrolysate of *P. giganteum* pretreated in seawater, the total conversion rate of glucose into glycerol and ethanol reached 0.45 g/g. This study indicates that hypertonic *C. krusei* exhibits remarkable adaptability to substrate, salt, and temperature. It not only can directly utilize complex lignocellulosic hydrolysates, but also exhibits strong tolerance to them. Therefore, it provides a potential candidate strain for the production of bio-based chemicals using lignocellulosic processes.

Keywords: hypertonic *Candida krusei*; tolerance; fermentation in seawater; lignocellulose; glycerol; ethanol

木质纤维素是地球上最为丰富的可再生资源之一, 具有环保可再生、利用率高等优点^[1], 使用木质纤维素代替石油天然气等不可再生资源是大势所趋, 不仅可以减少污染还能实现资源可再生和循环利用^[2]。经酸、碱、蒸汽或氨气等方式预处理后的木质纤维素, 被高效的纤维素酶降解为葡萄糖, 再利用工业微生物发酵将糖转化为有机酸、醇、酮等化学品、能源物质或聚合物单体, 部分取代石油、煤炭、天然气为原料的化学品, 是实现碳中和及可持续生物经济的重要途径。巨菌草(*Pennisetum sinense* grasses)隶属被子植物门、单子叶植物纲、禾本科和狼尾草属, 是多年生直立丛生型植物, 原产于北非, 较强的环境适应性使其可以在边际土地生长, 在我国南北方都有规模化种植, 具有生长快、生物量大、粗蛋白和糖分含量高、抗性强、对环境的适应力强等优点^[3]。一年内最高株可达 7 m, 鲜草年产量最高达 525 t/hm², 生长 7 个月的巨菌草中纤维素、半纤维素和木质素的含量分别为 44%、26% 和 16%^[4], 因此巨菌草是一种有待开发的高产优质生物质原料。

甘油是一种重要的平台化合物, 广泛应用于食品、制药、化妆品、油漆、纸张、纺织品、皮革和炸药等领域, 预期 2024 年全球甘油市场将达到 50 亿美元^[5]。化学法合成甘油存在设备投资大、成本较高等缺点; 微生物发酵法生产甘油具有操作简单、环境友好等优点, 近些年来备受青睐。生物乙醇是当今世界上消耗最多的生物燃料之一^[6], 可减少对不可再生化石燃料的依赖, 提高国家的能源安全。使用丰富的可再生生物质资源生产甘油及乙醇, 在工业上具有广阔前景。

耐高渗酵母是发酵行业的优良菌种, 能通过糖酵解等途径将葡萄糖转化为甘油及乙醇。工业发酵过程中常见问题是发酵环境多变, 如高温、高渗、代谢产物积累等胁迫, 严重影响菌株的生长与生产性能。在工业发酵过程中由于天气原因或细胞新陈代谢旺盛造成发酵温度升高会影响菌种性能, 目前常使用人工降温进行冷却, 往往造成成本增加^[7], 另外造成工业上发酵成本增加的原因还有底物成本及灭菌能耗。如果使用价格低廉的底物并减少过程中淡水的使用, 同时降低灭菌带来的能耗, 则可能实现低成本的生产^[8]。

使用资源丰富的木质纤维素转化为生物基化学品可有效降低成本;利用海水进行发酵可以减少灭菌过程耗能、节约发酵过程中的淡水资源。

菌种的鲁棒性是指该菌种在受到外部环境胁迫等干扰因素时仍能保持其结构及功能的稳定性^[9]。提高菌种的耐受性,使其在多变的环境中仍能保持稳定性能,在发酵工艺中至关重要。木质纤维素经预处理、酶解后的溶液中常含有较多杂质,因此选择一株环境适应性强的菌种是后续发酵的重中之重。耐高渗酵母具有较好的耐受性,利用其发酵生产甘油的研究比较多,如:江南大学工业微生物研究中心筛选到一株耐高渗的甘油生产菌株,好氧发酵甘油产量能达到 130 g/L,转化率达 63%,工业化生产产量可达 110–120 g/L,转化率可达 58%^[10];唐军等^[11]使用克鲁斯假丝酵母(*Candida krusei*)分批发酵,最终的甘油总得率为 0.377 g/g,使用补料分批培养获得甘油得率可提高 0.058 g/g;刘永强等^[12]发现使用游离耐高渗酵母细胞反复分批发酵法生产甘油,在反复分批发酵 12 个批次中平均甘油质量分数为 7.1%,平均耗糖转化率可达 35.5%。甘油是一种较为理想的耐高渗透压介质,当环境渗透压升高时,耐渗酵母将合成并在胞内积累大量的多元醇,用来维持细胞内外的渗透压平衡^[10,13]。

本文通过底物浓度、盐离子、高温冲击等条件对克鲁斯假丝酵母的耐受性进行探究,考察使用海水发酵的可能性,进一步验证其直接利用廉价木质纤维素酶解液进行发酵的可能性。为木质纤维素生产生物基化学品提供高耐受性的候选菌株。

1 材料与amp;方法

1.1 菌种

克鲁斯假丝酵母(*Candida krusei*, 保藏编号: CICC 1722), 购自中国工业微生物菌种保

藏管理中心。

1.2 培养基

固体培养基(g/L): 工业葡萄糖 100, 玉米浆 5, 尿素 2, 琼脂 20。种子培养基(g/L): 工业葡萄糖 100, 玉米浆 5, 尿素 2。发酵培养基(g/L): 工业葡萄糖 200, 玉米浆 5, 尿素 2。以上培养基均为自然 pH, 经 115 °C 灭菌后使用, 尿素溶液用 0.22 μm 滤膜过滤灭菌。

海水培养基: 使用的海水取自辽宁省大连市星海广场。对海水进行抽滤后保存, 使用电导率仪对海水盐含量进行测定, 折合成氯化钠浓度为 28 g/L。向海水中加入 5 g/L 玉米浆, 2 g/L 尿素, 以及葡萄糖等碳源, 不灭菌直接接种发酵。

盐酸调节 pH 的酶解液及其培养基: 使用 2% NaOH 进行高温预处理巨菌草 3 h 后^[14], 真空过滤, 收集过滤后的残渣, 用盐酸调节 pH 至 4.8, 再加入 45 FPU/g CTec2 纤维素酶, 在 45 °C 摇床进行酶解处理^[15]。酶解 48 h 后煮沸灭活, 得到巨菌草酶解液, 再加入 5 g/L 玉米浆、2 g/L 尿素, 不灭菌直接接种发酵。

柠檬酸调节 pH 的酶解液及其培养基: 预处理及酶解步骤同上述, 过滤后将残渣使用海水冲洗至中性, 再用柠檬酸缓冲液(50 mmol/L)调节 pH 进行酶解。后续步骤同上。

1.3 培养和发酵方法

菌种纯化与保藏: 将驯化至能耐受 200 g/L 的菌液涂布平板, 当固体平板上有菌落长出时, 挑取菌落, 重复平板划线 2 次以纯化单菌, 将完成纯化的单菌接种至种子培养基中, 培养 12 h 后转接保种, 取 1 mL 菌液转移至装有 1 mL 40% (体积分数)甘油溶液的 2 mL 灭菌离心管中, 混合均匀后保藏于 -80 °C 冰箱中。菌种每隔 6 个月进行传代活化复壮一次。

种子培养: 接种保藏菌种 2 mL (含 1 mL 甘油)至装液量 50 mL 的 250 mL 锥形瓶中, 使用透

气膜, 于 30 °C、200 r/min 摇床进行种子培养。

发酵培养: 种子培养 24 h 后, 以体积分数 2% 的接种量接种于装液量 50 mL 的发酵培养基中, 使用透气膜, 于 30 °C、200 r/min 摇床中发酵培养。

菌种实验室适应性进化(adaptive laboratory evolution, ALE): 对购买的菌种进行递增葡萄糖浓度连续传代, 葡萄糖浓度梯度设置为 80、90、100、120、140、160、180 g/L 和 200 g/L。

高温冲击耐性考察: 先将待热冲击的摇瓶放入 50 °C 的恒温水浴锅中快速升温约 1–2 min, 使发酵液温度接近 40–45 °C; 再将摇瓶分别置于所需温度的恒温摇床中, 维持 30 min^[16]。

巨菌草酶解液发酵: 种子培养 24 h 后, 将体积分数 2% 的菌液接种于装液量 50 mL 的巨菌草酶解液培养基中, 于 30 °C、200 r/min 摇床中发酵培养。

1.4 分析方法

1.4.1 菌种生物量测定

将待测样品稀释适当倍数后, 以蒸馏水为空白对照, 利用分光光度计测定其在 600 nm 处的吸光值。

1.4.2 葡萄糖含量测定

使用生物传感分析仪 SBA-50B 对样品中的葡萄糖浓度进行测定。

1.4.3 甘油及乙醇含量测定

甘油及乙醇的含量通过高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC) 进行测定。

HPLC 设备及检测条件: 采用 Waters 高效液相色谱法折光示差检测器检测, 色谱柱为 BioRad HPX-87H 柱, 柱温 55 °C。流动相为 5 mmol/L H₂SO₄ 溶液, 流速为 0.6 mL/min, Waters 2414 示差检测器, 检测器温度 35 °C, 进样量 20 μL^[17]。

2 结果与分析

2.1 克鲁斯假丝酵母的底物耐受性

为验证克鲁斯假丝酵母的底物耐受性, 按上述 ALE 方法, 逐步提高葡萄糖浓度对耐渗假丝酵母连续传代培养; 实验结果表明, 适应性驯化的克鲁斯假丝酵母可以耐受 200 g/L 的葡萄糖, 具有耐受高渗的能力。在 120 h 内可消耗 200 g/L 葡萄糖, 产生甘油 23 g/L, 转化率为 0.12 g/g; 产生乙醇 54 g/L, 转化率达 0.27 g/g (图 1); 二者合计转化率为 0.39 g/g。底物浓度对该耐渗酵母产甘油及乙醇存在相关调节作用, 在低糖浓度下偏向于产乙醇, 高糖浓度下产甘油, 这是因为耐渗酵母具有较好的渗透压耐受性, 当受到糖浓度胁迫时, 甘油的形成被充分诱导, 在细胞内积累甘油用于平衡细胞内外的渗透压, 因而表现出较好的产甘油优势。

2.2 耐高渗克鲁斯假丝酵母的耐盐性

为验证盐类小分子对耐渗酵母产甘油是否有促进效果, 设置氯化钠浓度梯度进行实验, 在发酵培养基培养 48 h (即指数生长后期) 向锥形瓶中分别加入 10、20、30 g/L 氯化钠, 相同

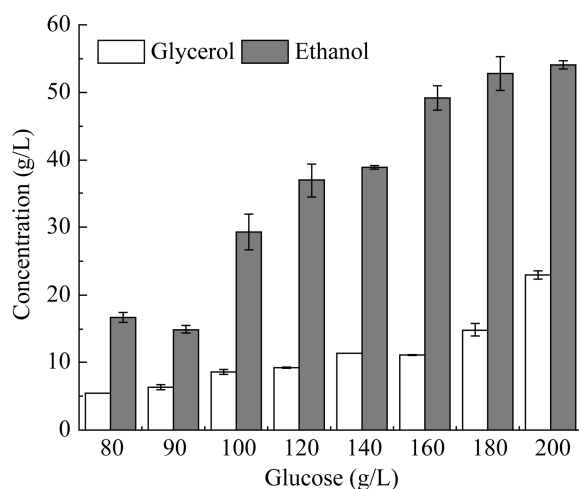


图 1 不同葡萄糖浓度发酵产物浓度

Figure 1 Concentration of fermentation products at various glucose concentrations.

条件下继续培养。实验结果表明,在耐渗假丝酵母发酵指数生长后期向培养基中加入适量的氯化钠能促进甘油的生产(图 2),添加 20 g/L 氯化钠效果最佳,产生甘油 27 g/L,转化率达 0.14 g/g,产生乙醇 44 g/L,转化率达 0.23 g/g。通过 HPLC 检测,加入氯化钠的发酵过程中除产生乙醇外无其他副产物生成;对照组产生甘油 20 g/L,葡萄糖转化率为 0.11 g/g。

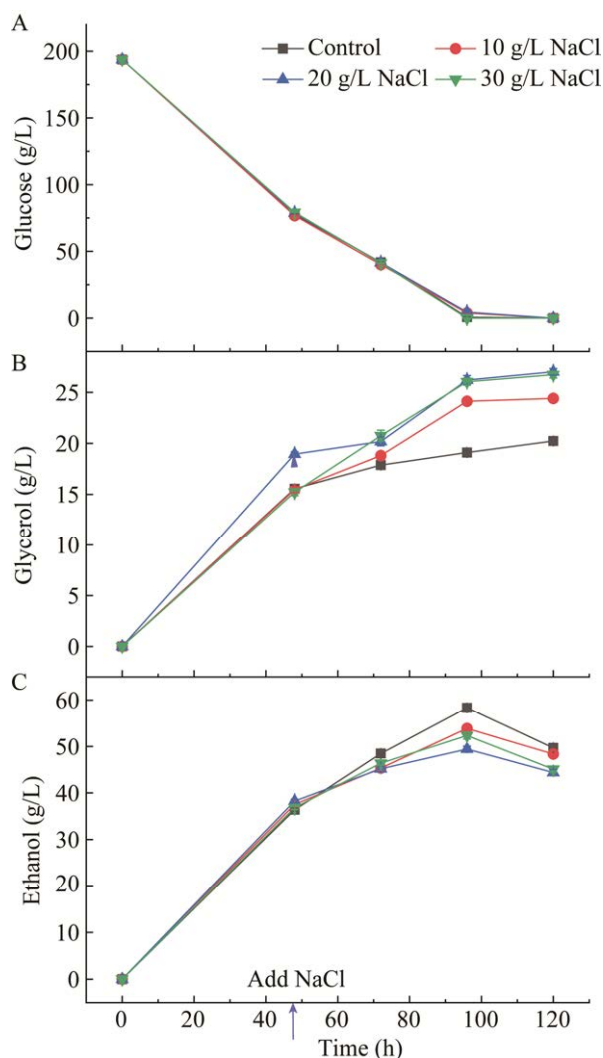


图 2 添加梯度浓度 NaCl 对发酵的影响 A: 葡萄糖浓度. B: 甘油浓度. C: 乙醇浓度

Figure 2 Effect of addition of gradient concentration NaCl on fermentation. A: Glucose concentration. B: Glycerol concentration. C: Ethanol concentration.

2.3 对还原剂的耐受性

亚硫酸盐可以打破木质纤维天然结构的顽固性,通过磺化降低木质素的疏水性,从而提高底物的水解性。制浆行业中用碱性亚硫酸盐增加木质素磺化和增溶,促进多糖的氧化稳定,提高脱木质素率和纸浆收率,促进木质纤维素生物质的生物转化率^[18-19]。为考察亚硫酸钠对耐渗酵母生长发酵是否有抑制作用,设置亚硫酸钠浓度梯度进行实验,在发酵培养基培养 48 h 时向锥形瓶中分别加入 10、20、30 g/L 亚硫酸钠。根据文献报道^[20],更高浓度的亚硫酸钠会抑制微生物的生长,并且过量亚硫酸钠会增加成本,因此没有进行更高浓度的探究。结果表明,在耐渗假丝酵母发酵指数生长后期向培养基中加入适量的亚硫酸钠可有效促进甘油的生产,添加 30 g/L 亚硫酸钠效果最佳(图 3),发酵 96 h,产生甘油 59.03 g/L,转化率为 0.29 g/g;产生乙醇 26.01 g/L,转化率 0.13 g/g;产生乙酸 8.52 g/L,转化率为 0.04 g/g。对照组产生甘油 18.78 g/L,转化率为 0.094 g/g,不产生有机酸。甘油转化率相对对照组提升了 214%。由此,该菌株可耐受较高亚硫酸钠浓度,在利用木质纤维素转化为甘油的工业生产中具有优势。

2.4 耐渗假丝酵母的耐温性能

高渗环境有利于甘油产出,也提高了细胞对温度的耐受性。为考察耐渗假丝酵母的耐温性能,本研究分别考察了梯度升温发酵及 30 min 热冲击发酵对耐渗假丝酵母发酵的影响。

对于梯度升温发酵,设置了两组对照实验:一组在 30 °C 下进行恒温培养,另一组前 14 h 进行 30 °C 培养,之后放入 40 °C 摇床培养。实验结果表明,持续高温限制了耐渗假丝酵母的生长,降低了发酵消耗葡萄糖的速率,发酵进行到 120 h 后残糖量仍较高(图 4A),发酵 120 h 共消耗 52.41 g/L 葡萄糖,产生甘油 20.70 g/L,转化率

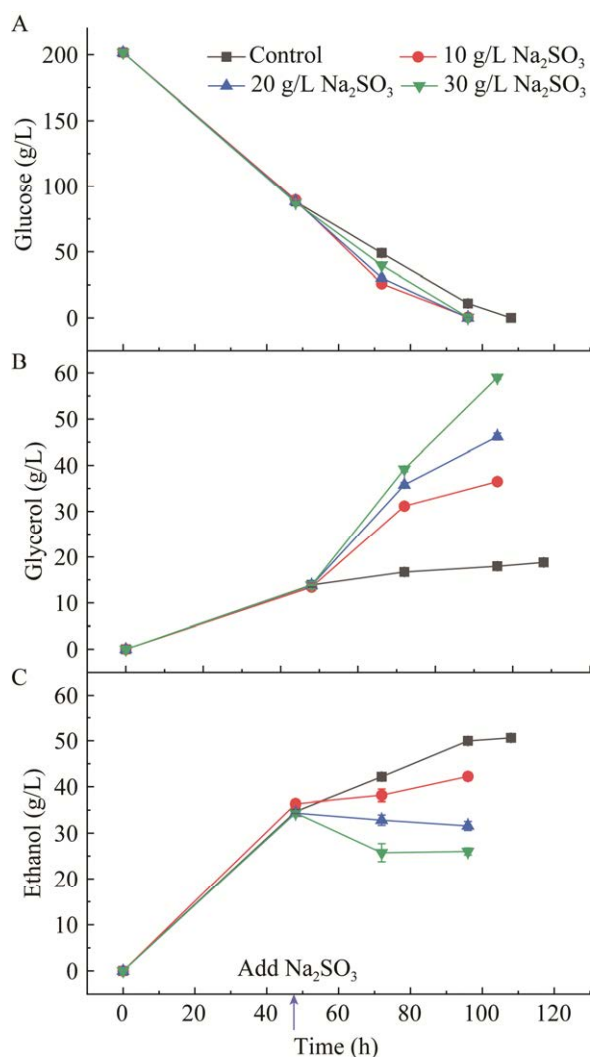


图3 添加梯度浓度 Na_2SO_3 对发酵的影响 A: 葡萄糖浓度. B: 甘油浓度. C: 乙醇浓度

Figure 3 Effect of addition of various concentrations of Na_2SO_3 on fermentation. A: Glucose concentration. B: Glycerol concentration. C: Ethanol concentration.

为 0.39 g/g (图 4B), 转化率确有提升; 产生乙醇 2.20 g/L (图 4C), 与 30 °C 恒温发酵的产物相比, 40 °C 发酵的菌株产生乙醇较少, 可能是由于部分乙醇因高温挥发。

对于热冲击实验, 选择在菌株发酵 32 h 时对其进行 30 min 热冲击, 之后转入 30 °C 摇床中继续进行发酵, 直到结束。与 30 °C 恒温培养的对照组以及 40 °C 热冲击实验组相比, 45 °C 热冲

击 30 min 的效果更好, 但残糖量仍很高(图 5A), 发酵 120 h, 消耗 130.67 g/L 葡萄糖, 产生甘油 37.06 g/L (图 5B), 转化率为 0.28 g/g; 产生乙醇 12.67 g/L (图 5C), 相对 40 °C 热冲击的菌株产生乙醇量减少。

2.5 海水对耐渗酵母发酵的影响

根据上述实验结果, 培养基中添加盐类分子可以促进甘油的生产。如果使用海水代替淡水进行配制培养基再进行发酵, 可以节约淡水资源。

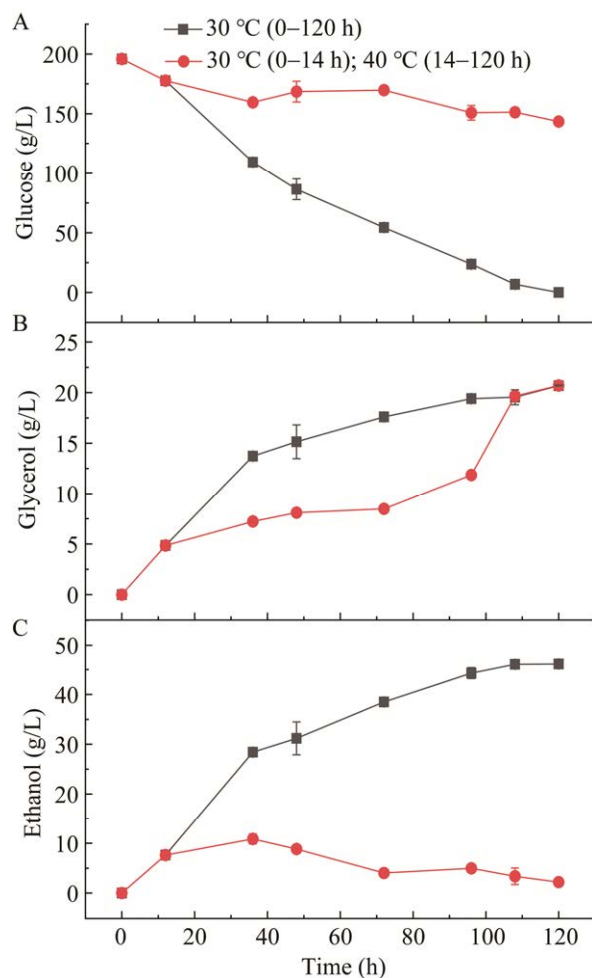


图4 变温发酵的影响 A: 葡萄糖浓度. B: 甘油浓度. C: 乙醇浓度

Figure 4 Effect of variable temperature fermentation. A: Glucose concentration. B: Glycerol concentration. C: Ethanol concentration.

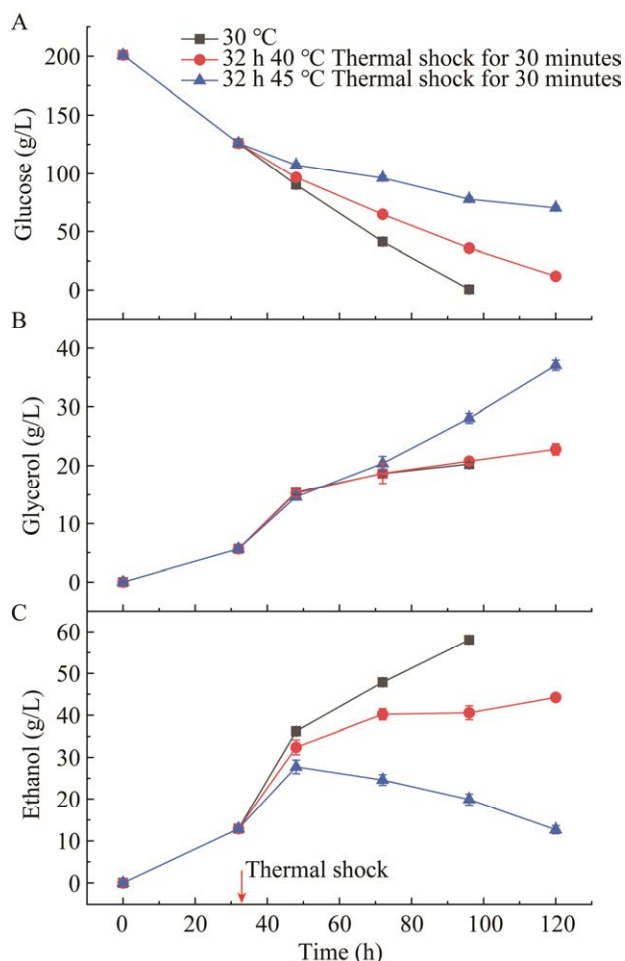


图 5 热冲击对发酵的影响 A: 葡萄糖浓度. B: 甘油浓度. C: 乙醇浓度.
Figure 5 Effect of thermal shock on fermentation. A: Glucose concentration. B: Glycerol concentration. C: Ethanol concentration.

首先考察了使用海水发酵的可能性, 一组使用自来水配制培养基, 高温灭菌后使用; 另一组直接使用海水。结果表明, 利用海水配制培养基发酵 120 h, 消耗葡萄糖 203.28 g/L, 产生甘油 40.22 g/L, 转化率 0.20 g/g; 与对照组发酵 96 h 产生甘油 19.22 g/L 相比, 提高了 109%; 产生乙醇 41.96 g/L, 转化率 0.21 g/g (图 6); 使用海水进行甘油发酵效果较为显著。海水中除 NaCl 外,

还含有钙、镁等多种离子。海水盐度约 3.1% (31 g/L), 与 2.2 节中 30 g/L 氯化钠接近, 对甘油生产有促进作用。钙、镁离子往往是胞内酶的激活因子, 这可能是海水发酵效果相对较好的原因。

陈国强团队^[8]利用海水制造生物燃料, 不存在与人争粮的情况, 而且使用海水替代淡水, 过程中产生的水也可以循环使用, 从而达到节约用水的目的, 发酵所使用的嗜盐微生物可在高盐、

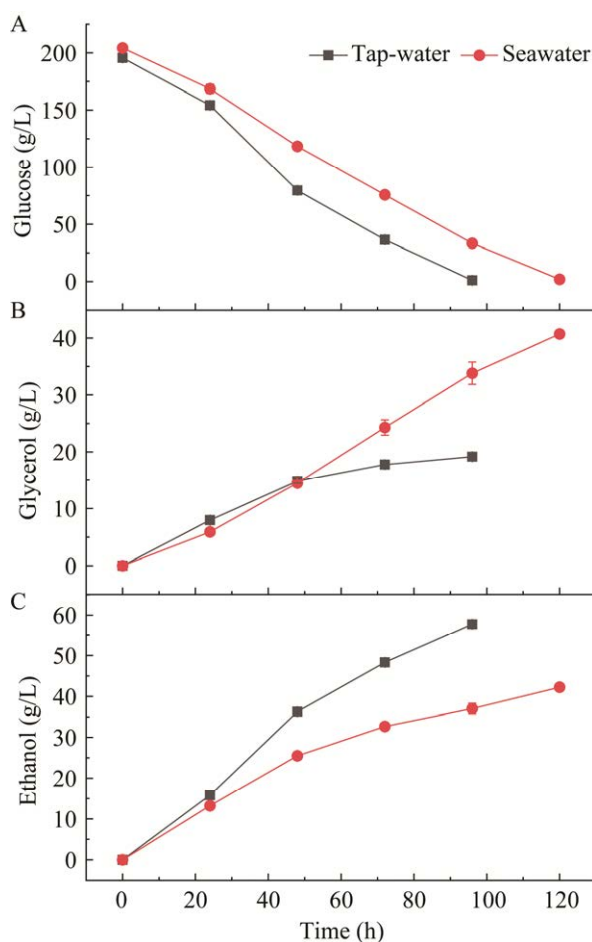


图 6 海水发酵的影响 A: 葡萄糖浓度. B: 甘油浓度. C: 乙醇浓度.
Figure 6 Effect of seawater fermentation. A: Glucose concentration. B: Glycerol concentration. C: ethanol concentration.

高碱性的环境中生长,过程中不易染菌,因此发酵过程中不用高温高压灭菌,这就简化了操作步骤,并在很大程度上降低能耗和节约成本,从而提高产品的市场竞争力。

由于海水中含有较多无机盐离子,使用海水发酵可以有效促进甘油的产出,仅使用海水配制培养基就可使甘油产量有明显的提升。

为了考察额外加入亚硫酸钠是否会对海水发酵结果产生促进效果,设置亚硫酸钠浓度梯度及空白对照组,在发酵 48 h 时向锥形瓶中分别加入 10、20、30 g/L 亚硫酸钠,相同条件下继

续培养。结果表明,在使用海水发酵 48 h 后向培养基中加入适量的亚硫酸钠有利于甘油的产出,添加 10 g/L 亚硫酸钠效果最佳(图 7),发酵 144 h,消耗 202 g/L 葡萄糖,产生甘油 71.22 g/L,转化率为 0.35 g/g; 产生乙醇 18.10 g/L,转化率为 0.09 g/g。

最后,在添加 10 g/L 亚硫酸钠的基础上,对发酵 32 h 的菌株进行热冲击处理。实验结果表明,发酵 144 h,消耗 201.43 g/L 葡萄糖,产生甘油 74.69 g/L,转化率为 0.37 g/g; 产生乙醇 13.48 g/L,转化率为 0.067 g/g(图 8)。

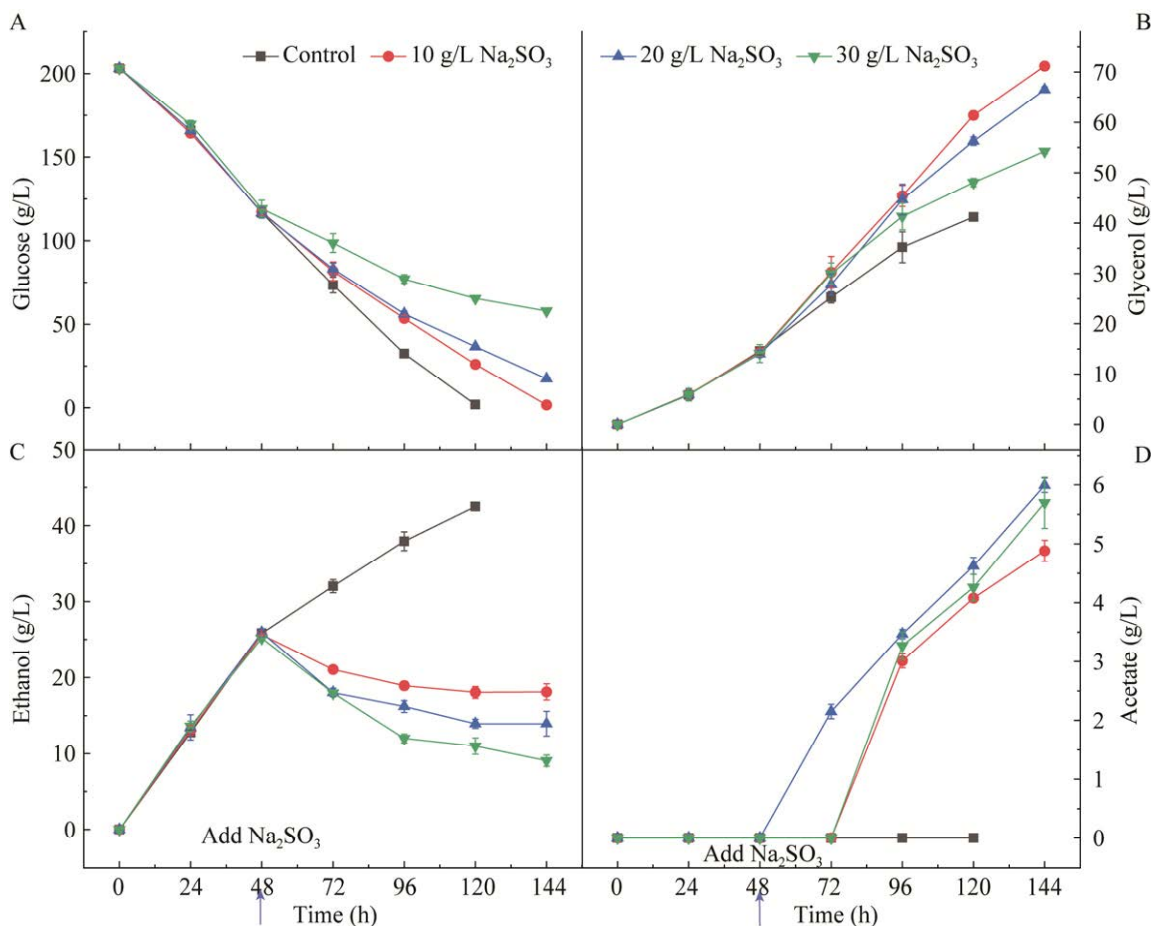


图 7 海水、添加梯度浓度 Na_2SO_3 对发酵的影响

A: 葡萄糖浓度. B: 甘油浓度. C: 乙醇浓度. D: 乙酸浓度

Figure 7 Effect of seawater and addition of various concentrations of Na_2SO_3 on fermentation. A: Glucose concentration. B: Glycerol concentration. C: Ethanol concentration. D: Acetate concentration.

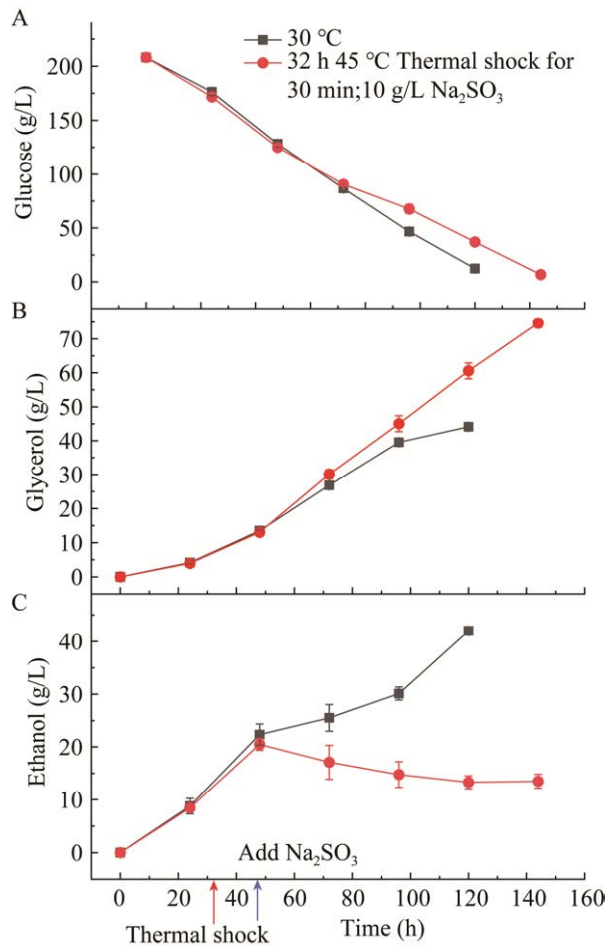


图 8 海水、热冲击、添加梯度浓度 Na_2SO_3 对发酵的影响 A: 葡萄糖浓度. B: 甘油浓度. C: 乙醇浓度

Figure 8 Effects of seawater, thermal shock and addition of various concentrations of Na_2SO_3 on fermentation. A: Glucose concentration. B: Glycerol concentration. C: Ethanol concentration.

表 1 使用盐酸调 pH 酶解后发酵底物及产物情况

Table 1 Fermentation substrates and products after enzymatic hydrolysis using hydrochloric acid to adjust pH

Time (h)	Glucose (g/L)	Xylose (g/L)	Arabinose (g/L)	Acetate (g/L)	Product concentration (g/L)			Yield (g/g)
					Glycerol	Ethanol	Total	
0	32.48	13.66	1.49	2.19	0	0	0	0
4	31.66	13.56	1.48	2.11	0	0	0	0
8	19.76	13.85	1.51	1.91	1.92	4.93	6.85	0.54
12	0	13.13	1.53	1.44	2.49	11.62	14.11	0.43

2.6 耐渗酵母发酵巨菌草酶解液

综上所述,在发酵液中引入小分子盐类可促进耐渗假丝酵母产甘油。使用 2% NaOH 高温预处理巨菌草后使用盐酸调节 pH 进行酶解,酶解后进行灭活处理便可得到成本低廉的糖溶液,再接入酵母进行发酵。酶解后可得 32.48 g/L 葡萄糖、13.66 g/L 木糖及 1.49 g/L 阿拉伯糖;发酵 12 h, 产生甘油 2.49 g/L, 转化率为 0.077 g/g; 产生乙醇 11.62 g/L, 转化率 0.36 g/g; 总转化率达 0.43 g/g (表 1)。且该菌种对底物具有选择性, 利用葡萄糖, 不利用木糖和阿拉伯糖。

通过一锅法使用 NaOH 预处理后,不进行洗涤去除木质素,直接使用 HCl 调节 pH 对后续酶解影响较大,葡萄糖生成量较低。因此对预处理后的纤维素进行洗涤烘干,选择加入温和的柠檬酸缓冲液及纤维素酶进行酶解处理;得到的酶解液进行浓缩、稀释后再用于发酵,且稀释后糖浓度与浓缩前相当。使用海水进行洗涤及稀释的酶解液发酵 14 h, 消耗葡萄糖 52.09 g/L, 最终产生甘油 4.83 g/L, 产生乙醇 18.87 g/L, 总转化率为 0.45 g/g (表 2)。

3 讨论

微生物有迅速适应不同环境的能力,实验室连续传代培养是传统的适应性进化手段,选择合适的传代周期连续传代培养,不断提高筛选压力,从而定向获得需求的性状^[21], ALE 常用来提高菌株的耐受性^[22-24]。

表 2 使用柠檬酸缓冲液调 pH 酶解后发酵底物及产物情况

Table 2 Fermentation substrates and products after enzymatic hydrolysis using citric acid buffer to adjust pH

Time (h)	Glucose (g/L)	Xylose (g/L)	Acetate (g/L)	Product concentration (g/L)			Yield (g/g)
				Glycerol	Ethanol	Total	
0	52.09	15.77	3.90	0	0	0	0
4	51.77	16.60	3.91	0	0	0	0
6	48.36	16.84	6.03	0	0	0	0
8	40.29	16.63	6.56	0	5.37	5.37	0.46
10	29.35	16.83	4.53	3.55	7.84	11.39	0.50
12	14.38	16.32	4.42	3.92	13.57	17.49	0.46
14	0	14.68	4.27	4.83	18.87	23.70	0.45

甘油合成途径中的第一个关键酶是 3-磷酸甘油脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GPD), 第 2 个酶是 3-磷酸甘油酯酶(glycerol 3-phosphatase, GPP), 且这 2 个关键酶量及其活性受基质渗透压影响, 所以可以通过人为调节基质渗透压的方法, 刺激高渗酵母生成更多的甘油^[25]; 有研究表明, 使用氯化钠作为渗透压调节剂来提高渗透压能够促进甘油的生产^[26]; 本实验结果表明, 添加 20 g/L 氯化钠效果最佳, 过高盐浓度会起到抑制作用。对于加盐的时机, 过早加盐会导致对细胞的抑制较大, 指数生长中期细胞对渗透压变化的敏感性较差, 从而导致效果不明显, 因此最佳加盐时机可确定为指数生长后期, 此时酵母对外界渗透压变化敏感性较大^[25]; 在菌株指数生长后期, 即发酵 48 h 添加氯化钠效果较好。

甘油形成的一个非常重要的方面是控制甘油和乙醇相对产量, 通过阻断乙醇生成途径可以达到提升甘油产量的效果。亚硫酸钠作为导向剂, 通过固定乙醛并避免其进一步还原为乙醇, 在将代谢途径转变为甘油形成方面发挥着重要的作用; 当主要的氢受体乙醛被固定时, 糖酵解途径中的另一个三糖充当氢受体并被还原为甘油, 可有效提升甘油产量^[20]。

一般耐高渗微生物也具有耐温性, 如产甘油假丝酵母(*Candida glycerinogenes*) WL2002-5 比

酿酒酵母具有更好的高渗透压、高温、高糖耐受性^[27]。由于细胞生长、底物消耗以及产物生成可能不在同一温度和同一时间达到最佳状态, 因此变温发酵有可能取得更好的效果。谢东明等^[28]采用变温发酵方式: 初始阶段低温发酵促进细胞生长, 随后再采用高温发酵, 可以使细胞增加初期的糖分消耗, 并提高甘油的产出。变温发酵的优势在于不管升温时间多长, 甘油产量都比恒温发酵有所提高。本研究的实验结果表明, 后期高温发酵限制了酵母的生长, 降低了发酵消耗葡萄糖的速率, 发酵后期残糖量仍较高, 但甘油转化率有所提升。通过热冲击可以增加细胞在高渗透压环境下的代谢活力从而提高发酵甘油的产量, 原因是高温刺激能够增加细胞内的热休克蛋白和伴侣分子(如海藻糖), 增加胞内蛋白、酶的热稳定性^[27], 提高细胞对渗透压的耐受能力。实验结果表明, 对菌株进行短时间热冲击可以提升甘油产量及转化率。这一结果与文献报道相吻合, 如谢东明等^[16]考察了热冲击温度、时机、持续时间对耐高渗酵母产甘油的影响, 发现热冲击并不会改变细胞生长及糖分消耗, 在细胞指数生长期的中期进行热冲击的效果最好。

目前对巨菌草的利用和研究主要集中于食用菌培养、生态治理、饲料生产、清洁型燃料、生物质能源制备、沼气生产及造纸等方面^[28]; 如果将难以用作发酵底物的纤维素作为碳源, 用

于生产大宗有机化工原料,将实现对廉价生物质资源的充分利用。当前利用木质纤维素生产燃料乙醇具有较大优势^[29],但是预处理过程中会产生抑制剂,对后续发酵存在一定的抑制作用^[30]。因此,发酵前还需对酶解液进行脱毒处理,这也是实现木质纤维素生物炼制产业发展的关键步骤^[31]。本研究使用“一锅法”对巨菌草进行预处理、酶解后直接进行发酵,菌株仍表现出较好的环境适应性,对原料要求低,在产乙醇的同时还产生甘油,对廉价生物质资源的充分利用具有广阔前景。

4 结论

本文考察了克鲁斯假丝酵母对底物、盐、还原剂和高温冲击的耐受性。使用海水替代淡水、不灭菌发酵的甘油产量较淡水灭菌发酵提高了109%;发酵32 h时热冲击结合48 h时引入10 g/L亚硫酸钠,葡萄糖转化为甘油的产率为0.37 g/g,甘油产量比对照组提升了225%。与普通酵母菌相比,耐渗假丝酵母在不同底物浓度下调节代谢物乙醇和甘油的产出,糖浓度低时主产乙醇,糖浓度高时偏向甘油的生产。该菌株具有较强的耐受性且对原料要求较低,能直接利用海水处理的巨菌草酶解液进行发酵,酶解产生的葡萄糖转化为甘油和乙醇的总转化率为0.45 g/g。本研究为利用木质纤维素发酵生产生物基化学品提供了具有较好耐受性的候选菌株及廉价发酵工艺。

REFERENCES

- [1] LU QL, TANG LR, WANG S, HUANG B, CHEN YD, CHEN XR. An investigation on the characteristics of cellulose nanocrystals from *Pennisetum sinense*[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2014, 70: 267-272.
- [2] HUANG C, ZHAN YN, CHENG J, WANG J, MENG XZ, ZHOU XL, FANG G, RAGAUSKAS AJ. Facilitating enzymatic hydrolysis with a novel guaiacol-based deep eutectic solvent pretreatment[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 326: 124696.
- [3] 雷荷仙, 张进国, 黎纪凤, 赵建刚, 杨桂芬, 杨雪松, 任明晋. 海拔高度对巨菌草生长性能的影响试验[J]. *贵州畜牧兽医*, 2012, 36(6): 59-63.
LEI HX, ZHANG JG, LI JF, ZHAO JG, YANG GF, YANG XS, REN MJ. Effect of altitude on growth performance of *Pennisetum giganteum*[J]. *Guizhou Animal Science and Veterinary Medicine*, 2012, 36(6): 59-63 (in Chinese).
- [4] 田中建. 巨菌草三大组分的分离、糖化及高值化利用研究[D]. 南宁: 广西大学博士学位论文, 2017.
TIAN ZJ. Fractionation of the three main components from *P. sinense* and using for high value products[D]. Nanning: Doctoral Dissertation of Guangxi University, 2017 (in Chinese).
- [5] SIBIRNY AA. *Biotechnology of Yeasts and Filamentous Fungi*[M]. Cham: Springer International Publishing, 2017, 117-148.
- [6] FATMA S, HAMEED A, NOMAN M, AHMED T, SHAHID M, TARIQ M, SOHAIL I, TABASSUM R. Lignocellulosic biomass: a sustainable bioenergy source for the future[J]. *Protein and Peptide Letters*, 2018, 25(2): 148-163.
- [7] 俞利平. 通过调控蛋白质内平衡网络增强酵母细胞鲁棒性[D]. 北京: 北京理工大学硕士学位论文, 2017.
YU LP. Enhancing the robustness of engineered *Saccharomyces cerevisiae* through the regulation of cellular protein homeostasis[D]. Beijing: Master's Thesis of Beijing Institute of Technology, 2017 (in Chinese).
- [8] 尹进, 陈国强. 蓝水生物技术: 聚羟基脂肪酸酯的产业发展[J]. *新材料产业*, 2016(2): 16-20.
YIN J, CHEN GQ. Blue water biotechnology-industrial development of polyhydroxy fatty acid esters[J]. *Advanced Materials Industry*, 2016(2): 16-20 (in Chinese).
- [9] 吴静, 唐蕾, 刘立明. 光滑球拟酵母转录因子 *Asg1p* 调控鲁棒性的生理机制[J]. *食品与生物技术学报*, 2017, 36(2): 156-163.
WU J, TANG L, LIU LM. Physiological mechanism of transcription factor *Asg1p* for the regulation of robustness of *Candida glabrata*[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2017, 36(2): 156-163 (in Chinese).
- [10] 谢涛. 产甘油假丝酵母产甘油发酵的代谢机理[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2006.
XIE T. Metabolic mechanism of glycerol fermentation

- by *Candida glycerinogenes*[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2006 (in Chinese).
- [11] 唐军, 黄良军, 蔡水洪, 叶勤. *Candida krusei* 的分批培养与补料分批培养生产甘油[J]. 化学反应工程与工艺, 2001, 17(1): 50-54.
- TANG J, HUANG LJ, CAI SH, YE Q. Production of glycerol in batch and fed-batch cultivation processes of *Candida krusei*[J]. Chemical Reaction Engineering and Technology, 2001, 17(1): 50-54 (in Chinese).
- [12] 刘永强, 刘德华, 刘天中, 马志国. 反复分批发酵法生产甘油研究[J]. 化学工程, 2003, 31(3): 50-52, 57.
- LIU YQ, LIU DH, LIU TZ, MA ZG. Glycerol production of repeated batch fermentation technology with free osmophilic yeast[J]. Chemical Engineering, 2003, 31(3): 50-52, 57 (in Chinese).
- [13] 赵有玺, 饶志明, 沈微, 方慧英, 诸葛健. 产甘油假丝酵母产甘油关键酶基因在酿酒酵母中的表达[J]. 中国生物工程杂志, 2006, 26(1): 38-41.
- ZHAO YX, RAO ZM, SHEN W, FANG HY, ZHUGE J. Expression of key enzymes in glycerol synthesis of *Candida glycerolgenesis* in *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A[J]. China Biotechnology, 2006, 26(1): 38-41 (in Chinese).
- [14] 沈家赫. 基于半纤维素酶解的巨菌草纤维组分分离研究[D]. 济南: 齐鲁工业大学硕士学位论文, 2021.
- SHEN JH. Study on fiber component separation of giant weed based on hemicellulose enzymatic hydrolysis[D]. Jinan: Master's Thesis of Qilu University of Technology, 2021 (in Chinese).
- [15] 安雨萌. 羟胺型离子液体预处理菊芋秸秆发酵产乙偶姻[D]. 大连: 大连理工大学硕士学位论文, 2022.
- AN YM. Pretreatment of Jerusalem artichoke straw by hydroxylamine ionic liquid for fermentation to produce acetoin[D]. Dalian: Master's Thesis of Dalian University of Technology, 2022 (in Chinese).
- [16] 谢东明, 刘德华, 张岩, 朱丙田, 刘天中, 苏志国. 应用热冲击处理技术提高发酵甘油的产率[J]. 生物工程学报, 2000, 16(3): 383-386.
- XIE DM, LIU DH, ZHANG Y, ZHU BT, LIU TZ, SU ZG. Application of thermal shock treatment technology to improve the yield of fermented glycerol[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2000, 16(3): 383-386 (in Chinese).
- [17] WANG XL, ZHOU JJ, SHEN JT, ZHENG YF, SUN YQ, XIU ZL. Sequential fed-batch fermentation of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* DL07[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(21): 9179-9191.
- [18] WANG X, TAO YH, YANG Q, CHENG Y, DU J, WANG HS. Ammonia and sodium sulfite synergistically pretreat reed to enhance enzymatic saccharification[J]. Bioresource Technology, 2023, 380: 129070.
- [19] ZHANG Y, XIN DL, WEN PY, CHEN X, JIA LL, LU ZM, ZHANG JH. Comparison of alkaline sulfite pretreatment and acid sulfite pretreatment with low chemical loading in saccharification of poplar[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2023, 195(7): 4414-4428.
- [20] PETROVSKA B, WINKELHAUSEN E, KUZMANOVA S. Glycerol production by yeasts under osmotic and sulfite stress[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1999, 45(8): 695-699.
- [21] 李建, 孔婧, 李圣龙, 赵禹, 赵雅坤, 肖冬光, 于爱群. 适应性实验室进化技术在微生物育种中的应用进展[J]. 生物工程学报, 2021, 37(1): 130-141.
- LI J, KONG J, LI SL, ZHAO Y, ZHAO YK, XIAO DG, YU AQ. Advances in adaptive laboratory evolutionary engineering to microbial breeding[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(1): 130-141 (in Chinese).
- [22] 朱晁谊, 朱牧孜, 李爽. 微生物实验室进化的研究进展[J]. 生物加工过程, 2019, 17(1): 8-14, 22.
- ZHU CY, ZHU MZ, LI S. Research progress in microbial laboratory evolution[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2019, 17(1): 8-14, 22 (in Chinese).
- [23] LIANG SX, JIANG W, SONG YB, ZHOU SF. Improvement and metabolomics-based analysis of D-lactic acid production from agro-industrial wastes by *Lactobacillus delbrueckii* submitted to adaptive laboratory evolution[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(29): 7660-7669.
- [24] ZHANG CJ, SHARMA S, MA CW, ZENG AP. Strain evolution and novel downstream processing with integrated catalysis enable highly efficient coproduction of 1,3-propanediol and organic acid esters from crude glycerol[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2022, 119(6): 1450-1466.
- [25] 杨燕鸥. 耐高渗酵母发酵法生产甘油的工艺优化—渗透压和细胞膜透性调节及流加发酵的工艺优化[D]. 北京: 中国科学院过程工程研究所硕士学位论文, 1999.
- YANG YO. Optimization of glycerol production by hypertonic yeast fermentation—adjustment of osmotic pressure and cell membrane permeability and optimization of fed-batch fermentation[D]. Beijing:

- Master's Thesis of Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, 1999 (in Chinese).
- [26] 刘永强, 刘德华, 苏琼. 以氯化钠为渗透压调节剂的甘油间歇和连续发酵[J]. 化工学报, 2003, 54(2): 259-263.
- LIU YQ, LIU DH, SU Q. Glycerol production by batch and continuous fermentation with NaCl as osmo-regulator[J]. Journal of Chemical Industry and Engineering, 2003, 54(2): 259-263 (in Chinese).
- [27] 杨飞. 产甘油假丝酵母高温高糖发酵应答研究[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2018.
- YANG F. Study on fermentation response of *Candida glycerinogenes* at high temperature and high sugar[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2018 (in Chinese).
- [28] 郑华坤, 林雄杰, 林辉, 李晶, 鲁国东, 林占熿. 巨菌草(*Pennisetum giganteum*)研究进展[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2019, 48(6): 681-687.
- ZHENG HK, LIN XJ, LIN H, LI J, LU GD, LIN ZX. Research progress on JUJUNCAO (*Pennisetum giganteum*)[J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition), 2019, 48(6): 681-687 (in Chinese).
- [29] 张敬芝. 基于木质纤维素能源作物预处理及发酵转化乙醇的过程强化[D]. 北京: 北京化工大学博士学位论文, 2017.
- ZHANG JZ. Pretreatment of crops based on lignocellulose energy and process enhancement of ethanol fermentation[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Beijing University of Chemical Technology, 2017 (in Chinese).
- [30] PALMQVIST E, HAHN-HÄGERDAL B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition[J]. Bioresource Technology, 2000, 74(1): 25-33.
- [31] 郑晓洁. 甘蔗渣水热短时解聚预处理-酶解-发酵“一锅法”制备纤维素乙醇的研究[D]. 广州: 广东工业大学硕士学位论文, 2022.
- ZHENG XJ. Preparation of cellulose ethanol from bagasse by “one pot method” of pretreatment-enzymatic hydrolysis-fermentation after hydrothermal short-time depolymerization[D]. Guangzhou: Master's Thesis of Guangdong University of Technology, 2022 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)