

树干毕赤酵母和酿酒酵母耦合 发酵高浓度混合糖产乙醇

苏海锋,杨登峰

(广西科学院 国家非粮生物质能源工程技术研究中心,广西 南宁 530007)

摘要: 研究在高浓度发酵底物下,不同木糖及葡萄糖之间的比例、*P. stipitis* CBS5773 和 *S.cerevisiae* 的发酵先后启动顺序、两菌间的协同发酵对两菌共同发酵混合糖产乙醇的影响。结果表明,乙醇的产量主要来自于由 *S.cerevisiae* 消耗葡萄糖而产生,两菌株偶联发酵时,*S.cerevisiae* 能较快启动进入产乙醇发酵而不受 *P. stipitis* CBS5773 生长的抑制。在高浓度(200 g/L)糖浓度下,*S.cerevisiae* 和 *P. stipitis* CBS5773 存在相互拮抗作用,*S.cerevisiae* 并不完全抑制 *P. stipitis* CBS5773 的生长。当木糖与葡萄糖之比为 3:2,且 *S.cerevisiae* 和 *P. stipitis* CBS5773 分开接入,发酵 12 h,乙醇产量最大,达到 57 g/L。

关键词: 微生物; 树干毕赤酵母 CBS5773; 酿酒酵母; 共同发酵; 乙醇

中图分类号: QP3-3; TS261.1; TS262.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-9286(2010)05-0019-04

Coupled Fermentation of High-concentration Mixed Sugars by *P. stipitis* and *S.cerevisiae* to Produce Ethanol

SU hai-feng and YANG Deng-feng

(Guangxi Scientific Academy, Non-grain Biomass Energy Engineering Technology Research Center, Nan'ning, Guangxi 530007, China)

Abstract: The effects of different ratio of xylose and glucose, the fermentation start-up sequence of *P. stipitis* CBS5773 and *S.cerevisiae*, and the cooperative fermentation of the two yeasts on ethanol production from mixed sugars were investigated in conditions of high-concentration fermenting substrate. The results showed that ethanol was produced mainly by glucose consumption via *S.cerevisiae*, *S.cerevisiae* was faster in fermentation start-up in coupled fermentation process and such start-up would not be inhibited by *P. stipitis* CBS5773 growth, *S.cerevisiae* and *P. stipitis* CBS5773 presented mutual antagonism under high sugar content (200 g/L), and *S.cerevisiae* would not completely inhibit the growth of *P. stipitis* CBS5773. The maximum ethanol yield could be achieved (57 g/L) if the ratio of xylose and glucose was 3:2, *S.cerevisiae* and *P. stipitis* CBS5773 inoculated respectively, and fermentation time was 12 h.

Key words: microbe; *P. stipitis* CBS5773; *S.cerevisiae*; co-fermentation; ethanol

目前,利用基因工程改造菌株能够同时发酵戊糖和己糖有两个基本途径,一个就是将能够发酵木糖微生物的某个关键酶导入另一能够发酵己糖的微生物中,从而达到发酵所需的目标产物。例如,研究者将木糖还原酶、木糖脱氢酶、木糖醇脱氢酶、木酮糖激酶的基因融合到糖酵解启动子中,目前已经成功整合进酵母染色体中^[1-2];第二个途径就是改变细胞的机制以使在葡萄糖存在的情况下同步消耗木糖,例如带 *ptsG* 基因的产乙醇的大肠杆菌突变株降低了木糖发酵时葡萄糖产生的阻遏^[3]。

因而,许多从事生物质能研究的科学家根据以上两种途径来构建能够有效地将木质纤维素发酵产乙醇的菌

株^[4-6]。但是由基因工程构建的单一菌株发酵混合糖总是存在许多局限。其中一个局限就是通过改造后的菌株在一定程度上能消耗混合糖,但是在发酵过程中,葡萄糖总是酶转化底物的最优选择,混合糖的消耗总是不能同步进行,例如在 *E.coli* K011 菌株的发酵木质纤维素的水解底物中,24 h 后木糖仅被消耗了 11% 而葡萄糖却被消耗了 85%^[7]。通过改善 *ptsG* 基因从而提高了在葡萄糖存在的情况下木糖的消耗率,但仍然有 40% 的残余^[3]。类似这种方法,基因工程菌 *S. cerevisiae* 消耗完葡萄糖时,木糖消耗仍达不到 25%^[2]。即使将木糖异构酶转接到 *S. cerevisiae* 中而使木糖转化成胞外木酮糖,当葡萄糖消耗

基金项目 国家自然科学基金项目 以禾木纤维素为原料发酵法生产燃料乙醇的关键科学基础及实用技术(20666002)。

收稿日期:2010-03-10

作者简介 苏海锋(1981-),男,广西博白人,硕士,研究实习员,主要从事环境微生物、生物质能源研究。

完毕时仍有 75 % 的木糖残余^[8]。

而由这些基因工程改造的菌株要么存在乙醇产量低,副产物较多,要么就是菌株不稳定等无法克服的问题,例如 Walfridsson^[9] 等克隆高温细菌 *Thermus thermophilus* 的木糖异构酶基因并在酿酒酵母中得到活性表达。但是该重组菌株表达的 XI 的最适温度为 85 ℃,并不适合乙醇发酵的常规温度(30 ℃),当此菌株处于乙醇发酵的常规温度时其活性仅为最适条件下酶活的 4 %。故而到目前为止,仍然没有找到理想的能够同时转化戊糖和己糖生产乙醇的、具有经济价值的单一菌株。在自然界中也还没有找到单一的微生物菌株能够发酵来自木质纤维素水解后产生的所有糖。

因此,研究者们对在同一发酵体系中利用两种微生物协同发酵进行了相关的研究。两个菌株同时发酵木糖和葡萄糖转化乙醇取决于两个因素:一是协同发酵的两个菌株必须能够共同生长^[10-12];二是共同发酵过程必须是连续的^[13]。S. G. Kilian 研究了 *Pichia stipitis* 和 *Candida shehatae* 共同发酵时,它们各自对葡萄糖和木糖的优先利用顺序^[14];J. C. du Preez 研究了 *Candida shehatae* 和 *Pichia stipitis* 共同发酵低浓度(40 g/L)葡萄糖、木糖及阿拉伯糖的顺序及两个菌之间的协同作用^[15];T. Lebeau 研究了将 *Saccharomyces cerevisiae* 和 *Candida shehatae* 固定化后对发酵混合糖产乙醇的影响^[16]。然而,以上研究均是在木糖和葡萄糖较低浓度条件下进行的(<200 g/L),而且并不涉及 *P. stipitis* 和 *S. cerevisiae*,在这方面国内尚无相关研究。本文探讨了在高浓度发酵底物条件下,对木糖及葡萄糖两者之间的比例,以及 *P. stipitis* 和 *S. cerevisiae* 在发酵中的先后启动的顺序,两株菌间的协同发酵问题做一定的研究,并考察两株菌共同发酵混合糖时产乙醇的情况,从而找出最佳的混合糖浓度的比例。

1 材料与方法

1.1 菌种

树干毕赤酵母来源于美国标准菌种库库藏菌种 *P. stipitis* CBS5773;酿酒酵母 *S. cerevisiae* 来源于广西科学院国家非粮生物质能工程中心。

1.2 培养基

1.2.1 用于培养树干毕赤酵母 CBS 5773 的培养基

斜面培养基:木糖 20 g/L,琼脂 25 g/L,酵母浸膏 3 g/L,蛋白胨 5 g/L,pH 值 4.5。

活化培养基:木糖 20 g/L,酵母浸膏 3 g/L,蛋白胨 5 g/L,pH 值 4.5。

液体发酵种子培养基:木糖 20 g/L,葡萄糖 10 g/L,蛋白胨 3 g/L,酵母浸膏 2.5 g/L,CaCl₂ 0.25 g/L,MgSO₄

0.25 g/L,KH₂PO₄ 2.5 g/L,pH 值 4.5。

1.2.2 用于培养酿酒酵母 *S. cerevisiae* 的培养基

斜面培养基:酵母菌完全培养基 YEPD:酵母浸膏 10 g/L,蛋白胨 20 g/L,葡萄糖 20 g/L,pH 自然。

活化培养基:葡萄糖 20 g/L,酵母浸膏 3 g/L,蛋白胨 5 g/L,pH 值 4.5。

液体发酵种子培养基:蛋白胨 10 g/L,葡萄糖 10 g/L,酵母浸膏 7.5 g/L,KH₂PO₄ 3 g/L,MgSO₄·7H₂O 5 g/L、自然 pH。

1.2.3 混合糖发酵液

木糖和葡萄糖分别为 1:1、7:3、6:4,各处理总糖浓度分别为 200 g/L,各处理分别添加蛋白胨 3 g/L,酵母浸膏 2.5 g/L,CaCl₂ 0.25 g/L,MgSO₄ 0.25 g/L,KH₂PO₄ 2.5 g/L,pH 4.5。

1.3 培养方法

斜面培养基中恒温 30 ℃,培养 24 h。将菌种接入装有 150 mL 活化培养基的 250 mL 三角瓶中,恒温 30 ℃,摇床转速 150 r/min,活化培养 48 h。再将 30 mL 活化培养基接种到装有 150 mL 液体发酵种子培养基的 250 mL 三角瓶中,恒温 30 ℃,摇床转速 150 r/min,培养 48 h 后,取 30 mL 接种于 1.2.3 中的装有各发酵处理 150 mL 培养液的 250 mL 三角瓶中,在恒温振荡器内振荡发酵,发酵时间 60 h。

1.4 试验方法及过程

分为两批试验,一批为在混合糖发酵液中先接入酿酒酵母 *S. cerevisiae*,24 h 后,接入 *P. stipitis* CBS5773;另一批为 *S. cerevisiae* 及 *P. stipitis* CBS5773 同时接入,每隔 12 h,测定产酒精度,酵母生长量及还原糖总量,发酵结束后,测定木糖、木糖醇、葡萄糖含量。

1.5 分析方法

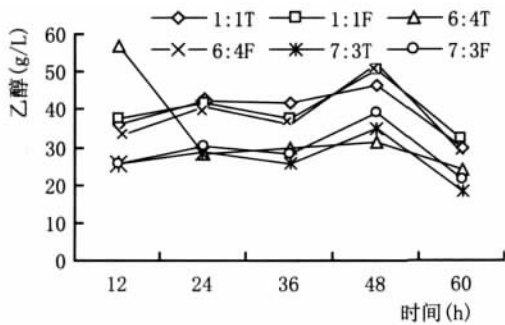
酒精度测定:气相色谱法;木糖、葡萄糖、木糖醇测定:高效液相色谱法;还原糖总量测定:DNS 法。

2 结果与分析

2.1 *P. stipitis* CBS5773 及 *S. cerevisiae* 耦合发酵高浓度木糖、葡萄糖的产乙醇量变化

利用 *P. stipitis* CBS5773 及 *S. cerevisiae* 耦合发酵 200 g/L 的高浓度底物木糖、葡萄糖混合糖发酵产乙醇,每隔 12 h 取样测定乙醇量的变化,结果见图 1。

由图 1 中可以看出,除 6:4T 处理外,各处理的乙醇产量总变化趋势基本一致,乙醇的积累产量均在前 12 h,1:1T、1:1F、6:4F、7:3T、7:3F 在 12 h 时的产量分别为 36 g/L、37.6 g/L、32.8 g/L、25.6 g/L、25.6 g/L,此后产量变化幅度不大,发酵进行到 48 h 时达到最大,分别为



注:1:1、6:4、7:3 表示木糖和葡萄糖量之比。T: 表示 *P. stipitis* CBS5773 与 *S.cerevisiae* 同时接入发酵。F:表示 *P. stipitis* CBS5773 与 *S.cerevisiae* 分开,并 *S.cerevisiae* 较先接入。以下各图相同。

图1 不同处理乙醇产量的变化

46.4 g/L、50.4 g/L、52 g/L、35.2 g/L、39.2 g/L, 此后各处理均有所下降。

而在 6:4T 处理中,其乙醇产量在 12 h 时,达到最大,为 57 g/L,比各处理高出 36 %、34 %、42 %、55 %、55 %,随后开始呈下降,最低为 24 g/L。由此表明,当木糖与葡萄糖的比率处于 6:4,且它们之间为分开加入时产生的乙醇最多。

2.2 *P. stipitis* CBS5773 及 *S.cerevisiae* 耦合发酵高浓度混合糖产乙醇的还原总糖变化

利用 *P. stipitis* CBS5773 及 *S.cerevisiae* 耦合发酵高浓度混合糖产乙醇过程中的还原糖变化结果见图 2。

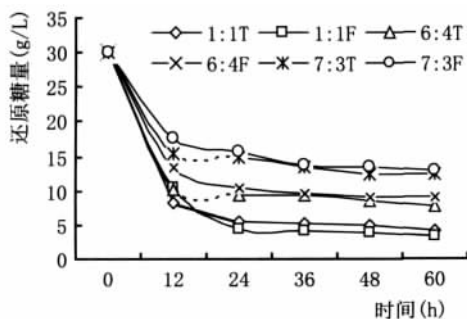


图2 不同处理还原总糖变化

由图 2 中可以看出, 处理 1:1T、1:1F、7:3T、7:3F 在 24 h 前均为快速下降阶段,由发酵前的 30 g/L 下降到分别为 5.4 g/L、4.3 g/L、9.5 g/L、10.6 g/L、14.9 g/L、15.6 g/L, 24 h 后,还原糖总量变化并不明显。由图 2 也可以看出,各处理被消耗的还原糖量依次为 1:1F>1:1T>6:4T>6:4F>7:3T>7:3F, 60 h 后,还原总糖消耗率依次为 86 %、89 %、74 %、70 %、58.6 %、57.6 %。

2.3 *P. stipitis* CBS5773 及 *S.cerevisiae* 耦合发酵高浓度混合糖 60 h 后木糖醇量变化

发酵 60 h 后,各处理的木糖醇产量变化见图 3。

由图 3 可知, 发酵结束后,7:3 的处理产生的木糖醇

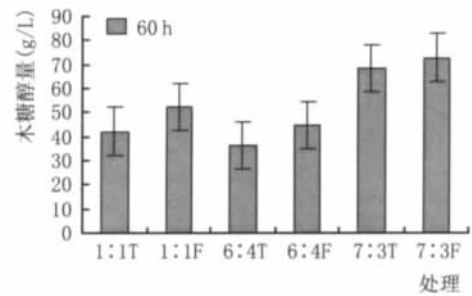


图3 不同处理在 60 h 时的木糖醇量

最多,且 7:3F>7:3T,分别为 72.9 g/L、68.4 g/L,其次为 1:1 的处理,且 1:1F>1:1T,分别为 52.3 g/L、42.2 g/L;产生木糖醇量最少的是 6:4,其中 6:4F>6:4T,因此产生木糖醇量最低的处理为 6:4T,比最高的 7:3F 少 50.2 %。

由图 3 还可以看出,*P. stipitis* CBS5773 及 *S.cerevisiae* 分开接种时,产生的木糖醇均比两种酵母同时接入时高,分开接种时,各处理的木糖醇平均值比同时接入时高 13.5 %。

2.4 混合菌耦合发酵高浓度混合糖 24 h、60 h 时葡萄糖含量

葡萄糖在混合菌的耦合发酵中 24 h、60 h 时变化情况见图 4。

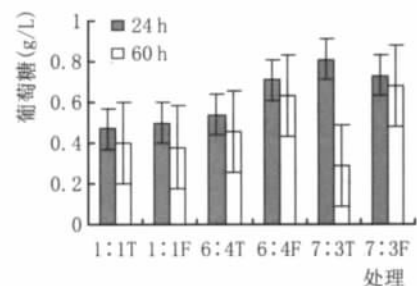


图4 不同处理在 24 h、60 h 时的葡萄糖量

由图中 4 可看出,各处理的葡萄糖在 2 个时期的变化基本一致,60 h 后,葡萄糖均出现下降,各处理(1:1T、1:1F、6:4F、6:4T、7:3T、7:3F)中下降最明显的是 7:3T。在发酵 24 h 后, 发酵液中各处理剩余的葡萄糖分别为 0.47 g/L、0.5 g/L、0.71 g/L、0.54 g/L、0.81 g/L、0.73 g/L, 即依次降低了 96 %、96.7 %、94.1 %、95.5 %、91 %、91.8 %、91.9 %。60 h 后葡萄糖量较发酵初各处理依次减少了 97 %、97.5 %、96.2 %、96.8 %、94.8 %、92.4 %。由此可表明,各处理中发酵 24 h 后,葡萄糖被消耗最多的是处理 1:1,其 1:1F 略高于 1:1T,各处理在 24 h 后,葡萄糖的消耗基本结束,在此后的发酵中(60 h)略有下降,各处理下降率依次为 1 %、0.8 %、2.1 %、1.3 %、3.8 %、0.5 %,其中下降明显的是 7:3T。

3 讨论

3.1 高浓度木糖与葡萄糖比例对 *P. stipitis* CBS5773 及

S.cerevisiae 耦合发酵产乙醇的影响

木糖和葡萄糖均是纤维素水解后的主要产物,木糖的产量仅次于葡萄糖,在木质素的水解产物中,木糖甚至多于葡萄糖。*S.cerevisiae* 由于缺少木糖利用的最初代谢途径,不能利用木糖,而只能利用其异构体-木酮糖。许多研究者亦将树干毕赤酵母所具有的木糖异构酶基因导入酿酒酵母中构建酿酒酵母利用木糖菌种,目前均未获得成功^[17]。本试验将两种菌各自的优势结合共同处在一个发酵体系中,寻找最适合两者发酵的最佳混合糖比例。在试验中分别设置了木糖:葡萄糖之比为 1:1、6:4 和 7:3。试验结果亦表明,随着木糖的增加,各处理的乙醇产量反而保持不变(图 1、图 4)。由此可见,在此后的发酵中,木糖的发酵并不能进行,这可能是当葡萄糖和木糖同时存在时,*P. stipitis* CBS5773 优先利用葡萄糖作为自身生长,但当葡萄糖浓度增加到一定值时,开始对树干毕赤酵母产生抑制作用。且随着葡萄糖的增加,树干毕赤酵母利用木糖的能力不断降低,当葡萄糖与木糖之间存在一定比例时,树干毕赤酵母利用木糖的能力几乎完全丧失。尽管如此,不同混合糖的比例对发酵乙醇结果的影响仍相对明显,6:4T>1:1T>7:3T(图 1)。然而,不论是何种比例,乙醇的主要产量均是来自于葡萄糖,由树干毕赤酵母发酵木糖而产生的乙醇非常少。由图 3、图 1 可知,在乙醇产量基本不变的情况下,木糖醇能够产生,说明高浓度的葡萄糖对 *P. stipitis* CBS5773 产生的抑制可能主要在于抑制其木酮糖还原酶酶活从而导致木糖醇不能向 D-木酮糖转化,最终导致乙醇产量不理想。

3.2 *P. stipitis* CBS5773 及 *S.cerevisiae* CBS 1200 两种菌分开接种对不同比例的高浓度木糖与葡萄糖发酵产乙醇的影响

由于考虑到当葡萄糖在高浓度下对 *P. stipitis* CBS 5773 发酵木糖产生的抑制作用,因此试验设置了将两种菌株按先后顺序分别接入发酵液中,通过考察乙醇产量及葡萄糖消耗量的变化来推断两菌株间的协同或拮抗作用。在试验中首先接入 *S.cerevisiae* 菌株,待残余葡萄糖量保持不变时接入 *P. stipitis* CBS5773 发酵木糖。当两种菌先后接入发酵过程,产乙醇量却没有出现增长(图 1),这是因为 *P. stipitis* CBS5773 与 *S.cerevisiae* 相互存在拮抗,之前发酵大量产生高浓度的 *S.cerevisiae* 对随后接入的 *P. stipitis* CBS5773 产生抑制作用,从而导致 *P. stipitis* CBS5773 不能将木糖发酵产乙醇。同时,由于 *P. stipitis* CBS5773 对乙醇的低耐受性^[18-19],由 *S.cerevisiae* 利用葡萄糖发酵而产生的乙醇对于后接入的 *P. stipitis* CBS5773 也能够产生抑制作用。然而在各个处理中,当葡萄糖与木糖共存在时,树干毕赤酵母优先利用葡萄糖,

在葡萄糖基本不变的情况下接入 *P. stipitis* CBS5773 后葡萄糖均有所下降(图 4),消耗的部分葡萄糖应为 *P. stipitis* CBS5773 所利用,说明即使在高浓度的木糖发酵底物下,大量生长的 *S.cerevisiae* 不能完全抑制此后接入的 *P. stipitis* CBS5773 的生长。

综合以上结果表明,在高浓度的发酵底物下,在同时接入 *P. stipitis* CBS5773 和 *S.cerevisiae* 的共同发酵中,乙醇的产量主要来自于由 *S.cerevisiae* 消耗葡萄糖而产生,两菌株偶联发酵时 *S.cerevisiae* 能较快启动进入产乙醇发酵而并不受 *P. stipitis* CBS5773 生长的抑制,相反较快生长的 *S.cerevisiae* 却对后来接入的 *P. stipitis* CBS5773 产生抑制作用,而导致由消耗的木糖产生乙醇微乎其微。

参考文献:

- [1] Ho NWY, Chen Z, Brainard A: Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective cofermentation of glucose and xylose[J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64:1852-1859.
- [2] Sedlak M, Edenberg HJ, Ho NWY: DNA microarray analysis of the expression of the genes encoding the major enzymes in ethanol production during glucose and xylose co-fermentation by metabolically engineered *Saccharomyces*[J]. Enzyme Micro Technol, 2003, 33:19-28.
- [3] Dien BS, Nichols NN, Bothast RJ: Fermentation of sugar mixtures using *Escherichia coli* catabolite repression mutants engineered for production of L-lactic acid[J]. J Industr Microbiol, 2002, 29:221-227.
- [4] Jeppson M, Johansson B, Hahn-Hagerdal B, et al. Reduced oxidative pentose phosphate pathway flux in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains improves the ethanol yield from xylose[J]. J Appl Environ Microbiol, 2002, 68:1604-1609.
- [5] K?tter P, Ciriacy M. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. J Appl Microbiol Biotechnol, 1993, 38:776-783.
- [6] Watanabe S, Saleh AA, Pack SP, et al. Ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing protein engineered NADP+-dependent xylitol dehydrogenase[J]. J Journal of Biotechnology, 2007, 130(3):316-319.
- [7] Barbosa MFS, Geck MJ, Fein JE, Potts D, Ingram LO: Efficient fermentation of Pinus sp. acid hydrolysates by an ethanologenic strain of *Escherichia coli*[J]. Appl Environ Microbiol, 1992, 58:1382-1384.
- [8] Chandrakant P, Bisaria VS: Simultaneous bioconversion of glucose and xylose to ethanol by *S. cerevisiae* in the presence of xylose isomerase[J]. Appl Micro Biotechnol, 2000, 53:301-309.
- [9] Walfridsson M, Bao AM, Lilius G, et al. Ethanolic fermentation of xylose with *Saccharomyces cerevisiae* harboring the *Thermus*

(下转第 26 页)

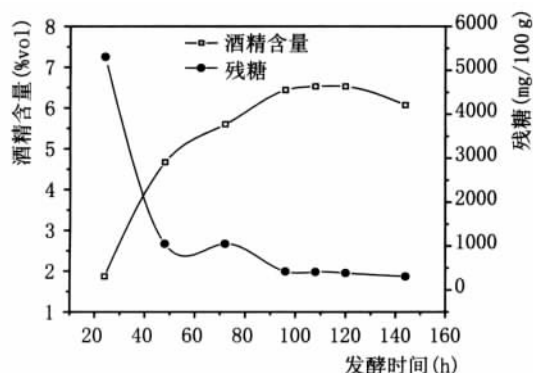


图 10 发酵时间对丹宝利酵母发酵的影响

精含量呈现先升高后下降的趋势,残糖含量逐渐下降,表明糖分逐渐被分解。发酵时间为 24 h 时,酒精含量很低,分别仅为 1.83 %vol 和 1.87 %vol, 残糖含量分别高达 4422 mg/100 g 和 5307 mg/100 g, 可能是由于时间太短,酵母菌还没有达到对数生长期^[7],因此,对糖分的利用率很低,发酵效果差,导致酒精含量低;发酵 108 h 后,2 种酵母发酵液中酒精含量均呈现逐渐下降趋势,可能是由于在杂菌的影响下,酒精发生了变化,导致含量下降。因此,为缩短发酵周期,提高产能,可适当提高发酵温度,发酵时间选择 72~96 h 较为适宜。

3 结论

3.1 通过单因素试验对比,用安琪和丹宝利酵母菌作为发酵剂,哈密大枣的发酵性均表现出良好的发酵性能,但丹宝利酵母要优于安琪酵母。

3.2 试验结果表明,温度、发酵时间、接种量和初始糖度对发酵效果影响比较大,而 pH 值的影响较小。

3.3 各单因素试验结果显示,当接种量为 0.1 %左右,糖浓度为 12 %~14 %,发酵 72~96 h, pH 3.5~4.0, 发酵温度 30 ℃左右时,发酵效果较好,几乎完全发酵,产生的酒精度符合 1.7 g 糖产 1 %vol 酒精。有关其发酵条件有待于进一步实验优化。

参考文献:

- [1] 无锡轻工大学,天津轻工业学院,等.食品分析[M].北京:中国轻工业出版社,2004.
- [2] 朱克永.食品检测技术[M].北京:科学出版社,2004.
- [3] 张惟广.发酵食品工艺学[M].北京:中国轻工业出版社,2005.
- [4] 玛丽娜.红枣醋的开发研究[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2005.
- [5] 周文化,钟秋平,陈文学.芒果果醋发酵条件的实验研究[J].食品科技,2005,(1):29-31.
- [6] 刘蒙佳.安哥诺李果醋加工工艺的研究[D].西安:陕西师范大学,2007.
- [7] 江汉湖.食品微生物学[M].北京:中国农业出版,2002.

(上接第 22 页)

- thermophilus XYLA gene which expresses an active xylose (glucose) isomerase[J]. J Appl Environ Microbiol, 1996, 62: 4648-4651.
- [10] Laplace JM, Delgenes JP, Moletta R, Navarro JM. Alcoholic glucose and xylose fermentations by coculture process: compatibility and typing of associated strains[J]. Can J Microbiol, 1992, 38: 654-658.
 - [11] J. M. Laplace, J. P. Delgenes et al. Effects of culture conditions on the co-fermentation of a glucose and xylose mixture to ethanol by a mutant of *Saccharomyces diastaticus* associated with *Pichia stipitis*[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1993, 39: 760-763.
 - [12] Mark A Eiteman*, Sarah A Lee and Elliot Altman A co-fermentation strategy to consume sugar mixtures effectively[J]. Journal of Biological Engineering, 2008, 2~3: 10.1186/1754.
 - [13] Laplace JM, Delgenes JP, Moletta R, Navarro JM. Cofermentation of glucose and xylose to ethanol by a respiratory deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae* cocultivated with a xylose fermenting yeast[J]. J Ferment Bioeng, 1993, 75 (3): 207-212.
 - [14] S. G. Kilian, and N. van Uden. Transport of xylose and glucose in the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1988, 27: 545-548.
 - [15] J. C. du Preez, M. Bosch, and B. A. Prior. The fermentation of hexose and pentose sugars by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1986, 23: 228-233.
 - [16] T. Lebeau á T. Jouenne á G.-A. Junter. Continuous alcoholic fermentation of glucose/xylose mixtures by co-immobilized *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida shehatae*. Appl Microbiol Biotechnol, 1998, 50: 309-313.
 - [17] Karhumaa K, Fromanger R, Hahn-Hagerdal B, et al. High activity of xylose reductase and xylitol dehydrogenase improves xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*[J]. J Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 73: 1039-1046.
 - [18] T. Lebeau, T. Jouenne and G. A. Junter. Simultaneous fermentation of glucose and xylose by pure and mixed cultures of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida shehatae* immobilized in a two-chambered bioreactor[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1997, 21: 265-272.
 - [19] Nan Fu, Paul Peiris. Co-fermentation of a mixture of glucose and xylose to ethanol by *Zymomonas mobilis* and *Pachysolen tannophilus*[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2008, 24: 1091-1097.