

纤维素乙醇生物加工过程中的抑制物对酿酒酵母的影响及应对措施

李洪兴^{1,2}, 张笑然¹, 沈煜¹, 董永胜², 鲍晓明¹

1 山东大学 微生物技术国家重点实验室, 济南 250100

2 山东轻工业学院食品与生物工程学院, 济南 250353

摘要: 以木质纤维素为原料生产乙醇, 预处理是必需的环节, 这一过程中不可避免产生了多种对微生物有抑制作用的化合物, 这些抑制物主要有 3 大类: 弱酸、呋喃醛类和酚类化合物。这些化合物影响后续乙醇发酵微生物酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的生长及发酵性能, 降低了乙醇的得率和产量, 是木质纤维素原料大规模生产乙醇的一个主要障碍。以下介绍了 3 类抑制物的形成及作用机制, 并介绍了应对抑制物作用、提高酵母发酵能力的措施及研究进展, 包括发酵前预处理原料脱毒、通过进化工程驯化菌种或通过对抑制物耐受性相关基因的代谢工程操作提高酿酒酵母耐受性, 及通过发酵过程控制减少抑制物影响等。

关键词: 木质纤维素, 抑制物, 乙醇, 耐受性, 酿酒酵母

Inhibitors and their effects on *Saccharomyces cerevisiae* and relevant countermeasures in bioprocess of ethanol production from lignocellulose— a review

Hongxing Li^{1,2}, Xiaoran Zhang¹, Yu Shen¹, Yongsheng Dong², and Xiaoming Bao¹

1 State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China

2 School of Food and Bioengineering, Shandong Institute of Light Industry, Jinan 250353, China

Abstract: The pretreatment of raw materials is necessary for ethanol production from lignocellulose, however, a variety of compounds which inhibit the fermenting microorganism such as *Saccharomyces cerevisiae* are inevitably formed in this bioprocess. Based on their chemical properties, the inhibitors are usually divided into three major groups: weak acids, furaldehydes and phenolic compounds. These compounds negatively affect the growth of *S. cerevisiae*, ethanol yield and productivity, which is one of the significant hurdles for the development of large-scale ethanol production from lignocellulose. We address here the origins of the three kinds of inhibitors and their mechanisms to *S. cerevisiae*. We also discuss the strategies of improving the fermentation performance of yeast, including detoxification of the pretreated substrates, enhancement of yeast tolerance and also fermentation control to reduce the effects of the inhibitors. The methods used in enhancing the yeast tolerance are traditional mutagenic breeding integrated with strains evolution under the suitable selective pressure, and metabolic engineering by introducing and/or overexpressing genes

Received: May 9, 2008; **Accepted:** July 8, 2009

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2007AA05Z402), National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2007CB707803).0

Corresponding author: Xiaoming Bao. Tel/Fax: +86-531-88365826; E-mail: bxm@sdu.edu.cn

国家高技术研究发展计划(863 计划)(No. 2007AA05Z402), 国家重点基础研究发展计划(973 计划)(No. 2007CB707803)资助。

encoding enzymes such as furfural reductase, laccase and phenylacrylic acid decarboxylase, that confer the *S. cerevisiae* strains resistance towards specific inhibitors.

Keywords: lignocellulose, inhibitor, ethanol, tolerance, *Saccharomyces cerevisiae*

发展可再生清洁能源、保护生态环境是人类必须面对的两大课题。燃料乙醇被公认为是最有发展前景的可再生清洁能源之一^[1]，由于其独特的车用性质而受到广泛关注。利用丰富廉价的可再生木质纤维素(例农林业废弃物，或专门用于乙醇等生产而培育的能源植物)生产乙醇，是规模化发展车用燃料乙醇的基础^[2]。其主要组分是纤维素、半纤维素和木素，且含量及组成随植物原料不同而不同^[3]。木质纤维素乙醇生物加工过程的基本流程是：原料的预处理，纤维素的酶解，糖的微生物发酵^[3]。一般地，预处理可以水解木素和半纤维素，降低纤维素结晶度及增加其孔隙度，同时产生多种对微生物生长有抑制作用的化合物，抑制随后酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的乙醇发酵过程。与淀粉或糖质的乙醇发酵不同，纤维素乙醇发酵，很难达到对微生物有抑制作用的乙醇浓度。因此木质纤维素乙醇生物加工过程产生的抑制物主要来源于预处理环节^[4]。以下综述了重要抑制物的形成及其作

用机制，并讨论了相关应对措施，包括发酵前预处理原料脱毒，进化工程菌种驯化或通过对抑制物耐受性相关基因的代谢工程操作提高酿酒酵母对抑制物耐受性，以及通过发酵过程控制减少抑制物的影响等。

1 木质纤维素乙醇生物加工过程中抑制物的形成、影响及其作用机制

木质纤维素的结构与组成复杂，其中，主要以葡萄糖基组成的纤维素结构致密，较难水解，而以多种杂糖基组成的半纤维素，结构比较松散，预处理可以被水解成单糖^[2,5-6]。

目前正在研究的有多种木质纤维素原料预处理方法，例如酸水解、蒸汽爆破、氨纤维爆破及湿氧化法等。Sun 等^[3]详细比较了预处理的各种物理、化学及生物学方法。由于稀酸水解有较高的反应速率且能显著提高纤维素的酶解得率，并且过程廉价，是目前比较认可的预处理方法之一。各种不同的预

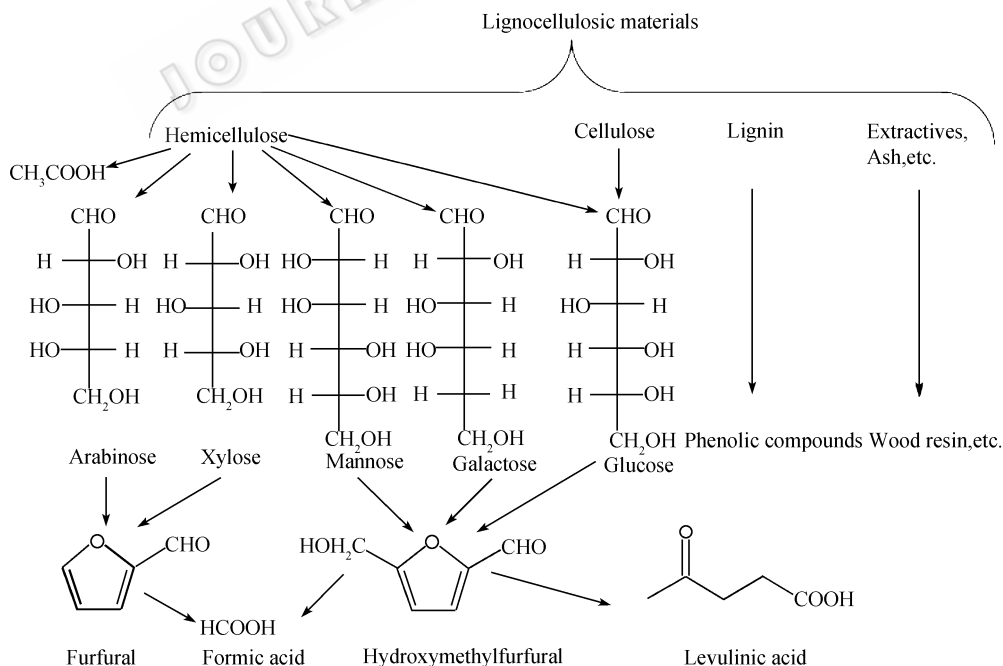


图 1 木质纤维素原料预处理过程中发生的各种反应及抑制物的形成^[2,6]

Fig. 1 Reactions occurring and inhibitor producing during pretreatment of lignocellulosic materials^[2,6].

处理过程都产生多种化合物(图 1), 其种类及含量随纤维素原料性质及预处理条件的不同而不同, 主要形成 3 类微生物生长抑制物^[6]: 1) 弱酸: 乙酸、甲酸、乙酰丙酸等。乙酸由半纤维素脱乙酰生成, 甲酸和乙酰丙酸是 5-羟甲基糠醛(HMF, 5-Hydroxymethylfurfural)的降解产物, 同时甲酸也可由糠醛在酸性环境下降解产生; 2) 呋喃醛类: 主要是糠醛(Furfural)和 HMF, 分别由戊糖和己糖在酸性环境下脱水生成^[7]。本课题组分析表明玉米芯稀酸预处理液中糠醛浓度约为 3.2 g/L; 3) 酚类化合物: 主要由木素降解形成, Klinke 等^[8]详细列举了木质纤维素预处理过程中形成的酚类化合物。此外, 推测在纤维素预处理液中尚存在痕量或不明确的微生物生长抑制物。

1.1 弱酸

木质纤维素水解物中最常见的弱酸有乙酸、甲酸和乙酰丙酸, 弱酸引起细胞内环境酸化是抑制细胞生长的主要原因, 可能的机制^[6]有: 1) 非耦合机制。进入细胞内的弱酸在细胞膜上腺苷三磷酸酶(ATPase)的作用下被中和, ATPase 水解 ATP 产生能量将质子泵出细胞以维持细胞内中性环境, 在弱酸存在时, 细胞必须产生足够的 ATP, 在厌氧条件下可通过减少生物量形成和增加乙醇产量以生成足量 ATP。但是在高浓度弱酸存在时, ATP 将被耗尽, 细胞质子泵出能力超出最大限度, 导致胞内环境被酸化。2) 胞内阴离子累积效应。当胞外 pH 值较低时, 未解离形式的弱酸浓度升高, 其扩散穿过细胞膜进入细胞直至达到平衡, 进入胞内的弱酸在中性环境下不断发生解离导致细胞内阴离子大量累积且最终导致细胞内环境的酸化。此外, 乙酸还可抑制部分糖酵解酶类的活性。

Larsson 等^[9]研究了乙酸、甲酸和乙酰丙酸对酿酒酵母乙醇发酵的影响, 研究结果表明低浓度的弱酸(<100 mmol/L)可以增加乙醇得率, 而在高于这一浓度时, 乙醇得率则会降低。林贝等^[10]对酿酒酵母木糖利用重组菌株 6508-127 的研究结果表明, 甲酸对菌株的影响力大于乙酸, 且对菌体生长的抑制强于对乙醇生成过程的抑制。Nigam 等^[11]在合成培养基中加入 5 g/L(约 83 mmol/L)的乙酸, 树干毕赤酵

母(*Pichia stipitis*)对糖利用率、最大乙醇浓度及乙醇产率明显下降, 说明毕赤酵母比酿酒酵母对乙酸的耐受性低。

1.2 呋喃醛类化合物

呋喃醛类化合物(主要是糠醛和 HMF)对酿酒酵母的可能抑制机制有: 1) 直接抑制乙醇脱氢酶、乙醛脱氢酶和丙酮酸脱氢酶^[12]、己糖激酶和甘油醛-3-磷酸脱氢酶^[13], 使细胞产能能力降低, 停滞期延长。2) 抑制细胞内转化活性醛的醛氧化酶类, 导致活性氧(Reactive oxygen species, ROS)含量上升, 而 ROS 对细胞有诸多危害^[2]。3) 酿酒酵母可利用 NAD(P)H 参与的还原反应转化糠醛和 HMF 为相应的醇化合物, 但转化过程导致了辅酶的大量消耗, 造成了细胞内辅酶水平的不平衡; 一些抗氧化蛋白也因可利用的辅酶减少而失活, 使得酵母细胞易受氧化性破坏^[2]。

呋喃醛类化合物对酿酒酵母的影响主要是抑制酵母生长, 使延滞期增长, 降低乙醇得率和产量, 且抑制作用程度取决于其浓度以及菌株的遗传背景。而且随着糠醛或 HMF 浓度的增加, 酿酒酵母生长的延滞期逐渐延长, 表现出明显的剂量效应^[14]。本课题组对不同酿酒酵母工业菌株的糠醛耐受性进行了分析, 结果表明当平板中糠醛浓度达到 1.0 g/L 时, 被测菌株均受到较强的抑制^[15]; 而后续的研究发现, 液体培养时, 接种早期添加糠醛对酿酒酵母有明显的抑制作用, 而对数生长期添加同样浓度的糠醛则对细胞生长没有影响。此外, 糠醛和 HMF 对发酵的影响还存在协同效应^[7], 在厌氧分批发酵液中加入 HMF 至 4 g/L, CO₂ 释放速率(CO₂ evolution rate, CER)立即下降了约 32%, 而同时添加糠醛(2 g/L)和 HMF(2 g/L)则使 CER 下降了 62%。糠醛对酿酒酵母代谢的影响有更强的即时效应, 与 HMF 相比对酵母发酵速率和生长速率影响更大。但在有氧及厌氧条件下, 糠醛和 HMF 均可被酵母转化为相应的毒性较低的醇类, 糠醇和羟甲基糠醇(2,5-二羟甲基呋喃), 且糠醛的比转化速率是 HMF 的 5 倍^[7,14,16]。Taherzadeh 等^[7]认为由于 HMF 比转化速率慢, 在发酵液中存留时间较长, 因而可能会对酿酒酵母发酵产生更严重的影响。

1.3 酚类化合物

在木质纤维素降解产生的多种抑制物中, 酚类化合物对发酵具有最强的抑制作用, 并且低分子量酚类化合物毒性更强^[6], 且取代基的位置(对位、邻位、间位)也影响酚类的毒性。Klinke 等^[8]详细列举了各种酚类化合物对发酵的影响。林贝等^[10]的实验结果表明, 2 g/L 香草醛可使重组酿酒酵母木糖发酵菌株 6508-127 生长延滞期明显延长, 4 g/L 香草醛则完全抑制其木糖利用和菌体生长。

由于缺乏定量及定性的分析方法, 酚类化合物对酿酒酵母等真核微生物的抑制机制还没有完全阐明, 推测酚类化合物破坏了细胞膜完整性, 因此影响了膜作为选择性屏障和其他生物学作用的功能^[2]。除了抑制物各自的抑制作用外, 相互间的协同作用也强化了抑制作用^[17]。

这些抑制物对随后乙醇发酵酿酒酵母的抑制, 已成为木质纤维素乙醇生物加工过程的主要瓶颈之一。须采取必要的应对抑制物的措施以减少或消除其抑制作用。

2 发酵前预处理原料的脱毒

人们尝试了多种方法对木质纤维素水解液进行发酵前的脱毒处理, 包括生物学、物理及化学方法等^[17]及不同措施组合使用。由于原材料及预处理条件不同, 预处理液组成有很大差别, 应在了解水解液中含有的主要抑制物的基础上, 选用合适的脱毒方法^[18]。

生物学方法包括利用特定酶(例如漆酶 laccase)或微生物对水解液进行脱毒处理。漆酶是一类含铜氧化还原酶, 专一性地对酚类底物分子进行单电子氧化, 生成相应的活性自由基, 活性的中间物随后转变为二聚体、寡聚体和高聚物^[19]。在这一过程中小分子量酚类化合物发生了氧化聚合反应, 生成了毒性较低的高分子量化合物^[17-18], 从而减少了木质纤维素预处理液中酚类物质的毒性。Mussatto 等^[18]用只能利用乙酸生长的酿酒酵母突变株处理水解液, 使其中的乙酸浓度由 6.8 g/L 降低至 0.4 g/L。物理方法有真空干燥浓缩、蒸煮、活性炭吸附、离子交换吸附及溶剂萃取等, 真空浓缩及蒸煮可以使挥发

性抑制物大量减少, 离子交换及溶剂萃取可有效降低乙酸、呋喃醛及酚类化合物含量^[16-17]; 化学方法包括利用各种碱(NH₄OH、NaOH、Ca(OH)₂等)及过量石灰法等对水解液处理, 其中NH₄OH能有效去除呋喃醛类物质, 过量石灰处理可以有效提高水解液中单糖利用率^[16-17]。另外, 水洗预处理原料也是一种简单的脱毒过程。将2种或多种方法联合使用可以达到更好的脱毒效果^[18]。

但是, 脱毒步骤无疑增加了纤维素乙醇发酵成本, 使工艺过程更为复杂, 同时也导致一部分可发酵性糖的损失^[18,20]。所以在发酵过程中须尽量减少发酵前的脱毒环节, 比较有利的方法是选育高抗性菌株, 提高其自身内在的耐受能力, 并通过发酵过程控制外在因素, 以减少或消除抑制作用影响。而高抗性菌株选育主要通过进化工程及基因工程手段。

3 利用进化工程提高菌种对抑制物耐受性

酿酒酵母对水解液中抑制物的耐受性依不同菌株而异^[21]。本课题组对多种酿酒酵母的胁迫条件耐受性进行了分析, 结果表明酵母菌株对逆境条件的耐受性有明显差别, 且多倍性的酿酒酵母工业菌株的耐受性高于单倍体实验室菌株^[15]。通过诱变或直接筛选、及进化工程对菌种长期驯化, 是提高菌株固有耐受性的有效措施。

3.1 菌种筛选

直接在木质纤维素水解液中或是在含有抑制物的合成培养基中已筛选得到了可用于木质纤维素乙醇生物加工过程的菌株, 在这些研究中发现的一个共性就是筛选得到的最优菌株具有最高的呋喃醛转化速率^[16]。应该注意的是, 在某种水解液中筛选得到的最适发酵菌株可能并不适合在其他水解液中进行发酵, 因此, 当利用不同木质纤维素水解液发酵时, 菌株的筛选是很有必要的。筛选出的这些菌株除了可以直接用于发酵外, 也可作为菌种驯化或基因工程技术改造的出发菌。本课题组利用甲基磺酸乙酯(EMS)对酿酒酵母木糖代谢工程菌株 NAN-127^[22]进行诱变, 筛选获得1株对汽爆玉米秸秆原料的抗性有所提高的菌株 EM-13。

3.2 菌种长期驯化

菌种长期驯化是在合适的选择性压力下, 基于反复的遗传性状变化及多次筛选来选择出有利性状的过程。与短期的适应相比, 由长期驯化得到的菌株具有一定的遗传稳定性, 即使在没有选择性压力的条件下, 其优良性状也能继续保持。利用这种方法已经得到了对糠醛和 HMF 的耐受性增强的酵母菌株^[20,23]。Heer 等^[23]将酵母菌株 TMB3400 在含有 3 mmol/L 糠醛的基本培养基中厌氧摇瓶培养, 当到达对数生长期后期时则转移至少 10^7 个细胞至另一含有相同培养基的摇瓶中, 每当酵母停滞期变短时就增加糠醛浓度, 经过 30 次转移(约 300 代)摇瓶中糠醛浓度最终达到 20 mmol/L。对驯化后的菌种划线得到单菌落, 通过遗传稳定性试验后选取 TMB3400-FT30-3 进行发酵性能的验证, 结果表明在含有 40% 云杉水解液的基本培养基中厌氧培养时, 与出发菌株 TMB3400 相比, 其延滞期由 80 h 缩短至 10 余小时。而且, 在含糠醛培养基中的存活率试验证明出发菌株在 10 h 后逐渐死亡, 而驯化菌株仍然存活且继续以较高速率还原糠醛。

Liu 等^[20]对毕赤酵母 NRRL Y-7124 和酿酒酵母 NRRL Y-12632 在添加有糠醛或 HMF 的培养基中的驯化也得到了相似的结果, 细胞首先在含有低浓度抑制物(糠醛或 HMF)的合成液体培养基中生长, 一旦达到对数期, 则将细胞转移至含有抑制物的新鲜培养基中, 以相同方式反复转移直至培养物稳定后逐渐减少接种量到最后得到稳定的培养物, 然后将其转移至含有更高浓度抑制物的培养基中, 反复操作直至达到想要的菌种耐受性水平。最后通过约 100 次筛选转接后得到 4 株菌: *S. cerevisiae* 307-12H60、307-12H120、*P. stipitis* 307-10H60(经 HMF 驯化)及 *S. cerevisiae* 307-12-F40(经糠醛驯化)。驯化后菌株的糠醛或 HMF 转化速率明显大于出发菌株。与出发菌株 NRRL Y-12632 相比 307-12H60、307-12H120, 在含 30 mmol/L HMF 的培养基中的生长速率均更快, 16 h 即达到稳定期, 而前者 48 h 后才到稳定期, 且无论在含 30 mmol/L 或 60 mmol/L HMF 的培养基中, 驯化后的菌株都能将 HMF 完全转化为羟甲基糠醇。同样地, 307-12-F40 在较短的时间内将糠醛完全转

化为糠醇且能有效地生成乙醇。

以上对酵母菌的驯化是在单类抑制物条件(糠醛或 HMF)下进行, Martin 等^[24]将酿酒酵母木糖利用重组菌株 TMB3001 在含有多种抑制物的甘蔗渣水解液进行了驯化。菌种在经过约 20 h 分批培养后, 进入一个连续培养系统中进行驯化, 流加培养基中抑制物浓度逐渐上升, 驯化过程约为 350 h, 最后筛选出目的驯化菌株。与出发菌株相比, 驯化菌株在含较低浓度水解液(75%)的培养基中有较高的糠醛和 HMF 转化率, 分别为 74%和 40%, 而前者的转化率分别为 22%和 20%, 同时在这一条件下, 驯化菌株乙醇得率提高了 83.3%, 生物量提高了 100%。而在高浓度水解液培养基中(100%)驯化菌株发酵性能没有明显改善。

Heer^[23]、Liu^[20]、Martin^[24]的实验结果表明, 长期驯化的结果以不同方式提高了菌株对预处理液的耐受性, 菌株存活能力提高, 或糠醛和 HMF 的转化率提高。

本课题组将诱变筛选得到耐受性提高的酿酒酵母木糖利用工程菌株 EM-13, 进一步在含有玉米秸秆汽爆料水提液的培养基中驯化 45 d, 期间每隔一定时间转接培养, 分离得到 3 株在含玉米秸秆汽爆料水提液培养基中生长状况都显著优于亲本的菌株, 但 3 个驯化菌株对单类抑制物(糠醛或乙酸)抗性表现不同。

4 基因工程改造提高酿酒酵母的耐受性

在高浓度单类抑制物或是在木质纤维素水解液中对菌种长期驯化的进化工程, 是提高菌种对抑制物耐受性的有效措施。而通过生物芯片技术的转录组学研究, 可探寻与菌种耐受性相关的基因, 这一方面解析菌株的耐受性分子机理, 另一方面, 在此基础上, 利用基因工程技术进行理性的分子育种。

几种与呋喃醛类化合物转化有关的氧化还原酶已被鉴定且用于构建对木质纤维素水解液中抑制物有更高耐受性的酿酒酵母菌株^[16]。

ADH6 编码一种严格依赖 NADPH 的乙醇脱氢酶(ADH6p), ADH6p 是早期鉴定出的可催化糠醛及 HMF 还原的酶^[25]。Pettersson 等^[26]分别在含有及不含

HMF 的培养基中对酿酒酵母实验室菌株 CBS8066 和高抑制物耐受性菌株 TMB3000 进行培养, 通过生物芯片技术分析得出 TMB3000 中至少有 15 种还原酶在 HMF 诱导下大量表达。分别将 15 种还原酶基因在酿酒酵母中超表达, 与对照相比, 超表达 *ADH6*、*ADH7* 或 *SFA1* 等基因, 可增加 HMF 的还原能力。进一步利用多拷贝载体, 将强启动子下 *ADH6* 基因在酿酒酵母 CEN.PK 113-5D 中超表达, 其编码的还原酶在利用 NADPH 作为辅酶时, HMF 及糠醛还原活性较对照菌株都有很大提高。从 TMB3000 中分离得到 1 个乙醇脱氢酶 1 突变基因(*mut-ADH 1*), 其编码的突变酶辅酶特异性发生了改变, 由依赖 NADPH 转变为依赖 NADH^[16]。也有报道来源于毕赤酵母的木糖还原酶(Ps-XR)同样拥有还原呋喃醛类化合物的活性^[16]。

此外, Gorsich 等^[27]通过对酿酒酵母单基因突变体库的筛选找到 62 种与糠醛耐受性相关的基因。超表达其中的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的基因 *ZWF1*, 酿酒酵母可以在高浓度的糠醛下生长, 可能是因为超表达使葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的活性增加, 为糠醛还原酶或依赖 NADPH 的胁迫应激酶类(如谷胱甘肽还原酶)提供了大量的还原力^[2]。

基因工程方法同样可以用来增强酵母菌株对酚类化合物的耐受性。Endo 等^[28]通过对 *S. cerevisiae* BY4743 单基因缺失突变体的筛选找到 76 个与香草醛耐受性相关的基因。通过在酵母中表达白腐真菌 *Trametes versicolor* 漆酶基因得到的重组菌可以在含 1.25 mmol/L 松柏醛的培养基中生长, 而此浓度的松柏醛完全抑制对照菌株^[19]。

Larsson 等^[29]将编码苯基丙烯酸脱羧酶的基因 *PAD1* 在酿酒酵母中超表达, 超表达后的菌株在含有阿魏酸和肉桂酸的培养基中或是在云杉水解液中均有较高的生长速率和乙醇生产能力。在有氧或限氧条件下, 超表达 *PAD1* 的菌株转化阿魏酸和肉桂酸的速率都高于对照菌, 在云杉稀酸水解液中, 超表达菌株的糖消耗速率更快, 且乙醇产生速率增加了 24% 至 29%。

总之, 与抑制物转化有关的酶的鉴定, 和在此基础上理性的分子育种, 是提高酿酒酵母自身对木

质纤维素水解液耐受性的有效方法。

5 发酵过程控制减少抑制物的影响

酿酒酵母对呋喃醛类和酚类化合物具有一定程度的固有耐受性, 在有氧及厌氧条件下, 糠醛和 HMF 均可被酵母转化为相应的毒性较低的醇类^[7,14], 且一旦糠醛和 HMF 被酿酒酵母完全转化, 酵母其生长和乙醇生成能力将恢复。酿酒酵母同样具有代谢水解液中某些酚类化合物的能力, 可能是因为存在能够转化某些酚类抑制物(例肉桂酸、香豆酸和阿魏酸)的芳香酸脱羧酶 - 苯基丙烯酸脱羧酶等^[2]。

通常在含有抑制物的水解液中, 细胞生长停止、乙醇的生成受到阻碍。底物流加的过程控制是缓解这一抑制作用的有效措施之一。通过控制底物的流加速率, 使抑制物的浓度始终不超过酿酒酵母细胞自身的耐受性, 发酵过程则可以顺利进行。补料分批发酵同样也是根据保持抑制物浓度在较低水平的理念, 以提高酵母发酵能力和乙醇的产量, 因此与分批发酵相比, 木质纤维素水解液酿酒酵母乙醇发酵(包括普通发酵和同步糖化发酵)更适宜采用补料分批发酵操作方式^[2]。

本课题组研究了糠醛对酿酒酵母木糖代谢基因工程菌株 NAN-127 菌体生长和发酵的影响, 结果表明, 接种同时即添加 0.7 g/L 糠醛, 菌体生长速率、底物利用率和产物得率都没有受到明显影响, 而糠醛浓度增加为 3.0 g/L 时, 菌体生长速率及底物利用率明显降低。但是若在菌体生长稳定期(12 h)加入 3.0 g/L 糠醛, 则对菌体生长量没有明显影响, 同时副产物木糖醇得率下降了 17.2%。同样, 在稳定期后分别采用脉冲和流加的方式添加糠醛, 累计添加量达 9.0 g/L, 也没有对生物量水平及乙醇产率造成明显影响, 并且木糖醇得率较对照组分别下降了 39.7%(脉冲方式)和 25.0%(流加方式)。HPLC 分析表明, 糠醛在加入后 12 h 内即消耗完毕, 且 90% 以上的糠醛转化为糠醇。

增加发酵过程的初始细胞浓度也可以增强酵母对水解液的发酵力^[17]。此外, 人们也尝试了固定化细胞和细胞循环等过程控制措施^[6]。

另外, 在种子培养过程中添加一定量预处理水

解液有利于后续乙醇发酵。Alkasrawi 等^[30]利用在不同培养基中制备的种子进行同步糖化发酵(SSF)试验, 结果表明, 在云杉预处理水解液中制备的种子, 其发酵速率大于在纯葡萄糖培养基中制备的种子。而且, 前者对 HMF 转化速率也较高, 说明酵母在木质纤维素水解液中对抑制物有一个短期的适应性过程。Agbogbo 等^[31]通过试验证明经过短期适应的 *P. stipitis* CBS 6504 在未经脱毒处理的玉米秸秆水解液中发酵, 其糖利用率及乙醇产量较野生型都有所增加。

6 展望

预处理产生的抑制物对酿酒酵母乙醇发酵的影响, 是木质纤维素乙醇生物加工过程亟待解决的难题之一。近年来对抑制物形成、作用机制及酵母耐受机制的研究已经取得了很大进展, 在此基础上的理性分子育种, 及在合适的选择性压力下菌种的驯化, 是提高酿酒酵母自身对抑制物耐受性的有效方法, 结合发酵过程中控制条件的优化, 及研发利用廉价且选择性强的预处理原料的脱毒方法, 木质纤维素大规模生产乙醇定会取得很大进展。

REFERENCES

- [1] Shen Y, Wang Y, Bao XM, *et al.* Progress in the pathway engineering of ethanol fermentation from xylose utilising recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Chin J Biotech*, 2003, **19**(5): 636–640.
沈煜, 王颖, 鲍晓明, 等. 酿酒酵母木糖发酵酒精途径过程的研究进展. *生物工程学报*, 2003, **19**(5): 636–640.
- [2] Almeida JR, Modig T, Petersson A, *et al.* Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Chem Technol Biotechnol*, 2007, **82**(4): 340–349.
- [3] Sun Y, Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour Technol*, 2002, **83**(1): 1–11.
- [4] Liu ZL. Genomic adaptation of ethanologenic yeast to biomass conversion inhibitors. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, **73**(1): 27–36.
- [5] Fan LT, Lee YH, Gharpuray MM. The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis. *Adv Biochem Eng/Biotechnol*, 1982, **23**: 157–187.
- [6] Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresour Technol*, 2000, **74**(1): 25–33.
- [7] Taherzadeh MJ, Gustafsson L, Niklasson C, *et al.* Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000, **53**(6): 701–708.
- [8] Klinke HB, Thomsen AB, Ahring BK. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, **66**(1): 10–26.
- [9] Larsson S, Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B, *et al.* The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme Microb Technol*, 1999, **24**(3/4): 151–159.
- [10] Lin B, Zhao XQ, Ge XM, *et al.* The effects of dilute acid hydrolysate by-products of corn stover on ethanol fermentation of xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae* 6508-127. *Chin Biotechnol*, 2007, **27**(7): 61–67.
林贝, 赵心清, 葛旭萌, 等. 玉米秸秆酸解副产物对重组酿酒酵母 6508-127 发酵的影响. *中国生物工程杂志*, 2007, **27**(7): 61–67.
- [11] Nigam JN. Development of xylose-fermenting yeast *P. stipitis* for ethanol production through adaptation on hardwood hemicellulose acid prehydrolysate. *J Appl Microbiol*, 2001, **90**: 208–215.
- [12] Modig T, Lidén G, Taherzadeh MJ. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. *Biochem J*, 2002, **363**(3): 769–776.
- [13] Banerjee N, Bhatnagar R, Viswanathan L. Inhibition of glycolysis by furfural in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1981, **11**(4): 226–228.
- [14] Liu ZL, Slininger PJ, Dien BS, *et al.* Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2004, **31**(8): 345–352.
- [15] Liu XY, Zhang XH, Bao XM. Study on the stress resistance of *Saccharomyces cerevisiae* industrial strains. *Chin Brew*, 2006, **1**: 8–11.
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, **1**: 8–11.
- [16] Almeida JRM, Bertilsson M, Gorwa-Grauslund MF, *et al.* Metabolic effects of furaldehydes and impacts on biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, **82**(4): 625–638.
- [17] Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresour Technol*, 2000, **74**(1): 17–24.
- [18] Mussatto SI, Roberto IC. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolysates for use in fermentative processes: a review. *Bioresour Technol*, 2004, **93**(1): 1–10.
- [19] Larsson S, Cassland P, Jonsson LJ. Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose

hydrolysates by heterologous expression of laccase. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**(3): 1163–1170.

[20] Liu ZL, Slininger PJ, Gorsich SW. Enhanced biotransformation of furfural and hydroxymethylfurfural by newly developed ethanologenic yeast strains. *Appl Biochem Biotechnol*, 2005, **121**: 451–460.

[21] Nilsson A, Gorwa-Grauslund MF, Hahn-Hagerdal B, *et al.* Cofactor dependence in furan reduction by *Saccharomyces cerevisiae* in fermentation of acid-hydrolyzed lignocellulose. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**(12): 7866–7871.

[22] Wang Y, Shi WL, Liu XY, *et al.* Establishment of a xylose metabolic pathway in an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett*, 2004, **26**(11): 885–890.

[23] Heer D, Sauer U. Identification of furfural as a key toxin in lignocellulosic hydrolysates and evolution of a tolerant yeast strain. *Microbe Biotechnol*, 2008, **1**(6): 497–506.

[24] Martin C, Marcet M, Almazan O, *et al.* Adaptation of a recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strain to a sugarcane bagasse hydrolysate with high content of fermentation inhibitors. *Bioresour Technol*, 2007, **98**(9): 1767–1773.

[25] Larroy C, Fernandez MR, Gonzalez E, *et al.* Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* YMR318C (ADH6) gene product as a broad specificity NADPH-dependent alcohol dehydrogenase: relevance in aldehyde reduction. *Biochem J*, 2002, **361**: 163–172.

[26] Petersson A, Almeida J, Modig T, *et al.* A 5-hydroxymethyl furfural reducing enzyme encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* ADH6 gene conveys HMF tolerance. *Yeast*, 2006, **23**(6): 455–464.

[27] Gorsich SW, Dien BS, Nichols NN, *et al.* Tolerance to furfural-induced stress is associated with pentose phosphate pathway genes *ZWF1*, *GND1*, *RPE1*, and *TKL1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, **71**(3): 339–349.

[28] Endo A, Nakamura T, Ando A, *et al.* Genome-wide screening of the genes required for tolerance to vanillin, which is a potential inhibitor of bioethanol fermentation, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels*, 2008, **1**: 3.

[29] Larsson S, Nilvebrant NO, Jonsson LJ. Effect of overexpression of *Saccharomyces cerevisiae* Pad1p on the resistance to phenylacrylic acids and lignocellulose hydrolysates under aerobic and oxygen-limited conditions. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **57**(1/2): 167–174.

[30] Alkasrawi M, Rudolf A, Liden G, *et al.* Influence of strain and cultivation procedure on the performance of simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce. *Enzyme Microb Technol*, 2006, **38**(1/2): 279–286.

[31] Agbogbo FK, Haagensen FD, Milam D, *et al.* Fermentation of acid-pretreated corn stover to ethanol without detoxification using *Pichia stipitis*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2008, **145**: 53–58.



本期广告索引

企业	版位	企业	版位
GE Healthcare 公司	封底	美国 Promega 公司	内页
Roche 诊断产品有限公司	封二	生物谷网站	内页
赛默飞世尔科技有限公司	封三	上海国强生化工程装备有限公司	内页
泰州贝今生物技术有限公司	内页	镇江东方生物工程设备技术有限责任公司	内页