

研究报告

# 鹰嘴豆孢克鲁维酵母利用菊芋原料同步糖化与发酵生产乙醇

俞静, 江佳稀, 张永强, 吕红, 李育阳, 刘建平

复旦大学生命科学学院 遗传工程国家重点实验室, 上海 200433

**摘要:** 菊芋含有大量的菊粉多糖, 且种植简单、产量高, 是极具开发价值的替代玉米等粮食作物生产燃料乙醇的原料。文中研究了鹰嘴豆孢克鲁维酵母 Y179 利用菊芋原料同步糖化与发酵生产乙醇。鹰嘴豆孢克鲁维酵母 Y179 具有高效分泌菊粉酶的能力, 摇瓶试验显示 Y179 酵母能够利用完全由菊芋原料配制而成的培养基良好生长并发酵产生乙醇。通气及温度对乙醇产量影响明显, 相对厌氧环境对 Y179 酵母发酵产乙醇具有促进作用, 30°C 发酵温度相对 37°C 和 42°C 更有利于乙醇产量提高。种子液培养时间及接种量对乙醇产量影响较小。在 5 L 发酵罐中以 10% (V/V) 量接入预培养 36 h 的 Y179 种子液, 发酵液完全由菊芋干粉配制而成, 总糖含量 22% (W/W), 30°C 不通气, 300 r/min 搅拌, 发酵 144 h 时, 乙醇浓度达到 12.3% (V/V), 糖醇转化效率 86.9%, 糖利用率大于 93.6%。初步研究结果显示鹰嘴豆孢克鲁维酵母 Y179 在利用菊芋原料生产乙醇方面具有良好应用前景。

**关键词:** 菊芋, 鹰嘴豆孢克鲁维酵母, 菊粉酶, 同步糖化与发酵, 乙醇发酵

## Simultaneous saccharification and fermentation of Jerusalem artichoke tubers to ethanol with an inulinase-hyperproducing yeast *Kluyveromyces cicerisporus*

Jing Yu, Jiayi Jiang, Yongqiang Zhang, Hong Lü, Yuyang Li, and Jianping Liu

State Key Laboratory of Genetic Engineering, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China

**Abstract:** Jerusalem artichoke tubers with inulin as major component are potential feedstock for fuel ethanol production, and *Kluyveromyces cicerisporus* Y179 expressing high level of inulinase is suitable for ethanol production with this feedstock by simultaneous saccharification and fermentation approach. In this article, the impact of inoculum, aeration and temperature on ethanol production by the yeast was studied. The experimental results illustrated that inoculum with different levels and seed collected at different cultivation times had negligible effect, while anaerobic conditions enhanced ethanol production, and more ethanol was produced by the yeast at 30°C than at 37°C or 42°C. The medium using Jerusalem artichoke tuber meal as sole component with 22% (W/W) total sugars was inoculated with 36 h-precultured seed at 10% (V/V), and the batch fermentation was conducted in a 5 L fermentor at 30°C with a stirring speed of 300 r/min under anaerobic conditions. After 144 h, 12.3% (V/V) ethanol was produced and the yield of ethanol from sugars was 86.9% of its theoretical one, with 93.6% sugars consumed. These results indicate that *K.*

**Received:** May 20, 2010; **Accepted:** June 23, 2010

**Supported by:** National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2007AA02Z107), Shanghai Major Basic Research Program (No. 05JC14001).

**Corresponding author:** Jianping Liu. Tel/Fax: +86-21-65643465; E-mail: jpliu@fudan.edu.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2007AA02Z107), 上海市基础研究重点项目 (No. 05JC14001) 资助。

*cicerisporus* Y179 is a promising candidate for industrial ethanol production using Jerusalem artichoke tuber feedstock.

**Keywords:** Jerusalem artichoke tubers, *Kluyveromyces cicerisporus*, inulinase, simultaneous saccharification and fermentation, ethanol fermentation

由于石油等化石类资源有限且呈枯竭之势, 能源短缺已是当今社会面临的一个重大问题。发展可再生生物质能源是解决日趋紧张能源问题的有效途径, 其中燃料乙醇是发展生物质能源的重要选择。传统的发酵法生产乙醇主要以玉米、小麦等粮食作物为原料。鉴于我国人多地少、粮食生产压力大, 以粮食作物为原料的燃料乙醇发展空间受到极大限制, 难以长久支撑我国燃料乙醇产业持续发展, 菊芋、木薯等非粮作物因糖类含量丰富, 成为可用于燃料乙醇生产的候选原料<sup>[1]</sup>。

菊芋块茎富含菊粉 (又称菊糖, inulin), 达到湿重的 15%~19%。菊粉是由多个果糖分子通过  $\beta$ -2,1-果糖苷键连接成的多聚果糖, 其末端有 1 个葡萄糖残基以  $\alpha$ -1,2 键与之相连, 呈直链结构, 其中 75%~85% 为果糖、15%~25% 为葡萄糖, 分子质量 3 500~5 500 Da。菊芋这种植物耐贫瘠、易种植、适应性强、产量高, 在我国很多省份均有种植, 极具开发价值。据我国小面积栽培情况, 一亩菊芋可产块茎 1 250~5 000 kg, 国外报道最高为 6 000 kg<sup>[2]</sup>, 可作为新的廉价糖源和燃料乙醇生产原料, 但菊芋目前尚未得到很好的利用<sup>[3-4]</sup>。

菊芋是生产乙醇的良好糖源, 其关键是菊粉 (多聚果糖) 在菊粉酶 (Inulinase) 作用下水解成为由果糖和少量葡萄糖组成的混合单糖, 随后果糖等单糖经过酵母等微生物的发酵作用生成乙醇。利用菊芋生产乙醇自 20 世纪 80 年代起陆续有研究报道<sup>[5]</sup>。吕跃钢等<sup>[6]</sup>以菊芋为原料, 将酿酒酵母细胞与菊粉酶共同固定化发酵生产乙醇。实验结果表明, 当温度为 30℃, pH 值为 5.5, 发酵液糖度为 20% (W/V), 反应器连续流动流速为 13.15 mL/min 时, 发酵速度最快, 酒精转化率最高, 发酵醪液中乙醇浓度达到 11.98% (V/V)。Ge 等<sup>[7]</sup>以菊芋为原料, 利用黑曲霉和酿酒酵母混合菌发酵生产乙醇。

鹰嘴豆孢克鲁维酵母 Y179 具有高效分泌菊粉酶的能力, 本研究从种子液、通气、温度等多方面研究

其利用菊芋原料同步糖化与发酵产乙醇基本过程, 建立 Y179 酵母生产菊芋原料乙醇基本工艺, 为其进一步工业化应用奠定基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

鹰嘴豆孢克鲁维酵母 Y179, 即 *Kluyveromyces cicerisporus* CBS4857 (Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Yeast Division, Delft, The Netherlands)。

#### 1.1.2 主要试剂及仪器

测定乙醇用酶类乙醇脱氢酶 (ADH)、乙醇氧化酶 (AOX) 和过氧化物酶 (Peroxidase) 均购自 Sigma 公司。测定还原糖用试剂 3,5-二硝基水杨酸为国产分析纯以上级产品。

WFJ7200 型分光光度计 (Unico 公司), 5415D 型台式高速离心机 (Eppendorf 公司), 85-2 型磁力搅拌器 (上海司乐), Labo Autoclave MLS-3780 型湿热灭菌设备 (Sanyo 公司), KLF2000 5 L 发酵罐 (Bioengineering Laboratory Fermenter)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 培养基及培养条件

菊芋提取液: 将新鲜菊芋 (由南京农业大学刘兆普教授馈赠) 洗净后, 切片, 然后用热水 (60℃~80℃) 处理 1 h 左右, 去除固型物后将提取液于 115℃ 灭菌 15 min, 保存待用。

菊芋干粉: 将新鲜菊芋洗净后, 切片烘干, 用粉碎机磨粉, 然后用 40 目筛子筛除大颗粒, 得到的菊芋粉装入试剂瓶密封保存。

菊芋发酵培养基由菊芋干粉加水或菊芋提取液溶解而成, 115℃ 灭菌 15 min 后使用。

丰富培养基 YEPD: 1% (W/V) 酵母粉, 2% (W/V) 蛋白胨, 2% (W/V) 葡萄糖。121℃ 灭菌 15 min 后使用。

鹰嘴豆孢克鲁维酵母一般在 30℃ 培养, 摇床培养转速 230~250 r/min。

### 1.2.2 分析方法

还原糖含量的测定使用 DNS (3,5-二硝基水杨酸)法<sup>[8]</sup>。总糖含量的测定: 先用酸水解法水解菊粉等聚合糖, 取适量样品与等体积的 6 mol/L HCl 在 Eppendorf 管中混合, 37℃ 水浴反应 15 min。再与 2 倍样品液体积的 3 mol/L NaOH 混合后, 采取 DNS 法测定混合液中的糖含量。

菊粉酶活力测定及计算方法参照文献<sup>[9]</sup>。

乙醇测定采用乙醇氧化酶法或者气相色谱方法。乙醇氧化酶法方法: 新鲜配置 0.067 mmol/L 四甲基联苯胺溶液 (pH 7.0 磷酸缓冲液), 再加入 27 U 乙醇氧化酶和 500 U 过氧化物酶混匀。取上述试剂 3.5 mL, 加入稀释到乙醇浓度范围 0.02%~0.1% (W/V) 的样品液 0.1 mL, 精确反应 15 min, 加入 0.5 mL 0.8 mol/L HCl 终止反应, 测定反应液于 450 nm 处的吸光度<sup>[10]</sup>。按标准曲线计算样品液中的乙醇浓度。

## 2 结果

### 2.1 鹰嘴豆孢克鲁维酵母 Y179 产菊粉酶分析

对 Y179 在实验室常用丰富培养基 YEPD 及菊芋提取液中生长产菊粉酶的情况进行了测定。研究显示 Y179 能够在 YEPD 培养基和菊芋提取液中良好生长并高效分泌菊粉酶 (图 1、2)。虽然 Y179 菌株在菊芋提取液中产菊粉酶能力略逊于在 YEPD 培养基中, 但培养 48 h、72 h 时, 菊粉酶活力仍分别达到 120 U/mL、272 U/mL。Y179 菌株在单一菊芋

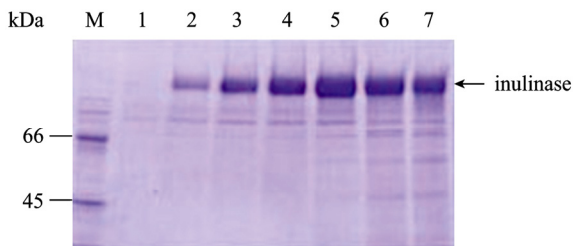


图 1 Y179 分泌表达菊粉酶 SDS-PAGE 检测

Fig. 1 Expression of inulinase by Y179 was detected by SDS-PAGE. 30  $\mu$ L supernatant sample of Y179 cultured in YEPD medium after 0, 24, 48, 60, 72, 84 and 96 h incubation was subjected to electrophoresis at lanes 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7, respectively; M: protein marker.

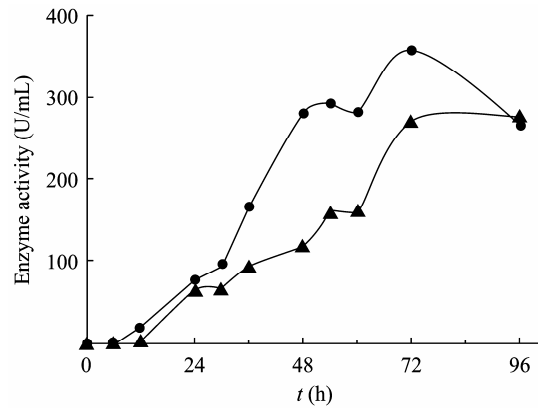


图 2 Y179 在 YEPD 和菊芋汁培养基中产菊粉酶曲线

Fig. 2 Time course of inulinase production by Y179 with YEPD and Jerusalem artichoke tuber juice medium. YEPD medium ( $\bullet$ ) and Jerusalem artichoke tuber juice medium containing 10% (W/V) total sugars ( $\blacktriangle$ ) were inoculated with 2% (V/V) inoculum of 17 h-precultured Y179 seed. The batch fermentation was conducted at 30℃ with a stirring speed of 230 r/min under aerobic conditions. Inulinase activities in the fermentation broth were assayed.

提取液培养基中能够正常生长并高效产酶的特点, 为其利用菊芋原料发酵生产乙醇提供了便利。

### 2.2 好氧条件下 Y179 利用菊芋培养基生长基本性状分析

鹰嘴豆孢克鲁维酵母 Y179 在通气好氧条件下利用菊芋提取液作为唯一培养基成分生长的基本性状分析结果如图 3 所示。Y179 是一种生长能力很强的酵母, 在培养 24 h 后, 其  $OD_{600}$  大于 40 (图 3a), 其培养基 pH 值出现双向变化, 先从初始的 5.2 降至 8 h 的 4.3, 然后升高至 24 h 的 6.5 左右 (图 3b)。培养 24 h 后, 菊粉酶急剧增加, 酶活达到 80 U/mL 左右 (图 3c)。图 3d 和图 3e 显示 8 h 时培养液中总糖含量从初始的 11% (W/V) 降至 2% 以下, 还原糖浓度只有 0.5% (W/V), 说明绝大部分菊粉已被 Y179 产生的菊粉酶降解成为单糖并消耗, 而此时培养液中菊粉酶酶活仅 10 U/mL 左右, 提示 Y179 菌株在菊芋培养基中生长早期产生的少量菊粉酶足以水解原料中的菊粉多糖并加以利用。在好氧培养条件下, 乙醇浓度在 8 h 时达到峰值 (4.5%, V/V), 随后降低, 这与还原糖耗尽及有氧呼吸代谢有关 (图 3f)。克鲁维酵母是一种以呼吸代谢为主的酵母, 好氧条件不利于乙醇生成和积累。为了有效提高乙醇产量, 需要选择合适的厌氧发酵时间。

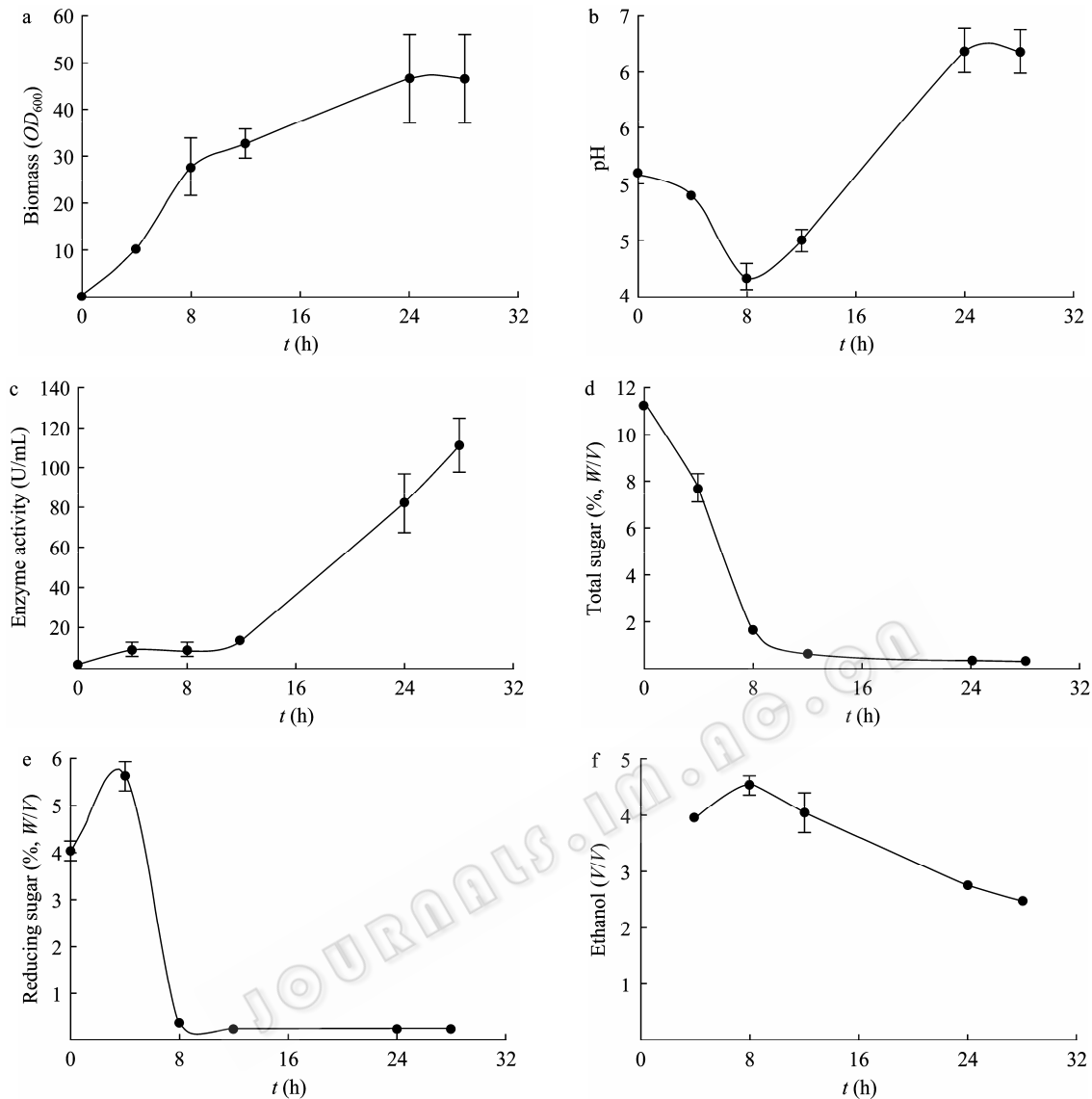


图3 好氧条件下菊芋汁培养基中 Y179 生长及乙醇发酵

Fig. 3 Growth and ethanol production of Y179 with Jerusalem artichoke tuber juice medium under aerobic conditions. 50 mL Jerusalem artichoke tuber juice medium containing 11% (W/V) total sugars in 250 mL Erlenmeyer flask was inoculated with 6% (V/V) inoculum of 17 h-precultured Y179 seed. The batch fermentation was conducted at 30°C with a stirring speed of 230 r/min under aerobic conditions. Biomass (a), pH (b), inulinase activity (c), total sugars (d), reducing sugars (e) and ethanol (f) in the fermentation broth of Y179 strain were assayed. All data are expressed as  $\bar{x} \pm s.$  of three independent experiments.

### 2.3 进入厌氧发酵时间对 Y179 利用菊芋原料发酵产乙醇的影响

Y179 种子液接入装有 10% (W/V) 菊芋汁培养基的三角瓶, 分别通气好氧培养 4 h、8 h、12 h 后静置 (即厌氧发酵), 其生长、糖消耗及产乙醇的结果如图 4 所示。4 h 好氧培养导致 24 h 时 Y179  $OD_{600}$  仅为 20, 远低于 8 h、12 h 好氧培养条件下产生的生物量。与结果 2.2 中不同, 3 种条件下发酵液 pH 值均出现单向降低趋势, 其中好氧培养 4 h 后进入

厌氧发酵导致发酵液 pH 值缓慢降低, 而 8 h 和 12 h 好氧培养条件产生的 pH 变化更快速, 这可能与其生物量更高有关。与此对应, 仅 4 h 好氧培养下, Y179 消耗总糖和还原糖的速率相对较慢, 发酵液中乙醇浓度相应逐步增加, 而 8 h 和 12 h 好氧培养条件下总糖、还原糖及乙醇变化曲线则十分相似, 变化速率均较快。乙醇曲线显示 4 h 好氧培养产生的乙醇浓度增加虽然相对缓慢, 但发酵 24 h 时其乙醇浓度达到 4% (V/V), 略高于 8 h 和 12 h 好氧培养条件产

生的乙醇浓度 (其峰值出现在 12 h 处, 约 3.6% (V/V))。结果提示缩短好氧培养时间, 较早进入厌氧发酵在一定程度上有助于乙醇产量提高。

#### 2.4 种子液培养时间及初始总糖量对 Y179 产乙醇的影响

菊芋汁培养基中分别接入培养 17 h、24 h 和 36 h 的 Y179 种子液, 好氧培养 8 h 后静置厌氧发

酵, 其糖消耗及产乙醇结果如图 5 所示。3 种种子液产生的总糖、乙醇变化曲线基本相似, 种子液培养时间越长, 产生还原糖的能力越强, 这与种子液中的菊粉酶量有关。种子液培养时间对乙醇产量影响较小, 初始总糖 10% (W/V) 时, 不同培养时间种子液发酵产生的乙醇浓度基本在 4% (V/V) 左右。

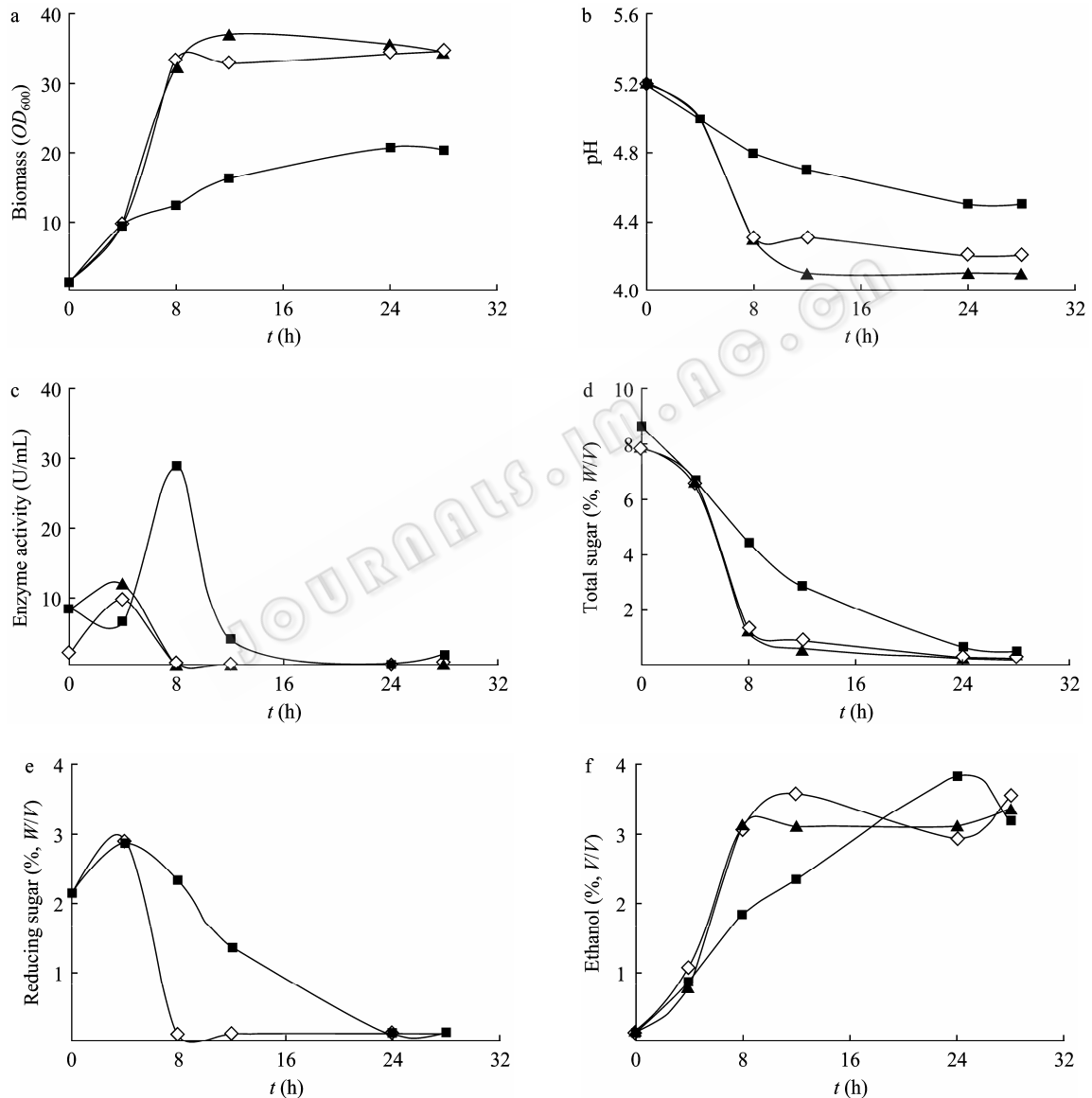


图 4 厌氧条件下菊芋汁培养基中 Y179 生长及乙醇发酵

Fig. 4 Growth and ethanol production of Y179 with Jerusalem artichoke tuber juice medium under anaerobic conditions. 50 mL Jerusalem artichoke juice medium containing 10% (W/V) total sugar in 250 mL Erlenmeyer flask was inoculated with 6% (V/V) inoculum of 17 h-precultured Y179 seed. The batch fermentation was conducted at 30°C with a stirring speed of 230 r/min under aerobic condition for 4 h (■), 8 h (◇), 12 h (▲) and then switched to stationary conditions. Biomass (a), pH (b), inulinase activity (c), total sugars (d), reducing sugars (e) and ethanol (f) in the fermentation broth of Y179 strain were assayed.

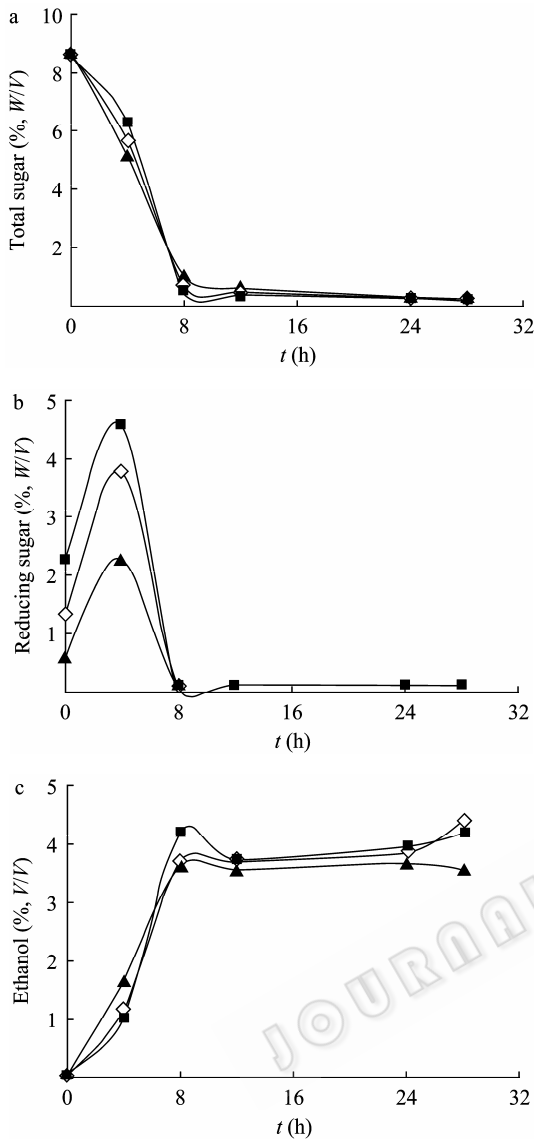


图5 种子液培养时间对 Y179 利用菊芋汁发酵产乙醇的影响

Fig. 5 The effect of Y179 seed age on ethanol production. 50 mL Jerusalem artichoke juice medium containing 10% (*W/V*) total sugars was inoculated with 6% (*V/V*) inoculum of 17 h (▲), 24 h (◇) and 36 h (■) precultured Y179 seeds. The batch fermentation was conducted at 30°C with a stirring speed of 230 r/min in 250 mL Erlenmeyer flasks under aerobic conditions for 8 h and then switched to stationary conditions. Total sugars (a), reducing sugars (b) and ethanol (c) in the fermentation broth were assayed.

通过菊芋汁中添加菊芋粉的办法可以提高菊芋培养基中总糖含量, Y179 菌株利用不同总糖含量菊芋培养基发酵产乙醇结果如图 6 所示。初始总糖为 13.75% (*W/V*) (50 mL 10% (*W/V*) 菊芋提取液添加 2.5 g 菊芋粉) 和 17.5% (*W/V*) (50 mL 10% (*W/V*) 菊芋提取液添加 5 g 菊芋粉) 时, 发酵 24 h 时总糖

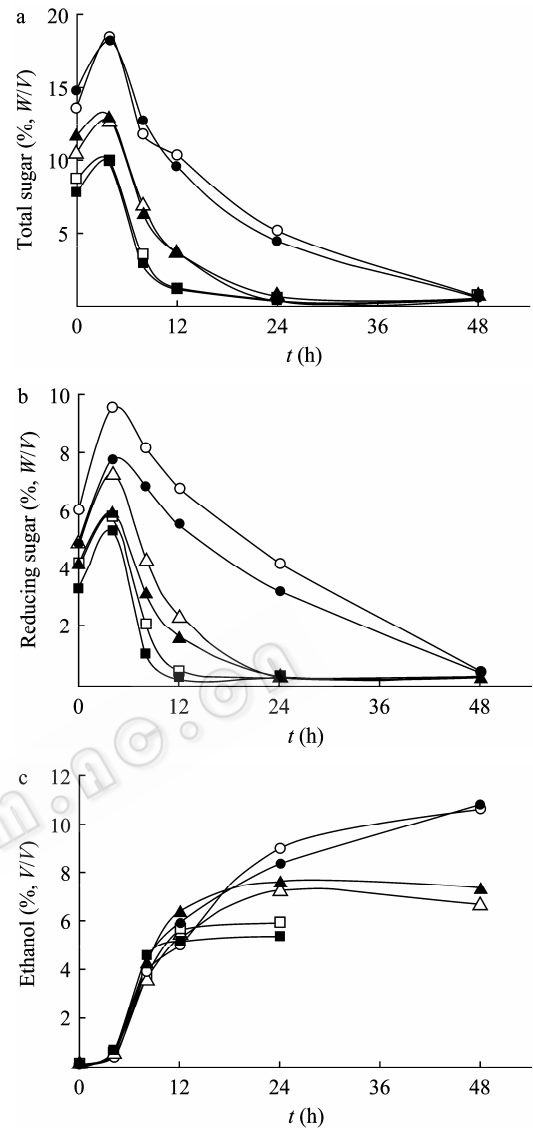


图6 初始总糖量对 Y179 利用菊芋培养基发酵产乙醇的影响

Fig. 6 The effect of initial total sugars on ethanol production by Y179. 50 mL Jerusalem artichoke juice medium containing 10% (*W/V*) total sugars supplemented with Jerusalem artichoke meal at 2.5 g (square), 5 g (triangle) and 10 g (circle) was inoculated with 6% (*V/V*) inoculum of the 24 h (solid icon) and 36 h (empty icon) precultured Y179 seeds. The batch fermentation was conducted at 30°C in Erlenmeyer flasks with a stirring speed of 230 r/min under aerobic conditions for 8 h and switched to stationary conditions. Total sugars (a), reducing sugars (b) and ethanol (c) in the fermentation broth were assayed.

和还原糖耗尽, 而初始总糖为 25% (*W/V*) (50 mL 10% (*W/V*) 菊芋提取液添加 10 g 菊芋粉) 时, 总糖和还原糖到 48 h 才基本耗尽。初始总糖越多乙醇产量相应越高, 初始总糖为 25% (*W/V*) 时, 乙醇浓度在发酵 48 h 时达到 11% (*V/V*)。和图 5 结果类似,

种子液培养时间 (24 h 和 36 h) 对乙醇的产量影响不大, 主要影响发酵液中还原糖的产生, 对总糖消耗速度和乙醇产量影响相对较小。24 h 和 36 h 种子液均保证了 Y719 有效利用菊芋培养基中的菊粉多糖, 发酵产生较高浓度的乙醇。

## 2.5 温度对 Y179 发酵产乙醇的影响

酿酒酵母的培养温度一般不宜高于 32℃, 而鹰嘴豆孢克鲁维酵母 Y179 是一种可以在相对高温下 (如 42℃) 良好生长的酵母。耐高温的特性在工业生产应用方面具有很高价值。Y179 菌株在 30℃、37℃ 和 42℃ 三种不同温度条件下利用菊芋培养基发酵生产乙醇结果如图 7 所示。42℃ 和 37℃ 发酵温度在初

期 (12 h 内) 有助于糖消耗及乙醇产生, 但对于乙醇终产量提高不利, 特别是在 42℃ 下, 发酵液乙醇浓度在 24 h 时即达到峰值 (10.3%, *V/V*), 随后快速降低, 其总糖、还原糖变化曲线也反映出 42℃ 下糖未得到充分利用, 残糖水平较高。37℃ 发酵温度条件下, 36 h 时总糖基本耗尽, 糖利用率较高, 但乙醇产量略逊于 30℃ 发酵温度。30℃ 发酵乙醇产量相对最高, 发酵 48 h 时乙醇浓度达到 12% (*V/V*), 残留总糖仅 0.48% (*W/V*), 糖醇转化效率达到 74.4%。种子液接种量从 6% (*V/V*) 提高至 12% (*V/V*) 对于 30℃ 和 37℃ 发酵温度条件下乙醇产量提高没有明显作用。

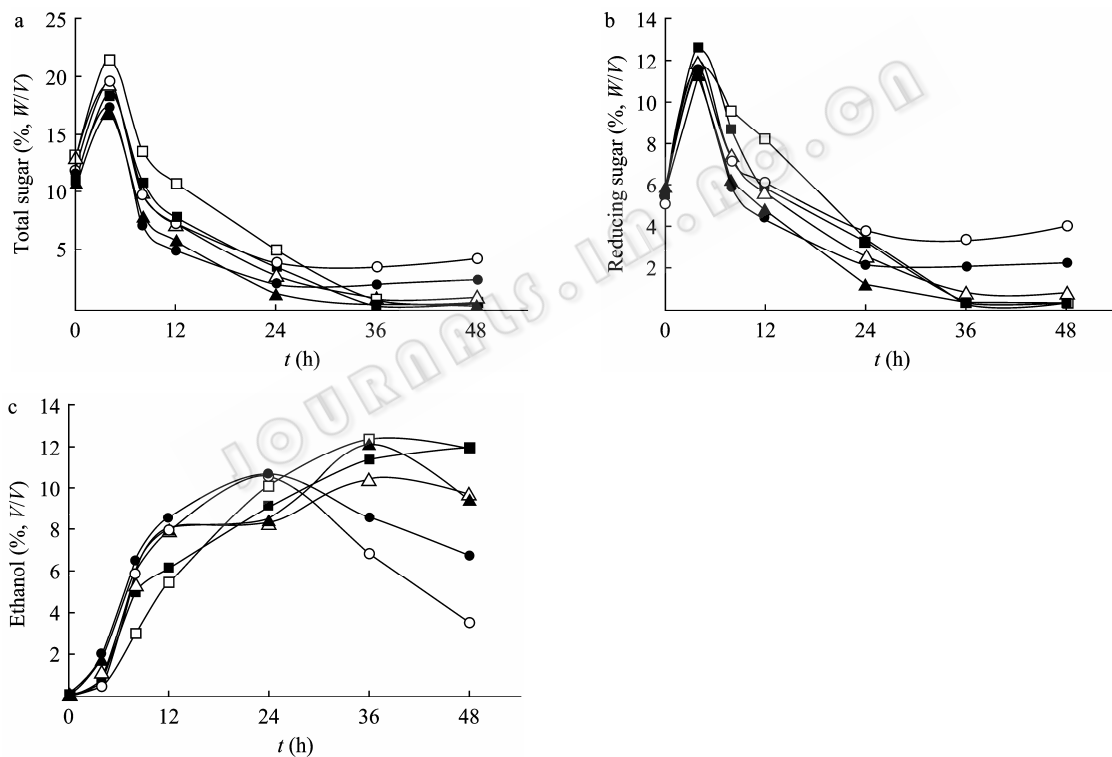


图7 温度和接种量对 Y179 利用菊芋培养基发酵产乙醇的影响

Fig. 7 The effect of temperature and inoculation levels on ethanol production by Y179. 50 mL Jerusalem artichoke juice medium supplemented with 10 g Jerusalem artichoke meal was inoculated with 6% (*V/V*) (empty) and 12% (*V/V*) (solid) inoculum of 36 h-precultured Y179 seeds, respectively. The batch fermentation was conducted in 250 mL Erlenmeyer flask at 30°C (square), 37°C (triangle) and 42°C (circle), with a stirring speed of 230 r/min under aerobic condition for 8 h and then switched to stationary conditions. Total sugars (a), reducing sugars (b) and ethanol (c) in the fermentation broth were assayed.

## 2.6 Y179 于 5 L 发酵罐中发酵产乙醇研究

在 5 L 发酵罐中对 Y179 酵母利用菊芋原料发酵产乙醇进行了测试。具体发酵过程如下: 首先接种 Y179 于一级种子液 YEPD 培养基中, 30℃、250 r/min 摇床培养 12 h, 然后按 10% (*V/V*) 量接种

于由 40 目菊芋干粉配制而成二级种子培养基 (总糖含量 5% (*W/V*)) 中, 30℃、250 r/min 摇床培养 36 h。5 L 发酵罐中装载 3 L 完全由 40 目菊芋干粉配制而成 (不添加任何其他物质) 的发酵培养基, 总糖含量约 22% (*W/V*), 85℃ 处理 30 min, 冷却后按 10%

(*V/V*) 量接入二级种子, 30℃, 不通气, 300 r/min 搅拌发酵。结果如图 8 所示, 随着发酵时间延长, 总糖浓度持续降低, 而乙醇浓度则相应逐步增加。发酵 144 h 时, 乙醇浓度达到 12.3% (*V/V*), 醪沼上清残糖 0.35% (*W/W*), 糖醇转化效率达到 86.9%, 糖利用率大于 93.6%。

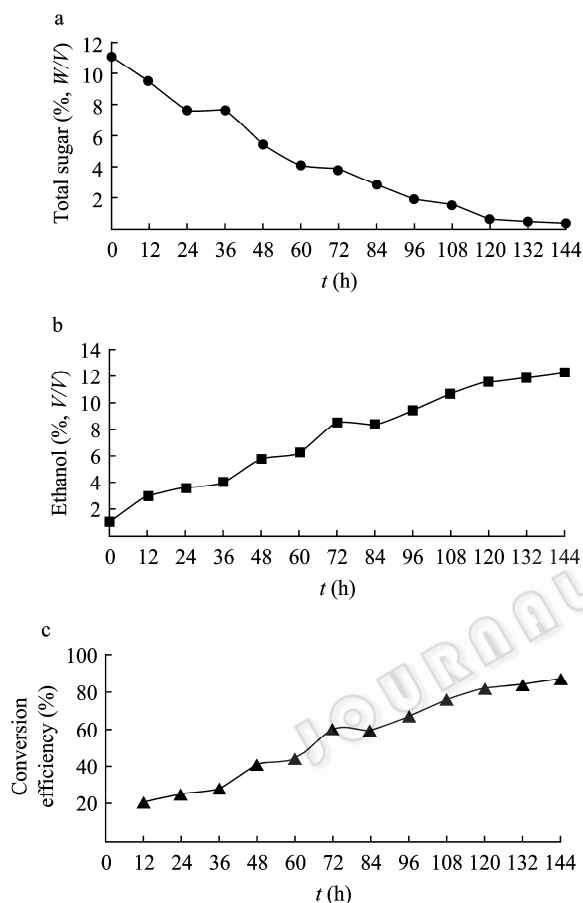


图 8 Y179 在 5 L 发酵罐中利用菊芋原料发酵产乙醇的研究

Fig. 8 Ethanol production by Y179 using raw Jerusalem artichoke tuber meal as sole medium component. Medium using raw Jerusalem artichoke tuber meal as sole component with 22% (*W/W*) total sugars was inoculated with 10% (*V/V*) inoculum of 36 h-precultured Y179 seed. The batch fermentation was conducted at 30℃ in a 5 L fermenter with a stirring speed of 300 rpm under anaerobic conditions. Total sugars (a), ethanol (b) and conversion efficiency (c) in the fermentation broth were assayed.

### 3 讨论

目前全球燃料乙醇年产规模近 3 000 万 t, 而我国燃料乙醇生产能力仅 100 万 t 左右, 主要以玉米、小麦等粮食作物为原料。而菊芋这种非粮植物耐贫

瘠、易种植、成本低、含丰富的多聚果糖-菊粉, 是极具开发价值的非粮型燃料乙醇生产原料。自 20 世纪 80 年代起, 就有关于利用菊芋生产乙醇的研究报道<sup>[5,11]</sup>。鹰嘴豆孢克鲁维酵母 Y179 是一株生长密度高、分泌菊粉酶能力强的酵母, 其菊粉酶基因已被本实验室克隆<sup>[12]</sup>。鉴于 Y179 酵母高效分泌菊粉酶的特性, 对其直接利用菊芋原料发酵产乙醇的能力进行了初步研究。小规模摇瓶试验结果显示, Y179 酵母能够在以菊芋汁或菊芋粉为唯一成分的培养基中良好生长, 分泌菊粉酶水解菊粉, 发酵产生乙醇。种子液培养时间及接种量对 Y179 酵母利用菊芋发酵产乙醇影响较小, 说明发酵过程对种子液中的菊粉酶初始酶量依赖不强。而通氧量及温度对乙醇产量影响相对较大。克鲁维酵母是一种以呼吸代谢为主的酵母, 厌氧有助于 Y179 酵母的发酵代谢进行, 研究结果证实缩短好氧培养时间, 较早进入厌氧状态可以一定程度提高乙醇产量。虽然 Y179 酵母可以在 42℃ 等相对高温条件下正常生长, 而且可以快速利用菊芋原料产生乙醇, 但残糖量大, 糖利用率不高, 发酵后期乙醇浓度明显降低, 这有可能与 42℃ 下 Y179 酵母糖异生代谢有关, 不利于乙醇积累。降低发酵温度则明显改善 Y179 酵母糖利用能力及乙醇产量, 虽然 30℃ 发酵温度下糖消耗及乙醇产生的速率相对较慢, 但以乙醇参数衡量, 效果最佳。通过增加菊芋培养基总糖浓度可以有效提高发酵液中乙醇产量, 即使在摇瓶中发酵, 乙醇浓度也可以达到 11%~12% (*V/V*)。上述试验是在摇瓶中通过磁力搅拌控制瓶中通气量, 停止搅拌静置制造相对厌氧状态进行的, 当在菊芋汁中添加菊芋干粉以增加总糖浓度时, 静置状态会影响原料的充分利用。为了便于操作和参数控制, 特别是提高菊芋原料糖利用效率, 设计了在 5 L 发酵罐中 Y179 酵母利用菊芋粉原料发酵试验。研究结果显示 Y179 酵母可以高效利用菊芋原料, 糖化和发酵同步进行生产乙醇, 乙醇浓度、糖醇转化效率等指标较摇瓶中均有较明显改善。这一菊芋乙醇生产方法特点在于采用具有分解利用菊粉能力的单一酵母菌株糖化和发酵同步进行生产乙醇, 工艺简单不容易染菌, 有利于发酵参数控制, 而且发酵液仅由菊芋粉配制, 不需添加其他



任何营养物质,可减低乙醇生产成本,有利于工业生产应用。研究报道多株克鲁维酵母能够利用菊粉发酵生产乙醇,25~29 h内乙醇浓度达到6%~7% (V/V),糖醇转化效率79.0%~87.4% (V/V)<sup>[11]</sup>,更多的相关研究多采用混合菌株发酵,如以菊芋为原料,利用黑曲霉和酿酒酵母混合发酵生产乙醇<sup>[7,13]</sup>;或以二步法生产乙醇,先用菊粉酶处理菊芋提取液后,再利用酿酒酵母以糖化后的菊芋提取液为发酵液生产乙醇<sup>[14]</sup>。

虽然初步研究显示Y179酵母可以直接利用菊芋原料发酵生产浓度大于12% (V/V)的乙醇,但发酵周期较长,糖醇转化效率相对传统采用的酿酒酵母略低,因此相关的生产工艺还需要进一步完善提高,为生物乙醇产业发展提供一条新途径。

## REFERENCES

- [1] Tian YS, Zhao LX, Meng HB, *et al.* Estimation of un-used land potential for biofuels development in (the) People's Republic of China. *Appl Energ*, 2009, **86**(Suppl 1): 77-85.
- [2] Kosaric N, Cosentino A, Wieczorek A, *et al.* The Jerusalem artichoke as an agricultural crop. *Biomass*, 1984, **5**(1): 1-36.
- [3] Hua CW, Wang JH, Teng D, *et al.* A progress of studies on inulin chemistry and microorganism endo-inulinase. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2004, **4**(4): 103-108.  
华承伟, 王建华, 滕达, 等. 菊粉化学和微生物菊粉内切酶研究进展. *中国食品学报*, 2004, **4**(4): 103-108.
- [4] Jiang SQ. Development of *Helianthus tuberosus* L. resources by biological technique. *J Nanning Voc Uni*, 2000, **5**(3): 53-56.  
蒋世琼. 应用生物技术开发菊芋资源. *南宁职业技术学院学报*, 2000, **5**(3): 53-56.
- [5] Margaritis A, Bajpai P, Cannell E. Optimization studies for the bioconversion of Jerusalem artichoke tubers to ethanol and microbial biomass. *Biotechnol Lett*, 1981, **3**(10): 595-599.
- [6] Lü YG, Ma JJ, Gu TC. The study of ethanol fermentation by immobilized inulinase and yeast cell using as raw material. *Food Ferment Ind*, 2003, **29**(5): 66-68.  
吕跃钢, 马家津, 顾天成. 利用固定化菊粉酶和酵母细胞以菊芋为原料发酵生产乙醇的研究. *食品与发酵工业*, 2003, **29**(5): 66-68.
- [7] Ge XY, Zhang WG. A Shortcut to the production of high ethanol concentration from Jerusalem artichoke tubers. *Food Technol Biotechnol*, 2005, **43**(3): 241-246.
- [8] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*, 1959, **31**(3): 426-428.
- [9] Yu J, Jiang JX, Fang ZA, *et al.* Enhanced expression of heterologous inulinase in *Kluyveromyces lactis* by disruption of *hap1* gene. *Biotech Lett*, 2010, **32**(4): 507-512.
- [10] Gonchar MV, Maidan MM, Pavlishko HM, *et al.* A new oxidase-peroxidase kit for ethanol assays in alcoholic beverages. *Food Technol Biotechnol*, 2001, **39**(1): 37-42.
- [11] Duvnjak Z, Kosaric N, Hayes RD. Kinetics of ethanol production from Jerusalem artichoke juice with some *kluyveromyces* species. *Biotech Lett*, 1981, **3**(10): 589-594.
- [12] Wen TQ, Liu F, Huo KK, *et al.* Cloning and analysis of the inulinase gene from *Kluyveromyces cicerisporus* CBS4857. *World J Microbiol Biotechnol*, 2003, **19**(4): 423-426.
- [13] Ohta K, Hamada S, Nakamura T. Production of high concentrations of ethanol from inulin by simultaneous saccharification and fermentation using *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**(3): 729-733.
- [14] Ma JJ, Lü YG. Study on ethanol two steps fermentation by immobilized inulinase and yeast cell using inulin as raw material. *J Beijing Technol Bus Uni*, 2004, **22**(6): 8-10, 17.  
马家津, 吕跃钢. 以菊芋为原料利用固定化酶和细胞两步法发酵生产乙醇. *北京工商大学学报*, 2004, **22**(6): 8-10, 17.