

一步法发酵菊芋生产乙醇

袁文杰, 任剑刚, 赵心清, 白凤武

大连理工大学 生物科学与工程系, 大连 116023

摘要: 利用马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*) YX01 具有菊粉酶生产能力且乙醇发酵性能良好的特点, 直接发酵菊粉生成乙醇。在摇瓶中考察了该菌株最适发酵温度, 进而在 2.5 L 发酵罐中考察了通气量和底物浓度的影响。实验结果表明: 该菌株最适发酵温度为 35°C; 在通气量为 50 mL/min 和 100 mL/min 时菌体生长加快, 发酵时间缩短, 但在不通气条件下糖醇转化率明显提高; 在菊粉浓度 235 g/L 时, 发酵终点乙醇浓度达到 92.2 g/L, 乙醇对糖的得率为 0.436, 为理论值的 85.5%。在此基础上, 使用近海滩涂种植海水灌溉收获的菊芋为底物, 以批式补料方式直接发酵菊芋干粉浓度为 280 g/L 的底物, 发酵终点乙醇浓度为 84.0 g/L, 乙醇对糖的得率为 0.405, 为理论值的 80.0%。这些研究工作, 为以菊芋为原料的燃料乙醇技术开发奠定了基础。

关键词: 菊芋, 乙醇, 一步法发酵, 马克斯克鲁维酵母

One-step Ethanol Fermentation with *Kluyveromyces marxianus* YX01 from *Jerusalem artichoke*

Wenjie Yuan, Jiangang Ren, Xinqing Zhao, and Fengwu Bai

Department of Bioscience and Bioengineering, Dalian University of Technology, Dalian 116023, China

Abstract: A unique one-step ethanol fermentation process was developed with the inulinase-producing strain *Kluyveromyces marxianus* YX01. Firstly, the impact of temperature on ethanol fermentation was investigated through flask fermentation, and the temperature of 35°C was observed to be the optimum to coordinate inulinase production, inulin saccharification and ethanol fermentation. And then, the impact of aeration and substrate concentration was studied through batch fermentation in the 2.5 L fermentor, and the experimental data indicated that the average ethanol fermentation time was decreased at the aeration rates of 50 mL/min and 100 mL/min, but higher ethanol yield was obtained under non-aeration conditions with more substrate directed to ethanol production. The ethanol concentration of 92.2 g/L was achieved with the substrate containing 235 g/L inulin, and the ethanol yield was calculated to be 0.436, equivalent to 85.5% of its theoretical value. Finally, *Jerusalem artichoke* grown in salina and irrigated with seawater was fermented without sterilization treatment, 84.0 g/L ethanol was obtained with the substrate containing 280 g/L dry *Jerusalem artichoke* meal, and the ethanol yield was calculated to be 0.405, indicating the *Jerusalem artichoke* could be an alternative feedstock for grain-based fuel ethanol production.

Keywords: *Jerusalem artichoke*, ethanol, one step fermentation, *Kluyveromyces marxianus*

利用非粮作物生产燃料乙醇, 是我国燃料乙醇产业发展的基本方向。菊芋的主要成分菊粉是多聚

果糖^[1], 可以通过酸解和酶解等途径转化为易于发酵的果糖。在国家海洋 863 项目的支持下, 我国在

Received: May 20, 2008; Accepted: July 16, 2008

Corresponding author: Fengwu Bai. Tel: +86-411-84706329; Fax: +86-411-84706329; E-mail: fwbai@dlut.edu.cn

耐盐菊芋品种选育及滩涂示范种植方面已经取得突破, 菊芋的干基生物质产量和成本, 与当前燃料乙醇生产使用的粮食类淀粉质原料相比, 具有竞争优势^[2], 将是我国燃料乙醇产业化发展可选择的原料之一。

国内外学者先后报道了各种以菊粉为原料生产乙醇的工艺技术^[3-7], 包括首先酸解或用黑曲霉等微生物产生的酶水解菊粉中的糖, 再利用酿酒酵母发酵生成乙醇, 或者进行菊粉酶产生酵母与酿酒酵母的混合培养。与这些工艺相比, 利用克鲁维酵母产生的菊粉酶和其乙醇发酵特性直接发酵菊粉生成乙醇的一步法工艺, 不仅省去了菊粉酶解步骤, 降低了过程成本, 而且同步糖化发酵可以防止因菊粉降解物糖的积累而抑制菊粉酶生成及乙醇发酵的现象^[8-10], 有利于维持较高的乙醇生产强度, 从而具有良好的工业化应用前景。

本研究使用具有菊粉酶生产能力且乙醇发酵性能优良的马克斯克鲁维酵母 *Kluyveromyces marxianus* YX01, 首先以菊粉为底物, 考察了这一集产酶、糖化和乙醇发酵为一体的一步法乙醇发酵新工艺, 进而以近海滩涂种植海水灌溉收获的菊芋为原料, 直接发酵生产乙醇。取得的研究结果可以为菊芋燃料乙醇技术的中试放大提供指导。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

本实验室驯化保存的马克斯克鲁维酵母 *Kluyveromyces marxianus* YX01。

1.1.2 菊芋材料

生长于山东莱州湾并使用 25%海水灌溉的菊芋由南京农业大学刘兆普教授提供。

菊粉(菊芋的热水抽提物)购于内蒙古亿利生物技术有限公司, 经实验测定 100 g 菊粉水解可得到 90 g 还原糖。

1.1.3 培养基

(1) 种子培养基(g/L): 菊粉 40, 酵母粉 4, 蛋白胨 4, 玉米浆 10, 121°C 灭菌 15 min;

(2) 发酵培养基(g/L): 菊粉 200, 酵母粉 4, 蛋白胨 4, pH 4.6, 115°C 下灭菌 15 min。

(3) 粗菊芋粉发酵培养基: 60 目以下的粗菊芋粉

配成的培养基, 浓度分别为: 250 g/L、225 g/L、200 g/L。

1.2 实验方法

1.2.1 种子液的培养方法

YX01 接种种子培养基后, 在 38°C 条件下培养 24 h, 其 OD 达到 10 左右, 菊粉酶活力 3 u/mL。

1.2.2 最适发酵温度的确定

发酵培养基 95 mL 中分别接入 YX01 种子液 5 mL, 加上厌氧塞, 150 r/min, 30°C、32°C、35°C、38°C、41°C 摇床中进行乙醇厌氧发酵。分别于 12 h、24 h、36 h、48 h 取样测其生物量、总糖、菊粉酶活力、乙醇, 选定其最适发酵温度。

1.2.3 最适通气量的确定

发酵罐(KF-2.5L, 韩国)中盛装 900 mL 发酵培养基, 分别接入种子液 100 mL。分别在厌氧和通气量 50 mL/min 和 100 mL/min 条件下进行批式发酵实验。pH 控制在 4.6~4.7, 温度 35°C, 转速 300 r/min, 考察通气量对产菊粉酶和乙醇的影响。

1.2.4 底物浓度对发酵的影响

发酵罐(KF-2.5L, 韩国)中盛装 900 mL 发酵培养基, 分别种子液 100 mL。分别在不同底物浓度条件下进行批式发酵实验。pH 控制在 4.6~4.7, 温度 35°C, 转速 300 r/min, 考察底物浓度对发酵的影响。

1.2.5 不同底物浓度的 25%海水灌溉菊芋粉对发酵的影响

以 60 目筛分的 25%海水灌溉的干燥粗菊芋粉不经灭菌直接作为底物进行厌氧发酵, pH 控制在 4.6±0.2, 温度 35°C, 转速 300 r/min, 接种量为 10%。参照目前淀粉质原料乙醇发酵底物浓度要求, 选取菊粉浓度为 250 g/L、225 g/L、200 g/L。

1.2.6 海水灌溉菊芋批式补料发酵

以 60 目筛分的 25%海水灌溉的粗菊芋粉为底物进行厌氧发酵, pH 控制在 4.6±0.2, 温度 35°C, 转速 300 r/min, 接种量为 10%。参照目前淀粉质原料乙醇发酵底物浓度要求, 配制起始菊粉浓度为 180 g/L, 培养 24 h 后添加菊芋粉 100 g。

1.3 分析方法

(1) 总糖和还原糖的浓度: 总糖使用浓盐酸水解后, 用 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 法测定还原糖。

(2) 菊粉酶活的测定方法^[11]: 将培养液离心分离, 上清液作为粗酶液, 取适当稀释的酶液 0.5 mL, 加入 2%的菊粉溶液 0.5 mL, 按照文献[11]方法测定

酶活。

菊粉酶活性单位定义：反应体系中每分钟产生 1 μmol 己糖所需酶量为 1 个酶活单位。

(3) 乙醇浓度由 Agilent 6890 气相色谱仪内标法测定^[12]。

(4) 酵母浓度的测定采用干重法或比浊法，具体方法如下：干重法：取一定体积的样品置于预先烘干称重的离心管中，离心后的沉淀用蒸馏水洗涤 2 次，然后置 105 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温烘箱中烘至恒重后称重；比浊法：所得发酵液制成菌悬液后，稀释 10 倍，在 OD_{600} 下测光密度值。

2 结果与讨论

2.1 适宜发酵温度的确定

前期摇瓶培养结果显示，YX01 是很好的耐热菌株，温度高达 38 $^{\circ}\text{C}$ 不影响其生长，而且有利于产酶（数据待发表），因此确定 38 $^{\circ}\text{C}$ 为 YX01 生长和产酶温度。由图 1 所示，不同温度的发酵过程中，总糖逐步降低，但 30 $^{\circ}\text{C}$ 时降糖速度明显低于 32 $^{\circ}\text{C}$ 和 35 $^{\circ}\text{C}$ ；在发酵过程中，菊粉酶酶活基本保持不变，且各温度间差距不大；而生物量随温度的升高而降低。在

发酵终点 48 h 时，35 $^{\circ}\text{C}$ 下的乙醇浓度明显高于其他温度。根据以上实验数据可以确定 35 $^{\circ}\text{C}$ 为 YX01 的最适发酵温度。

2.2 通气量对发酵的影响

在克鲁维酵母同步糖化发酵菊芋的过程中，通气量是很关键的参数。菊粉酶的分泌是好氧过程，而乙醇发酵是在厌氧条件下进行的。如何控制通气量成为整个发酵过程能够实现优化的关键。由图 2 可见，随通气量的增大，糖醇转化率呈现降低的趋势，分别为 83%、70% 和 51.4%。通气条件下，总糖的降解速率稍高于厌氧条件，菊粉酶酶活在培养后期开始增加，而厌氧条件下的酶活力基本保持不变，说明在同步糖化发酵中，种子液中的菊粉酶已经能够满足后续糖化过程的需要，无需通气刺激产酶，所以后续发酵实验采用厌氧条件。

2.3 底物浓度对发酵的影响

底物浓度对 YX01 乙醇发酵过程的影响如图 3 所示（以 235 g/L 的菊粉浓度为例），200 g/L、222 g/L 和 235 g/L 三种菊粉浓度条件下，表现出相同的规律。发酵进行到 24 h 时，有大量还原糖积累，从总糖与还原糖的差值看出，只有少部分菊粉没有被水

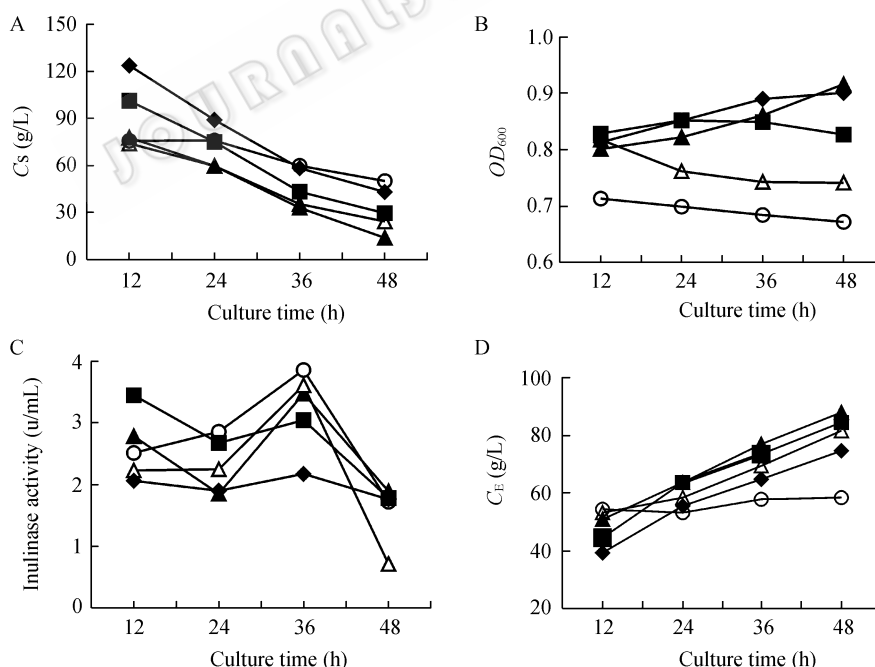


图 1 温度对 YX01 乙醇发酵的影响

Fig. 1 Impact of temperature on ethanol fermentation with *K. marxianus* YX01

(A) sugar consumption; (B) cell growth; (C) inulinase activity; (D) ethanol production
30 $^{\circ}\text{C}$ (◆); 32 $^{\circ}\text{C}$ (■); 35 $^{\circ}\text{C}$ (▲); 38 $^{\circ}\text{C}$ (△); 41 $^{\circ}\text{C}$ (○)

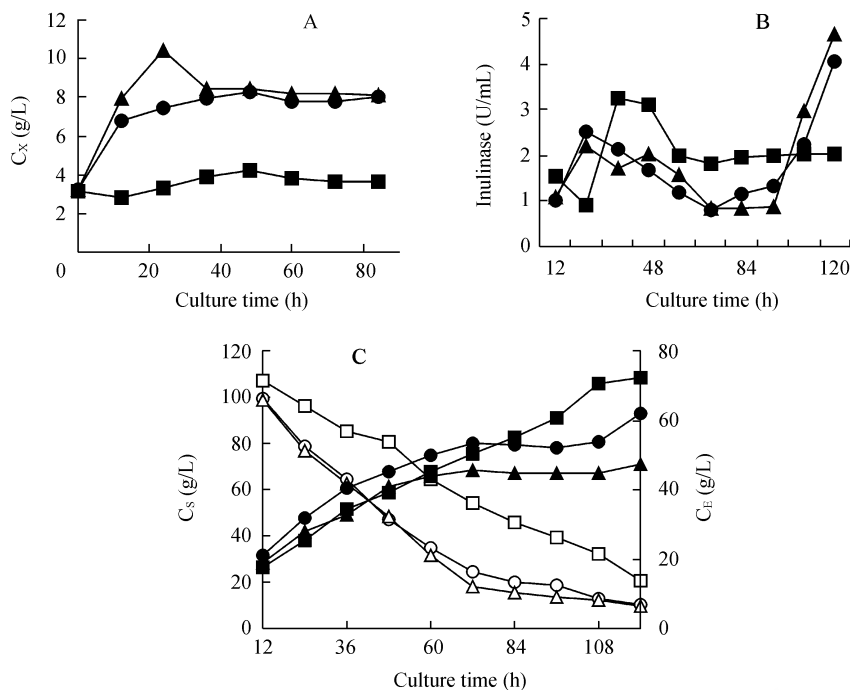


图 2 通气对 YX01 乙醇发酵的影响

Fig. 2 Impact of aeration rates on ethanol fermentation with *K. marxianus* YX01

(A) cell growth; (B) inulinase activity; (C) C_s (empty) and C_e (filled): total sugar and ethanol concentrations (g/L) at different aeration: without aeration (\square, \blacksquare), 50 mL/min (\circ, \bullet), 100 mL/min ($\triangle, \blacktriangle$)

解, 表明在乙醇发酵条件下, 菊粉酶的糖化能力仍然很强。24 h 以后还原糖以几乎恒定的速率减少, 乙醇则以同样规律增加, 进入主发酵阶段。

表 1 给出了不同底物浓度条件下, 发酵终点的生物量、乙醇、残总糖、残还原糖浓度及乙醇得率。可见, 在 200 g/L、222 g/L 和 235 g/L 三种底物浓度条件下, 乙醇得率均达 0.42 以上。尤其在初始底物浓度为 235 g/L 条件下, 发酵终点乙醇浓度为 92.2 g/L (11.5%, V/V), 乙醇得率为 0.44, 糖醇转化率为 86%, 基本上满足乙醇发酵工业生产的要求。

表 1 不同底物浓度条件下 YX01 发酵性能比较

Table 1 Impact of substrate concentration on ethanol fermentation performance of *K. marxianus* YX01

S_0 (g/L)	X (g/L)	S_T (g/L)	S_R (g/L)	P (g/L)	$Y_{P/S}^*$
200	6.1	12	4.0	75.6	0.420
222	4.5	13	3.6	87.2	0.436
235	4.3	18	6.0	92.2	0.436

* $Y_{P/S} = \frac{P}{S_0 \times 90\%}$, P : mass of ethanol; X : biomass; Y_P : productivity of ethanol; S_0 : mass of inulin; 90%: the total sugar measured in the inulin

2.4 菊芋粉的发酵研究

实验中使用的商品菊粉为菊芋粉的热水抽体物, 成本较高, 显然不能用于大规模生产, 并且由于菊芋鲜果不耐贮藏, 一般在收获季节可以直接加工, 以降低成本, 不能及时加工的鲜果, 宜干燥处理后贮藏, 为此考察了菊芋干粉乙醇发酵效果。

以 60 目筛分的 25%海水灌溉的粗菊芋干粉(水分含量 6%~7%, 果糖含量 75%±2%)为底物进行厌氧发酵过程中的总糖、果糖和乙醇时程变化如图 4 所示。从实验结果可以看出: 底物浓度虽然不同, 但果糖和总糖的降低速度相差不大, 且果糖最终浓度相近; 但残总糖的浓度和底物浓度直接相关, 底物浓度高, 残糖也相应提高。不同底物浓度发酵条件

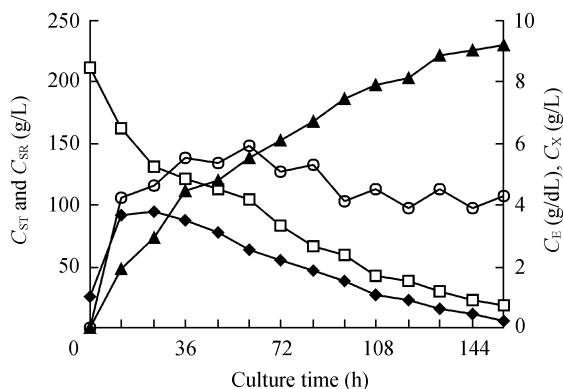


图 3 YX01 发酵 235 g/L 菊粉时程过程

Fig. 3 Time courses of the ethanol fermentation of 235 g/L inulin with *K. marxianus* YX01

C_{ST} (\square); C_{SR} (\blacklozenge); C_E (\blacktriangle); C_X (\circ)

下, 菊粉酶活力相差不大。乙醇浓度随底物浓度的增加而增加, 菊芋干粉浓度为 250 g/L 时, 乙醇浓度达到 66.9 g/L, 但糖醇转化率有所降低, 从 200 g/L 底物浓度的 80% 降低到 70%。由于本研究的一步法发酵利用自产菊粉酶边糖化边发酵, 原料不需蒸煮和预先糖化, 因而节约了大量的能耗和额外添加酶的费用, 同时还减少了因蒸煮而造成的可发酵性糖的损失, 边产酶边糖化使发酵醪中单糖的含量始终保持在较低的水平, 避免了因底物积累造成的抑制现象。此外, 发酵过程也比较平稳, 发酵温度较容易控制。如果这一工艺未来应用于工业化生产, 在工厂建设中就可以省去蒸煮设备、糖化设备以及有关的附属配套设备, 大大节省了基建和设备投资, 必然也节省了由此引起的动力、用水、人工、维修等方面的消耗, 相应降低了生产成本。另一方面, 我们也注意到此实验中的乙醇终点浓度略低于目前乙醇行业水平, 主要是因为底物浓度加大后, 醪液黏度增大, 流动混合困难, 需要在后续的中试放大乃至生产中解决。

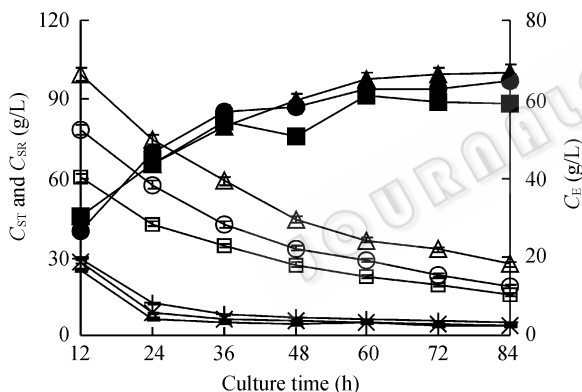


图 4 不同浓度的 25% 海水灌溉的菊芋干粉乙醇发酵性能

Fig. 4 Ethanol fermentation from the dry meal of the Jerusalem artichoke irrigated with 25% seawater

C_{SR} , C_{ST} (empty) and C_E (filled): reductive sugar, total sugar and ethanol concentrations (g/L) at three initial Jerusalem artichoke dry meal concentrations: 200 g/L (—, Δ , \blacktriangle), 225 g/L (\times , \circ , \bullet) and 250 g/L (+, \square , \blacksquare). The error bars showed the standard deviations of the two independent experiments

2.5 菊芋粉的批式补料发酵研究

为进一步提高菊芋粉发酵的终点乙醇浓度, 进行了菊芋干粉的批式补料发酵实验, 使底物总浓度达到 280 g/L, 实验结果如图 5 所示。实验中观察到, 通过这种批式补料方式, 可以避免一次性投料发酵醪黏度太高的现象, 发酵终点乙醇浓度提高到 84 g/L,

乙醇得率为 0.404, 达到理论转化值的 80% 左右。目前这种批式补料发酵的中试试验正在进行。

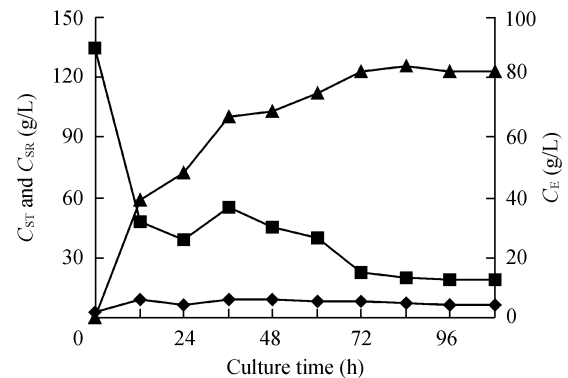


图 5 25% 海水灌溉菊芋干粉的批式补料发酵

Fig. 5 Fed-batch fermentation of the dry meal of the Jerusalem artichoke irrigated with 25% seawater

The initial substrate concentration was 180 g/L and 100 g dry meal was supplemented at 24 h

C_{ST} (\blacksquare); C_{SR} (\blacklozenge); C_E (\blacktriangle)

3 结论

(1) 通过测定生物量, 菊粉酶活力和乙醇浓度确定了发酵菊芋产乙醇的马克斯克鲁维酵母 YX01 最适发酵温度 35°C; 通气量实验证明该菌株一步法发酵菊粉时无需通气供氧。

(2) 在菊粉浓度 235 g/L 时, YX01 发酵的最高乙醇浓度为 92.2 g/L, 乙醇得率为 0.436, 为理论值的 85.5%。

(3) 200 g/L 的 25% 海水灌溉的菊芋干粉在未添加任何营养物质, 未经灭菌处理条件下, YX01 边产酶、边糖化、边发酵, 乙醇终浓度达到为 61.0 g/L, 乙醇得率为 0.407, 达到理论转化值的 80.0%。

(4) 以 25% 海水灌溉的菊芋干粉为底物进行批式补料发酵, 280 g/L 未灭菌的干粉发酵产乙醇终浓度为 84 g/L, 乙醇得率为 0.404, 达到理论转化值的 80% 左右。

REFERENCES

- [1] Szambelan K, Nowak J, Czarnecki Z. Use of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed with *Kluyveromyces fragilis* for improved ethanol production from Jerusalem artichoke tubers. *Biotech Lett*, 2004, 26(10): 845–848.
- [2] Long XH, Liu ZP, Liu L, et al. Advances in study on

- salt-tolerant energy source plant helianthus tuberosus. *Adv Marine Sci*, 2005, **23**(12): 80–84.
- 隆小华, 刘兆普, 刘玲, 等. 盐生能源植物菊芋研究进展. *海洋科学进展*, 2005, **23**(12): 80–84.
- [3] Allais JJ, Torre EF, Baratti J. Continuous production of ethanol with *Zymomonas mobilis* growing on Jerusalem artichoke juice. *Biotechnol Bioeng*, 1987, **24**(36): 778–782.
- [4] Anderson PJ, Mcneil K, Watson K. High-efficiency carbohydrate fermentation to ethanol at temperature above 40°C by *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* isolated from sugar mills. *Appl Environ Microbiol*, 1986, **51**(6): 1314–1320.
- [5] Ohta K, Hamada S, Nakamura T. Production of high concentration of ethanol from inulin by simultaneous saccharification and fermentation using *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**(3): 729–733.
- [6] Ge XY, Zhang WG. A short cut to the production of high ethanol concentration from Jerusalem artichoke tubers. *Food Technol Biotechnol*, 2005, **43**(3): 241–246.
- [7] Barthomeuf C, Regeat F, Pourrat H. High-yield ethanol production from *Jerusalem artichoke* tubers. *World J Microbiol Biotechnol*, 1991, **31**(7): 490–493.
- [8] Margaritis A, Bajpai P. Continuous ethanol production from Jerusalem artichoke tubers I: Use of free cells of *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol Bioeng*, 1982a, **24**(7): 1473–1482.
- [9] Margaritis A., Bajpai P. Continuous Ethanol production from Jerusalem artichoke Tubers II: Use of immobilized cells of *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol Bioeng*, 1982b, **24**(7): 1483–1493.
- [10] Rosa MF, Viera AM, Bartolomeu ML. Production of high concentration of ethanol from mash juice and pulp of Jerusalem artichoke tubers by *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme Microb Technol*, 1986, **8**(9): 673–676.
- [11] Singh P, Gill PK. Production of inulinase: Recent advances. *Food Technol Biotechnol*, 2006, **44**(13): 151–162.
- [12] Xu TJ, Zhao XQ, Bai FW. Continuous ethanol production using self-flocculating yeast in a cascade of fermentors. *Enzyme Microbial Technol*, 2005, **37**(6): 634–640.

《生物工程学报》英文版简介

为了加快期刊的国际化进程, 扩大国际交流, 本刊与国际知名的爱思唯尔出版公司(Elsevier)达成协议, 合作出版英文电子版《Chinese Journal of Biotechnology》, 该刊与中文版同步, 月刊。出版后置于爱思唯尔庞大的 ScienceDirect 网络出版平台上, 我刊网址: <http://www.sciencedirect.com/science/journal/18722075>。

爱思唯尔是国际著名的出版公司, 《Cell》等知名杂志便出自该公司。ScienceDirect 是爱思唯尔建立的世界最全面的服务于多学科研究型图书馆的电子数据库。研究人员通过它能在线访问超过 1800 种期刊和 400 万篇电子版全文。《生物工程学报》英文版借助这个庞大而成熟的平台, 将可以大大地提高文章的浏览量, 扩大期刊及作者在国内外的影响, 提高文章的被引频次。同时, 出版英文电子版将可克服与国外文字沟通的障碍, 使作者的科研成果能在第一时间为国际同行所了解。

本刊的栏目有综述、研究报告、研究简报和技术与方法等, 范围包括基因工程、细胞工程、酶工程、蛋白质工程、发酵工程、生化工程、代谢工程、组织工程、生物制药、生物芯片、生物反应器及生物信息学等, 涉及生物技术各个领域, 非常欢迎广大科研人员踊跃投稿。直接投英文稿件而被录用的, 也将同时发表在中文印刷版上。本刊将增加英文稿件的刊出量, 并邀请国外专家对录用英文稿件进行英文润色, 部分优质稿件将参考专家意见予以优先发表。英文版不再另收版面费。

具体做法是: 每期从中文版中精选出 5~10 篇稿件译成英文, 凡具备以下条件之一者即可入选: 1. 在理论方面有新发现或新见解。2. 在应用方面取得新进展, 达到新水平。3. 在技术方面建立新方法或改进已有的方法。选中后通知作者译成英文, 经编辑部审核送爱思唯尔出版公司进行文字加工, 再返回作者进行内容确证。

投稿时请注意以下事项: 1. 稿件撰写时, 应力求叙述清楚, 避免语法错误和用词不当。2. 突出创新点, 用具体材料、数据加以说明与论证。3. 加强图表注释, 使读者在不读正文的情况下能正确理解图表的涵义。

欲了解更详细的信息, 请关注我们网页的更新或联络编辑部:

电话: 010-64807509; 传真: 010-64807327; E-mail: cjb@im.ac.cn