

高产木糖醇酵母菌的筛选鉴定及两级法发酵特性

张金明¹, 耿安利^{2*}, 姚传义^{1*}, 卢英华^{1,3}, 李清彪^{1,3}

(1. 厦门大学化学化工学院, 福建 厦门 361005; 2. 义安理工学院生命与化学技术学院,

新加坡 599489; 3. 厦门大学化学生物学福建省重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要: 从 300 多种土壤样品中进行筛选, 最终得到 10 株可耐受 300 g/L 木糖的酵母菌株, 且其木糖醇转化率超过 64.0%。其中酵母菌株 SB18 在 150 g/L 木糖下的木糖醇转化率为 68.5%, 为相同条件下转化率最大的菌株, 并经 18S rDNA 测序鉴定为热带假丝酵母。酶活测定结果显示 SB18 木糖还原酶主要依赖辅因子还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH), 其酶活性远大于木糖醇脱氢酶活性。对 SB18 进行两级法发酵条件研究, 确定补充氮源为尿素和酵母提取物, 接种量为 0.5 g/L, 转速转换时间为 36 h。在此条件下由 250 g/L 木糖摇瓶发酵 252 h 得到 207.65 g/L 木糖醇, 转化率为 83.1%, 达到理论值的 91.8%。本研究表明酵母菌 SB18 在高浓度木糖醇的工业生产中具有很大的应用潜力。

关键词: 木糖醇生产; 两级法发酵; 热带假丝酵母; 木糖还原酶; 木糖醇脱氢酶

中图分类号: Q 939.9

文献标志码: A

文章编号: 0438-0479(2011)03-0624-07

木糖醇作为一种天然存在的五碳糖醇, 可以作为替代糖。木糖醇可以有效抑制造成龋齿形成菌的代谢从而防止龋齿的形成, 它可以降低变性链球菌从母亲传向子代的几率^[1], 其体内代谢不需胰岛素参与, 可用作葡萄糖替代物^[2]。此外木糖醇还可用来生产 L-来苏糖, L-木糖以及 L-阿拉伯糖^[3]。木糖醇可以由木糖的化学加氢还原得到或从木糖代谢微生物的中间产物得到^[4]。目前木糖醇的生产都集中在生物转化法^[5-6]。从商业应用和工业化生产角度考虑, 关键问题在于微生物对高浓度底物的耐受性及木糖醇转化率。当前很多研究者都致力于木糖醇生产菌株的改进^[7-8]。由基因工程手段进行菌种改进过程复杂, 周期长, 技术要求高, 且突变菌的筛选和鉴定比较困难。条件优化也可以一定程度上提高目的产物的转化率, 但提高的程度有限。因此从自然界筛选出耐高底物浓度的木糖醇高产菌株成为一种快速实用的手段。本研究通过对新加坡土壤中的微生物进行多次筛选, 得到耐高木糖浓度的木糖醇高产菌株 SB18, 通过 18S rDNA 测序鉴定。本文还对 SB18 的发酵条件进行了优化, 并对其发酵过程中的关键酶行为进行了初步研究。

1 材料和方法

收稿日期: 2010-06-29

* 通信作者: gan2@np.edu.sg; cyao@xmu.edu.cn

1.1 酵母菌株

从新加坡农场和公园获取了 300 多种与落叶腐烂杂草和农林废弃物接触的土壤样品, 从中筛选和分离到 54 株可以利用木糖产木糖醇的酵母菌株, 再经过进一步分离纯化得到了热带假丝酵母 SB18 (*Candida tropicalis* SB18)。该菌在 4 °C 斜面保藏培养基 (YPX-A) 上保存备用。

1.2 试剂

聚合酶链式反应 (PCR) 分析试剂: 前导引物 NS1 序列为 5'-GTAGTCATATGCTTGTCTG-3', 后随引物 ITS2 序列为 5'-GGCTGCTGGCACCAGACTTGG-3', 5U/μL *Taq* 聚合酶 (Fermentas, Canada), 10 μmol/L dNTP (Fermentas, Canada), 10 μmol/L 5 倍稀释缓冲液 (Fermentas, Canada), 超纯水 (Fermentas, Canada), TA 质粒载体 pGEM/T (Promega, USA)。

酶活及蛋白测定试剂: 0.25 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.0), 0.1 mol/L 2-巯基乙醇 (Bio-Rad, USA) 3.4 mmol/L 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH), 3.4 mmol/L 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH), 3.4 mmol/L 氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD), 0.5 mol/L 木糖, 0.5 mol/L 木糖醇。蛋白测定使用 Quik Start Bradford Protein Assay Kit (Bio-Rad, USA) 并以牛血清蛋白为标准样。

其他试剂均购自 Sigma (USA) 或 Merck (Germany), 分析纯。

1.3 培养基

种子培养基(YPX): 20 g/L 木糖, 10 g/L 酵母提取物和 20 g/L 蛋白胨.

斜面保藏培养基(YPX-A): 20 g/L 木糖, 10 g/L 酵母提取物, 20 g/L 蛋白胨和 20 g/L 琼脂.

摇瓶发酵培养基: 6.76 g/L YNB(yeast nitrogen base, 酵母氮源), 1.0 g/L 酵母提取物, 2.0 g/L 尿素, 150 g/L 木糖.

富集培养基(YPX): 300 g/L 木糖, 10 g/L 酵母提取物和 20 g/L 蛋白胨.

木糖醇生产菌株筛选培养基: 6.76 g/L YNB, 1.0 g/L 酵母提取物, 50 g/L 木糖和 20 g/L 琼脂.

1.4 木糖醇高产酵母菌株的筛选

15 mL 的试管中加入 5 mL 含 300 g/L 木糖的富集培养基和 1 g 土壤样品, 于 30 °C 条件下培养 5 d, 转速为 200 r/min. 观察微生物生长并从生长状况良好的试管中取样进行平板稀释涂布, 于 30 °C 条件下培养 3 d, 对其中生长旺盛的菌落在同样的平板培养基中进行纯化分离得到单菌落. 将分离得到的单菌落接于 100 mL 摇瓶培养, 摇瓶含有 30 mL 150 g/L 木糖的发酵培养基, 在 30 °C 和 200 r/min 条件下培养 5 d, 所得发酵液进行木糖醇含量测定, 确定 10 株木糖醇高产酵母菌株, 并对其中一株 SB18 进行鉴定发酵条件研究.

1.5 PCR 测序鉴定

PCR 引物采用通用引物 NS1 和 ITS2, 反应体系总体积为 50 μ L, 其中含有两种引物(10 μ mol/L) 各 1 μ L, 5 U/ μ L *Taq* 聚合酶 0.5 μ L, 10 mmol/L dNTP 1.5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 4 μ L, 5 倍稀释缓冲液 10 μ L, 超纯水 32 μ L 及 1 μ L 模板 DNA. 反应预变性温度 95 °C 5 min, 再经 30 个如下循环反应: 变性温度 94 °C 60 s, 退火温度 56 °C 60 s, 延伸温度 72 °C 2 min, 最后延伸温度 72 °C 10 min. 反应结束后产物在 4 °C 下保存. 所得 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳分离纯化后克隆到 TA 质粒载体 pGEM-T (参照厂家提供的说明书操作), 将所得克隆载体送测序公司进行测序, 所得基因序列图谱使用 BLAST 在线服务的 NCBI 基因库进行对照分析, 结果显示该菌株相关基因序列和酵母属的热带假丝酵母达到 100% 的吻合.

1.6 细胞内粗酶液的提取

在热带假丝酵母 SB18 的发酵培养过程中进行取样, 所得发酵液在 4 °C 8 000 g 下离心 4 min, 所得细胞在室温下用无菌水洗 2 次然后悬浮于 0.25 mol/L

的磷酸缓冲液(pH 7.0)中, 再加入 0.1 mol/L 的 2-巯基乙醇溶液, 使最终的细胞悬浮液质量浓度达到 3 g/L 左右. 取该细胞悬浮液 1 mL 于 2 mL 的离心管, 再加入直径为 0.5 mm 的玻璃珠 1 mL 进行机械破碎, 破碎总时间为 5 min, 过程中每破碎 20 s 后将其置于冰上 30 s, 破碎结束后于 4 °C 8 000 g 下离心 6 min, 收集上清液并于 4 °C 条件下保存然后进行木糖还原酶(xylose reductase, XR)和木糖醇脱氢酶(xylitol dehydrogenase, XDH)的活性分析.

1.7 酶活测定

XR 和 XDH 的酶活均在常温下用分光光度计(UVmin 1240, Shimadzu, Japan)测定反应体系在 340 nm 处吸光值的变化, 测定方法参考文献所述方法^[9-10]. XR 的测定在 1.5 mL 的比色皿中进行, 反应体系包含 100 μ L 去离子水, 500 μ L 磷酸缓冲液, 100 μ L 2-巯基乙醇, 100 μ L 3.4 mmol/L NADPH(NADPH 依赖的木糖还原酶)或 100 μ L 3.4 mmol/L NADH(NADH 依赖的木糖还原酶), 100 μ L 0.5 mol/L 木糖. 将反应液于室温下反应 2 min. XDH 的测定在同样的条件下进行, 只需将上述体系中的 NADPH(NADH)替换为 100 μ L 的 NAD 并将木糖替换为木糖醇即可. 所有反应于 100 μ L 提取的粗酶液加入开始记录吸光值的变化. 以没有加入酶液的体系作空白对照, 并用去离子水补齐到总反应体系 1 mL. 蛋白测定参考 Quik Start Bradford Protein Assay Kit 提供的说明进行. 所有酶活均使用比酶活为标准(U/mg, 酶活单位(U)定义为 1 min 催化氧化(或还原)1 μ mol 的 NADPH/NADH(或 NAD)所需消耗的酶量).

1.8 细胞干质量的测定

细胞干质量通过测定细胞发酵液在 600 nm 的吸光值(OD_{600})并由细胞穿透曲线确定. 细胞穿透曲线通过细胞悬浮液在 600 nm 处的吸光值和细胞干质量之间的线性关系获得, 该曲线线性范围在 OD_{600} 值 0.2~0.7 之间适用, 穿透曲线线性方程为: 细胞质量浓度 $X/(g \cdot L^{-1}) = 0.308 \times OD_{600}$.

1.9 发酵液成分分析

木糖和木糖醇浓度采用高效液相色谱仪(Agilent 1200, USA)测定. 色谱柱为 Aminex HPLC-87H 柱(Bio-Rad, USA), 柱温为 75 °C, 检测器为红外衍射检测器(RID), 检测器温度为 35 °C, 流动相为 5 mmol/L 硫酸溶液, 洗脱速度为 0.6 mL/min.

2 结果与讨论

2.1 高木糖浓度下木糖醇高产菌株的筛选鉴定

经多轮分离筛选得到 10 株高产木糖醇的酵母菌株, 结果见表 1, 得到的 10 株野生酵母菌株木糖醇转化率(Y_{PS})均超过了 64.0%, 除 SB16, WLR33 和 D6I 外, 其他 7 株基本能在 5 d 内完全利用木糖. 其中菌株 SB18 木糖醇产量(P)最高, 达到 100.76 g/L, 同时其木糖醇的体积产率(Q_P)也达最高(0.601 g/(L·h)). 菌株 WLR33 的木糖醇转化率最高(68.9%), 但其木糖醇体积产率低于 SB18. 另一株酵母 SB9 也表现出较高的木糖醇转化率, 其体积产率达到 0.601 g/(L·h), 但其木糖醇转化率低于 SB18. 综合考虑, SB18 被选为目的菌株. 对酵母菌株 SB18 进行 18S rDNA 测序分析, 对所得序列结果进行同源序列搜索, 比较了和已知酵母菌株相应序列的同源性, 结果显示 SB18 的 18S rDNA 相关序列和数据库中已知的热带假丝酵母属序列号为 NRRL Y-12968Y、IY03-5-26-4-12、HK10b 等酵母相关的核苷酸序列的吻合度均达到 100%, 菌株 SB18 因此被确定为热带假丝酵母属.

2.2 热带假丝酵母 SB18 木糖醇代谢的关键酶 XR 和 XDH

对热带假丝酵母 SB18 发酵过程中关键酶的酶活测定结果见图 1~3. 由图可见该酵母细胞内所含的 XR 主要是依赖于辅因子 NADPH, 其细胞内 NADPH 和 NADH 的比例平均超过 20. 由图 1 可见, 该菌株细胞内 XDH 活性很低, 而依赖于辅因子 NADH 的 XR 活性也很低并在发酵过程中逐渐降低, 最终在木糖消耗完毕时活性为零. 由于木糖醇的氧化可以继续, XDH 的活性维持不变. 图 2 中 NADPH 依赖性的 XR 在发酵开始后持续增大, 木糖消耗完毕活性开始下降. 图 3 中显示, 热带假丝酵母 SB18 在发酵过程中的 XR 和 XDH 的比例维持在 30 左右. Aguiar 等^[11]的研究结果表明, 产木糖醇的高效酵母菌株的 XR 对辅因子 NADPH 具有专一依耐性, 其 XDH 则对辅因子 NAD 具有专一依赖性. Jeffries 和 Jin 的报道^[12]指出, 酵母细胞内 XR/XDH 越大越有利于木糖醇的累积. 本实验结果表明, 热带假丝酵母 SB18 的木糖利用酶系确定其是一株产木糖醇的高效菌株.

2.3 不同氮源对木糖醇产量的影响

对于木糖代谢产木糖醇的大多数酵母菌株, 酵母提取物是其生长所需的重要营养物质, 有些酵母菌则偏好其他有机氮源或者无机氮源. 本实验在以 YNB 培养基(6.76 g/L)加酵母提取物(1.0 g/L)为基础, 分别以尿素(2.0 g/L), 硫酸铵(1.0 g/L), 硝酸铵(1.0 g/L)和酪蛋白氨基酸(2.0 g/L)为补充氮源, 考察了

表 1 10 株高产量木糖醇菌株之产率分析
Tab. 1 Analysis of top ten yeast strains for high xylitol production

菌株名	残余木糖/(g·L ⁻¹)	木糖醇/(g·L ⁻¹)	$Y_{PS}/\%$	$Q_P/(g\cdot L^{-1}\cdot h^{-1})$	$\eta/\%$
SB18	2.84±0.31	100.76±0.83	68.5	0.601	75.07
BT2	0	95.91±1.01	63.9	0.571	70.11
WLR33	7.83±1.21	97.90±1.36	68.9	0.583	75.51
SB16	28.37±3.98	83.13±3.72	68.3	0.495	74.94
D6I	13.75±2.76	89.58±2.81	65.7	0.533	72.09
AM76	0	97.88±1.12	65.3	0.583	71.55
SB1a	0	100.14±1.03	66.8	0.596	73.21
SB32	0	96.47±0.95	64.3	0.574	70.52
SB9	0	100.72±0.38	67.3	0.601	73.77
SB8a	1.38±0.78	97.07±0.71	65.3	0.578	71.61

注: 发酵在 100 mL 摇瓶中进行, 含有 30 mL 培养基, 培养基为 YNB 加酵母提取物, 木糖质量浓度为 150 g/L, 培养温度为 30 ℃, 转速为 200 r/min, 培养时间为 5 d. η : 木糖到木糖醇的转化效率= 实际木糖醇转化率/木糖醇理论最大转化率(91.2%)×100%.

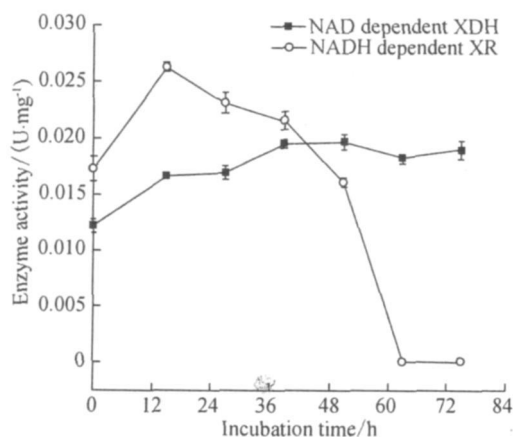


图 1 热带假丝酵母 SB18 中依赖于 NAD 的 XDH 的酶活以及依赖于 NADH 的 XR 的酶活
Fig.1 The enzyme activity of NAD dependent XDH and NADH dependent XR of *C. tropicalis* SB18

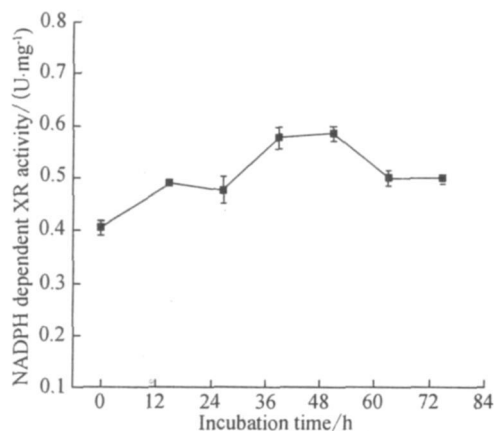
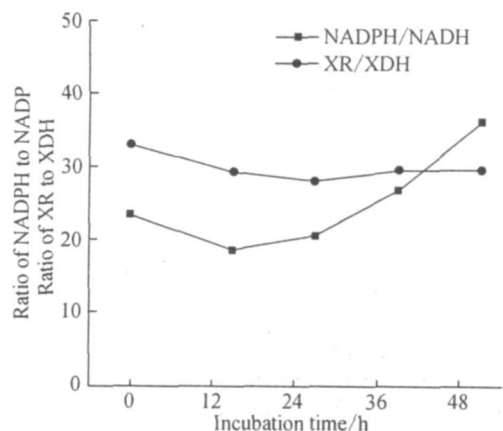


图 2 热带假丝酵母 SB18 中依赖于 NADPH 的 XR 的酶活
Fig.2 NADPH dependent XR activity of *C. tropicalis* SB18

其对细胞生长和木糖醇产量的影响, 结果见表 2. 由表可见, 在尿素和酪蛋白氨基酸作为补充氮源的培养基中热带假丝酵母 SB18 可以完全利用木糖, 而加入硫酸铵和硝酸铵对该菌株对木糖的利用基本没有促进作用. 尿素可以加速木糖利用和增加细胞产量, 同时也能大幅度提高木糖醇产量和体积产率, 这与 Kang 等^[14]的研究结果一致. 此外表 2 的结果也显示硝酸铵的加入反而会降低木糖发酵的各项参数, 酪蛋白氨基酸的加入则可以提高木糖醇产量和细胞产量, 这和 Vandeska 等^[15]的研究结果一致. Kern 等^[16]经研究指出, 氮源对木糖发酵过程的影响可能是对过程中关键酶 XR 和 XDH 的影响产生的, 这种影响主要是铵盐中的铵根离子起作用, 而硝酸根离子将会对这些酶起抑制作用. 本实验表明对于热带假丝酵母 SB18 最适合的氮源为酵母提取物加尿素.



实验培养条件为 30 ℃, 200 r/min, 木糖质量浓度为 50 g/L, 在 250 mL 摇瓶中进行, 含 100 mL 发酵培养基, 接种量为 0.1 g/L, 零时刻酶活代表种子细胞酶活.

图 3 热带假丝酵母 SB18 中关键酶 XR 和 XDH 比值以及 XR 的两种辅因子 NADPH 和 NADH 比值
Fig.3 The enzyme ratio of XR to XDH and the cofactor ratio of NADPH to NADH in *C. tropicalis* SB18

2.4 接种量对木糖产量的影响

接种量会影响到微生物的代谢活性和代谢能力, 从而影响到发酵效率及目的产物的转化率. 本实验中采用了 5 个不同的接种量并考察了其对木糖醇产量的影响, 结果见表 3. 由表可见, 在 5 d 的发酵结束后, 木糖全部被消耗, 但随着接种量的加大, 除细胞产量增大外, 其各项发酵参数均出现了下降. 最佳发酵参数在最少接种量 0.584 g/L 的条件下获得. 在此条件下木糖醇的产量最大(106.89 g/L), 转化率达到 71%. 这一结果表明, 较低的接种量更有利于热带假丝酵母 SB18 将木糖转化为木糖醇, 这与 Sampiao 等^[13]的研究结果一致. 因此对于热带假丝酵母 SB18 来讲, 其适接种量为 0.5~0.6 g/L.

2.5 两级法发酵过程转速切换时间的确定

由于热带假丝酵母 SB18 的 XR 主要依赖于辅因子 NADPH, XDH 则依赖于辅因子 NAD^[17], 而 NAD 则来源于 NADH 的氧化, 因此该过程氧气的供应决定了 XDH 的活性, XDH 活性越低越有利于木糖醇的生产. 而另一方面微生物发酵过程需要自身代谢和保证一定的细胞量. 因此, 木糖醇生产的酵母菌株需要在微氧条件下进行. 鉴于这一特点, 本研究采用了两级法发酵^[18-19], 通过控制转速以适当地控制供氧量. 表 4 为转速切换时间对木糖发酵参数的影响. 由表可见, 第一阶段持续 36 h 木糖醇产量达到最高(113.88 g/L), 在此情况下木糖醇转化率和体积产率均达最大. 当第

表 2 不同氮源对热带假丝酵母 SB18 木糖醇生产的影响
Tab. 2 Effects of nitrogen sources on xylitol production by *C. tropicalis* SB18

氮源	残余木糖/(g·L ⁻¹)	木糖醇/(g·L ⁻¹)	X/(g·L ⁻¹)	Y _{PS} /%	Q _P /(g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	η/%
1.0 g/L 酵母提取物	19.83±1.62	77.48±0.35	6.34±0.16	73	0.43	72.7
1.0 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄	22.32±4.61	76.61±3.55	6.49±0.21	75	0.42	74.4
1.0 g/L NH ₄ NO ₃	21.75±7.83	57.79±4.22	5.94±0.08	49	0.32	49.4
2.0 g/L 尿素	0	112.27±0.62	12.07±0.25	76	0.81	82.1
2.0 g/L 酪蛋白氨基酸	2.21±0.01	96.72±0.49	8.58±0.22	75	0.54	72.4

注:发酵在 250 mL 摇瓶中进行,含有 50 mL 培养基,第一阶段培养时间为 24 h,转速 250 r/min,第二阶段转速 100 r/min,接种量为 0.1 g/L,表中以 YNB 加酵母提取物的培养基为参考培养基.

表 3 接种量对热带假丝酵母 SB18 木糖醇生产的影响
Tab. 3 Effects of inoculum size on xylitol production by *C. tropicalis* SB18

接种量/(g·L ⁻¹)	残余木糖/(g·L ⁻¹)	木糖醇/(g·L ⁻¹)	X/(g·L ⁻¹)	Y _{PS} /%	Q _P /(g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	η/%
0.584±0.001	0	106.89±1.29	15.89±0.85	71	0.99	78.1
1.155±0.022	0	105.44±1.24	16.89±0.39	70	0.98	77.1
2.271±0.029	0	100.83±0.26	18.63±0.28	67	0.93	73.7
3.311±0.019	0	94.04±0.41	19.01±0.27	63	0.87	68.7
5.043±0.110	0	89.36±0.34	18.91±0.32	60	0.83	65.3

注:种子培养时间为 24 h,第一阶段发酵 24 h 转速为 250 r/min,第二阶段转速为 100 r/min,100 mL 摇瓶中含有 30 mL 发酵培养基,木糖质量浓度为 150 g/L.

表 4 转速切换时间对热带假丝酵母 SB18 木糖醇生产的影响
Tab. 4 Effects of shaking speed switch time on xylitol production by *C. tropicalis* SB18

转速切换时间/h	残余木糖/(g·L ⁻¹)	木糖醇/(g·L ⁻¹)	X/(g·L ⁻¹)	Y _{PS} /%	Q _P /(g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	η/%
12	30.68±0.47	87.83±2.02	6.61±0.05	74	0.81	80.71
24	13.44±0.69	103.99±0.04	8.63±0.01	76	0.96	83.02
36	0	113.88±0.11	10.17±0.14	76	1.05	82.91
48	0	108.86±0.39	13.16±0.19	73	1.01	79.57
60	0	104.82±1.49	14.81±0.09	71	0.97	76.62
72	0	99.73±0.98	16.28±0.29	66	0.92	72.91
84	0	96.54±0.47	18.05±0.07	64	0.89	70.57
96	0	91.68±0.39	17.29±0.59	61	0.85	67.02
120(单级)	0	90.77±0.23	21.25±0.21	61	0.84	66.40

注:100 mL 摇瓶中含有 30 mL 培养基,接种量为 0.5 g/L,第一阶段摇瓶发酵转速为 250 r/min,第二阶段转速为 100 r/min,转速转变时间代表从发酵开始到转速改变的第一阶段持续的时间,培养时间为 5 d.

一阶段培养时间多于 36 h,热带假丝酵母 SB18 的发酵参数随着该阶段时间的增加而降低.当发酵过程转速维持 250 r/min 不变(单级)时虽然细胞产量最大达到 21.25 g/L,但是其木糖醇转化率却最小,仅为 61%,这说明一部分生成的木糖醇被继续氧化代谢,从而降低了木糖醇的转化率.第一阶段时间小于 36 h,在 5 d 发酵结束时木糖利用不完全,且木糖醇体积产率随着该阶段时间的减少而降低.因此确定两级法发

醇的最佳转速切换时间为 36 h.

2.6 热带假丝酵母 SB18 在 250 g/L 木糖下于 500 mL 摇瓶中的发酵特性

经上述实验, 以 250 g/L 的木糖为唯一碳源, 用 YNB 作为基础培养基, 以酵母提取物和尿素作为辅助氮源, 接种量为 0.5 g/L, 在 500 mL 的摇瓶中进行一批发酵实验. 发酵液体积为 200 mL, 发酵第一阶段维持在 36 h, 第一阶段转速为 250 r/min, 第二阶段转速为 100 r/min, 结果见图 4. 由图可见, 在 250 g/L 的木糖质量浓度下, 经 252 h 发酵, 热带假丝酵母 SB18 可以完全利用木糖, 并产生 207.65 g/L 木糖醇, 此时木糖醇的体积产率为 0.82 g/(L·h), 木糖醇转化率为 83.1%, 达到理论转化率的 91.8%. 目前很多研究报道了不同的耐高浓度木糖的新木糖醇生产菌株. Kang 等^[14] 所筛选到的热带假丝酵母 HY200 可以耐受 300 g/L 木糖, 其木糖醇转化率为 72%. Ikeuchi 等^[20] 分离到的假丝酵母 5599 (*Candida* sp. 5599) 利用 300 g/L 的木糖发酵得到 210 g/L 木糖醇, 但其木糖利用率仅有 80.5%. 与上述报道相比, 热带假丝酵母 SB18 在高浓度木糖浓度下木糖醇的产量和转化率都体现出一定的优势. 而两级法发酵在控制了氧气供应的基础上提高了木糖的利用率和木糖醇的转化率.

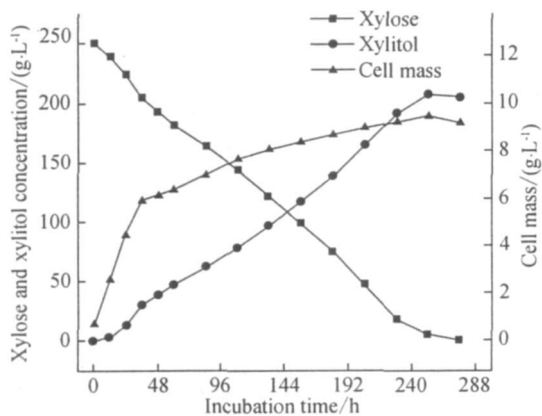


图 4 热带假丝酵母 SB18 在 250 g/L 木糖下的发酵特性
Fig. 4 The fermentation performance of *C. tropicalis* SB18 in 250 g/L xylose

3 结 论

本文通过对土壤样品中的微生物进行多次筛选, 分离得到耐受高木糖浓度的木糖醇生产菌株热带假丝酵母 SB18, 其木糖代谢的关键酶 XR 为 NADPH 专一依赖性. 两级法发酵研究表明, 该菌株的最佳补充氮源为酵母提取物加尿素, 适直接种量

为 0.5~0.6 g/L, 发酵过程转速切换时间为 36 h, 在上述条件下由 250 g/L 木糖发酵产生 207.65 g/L 木糖醇, 转化率为 83.1%, 达到理论转化率的 91.8%. 研究结果表明该菌株具有良好的木糖和木糖醇耐受性, 和较高的木糖转化效率, 具有很大的应用潜能. 两级法发酵对于提高木糖的转化效率有积极作用, 因而可以作为提高微生物转化效率的有效手段.

参考文献:

- [1] Lynch H, Milgrom P. Xylitol and dental caries: an overview for clinicians[J]. Journal of the California Dental Association, 2003, 31(31): 205-209.
- [2] Brunzell J D. Use of fructose, sorbitol, or xylitol as a sweetener in diabetes mellitus[J]. J Am Diet Assoc, 1978, 73(5): 499-506.
- [3] Granström T B, Uzunori K, Leisola M. A rare sugar xylitol. Part ②: biotechnological production and future applications of xylitol[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 74(2): 273-276.
- [4] Chiang C, Knight S G. Metabolism of D-xylose by moulds[J]. Nature, 1960, 188: 79-81.
- [5] Rita C L B R, Luciane S, Gilvane S M, et al. Enhanced xylitol production by precultivation of *Candida guilliermondii* cells in sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate[J]. Curr Microbiol, 2006, 53(1): 53-59.
- [6] Thomas P W. Xylitol production by *Candida* species grown on a grass hydrolysate[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2009, 25(5): 913-916.
- [7] Bae S M, Park Y C, Lee H, et al. Production of xylitol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* containing xylose reductase gene in repeated fed-batch and cell-recycle fermentations[J]. Enzyme Microb Technol, 2004, 35(6): 545-549.
- [8] Ko B S, Kim J, Kim J H. Production of xylitol from D-xylose by a xylitol dehydrogenase gene disrupted mutant of *Candida tropicalis*[J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(6): 4210-4213.
- [9] Smiley K L, Bolen P L. Demonstration of D-xylose reductase and D-xylitol dehydrogenase in *Pachysolen tannophilus*[J]. Biotechnol Lett, 1982, 4(9): 607-610.
- [10] Chiang C, Knight S G. D-Xylose reductase and D-xylitol dehydrogenase from *Penicillium chrysogenum* [J]. Methods Enzymol, 1966, 9: 188-193.
- [11] Aguiar W B, Faria L F F, Couto M A P G, et al. Growth model and prediction of oxygen transfer rate for xylitol production from D-xylose by *C. guilliermondii*[J]. Biochem Eng J, 2002, 12(1): 49-59.

- [12] Jeffries T W, Jin Y S. Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts[J]. Appl Microbiol Biotechnol J, 2004, 63(5) : 495-509.
- [13] Sampaio F C, Chaves A V M, Converti A, et al. Influence of cultivation conditions on xylose to xylitol bioconversion by a new isolate of *Debaryomyces hansenii* [J]. Bioresour Technol, 2008, 99(3) : 502-508.
- [14] Kang H Y, Kim Y S, Kim G J, et al. Screening and characterization of flocculent yeast *Candida* sp. HY2000 for the production of xylitol from *D*-xylose[J]. J Microbiol Biotechnol, 2005, 15(2) : 362-367.
- [15] Vandeska E, Amartei S, Kuzmanova S, et al. Effects of environmental conditions on production of xylitol by *Candida boidinii* [J]. World J Ferment Biotechnol, 1995, 11(2): 213-218.
- [16] Kern M, Nidetzky B, Klaus D, et al. Effect of nitrogen sources on the levels of aldose reductase and xylitol dehydrogenase activities in the xylose-fermenting yeast *Candida tenuis*[J]. J Ferment Bioeng, 1998, 85(2) : 196-202.
- [17] Chakravorty M, Veiga L A, Bacila M, et al. Pentose metabolism on *Candida* 2: the diphosphopyridine nucleotide-specific polyol dehydrogenase of *Candida utilis*[J]. J Biol Chem, 1962, 237(4) : 1014-1020.
- [18] Heux S, Sablayrolles J M, Cochon R, et al. Engineering a *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast that exhibits reduced ethanol production during fermentation under controlled microoxygenation conditions [J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(9) : 5822-5828.
- [19] Kim S Y, Kim J H, Oh D K. Improvement of xylitol production by controlling oxygen supply in *Candida parapsilosis*[J]. J Ferment Bioeng, 1997, 83(3) : 267-270.
- [20] Ikeuchi T, Azuma M, Kato J, et al. Screening of microorganisms for xylitol production and fermentation behavior in high concentrations of xylose[J]. Biomass Bioenergy, 1999, 16(5): 333-339.

Isolation and Identification of a High-yield Xylitol-producing Yeast Strain and Its Two-stage Fermentation Performances

ZHANG Jin-ming¹, GENG An-li^{2*}, YAO Chuan-yi^{1*}, LU Ying-hua^{1,3}, LI Qing-biao^{1,3}

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2. School of Life Sciences and Chemical Technology, Ngee Ann Polytechnic, Singapore 599489, Singapore;

3. The Key Laboratory for Chemical Biology of Fujian Province, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Xylose-utilizing yeasts isolated from soil samples in Singapore were screened for xylitol production in high xylose concentration. After several round of screening, 10 strains were selected for their high tolerance to 300 g/L xylose concentration, which can convert xylose into xylitol with a yield greater than 64.0%. Strain SB18 exhibited the maximal xylitol yield of 68.5% from 150 g/L xylose, and then was identified as *Candida tropicalis* by 18S rDNA sequencing information. Enzyme assay results indicate that in strain SB18, xylose reductase (XR) is NADPH dependent and its activity is much higher than that of xylitol dehydrogenase (XDH). A two-stage fermentation process was employed to investigate the cultivation condition of SB18. The results show that the best nitrogen sources are yeast extract and urea, inoculum size is 0.5 g/L, initial xylose concentration is 250 g/L, the optimal speed switch time is 36 h with a shaking speed of 250 r/min in the first stage, and a speed of 100 r/min afterwards. Under the optimal cultivation conditions, xylitol final concentration reached 207.65 g/L after 252 h incubation from 250 g/L, corresponding to a xylitol yield of 83.1% and 91.8% xylose-to-xylitol bioconversion efficiency. This work demonstrates that strain *C. tropicalis* SB18 has great potentials in industrial xylitol bioproduction in high xylose concentration.

Key words: xylitol production; two-stage fermentation; *Candida tropicalis*; xylose reductase; xylitol dehydrogenase