

分类号: _____ 密级: _____

U D C: _____

华东理工大学

学位论文

高固体含量下整合生物加工菊芋乙醇的研究

国立浩

指导教师姓名:

鲍杰 教授

华东理工大学生物工程学院

申请学位级别: 硕士 专业名称: 生物化工

论文定稿日期: 2012-4-13 论文答辩日期: 2012-5-18

学位授予单位: 华东理工大学

学位授予日期: _____

答辩委员会主席:

评 阅 人:

作 者 声 明

我郑重声明：本人恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的结果。除文中明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何他人已经发表或撰写过的内容。论文为本人亲自撰写，并对所写内容负责。

论文作者签名：

2012 年 4 月 13

高固体含量下整合生物加工菊芋乙醇的研究

摘要

菊芋是一种可以在盐碱地、干旱地等边缘地域上良好生长的非粮作物，从菊芋中生产燃料乙醇为能源危机、气候变暖和沙漠控制等全球问题的解决提供了一种可行的选择。使用菊粉为原料，采用生物法发酵生产低成本的燃料乙醇，关键在于降低或者不加菊粉糖化酶，以及提高乙醇浓度。在本论文中，我们以降低酶的成本、减化过程和减少能耗为出发点，以菊芋为原料生产燃料乙醇的开展了如下研究：

首先，对酿酒酵母 *S. cerevisiae* DQ1 中的菊粉水解酶进行了鉴定、亚细胞定位和生化表征。实验结果表明，*S. cerevisiae* DQ1 存在菊粉水解酶酶活并且发现酶主要存在于胞内和周质空间。通过葡聚糖柱层析分离和 SDS-PAGE 蛋白电泳分析发现该酶的分子量大约为 35kDa。另外，该酶的最适酶活条件为 pH 5.5 和温度 50 °C，*S. cerevisiae* DQ1 最适产酶条件为 pH 5.5，温度 30 °C，且所用碳源和氮源分别为菊粉和酵母提取物。

其次，通过测量还原糖和乙醇分析对比了不同种子培养基、不同 pH、温度和固体含量下该酵母在新型螺带式生物反应器中的发酵性能。对 35% 固体含量下的发酵体系还探索了分批补料和添加纤维素酶的措施对发酵结果的积极影响。结果表明，*S. cerevisiae* DQ1 在不添加任何水解酶的情况下可以直接发酵菊芋产生高浓度的乙醇，在分批补料的情况下得到的乙醇浓度为 128.7 g/L，在添加少量纤维素酶的措施下得到的乙醇浓度为 122.1 g/L。

本论文通过去除菊粉酶添加和明显提高乙醇浓度实现了菊芋乙醇生产能耗和成本的大幅降低，为将来以菊芋为原料大规模生产低成本燃料乙醇提供了借鉴。

关键词：燃料乙醇；菊芋；酿酒酵母；螺带式生物反应器；整合的生物加工过程

Consolidated Bioprocessing (CBP) of Jerusalem Artichoke Tubers for Ethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae* DQ1 under High Solids Loading

Abstract

Jerusalem artichoke is an alternative non-food feedstock for ethanol production and provides a practical option for resolving energy crisis, global warming, and desertification control etc. The low fuel ethanol cost requires the low inulin hydrolyzing enzyme dosage and the high ethanol titer during the enzymatic saccharification and fermentation. In this study, the overall Jerusalem artichoke ethanol processes were improved by cost-reducing and energy-saving. The major progresses of this study were summarized as follows:

Firstly, Identification, location and characterization of inulin hydrolysing enzyme from an inulinolytic brewing yeast *S. cerevisiae* DQ1 were implemented. The result showed the considerable inulinase activity was exhibited in *S. cerevisiae* DQ1 and located in the cytoplasm and periplasm. The optimum activity was at 50 °C and pH 5.0. Production of inulinase was more suitable using inulin as carbon source and yeast extract as nitrogen source at 30 °C, pH 5.5.

Secondly, the fermentation performance in the novel helical bioreactor under different pH, different temperature and different solids loading were compared and analyzed by measuring reducing sugars and ethanol. Fed-batch and cellulase addition processes were respectively investigated under 35.0% (w/w) solids loading. The results showed that *S. cerevisiae* DQ1 can directly ferment Jerusalem artichoke tubers to produce high concentration of ethanol up to 128.7 g/L in fed-batch fermentation, and 122.1 g/L by cellulase addition.

In conclusion, the cost of ethanol from Jerusalem artichoke was significantly reduced using the processing technology by removing inulinase and improving ethanol titer. This may be helpful for the large scale production of ethanol from Jerusalem artichoke in future.

Keywords: fuel ethanol; Jerusalem artichoke; yeast; helical bioreactor; consolidated bioprocessing

目录

前言	1
第 1 章 文献综述	2
1.1 燃料乙醇发展背景及国内外燃料乙醇生产现状	2
1.2 燃料乙醇发酵技术	3
1.2.1 乙醇发酵原理及面临的挑战	3
1.2.2 高浓度乙醇发酵技术 (Very High Gravity, VHG)	7
1.2.3 低成本燃料乙醇发酵技术	12
1.3 菊芋发酵生产燃料乙醇	13
1.3.1 菊芋生物质资源的利用	13
1.3.2 菊粉酶及产菊粉酶的微生物	13
1.3.3 以菊芋为原料生产燃料乙醇的研究现状	17
1.4 选题依据及研究思路	18
第 2 章 材料与amp;方法	20
2.1 菌株、试剂与仪器设备	20
2.1.1 菌种	20
2.1.2 实验试剂	20
2.1.3 培养基, 主要溶液的配置	20
2.1.4 实验仪器	22
2.2 实验方法	22
2.2.1 菌种保藏	22
2.2.2 种子活化	22
2.2.3 菊芋块茎的前处理	22
2.2.4 <i>S. cerevisiae</i> DQ1 中菊粉水解酶的分布	22
2.2.5 <i>S. cerevisiae</i> DQ1 中菊粉水解酶分子量范围的确定	24
2.2.6 不同 pH 或不同温度对粗菊粉水解酶酶活和稳定性的影响	25
2.2.7 各种因素对菊粉水解酶生产的影响	25
2.2.8 同步产酶、糖化与发酵	26
2.3 分析方法	26
2.3.1 菊芋块茎中总糖含量的测定	26
2.3.2 变性蛋白质电泳(SDS-PAGE)	26
2.3.3 菌体浓度的测定	26

2.3.4 菊粉水解酶酶活的测定	26
2.3.5 高效液相色谱法测定果糖、葡萄糖和乙醇的浓度	27
2.3.6 乙醇的得率的计算	27
第 3 章 实验结果	28
3.1 菊芋块茎粉末内主要组分的测定	28
3.2 <i>S. cerevisiae</i> DQ1 中菊粉水解酶生产的确定	28
3.2.1 <i>S. cerevisiae</i> DQ1 中菊粉水解酶确定探测	29
3.2.2 <i>S. cerevisiae</i> DQ1 中菊粉水解酶的亚细胞定位	30
3.2.3 <i>S. cerevisiae</i> DQ1 中菊粉水解酶的部分纯化和蛋白分子量估计	30
3.2.4 pH 对 <i>S. cerevisiae</i> DQ1 中菊粉水解酶酶活和稳定性的影响	32
3.2.5 温度对 <i>S. cerevisiae</i> DQ1 中菊粉水解酶酶活和稳定性的影响	32
3.2.6 不同碳源对 <i>S. cerevisiae</i> DQ1 中菊粉水解酶生产的影响	33
3.2.7 不同氮源对 <i>S. cerevisiae</i> DQ1 中菊粉水解酶生产的影响	34
3.2.8 pH 对 <i>S. cerevisiae</i> DQ1 中菊粉水解酶生产的影响	35
3.2.9 温度对 <i>S. cerevisiae</i> DQ1 中菊粉水解酶生产的影响	36
3.3 利用新型螺带桨生物反应器整合生物加工高固含量菊芋生产乙醇	37
3.3.1 不同碳源培养种子对菊芋同步糖化发酵的影响	37
3.3.2 不同 pH 对菊芋整合生物加工的影响	39
3.3.3 不同温度对菊芋整合生物加工的影响	41
3.3.4 不同固体含量对菊芋整合生物加工的影响	42
3.3.5 各种补料方式对 35% 固体含量下菊芋同步糖化发酵的影响	44
3.4 添加极少量纤维素酶对高固体含量下菊芋整合生物加工的影响	45
3.4.1 添加少量纤维素酶下 30% 固体含量菊芋的整合生物加工	45
3.4.2 添加少量纤维素酶下 35% 固体含量菊芋的同步糖化与发酵	46
3.4.3 添加少量纤维素酶对发酵醪液粘度的影响	47
3.4.4 添加少量纤维素酶对发酵醪中颗粒粒径的影响	48
3.5 以菊芋块茎为物料的整合生物加工对比	49
第 4 章 结论与展望	50
4.1 结论	50
4.2 展望	51
参考文献	52
致谢	61

前言

目前,全球石油资源面临枯竭,以石油为基础的资源 and 能源提供方式正在给全球经济带来巨大挑战,同时带来了气候变暖和环境污染等问题。因此,寻找可持续且环境友好的替代能源成为世界各国竞相研究的热点。利用生物质生产燃料乙醇是一个可行的选择,现在国内外普遍研究的焦点是利用木质纤维素、木薯、甜高粱或甘薯等生产乙醇,但是,木薯、甜高粱和甘薯的可种植范围有限,难以满足大规模乙醇的生产,而木质纤维素的预处理能耗高和纤维素酶成本偏高等问题难以短时间内实现突破。菊芋是一种一年生植物,具有对寒冷、干旱、盐碱和病虫害的抗逆性,因此可以在荒芜的边缘地上种植并且产量较高。菊芋块茎中最主要的糖类是菊粉,菊粉很容易通过酶法或酸法水解为可用于发酵的单糖,因此可以用菊芋作为底物发酵生产燃料乙醇。

乙醇是一种低附加值的产品,因此乙醇的生产需要严格控制成本。利用菊粉酶水解菊粉相对于利用酸水解菊粉有很多优势,如反应条件温和、没有环境污染和便于实现同步发酵等,但是现在商业化的菊粉酶仍不成熟,添加菊粉酶的成本仍然很高。精馏能耗在乙醇加工过程中占总能耗相当大的部分,故降低精馏能耗可以实现生产成本的降低,而精馏能耗同乙醇浓度成反相关关系,因此降低乙醇生产成本需要提高乙醇生产浓度。目前,由于菊芋发酵体系的高粘度和乙醇发酵菌种的耐受性差,难以实现高浓度菊芋乙醇的生产,因此,需要寻找降低或去除菊粉酶和提高菊芋乙醇生产浓度的加工方法。

第 1 章 文献综述

1.1 燃料乙醇发展背景及国内外燃料乙醇生产现状

当前, 全球面临着三个重大问题: (1)高油价; (2)气候变暖; (3)空气污染, 因此需要各国共同努力来解决人们所面临的高能源需求、不可再生能源的快速消耗和全球严重的污染问题。现在关于生物能源的讨论已经涉及到经济、社会和政治的方方面面, 如能源安全、环境保护、外汇储存和农村发展等社会经济问题。生物能源和传统的化石能源最大的区别是氧的含量不同。生物燃料含有大约 10% - 45% 的氧, 化石燃料则基本上不含有氧, 因此生物燃料的化学特性同化石燃料的化学特性非常不同。因为生物燃料的含氧量是一个非常合理的抗爆值, 所以生物燃料比化石燃料更有优势。从环境角度来考虑, 生物燃料也有很多优点, 如乙醇添加到汽油里可以提高马力, 使燃料燃烧更完全, 减少一氧化碳和碳氢化合物的排放^[1, 2]。

2009 年全球生物乙醇的生产总为 106 亿加仑, 而 2011 年全球生物乙醇的生产总量上升到了 139 亿加仑, 现在全球生物乙醇的生产占到了全球生物燃料生产总量的 94%。如果用 E85 燃料替代汽油则可以省下全球 32% 的汽油使用, 这个相当于 3530 亿升的汽油^[3]。全球生物乙醇的主要原料是甘蔗, 所占比例为 60%, 其余 40% 的原料则是其他农作物, 如玉米等^[4]。巴西和美国是世界上最大的两个生物乙醇生产国, 巴西以甘蔗为原料, 美国以玉米为原料。这两个国家的生物乙醇生产量占到了全球生物乙醇生产总量的 70%, 即便如此这两个国家仍需大量进口石油以满足其巨大的燃料需求。

在过去的几十年里, 利用非粮作物发酵生产乙醇的技术得到了很大进展, 但是目前还没有国家能够利用农业废弃物来生产便宜的生物乙醇^[5]。现在, 美国的生物乙醇 90% 由玉米生产所得。美国可再生燃料组织在 2007 年的报告中指出美国生物乙醇的生产取得了很大进展, 已经由 2004 年的 35.4 亿加仑增加到了 2006 年的 48.5 加仑^[3]。巴西的生物乙醇都是用甘蔗生产的, 其中大部分用于国内需求, 用于替代了大约 40% 的巴西石油消耗, 另外大约 20% 的生物乙醇会出口到美国、欧盟或其他国家^[6]。现在, 巴西种植了大约 270 万公顷的甘蔗, 并有 350 家酿酒厂用于燃料乙醇的生产, 每年大概可以从甘蔗中生产出约 45 亿加仑的生物乙醇, 可以为其国内的小汽车和轻型卡车提供燃料^[3, 7]。

欧盟国家也打算将燃料乙醇应用于运输业, 其 2006 年和 2010 年对生物乙醇的需求量分别是 60 亿升和 127 亿升, 但是欧盟估计只有每年 20 亿升的乙醇生产能力。在欧洲, 用于生物乙醇生产的原料主要是小麦、甜菜和酒糟。据预测欧盟需要将其农业用地的 4 - 13% 用于生物乙醇的生产, 只有这样才能满足其内部燃料乙醇的需求。欧盟国家 1999 年和 2005 年用于甜菜生长的农业用地分别为 25.5 亿公顷和 21.4 公顷^[8, 9]。

我国在“十五”计划发展纲要中明确提出要发展现代的生物能源产业, 以满足国内的燃料需求。另外, 原国家发改委批准在河南、安徽和吉林建设试点三套大型燃料乙醇生产装置, 其总的生产能力约为 102 万吨/年。目前, 我国发酵生产燃料乙醇的能力处

于世界第三位，仅落后于美国和巴西^[10]。

1.2 燃料乙醇发酵技术

1.2.1 乙醇发酵原理及面临的挑战

1.2.1.1 乙醇发酵原理

乙醇的发酵需要经过两个重要的生物过程，即己糖的转运和糖酵解途径。20 世纪 80 年代以来，随着分子克隆技术的发展和运用，乙醇发酵途径中的反应机理和重要性的得到了深入研究。这些进展总结如下：

(1) 己糖的转运

早期人们通过生化分析得到了两条基本的己糖转运系统，即高亲和转运系统和低亲和转运系统。后来葡萄糖转运系统、果糖转运系统和甘露糖转运系统又相继发现^[11, 12]。值得注意的是，酿酒酵母 *S. cerevisiae* 的糖转运不需要消耗能量，因为其通过协助扩散来进行糖的转运，而其它一些酵母进行糖转运是通过质子转运系统实现的，因此需要消耗能量^[13]。研究还发现不同的己糖转运体会受到不同糖浓度的诱导并且不同的己糖转运体会在不同的发酵时期表达^[14]。

(2) 糖酵解途径

葡萄糖-6-磷酸是糖代谢途径中最重要的中间代谢产物，在酵母糖代谢中起中心作用。己糖的吸收是控制酿酒酵母糖酵解速率的关键一步。实验表明，过表达糖酵解途径中的关键酶并没有增加乙醇的生成速率，说明限速步骤是己糖的吸收过程而不是糖酵解过程^[15]。

(3) 丙酮酸脱羧酶和乙醇脱氢酶

酵母生产乙醇主要通过糖酵解后的两步反应实现的，即丙酮酸脱羧酶（PDC1）催化丙酮酸生成乙醛，乙醇脱氢酶(ADH1)催化乙醛生成乙醇。当糖的浓度变低时，这两种酶的酶活会降低，促使丙酮酸进入呼吸作用途径^[16]。

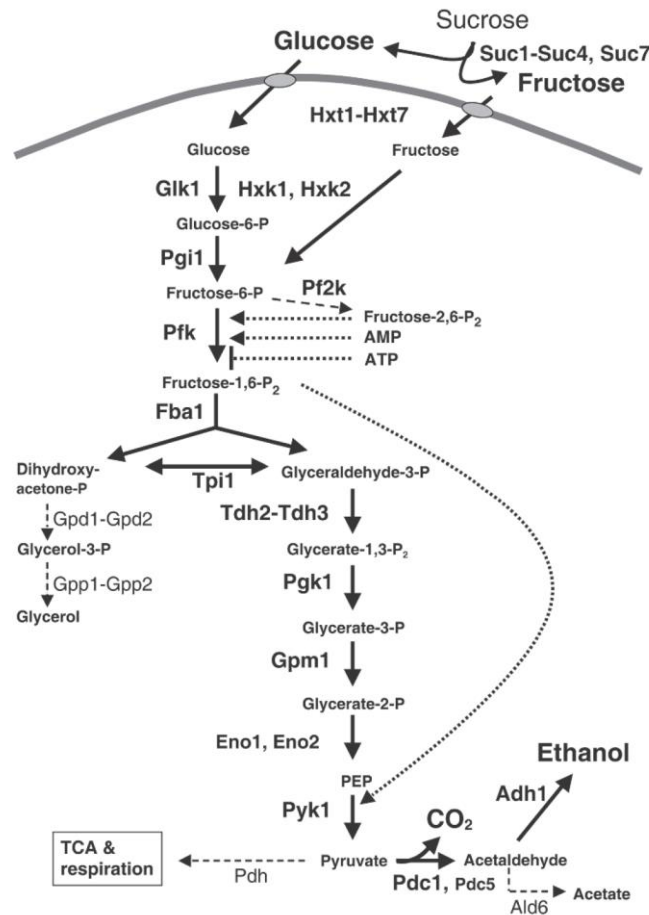


图 1.1 酵母乙醇发酵途径

Fig. 1.1 Pathway of ethanol fermentation in yeasts

1.2.1.2 乙醇发酵面临的问题

现在人类在监测和控制乙醇发酵方面已经有了很大进展,但在工业生产过程中仍常常碰到发酵停滞的情况。发酵停滞 (Stuck and sluggish fermentation) 定义为发酵结束时不能够把残糖降低到期望值以下或者发酵过程中的糖耗速率非常缓慢的情况。很多研究已经对发酵停滞的原因进行了探究,主要包括:高起始糖浓度、氮源不足、维生素不足、氧不足、高乙醇浓度、酵母发酵副产物(如脂肪酸、乙酸和生物毒素)的抑制作用和发酵原料所带抑制性物质(如杀虫剂,木质纤维素预处理后产生的抑制物)。这些因素可以分为物理因素(pH和温度)、化学因素(营养物质和抑制性物质)和生物因素(微生物的竞争),另外还可能是几个因素协同作用。了解造成发酵停滞的机制利于人们预防发酵中可能出现的风险和针对性的寻找造成发酵停滞的原因,便于控制发酵的稳定进行,减少经济损失。

(1) 酵母菌株

酵母的生理往往是由其遗传特性决定的。在恶劣的条件下酵母之间的差异会非常明显,显示出它们在环境适应性上的差异。不同酵母在发酵后期也会表现出在氮源需求和糖耗上的不同^[17]。通过筛选在低氮浓度下有效利用氮源的酵母可以解决乙醇发酵过程中

氮源不足的问题。不同的酵母利用葡萄糖和果糖的能力也不一样,分为亲葡酵母和亲果酵母,因此通过筛选合适的亲果酵母可解决一些发酵过程中由于葡萄糖与果糖比率太低而导致的发酵停滞。

很多发酵体系中都存在比较恶劣的发酵环境,如极低的含氧量、低可利用氮和高糖浓度,这些体系都需要高耐受性的酵母来保证发酵进行完全。筛选各种条件下进行发酵的酵母会有其相应的特征^[18]。进行高温和高乙醇浓度发酵也需要合适的耐受性酵母。

(2) 酵母种子液的制备

以活性干酵母作为发酵种子,酵母种子液的制备特别重要。首先,活性干酵母不能够直接接入发酵液,对酵母进行再水化是必要的。其次,酵母再水化的时间、温度和 pH 对酵母的膜功能和代谢活性的复苏都特别重要。再次,尽管混合会对酵母活力产生影响,但是再水化时仍要对悬浮液进行适当混合。另外,再水化后的酵母所在的培养基温度与要接入的发酵体系的温度差不应太大,否则会减少种子中细胞的数量。起始时刻接入的菌量太少也会导致发酵停滞现象,一般需要接入的菌量为 2×10^6 到 5×10^6 个酵母/mL。

(3) 酵母的营养

a.氮源:氮源对于高浓度乙醇的生产特别重要,因为氮源会影响到酵母生物量的生产、发酵的速率和完成发酵的时间。酿酒酵母属的酵母能够利用铵根离子 (NH_4^+)、碳和能源合成各种包含氮的组分,因此氨水和自由氨基酸(通常缩写为 FAN)很容易被酵母吸收利用,而多肽和蛋白质也可以通过水解作用得到氨基酸进而促进氮的吸收。酵母利用含氮物质的主要用途是:(1)合成增加生物量所需各种结构和功能蛋白;(2)促进酵母发酵过程中用于催化各种生化反应的各种酶的合成^[19]。氮源的缺乏(自由氨基酸的量不足 150 mg/L)会减缓酵母的生长和发酵,甚至会导致发酵停滞,可能的原因是氮源的不足抑制了用于将糖类从胞外转移到胞内的一些酶类的合成。有文献已经证明在酵母其他的营养足够的前提下,增加氮源会促进酵母的生长^[20]。但是,在酵母生长期过后再添加氨水对酵母的生长就不再有任何促进了,这是因为低氮条件所造成的酵母细胞的糖转运抑制是不可逆的。另外,酿酒酵母利用氨基酸生长发酵时并不仅仅把其作为氮源,氨基酸还会作为氧化还原剂来平衡限氧条件下的氧化还原势^[21]。

b.磷源:磷限制会影响酵母细胞的生长和酵母生物量的提高,也会直接影响发酵的速率。

c.氧和其它有利于存活的因子:氧和一些脂类物质的存在对酵母的生长十分关键,这些因子有利于减缓乙醇对酵母的抑制作用。在酵母生长的早期,氧可以为酵母的生长提供能源。另外氧是甾醇和不饱和脂肪酸合成的必须物质,而甾醇和不饱和脂肪酸是酵母细胞膜的结果和功能物质,对细胞的活性影响很大^[22]。在氧不足的情况下,酵母会产生辛酸和癸酸这两种毒性脂肪酸。这两种中链脂肪酸的毒性会随着乙醇浓度的上升而增加,进而抑制发酵的正常进行。氧不足导致发酵停滞的另一个原因是氧不足会抑制麦角甾醇和不饱和脂肪酸的合成,降低生物量的合成和酵母的活性。在发酵醪中通入氧气后

会促进脂类的合成, 增加细胞膜上脂类含量, 阻止中链脂肪酸的释放, 进而降低了潜在的毒性, 提高乙醇的耐受性, 在一定程度上降低了发酵停滞的可能^[23]。酵母壳是提取酵母内可溶物质后所剩下的酵母细胞壁残渣。向发酵体系中添加酵母壳也可以防止发酵停滞的发生, 这是因为酵母壳可以移除发酵体系里的毒性副产物, 并且可以为酵母提供对发酵有益的不饱和脂肪酸。

d. 维生素: 一些发酵停滞是由维生素不足造成的。酿酒酵母可以合成除生物素以外的所有维生素, 但是添加额外的维生素可以大大促进酵母的生长和发酵。然而, 不同的酵母对维生素的需求量是不同的, 如克勒克酵母所需要的硫胺素要比酿酒酵母低很多。乙酸会抑制发酵是因为乙酸降低了酵母转运和维持硫胺素的能力。二氧化硫会抑制发酵是因为二氧化硫会同硫胺素作用使其分为两部分, 进而丧失了其生物学功能。

e. 矿物质: 很多矿物质是糖酵解和其他酶催化反应中的辅因子, 因此矿物质不足或不平衡都会导致发酵停滞现象的发生^[24]。比如镁离子在代谢控制、细胞生长和增殖、糖酵解途径和随后的乙醇生产过程中都起到了关键的作用。缺少锌离子和镁离子的发酵液会直接影响到糖的代谢和随后的发酵。缺少了钙离子的发酵液会增加酵母对乙醇的敏感性。高浓度的锰离子会抑制镁离子的吸收, 相反地, 低浓度的锰离子会促进镁离子的吸收。另外, 不稳定的 pH 和钾离子不足也会导致发酵停滞现象发生。

(4) 抑制性物质

a. 乙醇: 乙醇会抑制酵母的各种转运系统, 影响质子泵的作用并影响酵母细胞膜的组成, 因而降低了糖类转运活力, 导致酵母生长受到抑制, 发酵速率下降^[25]。酵母对乙醇的耐受性还会受到发酵温度的影响, 在低温情况下酵母往往能够耐受更高的乙醇浓度。另外, 乙醇还会增加其他物质对酵母的毒害作用。甾醇和脂肪酸还会影响酵母对乙醇的敏感性。

b. 乙酸: 发酵停滞的发酵醪中往往会出现高浓度的乙酸。很多微生物都会向发酵醪中引入乙酸, 而乙酸浓度的提高会抑制酵母的生长, 提高乙醇的毒性进而阻止了发酵的完成。

c. 中链脂肪酸: 合成长链脂肪酸时往往会产生大量的中链脂肪酸中间体, 这些中链脂肪酸会抑制乙醇的发酵。常见的中链脂肪酸有辛酸和癸酸, 其毒性会随着 pH 的下降而增加, 其中癸酸比辛酸有更大的毒性, 这个两种脂肪酸都会抑制己糖转运系统因而导致发酵停滞^[26]。

d. 毒素: 一些酵母会产生毒素来抑制另外一些酵母的生长和发酵。这种毒素可以通过降低敏感型酵母细胞膜上的离子梯度来影响质子和氨基酸的偶联转运, 进而改变了氮的代谢^[27]。毒素也会引起酵母胞内的一些代谢物质的泄露, 如 ATP、葡萄糖和氨基酸的泄露。存在于生物质中的真菌也会产生霉菌毒素抑制酵母的发酵。另外, 植物本身也会产生一些物质(如植物抗毒素)和酶类(如病因相关蛋白)影响酵母菌的正常发酵。

e. 亚硫酸盐: 亚硫酸盐对微生物的毒性很高, 在低 pH 下尤甚, 因此会严重影响酵母的生长和发酵。过量使用 SO₂ 会对酵母细胞产生很大毒害。

f. 农作物残留农药：利用实际生物质发酵生产乙醇时，如果杀虫剂和杀菌剂在生物质表面残留过多，会对发酵产生负面影响。农药残留一般会直接或间接地影响酵母的生长。

(5) 物理因素

a. 发酵液的过度澄清：在以水解液进行发酵时，如果水解液过分澄清会是的其中的一些脂肪酸、甾醇和其他大分子损失，也会影响发酵的效率，这是因为过分澄清的水解液中损失了很多营养元素和脂肪酸，尤其是不饱和脂肪酸，因而影响到了氨基酸的转运，即影响到了氮源的吸收。发酵体系中固体水平也会影响酵母的乙醇耐受性，有一定量的固体存在更有利于酵母耐受高浓度乙醇^[18]。

b. pH: 酿酒酵母能够耐受较低的 pH, 甚至在 pH 为 2.8 - 4.2 的发酵汁仍能正常生长。亚硫酸盐的毒性主要依赖于 SO_2 在酵母细胞中的积累水平，一旦 SO_2 进入酵母细胞会迅速降低胞内 ATP 的水平，导致细胞死亡。

c. 温度：极端温度会对酵母的生长和发酵产生非常严重的影响。酵母乙醇的耐受性会受到温度的影响。在高温条件下，酵母细胞膜的流动性增加，乙醇更容易进入细胞内部，会对酵母的代谢和细胞生存产生不利影响。而在低温条件下，酵母细胞膜上的甾醇含量增加，会减少乙醇进入胞内，因而能够增加酵母对乙醇的耐受性。

(6) 微生物的污染：如果在发酵起始阶段引入了大量非酿酒酵母的微生物，则会增大发酵停滞的风险。这是因为引入的杂菌会同酿酒酵母竞争营养并产生毒性物质。

(7) 发酵停滞的代谢机理：酵母发酵停滞的代谢机理已经研究的相当透彻。糖消耗能力的下降同糖吸收能力的下降是相关联的。在各种不利影响因素下，如营养不足（包括大量营养元素和少量营养元素）、低 pH、氧不足、搅拌不足、极端温度、毒性物质存在、杂菌存在、矿物质不平衡、酵母的耐受性差（尤其是对乙醇和乙醛的耐受性差），葡萄糖和果糖的消耗都会下降。所有这些因素都影响到了葡萄糖和果糖转运体的表达和活性，进而导致了发酵停滞。在葡萄糖和果糖的混合发酵中，往往会在停滞发酵的发酵液中发现果糖的浓度是葡萄糖浓度 10 倍以上，因此可以把葡萄糖和果糖比率小于 0.1 作为发酵停滞的一个标志^[28]。

除了营养、物理和微生物这些因素会影响酵母的代谢导致发酵停滞，细胞凋亡也是影响正常发酵的一个因素。

1.2.2 高浓度乙醇发酵技术（Very High Gravity, VHG）

(1) VHG 发酵技术的发展和挑战

20 世纪 80 年代，研究人员开始提出提高乙醇发酵浓度的想法，不久就实现将乙醇浓度从 7-8% (v/v) 提高到 10-12% (v/v)。随着对乙醇发酵菌株生理的研究深入，有人提出 *Saccharomyces cerevisiae* 可以耐受更高浓度的乙醇，可以发展更高浓度乙醇的发酵技术，即高浓度乙醇发酵技术^[29]。在使用粮食或其他非粮作物作为发酵原料时往往会引入大量固体，因此，高浓度乙醇发酵技术（Very High Gravity, VHG）又称为高固体含量乙醇发酵技术。VHG 技术的主要目标是降低加工过程对水的需求并因此降低精馏能耗，

减少废水排放和废水处理的成本，这些成本约占总能耗成本的 30%。另外，VHG 技术还在没有添加额外设备投资的情况下通过提高发酵醪中乙醇的浓度实现了生产效率的提高。VHG 技术往往通过发酵高于 250 g/L 的糖类得到高于 15% (v/v) 的乙醇，这比现在全球大多数乙醇炼制厂的 10 - 12% (v/v) 的乙醇浓度高很多。因此，VHG 发酵技术相对于传统发酵技术的主要优点有：节省用水；乙醇生产率高；降低劳动力支出；降低能量需求；降低投资成本；减少染菌。

但是，VHG 发酵需要在发酵初始阶段加入高浓度的物料，这往往会给酵母细胞带来高渗透压。因此，进行 VHG 发酵时经常会出现发酵停滞和最终乙醇得率的下降。在高底物浓度的发酵培养基中，影响酵母生产和发酵的主要因素是高渗透压、低水活(a_w) 和高乙醇浓度的毒性，另外营养物质浓度、金属离子的浓度和温度等也会对酵母生长和发酵产生很大影响^[30]。首先，在高渗透压的条件下会使酵母细胞内积累更多的乙醇，这对酵母胞内与乙醇生产有关的酶会产生毒害作用，因此，酵母的发酵能力和存活能力在高渗条件下会受到严重影响。尽管 *Saccharomyces rouxii* 能够耐受高渗透作用，但是其乙醇生产能力非常差。其次，在发酵末期，高浓度乙醇对酵母的继续发酵是非常不利的。因此，为了降低高渗透作用和高浓度乙醇对酵母发酵的负面影响，研究者们正致力于研究酵母耐受极端条件的机制，主要集中于极端条件下酵母耐受机制和乙醇排泄机制的研究。

(2) VHG 生物乙醇发酵研究

VHG 乙醇发酵可以用简单糖类（如葡萄糖和蔗糖）为碳源，也可以用复杂聚糖（如淀粉和糊精）为碳源。VHG 乙醇发酵的关键是发酵速度快和终乙醇浓度高，典型的 VHG 发酵体系中包括了大于 300 g/L 的可溶性固体和自由氨基氮、酵母提取物、固醇等营养物质。过程优化可以避免底物和乙醇的损耗，比如细菌和野生酵母生产其他终产物的糖耗，也可以避免大量残糖存在于发酵液，比如有机酸、离子和其他抑制性总产物会导致残糖存在，因此通过过程优化对乙醇得率的提高非常有帮助。

a. 渗透保护剂和营养物质的影响

为了解决由高密度发酵液所带来的一些问题，研究者们尝试着通过添加一些营养物质或者辅料来改善酵母的生长和发酵。将各种辅料、可利用氮源、蛋白质-脂类复合物、粒状物质和渗透保护剂添加到发酵培养基后可以观察到对乙醇浓度的明显。常用到的营养性辅料包括麦角固醇、油酸和其他脂肪酸、植物油、脱脂奶粉、多聚糖和真菌菌丝等，这些物质的添加对酵母的生产促进作用十分明显。通过添加尿素、酵母提取物和铵盐等自由氨基氮可以提高 VHG 发酵中乙醇的终浓度^[31]。通过添加过量可同化氮 *Saccharomyces cerevisiae* 可以发酵生产高达 17% 的乙醇。通过向培养基中添加 12 g/L 的酵母提取物，0.3 g/L 的细胞壁，3 g/L 的甘氨酸和 20 g/L 的豆粉可以将发酵时间从原来的 56 小时降到 28 小时，因此将乙醇的生产效率提高了一倍^[32]。Pereira 等利用玉米浆（CSL）和尿素来促进 VHG 乙醇发酵，这两种物质大大促进了发酵后期乙醇的生产和酵母的活性，其乙醇的生产效率为 $2.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ^[33]。最近研究表明，尿素的添加不仅可

以克服发酵过程氮不足的问题，还可以延长酵母细胞的对数期，进而得到高的乙醇生产率^[34]。

常用到的渗透压保护剂有脯氨酸、甘氨酸甜菜碱、甘氨酸、胰蛋白胨、腺嘌呤-尿嘧啶-胞嘧啶、铵盐、钙盐和镁盐，这些物质可以应用于高浓度乙醇的发酵中。大豆粉和酵母细胞壁的添加可以提高乙醇的发酵速率、消耗的糖量和最终乙醇的浓度。Breisha^[35]报道通过添加 5 mg 硫酸铵/g 蔗糖可以在 48 小时内消耗完将 25%浓度的果糖消耗完，生产得到 11.55%的乙醇；添加 6 g/L 的酵母提取物和 0.2 g/L 的硫酸素可以将 30%浓度的果糖消耗完，生产得到 14%的乙醇，但是所用酵母不能够在相同条件下将 35%浓度的果糖消耗完；通过在发酵初期 12 小时内以 $150 \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1} \text{ m}^{-3}$ 速率向发酵醪内通入无菌空气的办法，酵母可以将 35%浓度的果糖消耗完全并产生 16%的乙醇。

b. 以简单糖类为原料的 VHG 乙醇发酵

简单糖类是指葡萄糖或蔗糖等单糖或二糖。很多研究已经报道了通过添加营养物质来提高大于 300 g/L 糖类发酵生产乙醇的情况。添加 4% (w/v)大豆粉可以将乙醇浓度提高到 12.8%；通过添加硬皮豆粉、蚕豆粉和豇豆麦芽粉可以再 72 小时内生产多余 15% (v/v)的乙醇，其生产效率大于 $2 \text{ gL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ^[36, 37]。玉米浆、尿素和硫酸镁等便宜的营养物质也有利于 VHG 乙醇发酵的进行，有报道在高达 330 g/L 葡萄糖的培养基中发酵的得到了高达 18.6%的乙醇^[38]。将甜高粱茎秆提取液和甜高粱混合后进行高浓度发酵得到了 16.8%的乙醇^[39]。最近，有人通过添加各种碳源和氮源辅料来提高高浓度甜高粱的发酵：以蔗糖作为辅料时生产乙醇的浓度为 15.0% (v/v)；以甘蔗糖蜜作为辅料时，得到的乙醇浓度有轻微下降，为 14.0% (v/v)；对甜高粱提取液分别在 500 mL、5.0 L 和 50.0 L 发酵罐上进行发酵放大时分别得到了 120.24、139.51 和 119.53 g/L 的乙醇^[40]。在 30 °C 共发酵浓度为 34-35% (w/v)甘蔗汁和糖蜜 48 小时得到了 15.8%的乙醇^[41]。

c. 以生物质为发酵原料的 VHG 乙醇发酵

如表 1.1 所示，现在已经有很多文献报道过利用生物质中的多聚糖进行高浓度乙醇发酵，其中主要利用生物质中的淀粉。现在利用小麦粉为基质发酵时生产的乙醇浓度已经得到了大幅提高，但是以其他含淀粉的生物质发酵乙醇仅仅是探索了其可行性。在制备 VHG 发酵浆液时必须遵守一定的规则，如提高生物质与水的比率，使用降低黏度的酶等^[46]。曾有报道发酵小麦可溶性固体含量达 38-39% (w/v)生产了高达 23%的乙醇^[43]。已经探索过 VHG 发酵的淀粉基生物质见表 1。最近一篇报道成功地将 VHG 乙醇发酵技术应用到了甘薯乙醇的生产，该报道中时用木聚糖酶降低粘度的^[57]。另外，该团队还对高浓度甘薯乙醇的同步糖化与发酵分别在实验室、中试和工业规模上进行了测试，得到的最大乙醇浓度分别为 128.51, 109.06 和 97.94 g/L^[58]。

d. 发酵醪的粘度

使用一些生物质制备高浓度乙醇发酵醪时往往会有很高的粘度，而高粘度会带来很多问题，如过程操作困难、固液难以分离、多聚糖水解不完全和发酵效率低等^[58, 59]。利用酶法降低发酵体系粘度现可以制备含高可溶性固体的发酵醪，保证高浓度乙醇的生

表 1.1 不同淀粉基生物质的 VHG 乙醇发酵

Table 1.1 VHG ethanol production using different starch biomass

底物	可溶性固体浓度	最大乙醇浓度	发酵时间 (h)	参考文献
小麦粉	35% (w/v)	17.1% (v/v)	72	[42]
小麦粉	37.9% (w/v)	23.8% (v/v)	130	[43]
无壳大麦	32% (w/v)	17.1% (v/v)	96	[44]
无壳燕麦	>30% (w/v)	353.2 L/t (dry wt.)	72	[45]
黑麦	32-34% (w/v)	434.5 L/t (dry wt.)	48	[46]
黑麦和小黑麦	>30% (w/v)	15.7-16.1% (v/v)	96-120	[47]
高粱和甜高粱	34% (w/v)	16.8% (v/v)	96	[48]
玉米粉	35% (w/w)	126-130 (g/kg)	72	[49]
麦芽糊精	>30% (w/v)	129 (g/L)	72	[50]
珍珠粟	35% (w/v)	16.8% (v/v)	72	[51]
玉米粉	>30% (w/v)	17% (v/v)	48	[52]
无壳大麦	30% (w/w)	14.3% (v/v)	72	[53]
土豆块茎	>30% (w/v)	16.61% (v/v)	72	[54]
穆子	>30% (w/v)	15.6% (v/v)	72	[55]
木薯粉	40% (w/v)	15.03% (v/v)	72	[56]
甘薯块茎	>30% (w/v)	17.0% (v/v)	36	[57]

产。酶的添加可以把吸附于生物质网状颗粒中的水分释放出来提高了水和生物质的比率。细胞壁降解酶如纤维素酶、半纤维素酶、木聚糖酶和阿拉伯聚糖酶等已经成功的应用于降低发酵醪粘度。另外添加果胶降解酶也可以降低以土豆等生物质为原料的发酵醪的粘度^[54]。Jones 等人评估了蛋白酶对发酵醪粘度的作用，发现蛋白酶可以将小麦中的蛋白质水解为自由氨基氮，因而降低了小麦发酵醪的粘度^[60]。生物纤维素酶和 β -葡聚糖苷酶可以用于水解大麦和燕麦中的 β -葡聚糖。有报道成功地利用 β -葡聚糖苷酶 (0.02%, w/w) 将大麦发酵醪的粘度降低，粘度降低速率为 8.2 BU/s，最终将粘度从 2460 BU 降低到 420 BU^[44]。

(3) 过程优化

VHG 乙醇发酵的最终目标是在最短的时间内获得高的乙醇浓度。通过过程优化可以实现培养基中乙醇浓度的提高，而营养物质的浓度尤其需要优化，因为营养物质对 VHG 乙醇发酵十分重要。Wang 等运用均匀设计和非线性逐步回归分析的方法估计了氮源和其他一些影响因素的最佳浓度，提高了玉米乙醇的生产浓度^[52]。Zhang 等利用响应曲面法和非线性回归分析优化了 VHG 条件下甘薯的粘度下降条件^[57]。基于三水平四因素 BB 设计的响应曲面法也成功应用到了低值 VHG 培养基^[33]。最近有人研究了氧化还原势同酿酒酵母生长状态直接的关联性，发现氧化还原势可以很好的指示出酵母生理状

态的变化,因此可以通过监测氧化还原势使用一些适当的补料措施或产品回收措施来优化乙醇的生产率^[61]。同样,运用热力学方法也可以用来监测酵母的生理状态进而用来优化乙醇的发酵^[34]。Rautio 等通过对酵母进行转录分析获取了酵母发酵时的生理状态,因此可以在复杂的发酵过程中对酵母的发酵性能进行监测和优化^[62]。

因此,在 VHG 条件下经常会恶化酵母的生理环境,通过过程设计和操作可以改善酵母的生理环境获得高的乙醇得率。

(4) 固定化酵母

将酵母细胞固定化可以降低 VHG 条件下的环境对细胞的压力,这依赖于固定化的载体。Smogrovicova 等观察到纤维素固定化酵母和自由酵母在 VHG 条件下的发酵性能几乎一样,但是用果胶酸钙或者藻酸钙固定化酵母的发酵速率会明显提高,这是因为酵母细胞包被在凝胶中后会保护微生物细胞免于底物或产物的毒性,在包含钙的凝胶中乙醇的耐受性还会提高^[63]。Patkova 等也发现使用藻酸钙包被的酵母发酵 24% (w/w) 麦芽发酵醪,8 天就可以发酵完全,这是自由酵母发酵时间的一半^[64]。Virrkajarvi 等用带孔玻璃珠为载体固定化酵母,发酵生产乙醇的浓度超过 10% (v/v)^[65]。另外,细胞固定化还可以同重复批次发酵偶联进行高浓度乙醇的生产,这样可以避免连续操作中自由细胞的损失。

(5) 温度和通气的影响

Jones 等使用 VHG 糖蜜培养基在 15 °C 下发酵,发现糖化速率特别慢,240 小时仅有利用了 44% 可溶性固体,而在 35 °C 下 72 小时发酵便会停滞,20 和 25 °C 条件下糖利用率最大^[41]。高浓度的小麦发酵醪(36.5 g 可溶性固体/100 mL)的最适发酵温度为 27-30 °C,在此温度下 55 小时内可以产生高达 20% (v/v) 的乙醇^[60]。因为少量的氧可以促进固醇和不饱和脂肪酸合成,因而可以维持细胞膜的完整性,所以通入适量的无菌空气可以促进酵母的繁殖。持续或者间歇通入适量空气都可以有效地提高酵母的生长和乙醇的生产。另外,通入少量空气还有助于减少发酵副产物甘油的生成。有文献报道在对数早期和中期以 0.82 L/min 的速度向 VHG 发酵体系中通入无菌空气可以更好地促进酵母的生长和乙醇的生成^[66]。

(6) 生物反应器的设计

因为高固体含量下的发酵醪粘度很高,发酵体系的热传递状况很差,难以控制合适的温度。螺旋折流板换热器和刮面式换热器特别适合于高粘度流体的传热,因此可以应用于高粘度发酵体系。另外,高粘度的发酵液在不同操作单元之间的转移也很困难,往往需要提高发酵液的温度(80-90 °C)降低发酵醪粘度,进而利于泵转移发酵醪。有文献报道,通过对 VHG 体系进行耦合的多级连续发酵把乙醇的浓度提高了 42%^[67]。通过增加串联发酵罐的数目或者在罐内添加挡板都能有效减轻乙醇的抑制效应^[68]。对串联发酵应用于 VHG 乙醇发酵的报道非常少,目前还只有 Ingledew 和 Lin 进行了研究^[67,69]。现在,关于 VHG 乙醇发酵反应器设计方面的研究非常少,因此需要加强这个领域的研究。

(7) VHG 发酵技术的经济评估

在高浓度或者高固体含量发酵体系中，水的使用减少接近 40%，由于需要加热、降温 and 精馏的流体减少，那么在随后的加工过程中会大大减少能耗。在高固体含量麦芽汁发酵中，将可溶性固体的含量从 16% 提高到 31% 可以节省 58.5% 的水，据估计将 44,558 kg 的小麦制备成 31% 固体含量的发酵醪要比制备成 16% 固体含量的发酵醪节省 78,232 kg 的水，即将水的需求量从 133,674 kg 降低到了 55,442 kg。

据统计，乙醇生产过程中 80% 的能耗成本来自于下游加工过程，其中精馏能耗占据总能耗的 30%。由于高固体含量下水量的下降，高固体含量体系下的精馏能耗会大大下降，当乙醇浓度从 12% 增加到 18% 时能耗会下降 4%^[70]。另外，高固体含量体系下的渗透压比较大，很多微生物难以存活，染菌的概率会大大下降，因此，使用抗生素的成本也会下降。

最近几年，一些商业用酶的价格不断降低，发酵和提纯技术不断提高，VHG 乙醇发酵可能不久便可以应用到商业化生产中去。

1.2.3 低成本燃料乙醇发酵技术

燃料乙醇是一种低附加值的产品，其生产中最大目标是降低燃料乙醇的生产成本。高浓度乙醇发酵(VHG)可以降低精馏能耗，实现成本降低，前面已经做过介绍，因此这里着重介绍其他三种低成本燃料乙醇的发酵技术。

(1) 带渣发酵

带渣发酵是一种使用全物料进行直接进行发酵的发酵工艺，不会对物料中的聚糖或者水解后的单糖进行提取后在发酵。同提取清液发酵或水解液发酵相比，带渣发酵不会讲提取清液或水解液中的聚糖或单糖随着渣滓带走，导致物料的乙醇得率降低，所以一般发酵中采取带渣发酵的方式，很少采用提取液进行发酵。但是随着许多可以降低发酵成本和提高发酵强度的新技术的出现，如差压精馏技术等，有些厂家也开始采用提取清液或水解液进行发酵^[71]。

带渣发酵相对于汁液发酵的优势是：带渣发酵没有前期固液分离的步骤，减少了生物乙醇加工的工序；带渣发酵没有固液分离，也去除了固液分离时随渣带着的糖类的损失；带渣发酵时，会有更多的营养物质留在发酵体系中，如氨基酸，更利于发酵的进行；带渣发酵的发酵体系里存在一些固体颗粒，这些颗粒的存在也有利于提高酵母对乙醇的耐受性，提高乙醇的生产浓度。

(2) 燃料乙醇的整合生物加工 (CBP)

生物质燃料乙醇的生产一般包括三个生物反应过程：微生物生产水解酶，水解酶水解生物质中的纤维素、淀粉或菊粉等聚糖，乙醇的发酵。将聚糖水解和乙醇发酵两个过程整合的技术已经取得了进展，如同步糖化与发酵 (SSF) 和同步糖化共发酵 (SSCF)。但是为了实现乙醇生产成本的进一步降低，终极目标是将上面的三个生物过程整合到一个反应器中进行。整合生物加工的优点：减少酶的添加，降低酶生产成本；实现过程整合，降低设备投入和操作成本；便于通过一个微生物对整个生物过程进行调节。但是现

在还没有合适的 CBP 微生物可以有效地从木质纤维素中生产乙醇。现在对木质纤维素进行整合生物加工的限速步骤主要是纤维素的水解和木糖的发酵。现在研究的主要方向是向乙醇生产微生物（如 *Saccharomyces cerevisiae*）中引入纤维素酶或半纤维素酶或者向纤维素降解微生物（如 *Clostridium thermocellum*）中导入乙醇生产所需的酶来实现 CBP。现在，对菊粉进行 CBP 加工是比较容易的，已经发现很多种微生物可以同时生产菊粉酶、水解菊粉和生产乙醇，如 *Kluyveromyces marxianus* 和一些 *Saccharomyces cerevisiae*^[72]。

（3）高温发酵技术

利用耐高温微生物发酵有很多优势：减少降温用冷水，节省降温成本；提高糖化和发酵的速率，降低操作成本；实现边发酵变分离的过程集成；降低染菌的风险。一般的到耐高温微生物的方法有：从菌种保藏库中筛选，高温驯化，菌种突变，分子生物学手段和从自然界中分离。尽管各种方法都有筛选到高温微生物的成功案例，但是目前从自然界中筛选高温微生物仍是最好的办法。现在已经筛选出很多耐高温乙醇发酵菌株，其中耐高温和发酵性能最好是 *Kluyveromyces marxianus* IMB3，研究者们已经对它进行了很多研究^[73]。

1.3 菊芋发酵生产燃料乙醇

1.3.1 菊芋生物质资源的利用

菊芋，又称为洋姜，属于向日葵属，是一种一年生双子叶植物，在全世界很多国家都有种植，如荷兰、比利时、印度、俄罗斯、美国等都有种植。菊芋是一种高产作物。与一般农作物的种植相比，菊芋有以下特点：抗旱、抗寒、抗盐碱并能抵御病虫害，因此菊芋适合在干旱地区种植，可用于沙漠治理；也可在盐碱地和滩涂地进行种植，不与粮争地；管理简单，不需要大量施肥和喷洒农药。因此菊芋可以作为一种很有潜力的经济作物，用于燃料乙醇和其他化学品的生产。

菊芋块茎中含糖量很大，一般鲜菊芋中含有 11-20% 的多糖，其中 70-90% 是菊粉，其含量会随着品种、收获季节和贮存时间的不同而变化。菊粉是一种线性的果聚糖并在其末端连接了一个果糖残基。菊粉很容易通过酸或菊粉酶水解为单糖，进而发酵得到乙醇或其他化学品。于现在普遍关注的木质纤维素生产乙醇相比，利用菊芋生产乙醇具有单位土地面积产量大、便于开发荒芜的盐碱地和滩涂、转化更加容易等特点，因此更容易实现工业化生产。除了乙醇生产的经济效益，在干旱地、盐碱地和滩涂的大面积种植菊芋还有很好的环境效益^[74]。

1.3.2 菊粉酶及产菊粉酶的微生物

（1）菊粉酶的分类

菊粉酶可以由细菌、真菌和植物生产，依据其分解菊粉的位点可以把菊粉酶分为内切型菊粉酶和外切型菊粉酶。酵母可以生产分解果糖、菊粉和左旋果聚糖的外切菊粉酶。外切型菊粉酶(EC 3.2.1.80)和内切型菊粉酶(EC 3.2.1.7)的不同主要体现在它们水解蔗糖

和菊粉末端的果糖残基的能力的不同。

值得注意的是,并不是能够水解 β -D-果聚糖的酶就可以称为菊粉酶。 β -D-果聚糖酶可以分为左旋果聚糖酶(水解左旋果聚糖)、菊粉酶(水解菊粉)和转化酶(分解蔗糖)。不同来源的酶只会对不同的果糖苷键有水解作用,如 *Bacillus subtilis* 可以分泌上面三种酶^[75]。从菊芋块茎分离出来的菊粉酶只能水解菊粉,而从 *Actinomyces viscosus* ATCC 19246 中得到的水解酶只能水解左旋果聚糖^[76]。从 *Aspergillus niger* 生产得到的果聚糖水解酶可以水解菊粉和蔗糖,但不能水解左旋果聚糖,而 *Arthrobacter ureafaciens* 生产得到的果聚糖水解酶可以水解菊粉和左旋果聚糖,却不能水解蔗糖^[77]。

(2) 产菊粉酶微生物

由于不同来源的菊粉酶在 pH 和热稳定性、固定化效果、诱导作用和代谢抑制等特性上有很大的不同,因此很难简单的从特性上对菊粉酶进行概括,所以这里从菊粉酶来源菌种上对其进行介绍。

a. 酵母

植物、细菌和真菌都可以产生菊粉酶,但是酵母尤其是 *Kluyveromyces* spp.是最佳的菊粉酶生产菌。酵母菊粉酶中以 *K. fragilis* 和 *K. marxianus* 的研究居多。从 *K. fragilis* 中部分纯化的菊粉酶最适条件为 45 °C, pH 5.0。将 *K. fragilis* 的菊粉酶纯化并用 2-氨基纤维素固定化,固定化后的菊粉酶在菊粉溶液和菊芋提取液中都表现出来了很好的稳定性^[78]。

K. marxianus CBS 6556 可以生产分布于周质空间的菊粉酶,也可以生产分布于上清培养液中的菊粉酶,这表明 *K. marxianus* CBS 6556 存在两种亚型的菊粉酶。*K. marxianus* CBS 6556 的菊粉酶可以把蔗糖、菊粉、棉籽糖和水苏糖做为底物进行水解,其 S/I 值为 15,表明该菊粉酶活与菊粉的长度是成反相关的,对胞内和胞外的菊粉酶进行纯化和表征后发现,胞内和胞外菊粉酶的亚基大小相似(64 kDa),但是它们的聚合形式不同,其中前者为四聚体,后者为二聚体。另一株高产菊粉酶的菌株 *K. marxianus* CDBB-L-278 可以在 2-脱氧葡萄糖(葡萄糖的类似物)存在的情况下以菊粉为单一碳源进行生长,在含有菊粉的培养基上其生产的菊粉酶活是对照菌株 *K. marxianus* NCYC-1429 的 3.3 倍,在含有甘油的培养基上其生产的菊粉酶活是对照菌株 *K. marxianus* NCYC-1429 的 3.6 倍^[79]。*K. marxianus* CDBB-L-278 和 *K. marxianus* NCYC-1429 可以在不含诱导物的甘油培养基上生产菊粉酶,说明这两个菌株可以组成型的表达菊粉酶。*K. marxianus* CDBB-L-278 生产的菊粉酶最适 pH 为 5.0,但其对菊粉和蔗糖的最适温度分别为 50 °C 和 70 °C。该菊粉酶在高温下有很好的稳定性,其在 50 °C 的半衰期为 180 分钟。这种菊粉酶对菊粉和果糖的 K_m 分别为 3.0 和 40.18。

Kluyveromyces sp. strain Y-85 可以同时产生内切菊粉酶和外切菊粉酶,其中两只内切菊粉酶 E1 和 E2 的分子量分别为 42 和 64 kDa,外切菊粉酶 Eexo 的分子量为 57 kDa, E1、E2 和 Eexo 的最适 pH 分别为 4.6、4.5 和 4.6,最适温度分别为 52、52 和 55 °C,三种酶的酶活都会受到 Ag^+ 、 Hg^{2+} 和 *p*-对氯高汞苯甲酸的强烈抑制。用大孔离子聚苯乙

烯将部分纯化的 *Kluyveromyces* sp. strain Y-85 胞内菊粉酶固定化, 发现固定化菊粉酶可以将 75% 的菊粉水解, 水解液中 85% 是 D-果糖, 15% 为 D-葡萄糖^[80]。分别以菊粉、蔗糖、果糖和葡萄糖为碳源培养培养 *K. marxianus* var. *bulgaricus*, 在其培养液上清中也能检测到菊粉酶活, 其最适 pH 为 4.75, 最适温度为 55 °C, 分子量为 57 kDa, 该酶会受到铁离子的强烈抑制, 会受到钡离子、锌离子和钠离子的部分抑制。虽然该酶可以在 50 °C 时可以保持 3 个小时的稳定, 但是在 55 和 60 °C 时会很快失去全部酶活^[81]。

用大孔明胶固定化 *K. marxianus* 细胞后, 酶在低于 pH 4.0 和高于 pH 7.0 时的稳定性提高, 最适酶活温度也有一定程度的提高^[82]。以分子筛为载体固定化菊粉酶使得菊粉酶最适 pH 从 6.0 下降到了 5.0, 最适酶活温度也得提高^[83]。在批次催化过程中, 固定化的细胞可以 3 小时内水解菊芋提取液中 93% 的菊粉, 并且该固定化菊粉酶重复使用 10 次的催化效果几乎恒定, 而以藻酸钡为载体固定化 *K. marxianus* 细胞, 重复使用 5 次后只残余 85% 的菊粉酶活^[84]。除了菊粉, *K. marxianus* 的菊粉酶生产还会受到葡萄糖、果糖和蔗糖的诱导。

由于转录或转录后修饰作用不同或者菊粉酶基因的序列不同, 不同的酵母菌株生产的菊粉酶会有不同的特性。另外, 酵母菊粉酶只能在比较温和的温度下才能保持稳定, 因此限制了其大规模工业化应用。

b. 真菌

很多种真菌可以生产菊粉酶, 如 *Panaeolus papillonaceus*、*Chrysosporium pannorum*、*C. cladosporioides*、*Scytalidium acidophilum*、*Fusarium oxysporum*、*Aspergillus* spp 等, 其中 *Aspergillus* spp 生产菊粉酶的能力最好。

A. ficuum 可以同时生产外切菊粉酶和内切菊粉酶, 这两种菊粉酶均是糖蛋白, 糖的含量占 22% - 41%, 外切菊粉酶的分子量为 74 kDa, 其 S/I 值从 2.75-6.38, 内切菊粉酶的分子量为 64 kDa, 其 S/I 值从 0.34-1.16^[85]。但是不同的内切菊粉酶会有不同的糖基化程度, 因而分子量会略有差异, 如 Novezyme 230 内切菊粉酶有两种分子量 64 kDa 和 66 kDa^[86]。用大孔玻璃珠固定化 *A. ficuum* 的菊粉酶会使其最适温度从 60 °C 变为 70 °C, 其他特性则没有改变, 而用壳聚糖固定的 *A. ficuum* 的菊粉酶则可以在 10 小时之内将菊芋水解液水解 90% 并且该固定化酶连续使用 2 周只有 14.8% 的酶活损失^[87]。

在 *Aspergillus* spp. 中, *A. niger* 是目前为止研究最多的。一株从 *compositae rhizosphere* 中分离出的 *A. niger* 菌株可以同时生产内切和外切菊粉酶, 这两种酶的最适 pH 和最适温度基本一致, 最适 pH = 4.3 - 4.4, 最适温度 55-56 °C, *A. niger* 中的菊粉酶有 I、II 和 III 共 3 种亚基, 等电点分别为 4.5、4.9 和 5.2, 三种亚基的最适 pH 为 5.0, 最适温度从 62.5 - 65 °C, 有一点值得注意, 粗酶 S/I 为 0.85, 而 I、II 和 III 三种亚基的 S/I 分别为 1.8、2.4 和 2.4, 分离得到的一个完整菊粉酶分子量为 300 kDa, 是由 4 个相同的亚基组成的, 其中亚基的分子量为 85 kDa^[88]。然而, 从另一株 *A. niger* 分离的菊粉酶只有 81 kDa, 该酶为外切菊粉酶, 同时也存在转化酶酶活, 该酶会受到 Fe³⁺ 的激活但会受到 Mn²⁺ 和 Mg²⁺ 抑制^[89]。

然而, 从第三种 *A. niger* 菌株中分离出来的菊粉酶同前两种又不一样, 该菊粉酶包括 5 种亚基, 分子量大小分别为 102.6、97.9、62.5、36.5 和 28 kDa, 等电点分别为 4.15、4.24、4.48、4.15 和 5.4, 这些亚基的最适温度为 55 – 60 °C, 最适 pH 为 4.0 - 5.0^[90]。

A. niger 除了外切菊粉酶, 也可以生产内切菊粉酶。Nakamura 等从 *A. niger* 817 的胞外组分里分离出两个内切酶单体 P-1A 和 P-1B, 其分子量分别为 68 和 70 kDa, 这同前面提到的一些内切酶的大小为 53 kDa 是不同的, 这个酶只能水解菊粉而不能水解蔗糖、棉籽糖和左旋果聚糖, 其 S/I 值为 1.14, P-1A 和 P-1B 的最适 pH 均为 5.0, 但最适温度却是不同的, 前者的最适温度为 40 °C, 后者的最适温度为 62.5-65 °C^[91]。将 *A. niger* 817、*A. niger* ATCC 20611 和 *Aspergillus japonicus* TIT-KJ1 的菊粉酶进行固定发现固定化后的最适温度和 pH 均发生了变化, 固定化酶在 30 °C 时在 pH 4.5 -6.5 范围内是稳定的, 而在 50 °C 时在 pH 5.0 – 6.0 范围内稳定^[92]。众多证据表明, 相对于 *A. niger* 内切菊粉酶, *A. niger* 外切菊粉酶分子量多样性更高 (28 - 300 kDa), 相应的最适温度更高, 因此外切菊粉酶更适合于工业化应用。另外, 一定外界压力条件下, *A. niger* 内的菊粉酶的生产能力会提高很多, 因此可以用来作为一个探索提高菊粉酶生产的方法^[93]。

其他的 *Aspergillus* spp. 也可以生产菊粉酶, 包括 *A. awamori* var. 2250、*A. candidus*、*A. oryzae* 和 *A. versicolor* (MTCC 280)^[94, 95]。这些真菌生产的菊粉酶均是外切菊粉酶, 最适 pH 范围为 4.5 - 5.5, 最适温度范围为 45 – 55 °C。*A. versicolor* (MTCC 280) 生产的菊粉酶分子量为 230 ± 20 kDa, *A. oryzae* 生产的菊粉酶分子量为 38 kDa, *A. candidus* 和 *A. awamori* 生产的菊粉酶的分子量分别为 54.4 ± 4 kDa 和 69 ± 1 kDa, 一般的商业化菊粉酶都是由 *A. niger* 生产的。*A. fumigatus* 所产菊粉酶在 60 °C 有最大酶活但在 34 °C 时最有利于菊粉酶的生产^[96]。通过柱层析分离得到了两种菊粉酶, 分别是 I 型和 II 型, I 型经 SDS-PAGE 后会出现 66、62.7 和 59.4 kDa 三条带, 而 II 型 SDS-PAGE 分析后只有一条带 62 kDa, 两者的 pI 分别为 8.8 和 4.5^[97]。

从上面的研究中我们可以看出 *Aspergillus* spp. 生产的菊粉酶会因菌株的不同而有不同的最适温度和温度稳定性。菊粉酶有的温度稳定性产生的机制可能是其分子内部有大量的离子键和氢键相互作用进而形成了一个亲水的核心, 也可能是酶蛋白分子中又大量的螺旋和片层结构。另外, 对比 *Aspergillus* 不同菌株的氨基酸序列也许产酶这些菊粉酶之间温度稳定性的不同, 进而可以人工设计有更高温度稳定性的菊粉酶。

c. 细菌

虽然主要的菊粉酶生产微生物是真菌和酵母, 但是也有不少细菌也可以生产菊粉酶, 如 *Arthrobacter ureafaciens*、*Streptococcus salivarius*、*Bacillus polymyxa*、*Clostridium acetobutylicum* 和 *Xanthomonas* sp. 等。Tanaka 等分离出的 *Arthrobacter ureafaciens* 可以在 70 °C 下稳定生产菊粉酶, 但这种菊粉酶只有在 45 – 55 °C 下有高酶活^[98]。*B. stearothermophilus* KP1289 是一株从土壤中分离出来的微生物, 可以在 41 – 69 °C 条件下稳定生长, 该菌株可以在菊粉的诱导下产生胞外菊粉酶, 菊粉酶的分子量为 54 kDa, pI 为 5.0^[99]。*Thermotoga maritima* 也含有菊粉酶基因, 该菌生产的菊粉酶是目前最耐热

的菊粉酶，这个菊粉酶可以在 80 °C 下 5 小时内保持 85% 的酶活，该酶的最大酶活是在 90 -95 °C 下测得的，而该菌的最适生长温度为 90 °C^[100]。

相对于酵母和真菌，人们对产菊粉酶细菌的研究较少。现在研究者主要产菊粉细菌的耐热特性并尝试着分离出高产菊粉酶的细菌，但是已发现的产菊粉酶细菌的菊粉酶产量很低，因此尚没有将细菌菊粉酶应用于发酵的报道。

1.3.3 以菊芋为原料生产燃料乙醇的研究现状

国际上很早就开始利用菊芋发酵生产乙醇，尤其是进入 20 世纪 80 年代以来，随着生物能源发展的迫切，科学家们进行了大量的研究工作。现在，发酵法生产菊芋乙醇的研究主要集中在筛选优良的发菌菌株和改进发酵工艺两个方面。从菊芋发酵生产乙醇的工艺角度可以把主要的研究进展分为三个方面：

(1) 分步糖化与发酵，即首先用酸法或酶解的方法将菊芋中的乙醇水解，然后用细菌或者酵母等乙醇发酵菌种将水解得到的果糖和葡萄糖发酵为乙醇：Sachs 等（1981）利用 *Saccharomyces cerevisiae* 发酵酸水解后的菊芋生产乙醇，耗时 132 小时得到乙醇浓度为 10.87%^[101]。Toran-diaz 等（1985）首先将菊芋酸解或酶解，然后用 *Zymomonas mobilis* 发酵两种水解液生产乙醇，最终生产的乙醇浓度分别为 41.2 g/L 和 38.0 g/L，乙醇转化率分别为 0.45 和 0.44^[102]。Favela 等（1986）用具有絮凝特性的 *Zymomonas mobilis* 发酵由酶法得到的菊芋水解液生产了高达 100 g/L 的乙醇，其乙醇得率为 92%^[103]。Allaist 等（1987）仍用 *Z. mobilis* 对酶解水解液进行连续乙醇发酵，生产乙醇浓度为 42.0 g/L，相应生产效率达到 67.2 g/(L·h)^[104]。Zhang 等（2010）利用酵母 *Saccharomyces sp* 发酵酶解后的菊粉，耗时 120 小时生产得到了 14.9% 的乙醇，乙醇转化率为 0.393 g/g 菊粉^[105]。

(2) 同步糖化与发酵或混菌发酵，即将菊粉酶或者产菊粉酶的微生物与乙醇生产微生物接入同一个发酵罐，实现糖化与发酵的同步进行。Toyohiko 实验室分别于 1993 年和 1996 年报道了利用 *Aspergillus niger* 和 *Saccharomyces cerevisiae* 混菌发酵菊粉或菊芋粉发酵生产乙醇的情况^[106, 107]。在以菊粉为底物进行发酵时，首先在 150 mL 的培养基中对 *Aspergillus niger* 培养 5 天，接入 45.0 g 菊粉，随后接入耐乙醇酿酒酵母，培养 15 小时后，再接入 20 g 菊粉至发酵结束，得到乙醇浓度达 20%，糖转化率达 83%。在以菊芋粉为底物进行发酵时，首先在 150 mL 的培养基中对 *Aspergillus niger* 培养 5 天，接入 45.0 g 菊芋粉，然后接入酿酒酵母，培养 15 小时后接入 30 g 菊芋粉，发酵进行 24 小时之后再接入 20 g 菊芋粉至发酵结束，得到乙醇浓度达 20.1%，糖转化率达 80%。Katarzyna 等人（2004）使用具有乙醇生产能力的菌株 *Z. mobilis* 或 *S. cerevisiae* 与能够生产菊粉酶的菌株 *Kluyveromyces fragilis* 混合共发酵，结果表明混菌发酵比单菌发酵效果要好，分别产生了高达 9.4% 和 9.9% 的乙醇^[108]。Chang 等人使用菊粉酶和自絮凝酵母 *Saccharomyces cerevisiae flo* 进行同步糖化与发酵，得到 90 g/L 的乙醇，明显优于分步糖化与发酵的结果^[109]。Ge 等人利用 *S. cerevisiae* Z-06 和 *A. niger* SL-09 对菊芋粉进行共发酵，60 小时内实现了 19% 乙醇的生产^[110]。

(3)整合生物加工,即在一个菌体细胞内同时实现菊粉酶的生产,菊粉的水解和乙醇发酵,是目前最有潜力的生物乙醇加工工艺。据报道 *Kluyveromyces* 属和 *Saccharomyces* 属的酵母均可以直接利用菊粉或菊芋生产乙醇^[111, 112]。

Kluyveromyces 属酵母研究最多,这里仅介绍几株发酵效果良好的报道进行介绍。Rosa 等人(1987)利用 *Kluyveromyces marxianus* 对菊芋提取液在 32 °C 下发酵,得到乙醇浓度为 11.5%,仅有 8 g/L 的果糖残留^[113]。Yu 等(2008)使用 *Kluyveromyces cicerisporus* 发酵菊芋全液生产乙醇,30 °C 条件下分批发酵 144 小时产生 12.3%乙醇,乙醇的得率为 86.9%^[114]。Yuan 等在 2008 和 2011 年分别报道了其利用 *Kluyveromyces marxianus* 发酵菊芋生产乙醇的进展^[115, 116]。2008 年,利用 *Kluyveromyces marxianus* ATCC8554 对海水灌溉的盐碱地生产的菊芋发酵,在 35 °C 下得到最高乙醇浓度 88.0 g/L。2011 年,利用 *Kluyveromyces marxianus* Y179 对菊芋全液进行发酵,通过添加果胶酶的办法降低发酵体系的粘度,使生产乙醇的浓度提高到 94.2 g/L。

曾有部分学者认为酿酒酵母没有生产菊粉酶的能力,因此,不适合对菊芋进行整合生物加工^[117],但是最近报道酿酒酵母是可以产菊粉酶对菊芋进行整合生物加工的。Lim 等人(2011)使用 *Saccharomyces cerevisiae* KCCM50549 发酵菊芋生产乙醇,不需要进行菊粉预水解,但是其发酵能力不是很好,只产生了 36.2 g/L 的乙醇,相应乙醇得率为 70%^[118]。Barthomeuf 等(1991)使用 *Saccharomyces cerevisiae* Y-481 分别对菊芋提取液和菊芋全液进行发酵,以菊芋提取液发酵时得到的最高乙醇浓度为 131 g/L,而以菊芋全粉发酵时可以生产 91 g/L 的乙醇^[119]。在国内,杨利博等(2010)筛选出一株具有菊粉酶活的安琪酿酒酵母,但其菊粉酶活性较低,然后对该安琪酿酒酵母通过紫外诱变和微波诱变结合进行复合诱变,筛选出一株高菊粉酶活的突变安琪酿酒酵母 Y05,利用突变体 Y05 直接发酵菊芋产生乙醇浓度达 71.78 g/L^[120]。

1.4 选题依据及研究思路

化石燃料的大量使用使当今世界面临着能源危机、环境污染等各种全球性问题,为了实现发展的可持续,必须寻求新的能源提供方式。自然界中存在着大量生物质,里面蕴含着巨大的能量,可以利用一些加工手段实现能源的生产,而生物法生产生物质能源具有操作条件温和与环境友好的特点,因此是生物质能源开发利用的首选。考虑到粮食安全,一些非粮生物质的能源化加工成为人们研究的热点,其中木质纤维素的加工研究最多。但是,由于木质纤维素的预处理能耗高、纤维素酶水解和木糖发酵效率低下等问题难以短时间解决,因此木质纤维素生产生物燃料的成本仍然居高不下,离商业化生产还有一段距离。菊芋是一种可以在边缘地上大量生产的非粮作物,其干物质中大部分由菊粉组成,是一种良好的发酵碳源,因此特别适合生物乙醇的生产。

近几年来,很多科学家已经关注菊芋乙醇的生产。很多乙醇生产微生物已经用到了菊芋乙醇的生产,如 *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Kluyveromyces marxianus* 等,也有很多发酵工艺的到了开发,如产菊粉酶真菌和产乙醇酵母的混合发

醇等。但是，与传统的利用淀粉质发酵生产乙醇相比，从菊芋中生产乙醇的成本仍然较高，成本较高的主要原因是菊粉酶的成本较高和发酵得到的乙醇浓度偏低。虽然有些研究者已经试着利用产菊粉酶的酵母进行发酵以免除菊粉酶的添加，如 *K. marxianus*，但是仍因为酵母耐受乙醇能力差或难以实现高固含量发酵液的混合等限制而不能有效进行燃料乙醇的生产。Yuan 等通过添加果胶酶的办法来降低发酵液的粘度提高乙醇生产的浓度，但需要认真权衡乙醇浓度提高和添加果胶酶成本提高之间的利弊^[116]，而 Zhang 等利用螺带式生物反应器实现了高固体含量玉米秸秆的良好混合，提高了乙醇的发酵性能^[121]。

本研究以降低菊粉酶添加和提高生产乙醇的浓度为出发点，利用螺带式生物反应器对高固含量发酵体系进行混合，利用耐受高乙醇浓度且具有菊粉水解酶生产能力的酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* DQ1 发酵菊芋生产乙醇，期望实现无菊粉酶添加的条件下实现高浓度乙醇的生产。

研究的主要内容：

(1) 确定 *Saccharomyces cerevisiae* DQ1 中菊粉水解酶的生产，并对该酶的亚细胞分布和分子量大小进行表征；

(2) 对最适酶活条件和最适产酶条件进行优化；

(3) 探索利用螺带式搅拌桨同步糖化发酵生产乙醇的条件；

(4) 探索少量纤维素酶的添加对 35% 固体含量菊芋同步糖化发酵的影响。

第 2 章 材料与方法

2.1 菌株、试剂与仪器设备

2.1.1 菌种

本论文所用菊芋乙醇发酵菌种为本实验室自行紫外诱变筛选的 *Saccharomyces cerevisiae* DQ1。 *Saccharomyces cerevisiae* DQ1 已保藏在中国普通微生物菌种保藏中心 (CGMCC)，菌种保藏号为 CGMCC 2528。

本论文所用的菌种 *Zymomonas mobilis* ZM4 购自美国菌种保藏中心 (ATCC, Washington DC, USA)，菌种保藏号为 ATCC 31821。

2.1.2 实验试剂

见表 2.1。

2.1.3 培养基，主要溶液的配制

(1) YPD 培养基

酵母提取物 10.0 g/L；一水合葡萄糖 20.0 g/L；蛋白胨 20.0 g/L。115 °C 下灭菌 20 min。

(2) 菊粉水解酶生产培养基

菊粉 20.0 g/L；酵母提取物 1.0 g/L；(NH₄)₂SO₄ 1.0 g/L；KH₂PO₄ 2.0 g/L；MgSO₄·7H₂O 1.0 g/L。115 °C 下灭菌 20 min。

(3) 菊芋发酵培养基

菊芋块茎购买自青海鑫农科技有限公司，通过对菊芋清洗除泥，切片风干，60 °C 过夜烘干得到菊芋片。菊芋片经粉碎机粉碎后过筛得到菊芋粉，以菊芋粉作为发酵发酵原料。发酵时，向灭过菌的去离子水中加入若干菊芋粉，无机盐 (NH₄)₂SO₄ 1.0 g/L，KH₂PO₄ 2.0 g/L，MgSO₄·7H₂O 1.0 g/L，酵母提取物 1.0 g/L 构成菊芋发酵培养基。

(4) 蛋白电泳液：

2 mol/L Tris-HCl 的贮存液：称取 121.0 g 的 Tris base，加入 350.0 mL 超纯水溶解，用玻璃棒搅拌 1 min，缓慢地加入 11.8 mol/L 浓盐酸 20.0 mL，继续搅拌至溶液澄清，补加超纯水至 500.0 mL，贮存在干净的无色玻璃试剂瓶中，保存于 4 °C 冰箱。

4 × 分离胶缓冲液：依次量取 2.0 mol/L Tris-HCl 375.0 mL，100.0 g/L SDS 溶液 20 mL 加入 500 mL 的量筒中，最后补齐超纯水至 500 mL。储存于无色玻璃试剂瓶中，保存于 4 °C 冰箱最多 12 个月。

4 × 浓缩胶缓冲液：超纯水 21.0 mL，1 mol/L Tris-HCl 50.0 mL，100.0 g/L SDS 溶液 4.0 mL。

100.0 g/L 的过硫酸铵溶液 (ammonium persulfate, AP)：于 20.0 mL 超纯水中加入 2.0 g 过硫酸铵，存放于无色塑料试剂瓶中。4 °C 冰箱中保存最多 10 个月。

TEMED：购买成品液后分装在 2 或 5 mL 的离心管中使用。

表 2.1 试剂

Table 2.1 Reagents

试剂名称	规格	生产厂家
98%浓硫酸	GR	上海菲达工贸有限公司
浓盐酸	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
十二烷基磺酸钠	AR	美国Amresco公司
苯酚	AR	上海润捷化学试剂有限公司
葡萄糖	AR	中国惠兴生化试剂有限公司
D-葡萄糖	AR	中国惠兴生化试剂有限公司
D-果糖	HP	生工生物
牛血清白蛋白	AR	Sigma公司
菊粉	AR	广州海圣生物科技有限公司
Tris-base	HP	北京普博欣生物科技有限公司
Tris-HCl	HP	北京普博欣生物科技有限公司
过硫酸铵	AR	国药集团化学试剂有限公司
琼脂	AR	中国惠兴生化试剂有限公司
酒石酸钾钠	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
乙酸	AR	上海润捷化学试剂有限公司生产
甲醇	AR	上海振兴化工一厂
TEMED	UP	MARESCO公司
三氯甲烷	AR	上海化学试剂有限公司
甲酸	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
EDTANa ₂	BG	SGENTIFIC RESEARCH SPECIAL公司
二硫苏糖醇	AR	北京普博欣生物科技有限公司
巯基乙醇	AR	北京普博欣生物科技有限公司
3,5-二硝基水杨酸	AR	国药集团化学试剂有限公司
亚硫酸钠	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
纤维素酶	AR	Genencor Internal, Rochester, NY, USA
硫酸铵	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
磷酸二氢钾	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
硫酸镁	AR	上海美兴化工有限公司
琼脂粉	AR	中国惠心生化试剂有限公司
酵母粉	AR	OXOIDLID BASINGSTOKE HAMPSHIRE ENGLAND
蛋白胨	AR	国药集团化学试剂有限公司

12% 分离胶的配制: 1.67 mL 丙烯酰胺溶液; 2.50 mL 分离胶缓冲液; 3.34 mL 超纯水; 30 μ L TEMED; 50 μ L AP。

5% 浓缩胶的配制: 0.67 mL 丙烯酰胺溶液; 1.25 mL 浓缩胶缓冲液; 2.3 mL 超纯水; 5 μ L TEMED; 30 μ L AP。

(5) DNS 反应液的配制: 182.0 g 酒石酸钾钠溶于 500.0 mL 去离子水, 用超声加速溶解 2 min, 再加入 20.8 g NaOH (于烧杯中称量), 5.0 g 亚硫酸钠, 6.0 g DNS (超声溶解, 0.5-1 h, 同时搅拌), 加入 5.0 g 苯酚 (结晶酚), 冷却后加蒸馏水定容至 1000mL, 转于棕色瓶中储存, 72 h 后方可使用。

2.1.4 实验仪器

本论文中所用的主要实验仪器见表2.2。

2.2 实验方法

2.2.1 菌种保藏

于YPD培养基中培养种子 20 h 后, 与60% (v/v)甘油等体积混合, 分装入2 mL冻存管中, 放入液氮中速冻1分钟, 然后-80 °C保藏。

2.2.2 种子活化

于-80 °C 冰箱中取一管冻存的菌种, 接种到 200 mL 灭过菌的 YPD 培养基中, 培养 20h 使种子生长到 OD₆₀₀ 约为 10 时即可作为活化的种子转接到发酵培养基中。

2.2.3 菊芋块茎的前处理

- a. 清洗: 把菊芋块茎放入塑料盆中, 加入澄清自来水, 将菊芋块茎表面的泥土清洗干净, 并于通风处自然沥干表面水分。
- b. 切片: 用刨片器将洗净的菊芋块茎刨成 0.1-0.2 cm 厚的薄片。
- c. 干燥: 将切好的菊芋片置于通风良好的空间中自然风干 (不可暴晒或高温烘干以免块茎中的糖类渗出损失), 至菊芋片表面没有明显水分时, 把菊芋片装在搪瓷盘中, 置于烘箱中 60 °C 烘 24 个小时左右, 装入密封良好的大塑料袋中, 用吸尘器抽真空密封后, 放置在微型工厂原料仓保存。
- e. 粉碎: 在干燥的空间里用飞利浦粉碎机将烘干后的菊芋片进行粉碎, 过筛后取大于 60 目/平方英寸的颗粒为发酵备用原料。
- f. 含水率测定: 从待测原料中取 5 g 样品 2-3 个, 放置在干净干燥的平板中, 在 105 °C 烘干过夜 (12 小时), 称量失水质量, 计算菊芋粉末原料含水率。

2.2.4 *S. cerevisiae* DQ1 中菊粉水解酶的分布

将*S. cerevisiae* DQ1在菊粉水解酶生产培养基中于30 °C, 180 rpm条件下培养

表2.2 实验仪器

Table 2.2 Experiment equipments

仪器名称	规格	生产厂家
电子天平	BS423S	北京赛多利斯
立式压力蒸气灭菌器	YXQ-LS-75S II	上海博迅实业有限公司医疗设备厂
气浴恒温振荡器	SHZ-82	金坛亿通电子
超声波脱气机	KWT-100A	科伟达超声波设备有限公司
落地恒温振荡摇床	HZ-9311K	太仓华利达
分光光度计	DU-800	Beckman公司
高速冷冻离心机	J-26	Beckman公司
台式低速冷冻离心机	5415R	Eppendorf公司
电热恒温鼓风干燥箱	DHG-9203A	上海一恒科学仪器有限公司
恒温水槽	ZC	宁波天恒有限公司
pH计	PHS-3C	上海精密科学仪器有限公司
刨片器	MS00749	广东省市丰铭塑料制品有限公司
制冰机	XB100	GRANT公司
生化培养箱	LRH-150	上海一恒科学仪器
超低温冰箱	86C	Thermo公司
飞利浦搅拌机	HR2094	珠海飞利浦家庭电器有限公司
标准筛	60目	上海宝蓝实验仪器制造有限公司
超净工作台	SW-CJ-1FD	苏州苏洁净化设备有限公司
全自动紫外与可见分析装置	FR-200A	复日科技
电泳槽	Mini-PROTEAN Tetra	Bio-Rad公司
冰箱	BCD-215KA	海尔公司
冰箱	SC-329GA	海尔公司
旋涡混合仪	XW-80A	江苏海门市其林贝尔公司
洁净工作台	100级SW-CJ-IBU	上海博迅公司
高效液相色谱	LC-20AD	岛津
电脑自动部份收集器	SBS-160F	上海精科实业有限公司
超纯水纯化系统	Milli-Q	Millipore公司
5L反应器（糖化罐）	5L	上海保兴生物设备工程有限公司
四联发酵罐	BIOTECH-3BG	上海保兴生物设备工程有限公司
冷冻干燥机	FD-1A-50	上海比朗仪器有限公司
激光粒度仪	Mastersizer 2000	英国马尔文仪器有限公司

24 小时。在 4 °C 下 10,000 rpm × 10 minutes 离心得到上清液和细胞沉淀。将酵母细胞重悬于提取缓冲溶液(50 mM 磷酸缓冲液(pH 7.0), 10 mM 二硫苏糖醇, 1 mM Na₂EDTA) 得到全细胞悬浮液, 其中一半的悬浮液用氯仿和 SDS 破坏细胞膜 (每 500 μ L 细胞悬浮液中加入 40 μ L 的氯仿和 20 μ L 的 10% SDS, 然后于涡旋振荡器上震荡 10 秒钟) 得到破膜悬浮液。分别按照菊粉水解酶酶活标准测定方法测定上清液, 全细胞悬浮液和破膜悬浮液中的酶活, 为防止酶活测定过程中细胞破碎, 测定温度设置为 40 °C。上清液中测到的酶活代表上清酶活 (S 组分), 全细胞悬浮液中测得的酶活代表周质空间酶活 (P 组分), 破膜悬浮液中测到的酶活代表胞内和周质空间的总酶活 (C + P 组分)。分泌率的定义为胞外酶活 (S + P) 与总酶活 (S + P + C) 的比值。

2.2.5 *S. cerevisiae* DQ1 中菊粉水解酶分子量范围的确定

首先将得到的粗菊粉水解酶经过 Sephadex G-100 凝胶柱层析进行分离, 将分离得到的菊粉水解酶进行 SDS 蛋白凝胶电泳得到其分子量。

a. Sephadex G-100 凝胶的溶胀处理

在 100 ml 烧杯中称取 10 g Sephadex G-100, 然后加入 100 mL 超纯水, 浸泡溶胀 24 小时, 倒掉上层的水, 重新加入超纯水洗涤。用搅棒轻轻搅拌凝胶悬浊液, 然后放置几分钟, 将没有沉淀凝胶随上层水倾倒掉。反复 3 - 5 次, 直至上层水中无漂浮颗粒为止。

b. 装柱

层析柱用超纯水洗净, 上、下端接上接头并连接小乳胶管, 然后将层析柱装上螺旋夹。随后检验层析柱是否垂直。检验过程中用下端绑有重物的细绳挂在铁架台的不同位置, 从多个角度验证柱子的垂直程度。打开层析柱上口, 从柱底部向柱内注入超纯水, 保证柱内不留气泡。最终柱内留存有 2 cm 的超纯水, 用夹子夹住层析柱下端的小乳胶管。轻轻搅动葡聚糖凝胶溶液 (一定不要搅动太快, 以防止空气再次进入), 然后立即沿玻璃棒贴层析管壁倒入, 待层析柱下端积累约 2 cm 的凝胶床后, 打开层析柱的下端出水口让水缓慢流出。随着层析柱内水的逐渐流出, 在层析柱上端口也不断加入葡聚糖凝胶悬浊液, 保证葡聚糖凝胶的床面上可以有凝胶连续积累 (若葡聚糖凝胶床上界面上不再有葡聚糖凝胶颗粒下降, 最好用玻璃棒轻轻地将葡聚糖凝胶床重新搅起约 3-6 厘米高, 然后重新加入葡聚糖凝胶悬浊液, 否则就会形成分层, 影响柱层析的效果)。若柱内出现气泡或分层, 必须重新进行装柱。

c. 平衡

层析柱装好后, 将葡聚糖凝胶床静止 15-20 分钟, 然后将装有洗脱液的瓶子出口和层析柱顶端进行连接, 让至少 5 倍体积的缓冲液通过层析柱以平衡葡聚糖凝胶。在平衡过程中务必保持操作压力稳定。缓冲溶液的流速为 1.0 mL/min。可以通过检验柱子出口处流出液的 pH 同原始缓冲溶液的 pH 是否完全一样来判定是否平衡完毕。

d. 样品洗脱

首先打开层析柱上端的接头, 检查葡聚糖凝胶上界面是否平整, 如果葡聚糖凝胶上

界面不平整,可用玻璃棒将凝胶上界面轻轻搅拌后,再让葡聚糖凝胶自然沉降,形成平整凝胶上界面。小心吸去胶面上大部分的水,然后让剩余的水自然下降,直到刚刚露出凝胶床上界面,用夹子夹住柱子下部的橡胶管不再让水流出。将样品放入高速离心机,10,000 rpm,离心 5 min。通过玻璃棒引流将离心过的样品沿管壁慢慢加入到凝胶上界面,一定不要将凝胶面破坏。将 1-1.5 mL 样品全部加入以后,用同样的缓冲溶液小心地冲洗凝胶柱的内壁,以保证粘附在壁上的样品全部吸入凝胶床。当上样的液体慢慢渗入凝胶床,使上样液体的下凹面与凝胶上界面重合时,封闭层析柱上端,开始调节洗脱液的流速使其保持 1 mL/min。然后用部分收集器来收集洗脱出的组分,2 分钟/管(约 2ml/管),至检测器不再检测到吸收峰为止。

e. 按照标准菊粉水解酶酶活测定方法测定各洗脱峰的酶活。

f. 对检测到菊粉水解酶酶活的洗脱组分进行 SDS 蛋白电泳,通过与蛋白分子量标准做对比,确定菊粉水解酶蛋白的分子量大小。

2.2.6 不同 pH 或不同温度对粗菊粉水解酶酶活和稳定性的影响

(1) 粗酶液的获取:在 30 °C, 180 rpm 的条件下,于气浴摇床内培养酵母 24 小时,然后取 100mL 菌液,10000 rpm × 10 min 离心收集菌体;将收集到的菌体重悬于 100 mL 0.1 M (pH 5.0)的柠檬酸缓冲液中洗涤,10000 rpm × 10 min 离心收集菌体,重复洗涤两次;重复两次 10000 rpm × 10 min 离心菌体以减少残留在菌体中的液体;将菌体转移到研钵中,加入液氮后反复研磨,直至菌体变为白色粉末状;加入 10 mL 0.1 M (pH 5.0)的柠檬酸缓冲液,在 4 °C 下 10000 rpm × 10 min 离心,取上清液为酵母菌粗酶液。

(2) 不同 pH 对菊粉水解酶酶活和稳定性的影响:酶活测定是按照标准酶活测定方法(参见 2.3.4)测定的,测定条件:不同 pH 梯度(4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5), 50 °C, 反应时间为 30 分钟。菊粉水解酶的 pH 稳定性定义:将粗菊粉水解酶柠檬酸缓冲溶液调节到不同 pH 值(4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5),置于 20 °C 环境下 24 小时,然后按照标准酶活测定方法(参见 2.3.4)测定酶活,测得的酶活即为残余酶活。

(3) 不同温度对菊粉水解酶酶活和稳定性的影响:酶活测定是按照标准酶活测定方法(参见 2.3.4)测定的,测定条件:温度梯度为 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70 °C, pH 5.0, 反应时间 30 分钟。菊粉水解酶的温度稳定性定义:将粗菊粉水解酶溶于 pH 5.0 的柠檬酸缓冲溶液置于不同温度梯度(30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70 °C)下 1 小时,然后按照标准酶活测定方法(参见 2.3.4)测定酶活,测得的酶活即为残余酶活。

2.2.7 各种因素对菊粉水解酶生产的影响

需要考察的影响菊粉水解酶的因素有 pH、温度、碳源和氮源。每种因素的影响分别考察,在考察每一种因素的影响时固定其他因素,设置待考察因素的梯度或种类,对酿酒酵母进行培养,培养时间为 20 小时。然后收获细胞,测定不同因素下的 OD₆₀₀ 和菊粉水解酶的比活。测定菊粉水解酶比活时,需要测定酶液的酶活和蛋白浓度,酶活测定是按照标准酶活测定方法进行测定,蛋白浓度是用 Bradford 法测定的。

2.2.8 同步产酶、糖化与发酵

- (1) 依据发酵菌种接种时间点和酿酒酵母菌种的活化周期，提前对酵母进行活化培养。
- (2) 根据菊芋粉末的含水量计算出本次实验所需的初始加水量及酿酒酵母种子加入量。
- (3) 向锥形瓶中加入大于所需水量的水后，密封好，放入高压蒸汽灭菌锅中进行常规离位灭菌；同时将酸碱瓶和加料器也进行灭菌。
- (4) 发酵罐灭菌完成后，室温冷却。然后安装好各种管线，开启机械搅拌桨，调整至所需转速，用称重法加入所需水量和活化好的酵母种子，同时开始加热。控制加料速度，使物料在罐体内不产生结块，待罐体内物料混合均匀后安装好已紫外杀菌的 pH 电极。将温度调至 30 °C 进行同步产酶、糖化与发酵。
- (5) 在发酵过程中每隔 8 小时进行取样，对样品进行处理后，采用 HPLC (Bio-rad HPX-87H 色谱柱) 检测上清液中糖含量和乙醇含量。
- (6) 同步产酶、糖化与发酵 72 h 后终止，将发酵醪收集后进行精馏处理。

2.3 分析方法

2.3.1 菊芋块茎中总糖含量的测定

精确称量 5.0 g 的干燥菊芋粉末，用将 pH 1.0 的硫酸溶液将称取的干燥菊芋粉末完全转移入 1 L 的容量瓶中，用 pH 1.0 的硫酸溶液定容。然后将精确配制好的溶液转移入摇瓶中，在 80 °C，150 rpm 的水浴摇床中反应 3 小时，取样，10,000 rpm 离心 5 分钟，用 HPLC 测定上清液的葡萄糖和果糖的浓度，用葡萄糖和果糖的浓度总和除以菊芋粉末的浓度 (5 g/L) 即为干燥菊芋中总糖的含量。

2.3.2 变性蛋白质电泳(SDS-PAGE)

根据所测蛋白质含量计算出样品溶液的上样量，再加入 1/2 体积 SDS-PAGE 样品缓冲液充分混匀置沸水中加热 3 - 5 min，冷却后上样于浓缩胶上梳状孔中，浓缩胶和分离胶分别以 70 V, 400 mA 和 140 V, 400 mA 电泳，待溴酚蓝迁移至、胶底边处停止电泳，准备进行染色。

采用考马斯亮蓝染色法进行染色。其基本过程依次是：40% 无水乙醇 + 10% 冰乙酸固定 30 分钟；30% 无水乙醇 + 0.2% 硫代硫酸钠 + 6.8% 乙酸钠敏化 30 分钟；用超纯水洗 3 次，每次 5 分钟；0.25% 硝酸银染色 20 分钟；用超纯水洗 2 次，每次 1 分钟；2.5% 无水碳酸钠 + 0.0084% 甲醛显影至斑点清晰为止；加入 1.46% 乙二胺四乙酸二钠终止 10 分钟；用超纯水洗涤 3 次，每次 5 分钟。然后即可扫描分析。

2.3.3 菌体浓度的测定

菌体的浓度采用分光光度法进行测定，取出 1.0 mL 样品在 10,000 rpm 下离心 5 min。以去离子水重悬菌体沉淀的方式清洗 2-3 遍，再悬浮于 1.0 mL 去离子水中，使用可见分光光度计在 600 nm 下测量其吸光值(OD₆₀₀)。

2.3.4 菊粉水解酶酶活的测定

- (1) 果糖标准曲线的制作

事先用 0.1 mol/L pH 5.0 的柠檬酸缓冲液为溶剂配制成浓度为 2 mg/mL 的标准液。依次稀释出浓度为 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 mg/mL 果糖溶液, 各取 2 mL 同 3 mL DNS 反应液充分混匀, 沸水浴加热 5 min, 冰水冷却。冷却后取出 0.2 mL 反应液, 加 2.5 mL 超纯水, 震荡摇匀, 然后 540 nm 波长处分光光度计用空白管调零, 读取各管吸光度值。

(2) 粗酶液酶活测定

取 0.1mL 酶液加入 0.9mL 2%(w/v)菊粉, 50 °C 反应 30 min。加入 1.0 mL 水和 3 mL DNS, 充分混匀, 沸水浴加热 5 min, 冰水冷却。冷却后取出 0.2 mL 反应液, 加 2.5 mL 水, 摇匀, 然后 540 nm 波长处分光光度计用空白管调零, 读取各管吸光度值。相同条件下, 以在沸水浴中加热 5 min 失活的酶液做为对照。

2.3.5 高效液相色谱法测定果糖、葡萄糖和乙醇的浓度

实验中葡萄糖, 果糖和果糖的浓度是通过日本京都岛津公司高效液相色谱(型号为 LC-20AD) 进行分析的, 检测器为 RID-10A 示差检测器, 层析柱为 Bio-Rad Aminex HPX-87H, 柱温 65 °C。水相酸性流动相为 5 mM H₂SO₄, 控制流动相的流速 0.6 mL/min。所有分析样品均需通过离心去除分析样品里的生物细胞和其他不溶性物质, 然后经 0.22 μm 的滤膜过滤后以 20 μL 的体积进样。根据液相色谱报告图谱上的出峰时间可以确定各种物质在色谱图上的出峰时间, 根据液相色谱报告图谱上的出峰面积和各标准溶液的浓度可以确定各物质的标准曲线, 即各物质浓度同峰面积之间的线性关系。测定发酵液样品时, 首先将样品稀释一定的倍数(确保样品中各物质的浓度处于线形范围之内), 样品经 0.22 μm 的滤膜过滤后即可进入色谱柱中进行分析。通过色谱报告图上的出峰时间和出峰面积便可以确定样品各种待测物质的浓度。

2.3.6 乙醇的得率的计算

乙醇得率是按照本实验室改进的适于高浓度乙醇得率的方法进行计算的。计算公式为

$$\text{乙醇得率} = \frac{[C_1] \times W}{976.9 - 0.804 \times [C_1]} \cdot \frac{1}{0.511 \times f \times [\text{Biomass}] \times m} \times 100\%$$

其中,

[C₁]为发酵完成后上清中乙醇的浓度, 单位: g/L;

W为发酵体系中水的总质量, 单位: g;

f为 1 克干菊芋中可以的总还原糖的克数, 单位: g/g;

[Biomass]为发酵体系中的固体含量, 单位: g/g;

m为发酵醪的总质量, 单位: g。

第 3 章 实验结果

3.1 菊芋块茎粉末内主要组分的测定

本课题中所用到得菊芋全部购买自青海鑫农科技有限公司，菊芋品种为青芋 2 号。菊芋是一种天然的地下块茎，因此本实验中所用的菊芋粉末中含有很多组分，其中很多物质含量都会对发酵产生比较大的影响，如菊粉是本论文中生物乙醇生产的出发点，是微生物生长与发酵最主要的碳源；菊芋块茎中的纤维素和半纤维素主要存在于菊芋的细胞壁，一般不能被微生物直接利用为碳源，然而它们的存在往往会使高固体含量的发酵体系产生高的粘度，影响搅拌桨的混合效果，进而影响传质和传热，因此会对发酵产生非常不利影响；菊芋作为一种天然生物质往往会存在一些蛋白质，这些蛋白质一般不可以自行分解为氨基酸供其他微生物作为氮源利用，但是通过加入蛋白酶或利用可以分泌蛋白酶的微生物进行共发酵则可以将蛋白质降解为单个氨基酸，进而供微生物作为氮源进行利用。青芋 2 号块茎粉末是 60 °C 烘干后得到的样品，其各组分含量如表 3.1 所示。青芋 2 号中菊粉的含量为 74.9%，表示菊粉是菊芋粉末的主要成分，说明菊芋 2 号是一种优良的生物质乙醇发酵底物。菊芋中纤维素和半纤维素的含量分别为 3.4% 和 2.2%，表明纤维素和半纤维素的含量较低，适合进行高固体含量体系的生物乙醇加工。菊芋中蛋白质的含量为 1.6%，含量较为丰富，但难于被微生物利用，通过添加蛋白酶水解蛋白可以得到单个氨基酸，作为发酵微生物的氮源，减少外源氮源的添加。菊芋粉末中脂肪的含量为 1.3%，可以作为少量碳源供微生物生长和发酵。

表 3.1 青芋 2 号块茎粉末中各种组分的含量

Table 3.1 Composition of the Jerusalem artichoke tuber flours (Qingyu 2)

组分	含量 (%， w/w)
水分	4.8
菊粉	74.9
纤维素	3.4
半纤维素	2.2
蛋白质	1.6
脂肪	1.3

3.2 *S. cerevisiae* DQ1 中菊粉水解酶生产的确定

S. cerevisiae DQ1 是本实验室进行玉米秸秆同步糖化与发酵过程中所使用的一株可以耐抑制物、耐高温和耐受乙醇的优良酵母，该酵母是通过 UV 诱变筛选所得。在利用该酵母进行高温菊芋乙醇发酵时发现，无论加入具有菊粉酶活的糖化酶的量多少，同步糖化与发酵生产菊芋乙醇的效果并没有发生明显变化。当把糖化酶的添加完全省去后，

同步糖化与发酵的结果也基本不受影响。我们认为该酿酒酵母应该是一株可以生产菊粉水解酶的菌株，因此对该酵母中菊粉水解酶的生产情况、生理生化特征进行了鉴定。

3.2.1 *S. cerevisiae* DQ1 中菊粉水解酶确定探测

S. cerevisiae DQ1 可以利用菊芋中的菊粉进行同步糖化与发酵，经分析可能有三种原因：（1）菊粉可以自发水解，且其水解速率能够满足酵母的生长和发酵；（2）菊粉的水解与合成是一个动态的化学平衡，乙醇生产菌的接入促进了平衡向菊粉水解的方向进行；（3）*S. cerevisiae* DQ1 可以产生菊粉水解酶，催化菊粉的水解。为确定原因，在含有菊粉的培养基中做了三个对比处理：不接任何菌，接入 *Z. mobilis* ZM4 和接入 *S. cerevisiae* DQ1，该处理直到三个实验组中的糖的浓度均不再变化为止。其中，*Z. mobilis* ZM4 是一种已知的不产菊粉酶的乙醇生产菌种，培养基中含有寡聚糖(菊粉)约 160 g/L，单糖（果糖和葡萄糖）约 40 g/L。实验结果表明，三个实验组中糖的浓度到 97 小时不再变化。如图 3.1 所示，不接菌的实验组在整个处理过程中寡聚糖和单糖的量都保持不变，说明菊粉很难进行自发的水解；接入 *Z. mobilis* ZM4 的实验组中，发现培养基中单糖（葡萄糖和果糖）完全消耗，而寡聚糖（菊粉）则几乎没有发生浓度的变化，说明 *Z. mobilis* ZM4 可以利用单糖进行生长和发酵，但是单糖的利用并不能促进菊粉的水解；接入 *S. cerevisiae* DQ1 的实验组中，不仅葡萄糖和果糖被完全消耗，而且菊粉被大部分水解并消耗，说明 *S. cerevisiae* DQ1 利用葡萄糖、果糖和菊粉菌可以正常生长和发酵。综合分析，我们可以推测 *S. cerevisiae* DQ1 可以产生菊粉水解酶来催化菊粉的水解。

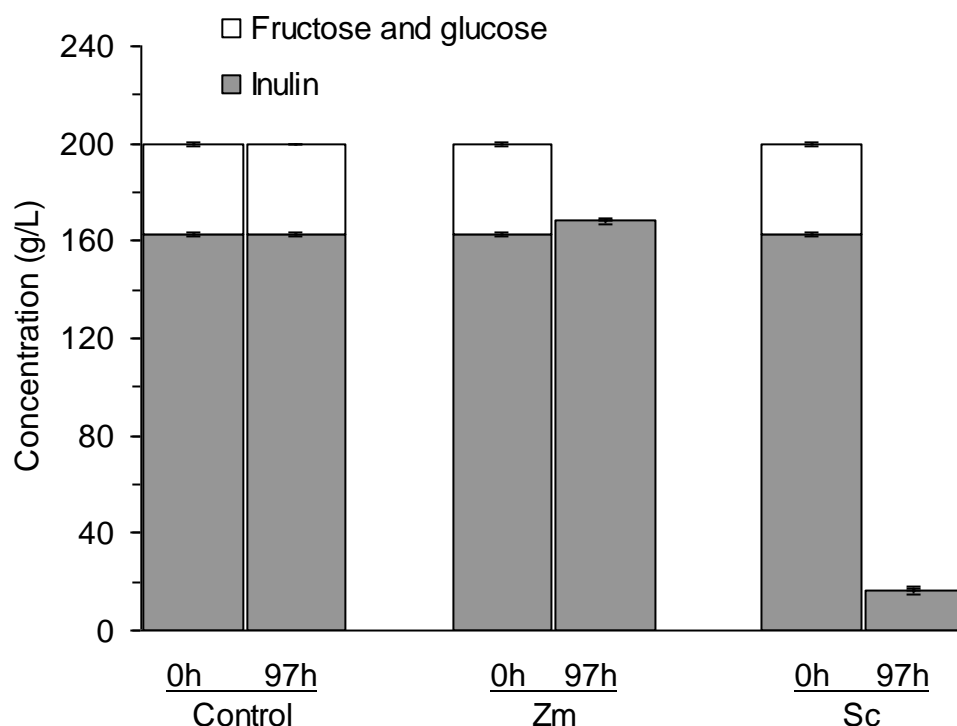


图 3.1 *S. cerevisiae* DQ1 中菊粉水解酶的确立

Fig. 3.1 Identification of inulin hydrolysing enzyme(s) from *S. cerevisiae* DQ1

3.2.2 *S. cerevisiae* DQ1 中菊粉水解酶的亚细胞定位

图 3.2 表示了酿酒酵母 *S. cerevisiae* DQ1 中菊粉水解酶在发酵液上清，周质空间和胞内的分布情况。从图中可以看出，酵母的周质空间和胞内均可以检测到很强的菊粉酶活，而发酵液上清中则几乎检测不到任何菊粉酶活，说明菊粉水解酶主要分布在 *S. cerevisiae* DQ1 的胞内和周质空间。其中大约 43% 的菊粉水解酶分布在周质空间，大约 57% 的菊粉水解酶分布在胞内，这预示着菊粉水解酶有机会在培养基中接触到菊粉分子实施其催化功能。Rene 等(1974)发现大约仅有 4% 的菊粉可以被酿酒酵母细胞直接吸收进入胞内，Phelps (1965)使用了 5 种不同的菊粉样品用于酿酒酵母的吸收实验，结果这 5 种样品的吸收情况只有轻微的不同^[122, 123]。因此，菊粉酶水解菊粉应该是胞外空间发生的，而不可能在菊粉很难进入的胞内空间。

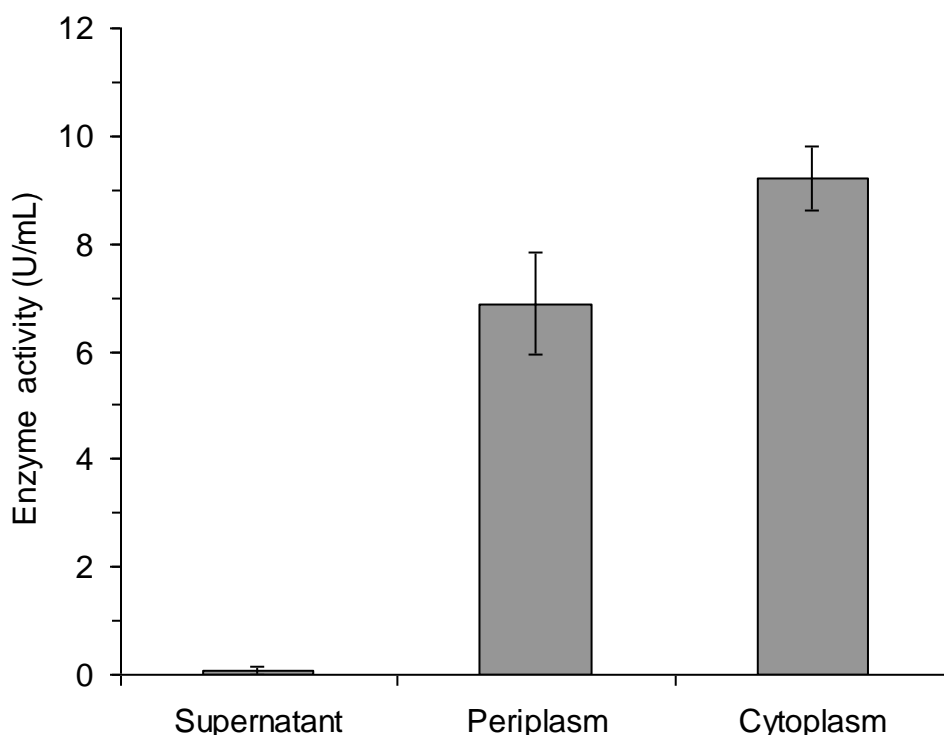


图 3.2 *S. cerevisiae* DQ1 中菊粉水解酶的亚细胞定位

Fig. 3.2 Subcellular distribution of inulin hydrolysing enzyme(s) from *S. cerevisiae* DQ1

3.2.3 *S. cerevisiae* DQ1 中菊粉水解酶的部分纯化和蛋白分子量估计

从 *S. cerevisiae* DQ1 中得到粗菊粉水解酶溶液，然后经过 Sephadex G-100 柱层析对菊粉水解酶进行部分纯化。从图 3.3(a)的洗脱图谱可以看出柱层析可以洗脱出 4 个主要的吸收峰，从左到右依次标记为 A, B, C 和 D。经菊粉水解酶酶活检测后发现，仅有 A 峰可以检测到菊粉水解酶酶活。将 A 峰上的组分经冷冻干燥和重悬后进行 SDS-PAGE 分析确定菊粉水解酶的分子量。如图 3.3(b)所示，该菊粉水解酶的蛋白分子量大约 35 kDa。

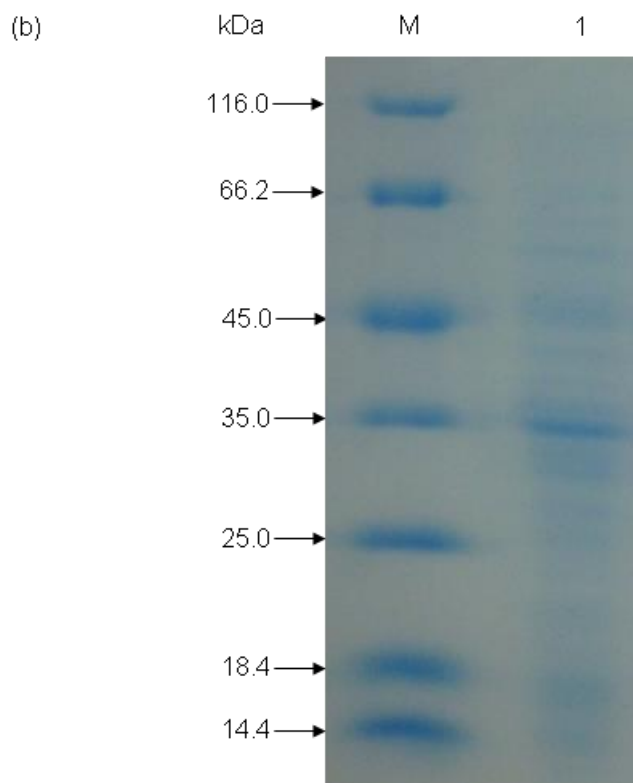
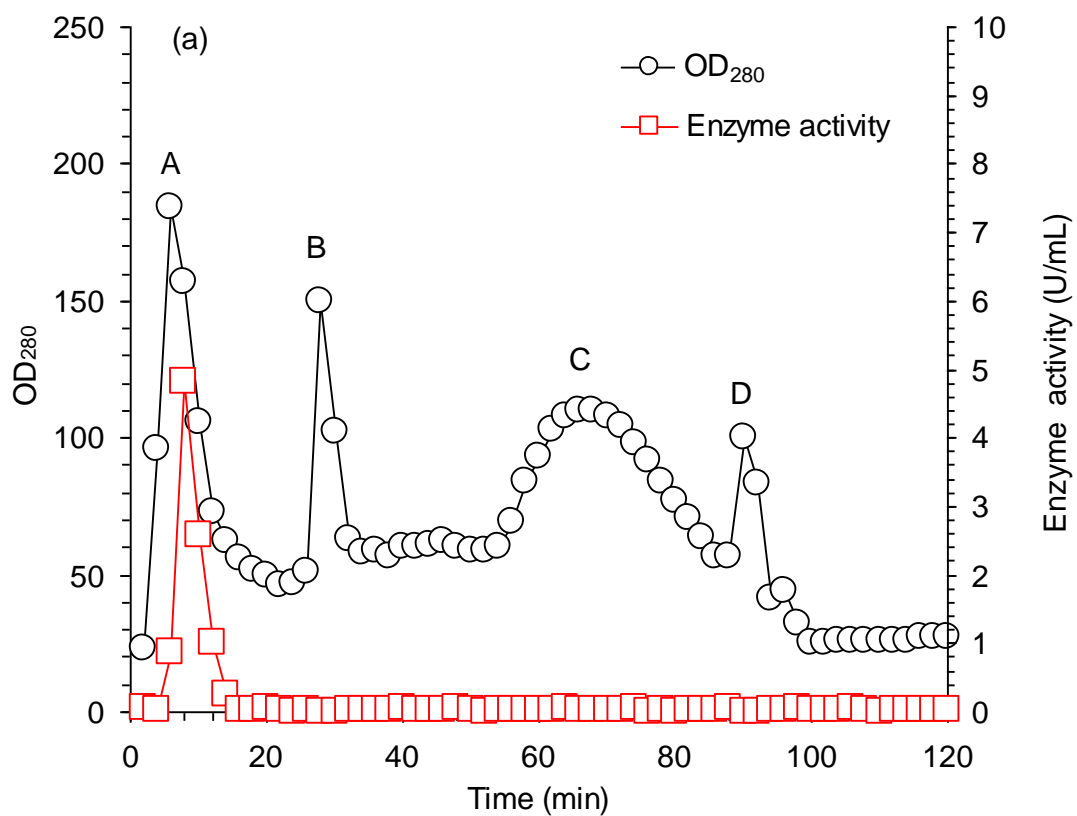


图 3.3 *S. cerevisiae*DQ1 中菊粉水解酶的部分纯化和分子量估计

Fig. 3.3 Partially purification of inulin hydrolyzing enzyme(s) of *S. cerevisiae* DQ1 and estimation of molecular weight.

3.2.4 pH 对 *S. cerevisiae* DQ1 中菊粉水解酶酶活和稳定性的影响

pH 是影响水解酶酶活和稳定性的一个重要参数, 因此我们对不同 pH 条件下的菊粉水解酶酶活和稳定性进行了分析。如图 3.4 所示从 pH 4.0 到 pH 5.0 随着 pH 值的增加菊粉水解酶的酶活逐渐增大, 但是当 pH 大于 5.0 时, 随着 pH 的逐渐增大菊粉水解酶的酶活会急剧下降, 因此在 pH 5.0 时菊粉水解酶可以获得最佳酶活。菊粉水解酶的稳定性在 pH 范围 4.0-6.5 之间时, 随着 pH 的增大酶的稳定性会有非常轻微的下, 但该酶在这个 pH 范围内基本上是稳定的, 不会有明显的酶活变化。

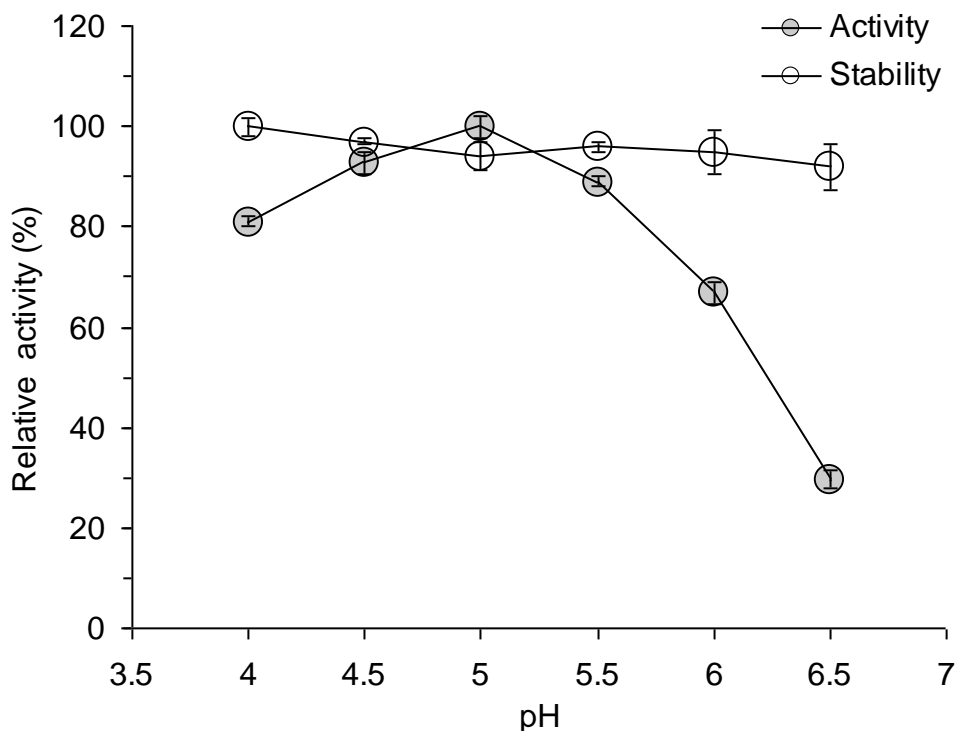


图 3.4 pH 对 *S. cerevisiae* DQ1 中菊粉水解酶酶活和稳定性的影响

Fig. 3.4 Effect of pH on the activity and stability of the inulin hydrolyzing enzyme(s) from *S. cerevisiae* DQ1

3.2.5 温度对 *S. cerevisiae* DQ1 中菊粉水解酶酶活和稳定性的影响

温度也是影响水解酶酶活和稳定性的一个重要参数, 因此我们通过对不同温度下的菊粉水解酶酶活和不同温度处理后残余的酶活进行了分析确定温度对其酶活和稳定性的影响。如图 3.5 所示从 30 °C 到 50 °C 随着温度的增加菊粉水解酶的酶活逐渐增大, 但是当温度大于 50 °C 时, 随着温度的逐渐增大菊粉水解酶的酶活会急剧下降, 在 70 °C 时基本上检测不到菊粉酶酶活, 因此在 50 °C 时菊粉水解酶可以获得最佳酶活。菊粉水解酶的稳定性在温度范围 30-50 °C 之间时基本上没有明显的酶活变化, 但是随着温度的继续上升酶活会急剧下降, 稳定性会随温度的上升迅速变差。

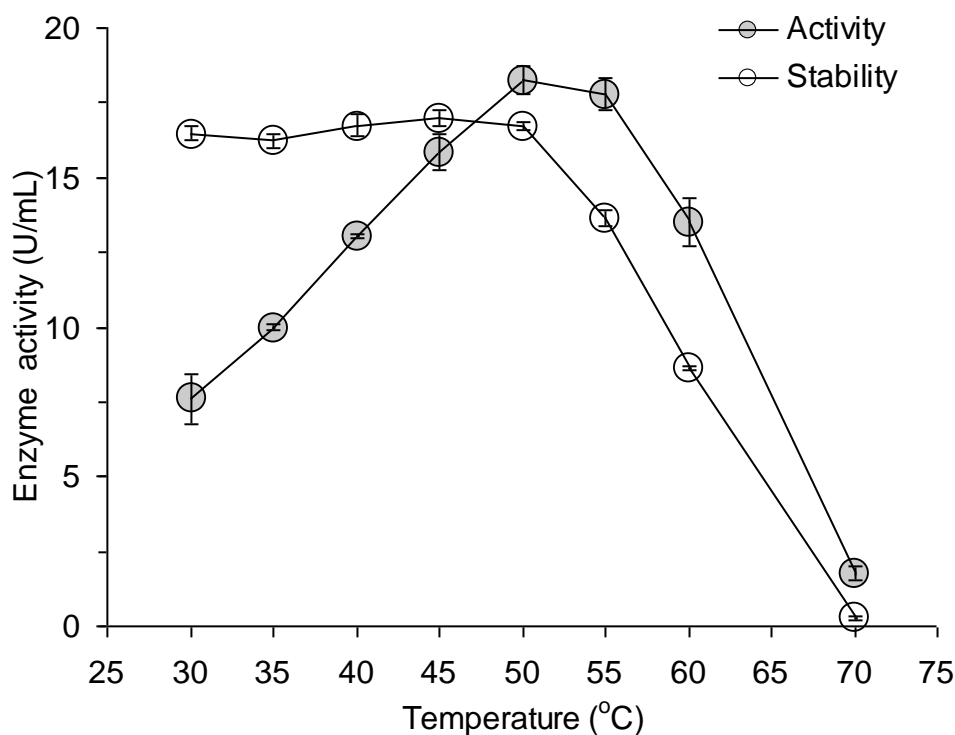


图 3.5 温度对 *S. cerevisiae* DQ1 中菊粉水解酶酶活和稳定性的影响

Fig. 3.5 Effect of temperature on the activity and stability of the inulin hydrolyzing enzyme(s) from *S. cerevisiae* DQ1

3.2.6 不同碳源对 *S. cerevisiae* DQ1 中菊粉水解酶生产的影响

在含有等浓度不同碳源的培养基上培养 *S. cerevisiae* DQ1，观察其生产菊粉水解酶的情况。如图 3.6 所示，*S. cerevisiae* DQ1 在含有菊粉、蔗糖、葡萄糖和果糖的培养基中均可以实现良好生长，在以淀粉和乳糖为碳源的培养基中该酵母的生长则会变差。*S. cerevisiae* DQ1 在含有菊粉和蔗糖的培养基中生长表现出了最高的比活，而在含有葡萄糖、果糖、淀粉和乳糖的培养基中生长得到的比活则依次下降。因此，在以葡萄糖、果糖、蔗糖、菊粉、淀粉和乳糖这六种糖类作为碳源培养 *S. cerevisiae* DQ1 时，菊粉和果糖最利于菊粉水解酶的生产，淀粉和乳糖最不利于菊粉水解酶的生产。

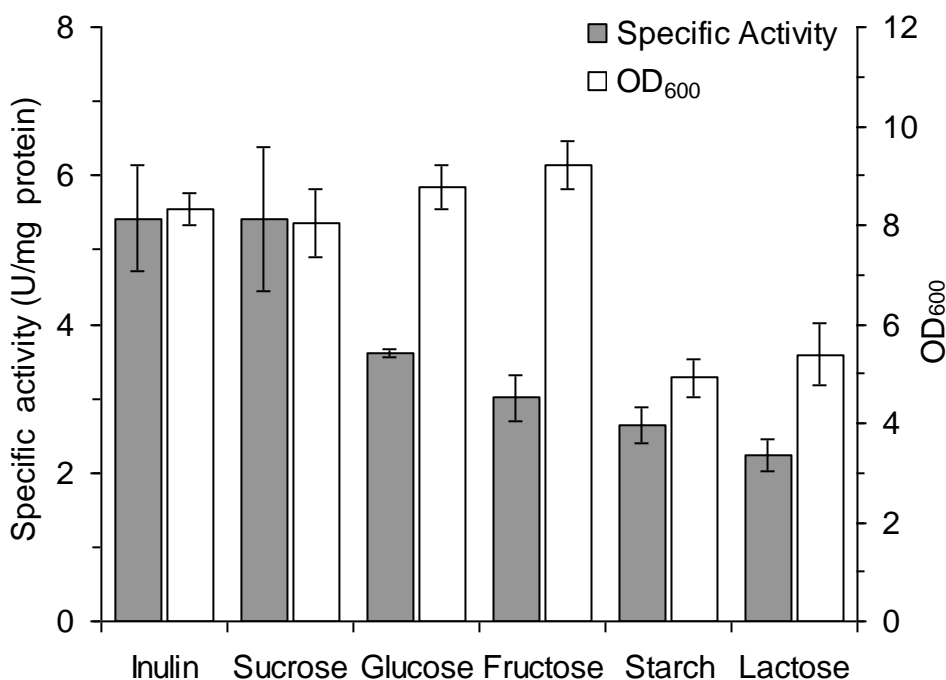


图 3.6 不同碳源对 *S. cerevisiae* DQ1 中菊粉水解酶生产的影响

Fig. 3.6 Effect of different carbon sources on the production of inulin hydrolysing enzyme(s) from *S. cerevisiae* DQ1

3.2.7 不同氮源对 *S. cerevisiae* DQ1 中菊粉水解酶生产的影响

在含有等浓度不同氮源的培养基上培养 *S. cerevisiae* DQ1，观察其生产菊粉水解酶的情况。如图 3.7 所示，*S. cerevisiae* DQ1 在含有有机氮源酵母提取物、蛋白胨和尿素的培养基上均比含有无机氮源磷酸二氢铵、硫酸铵和碳酸铵的培养基上的生长和菊粉水解酶比活高。说明 *S. cerevisiae* DQ1 更适合在有机氮源上生长和产酶。在三种有机氮源中，酵母提取物无论在酵母生长和菊粉水解酶生产上都优于另外两种有机氮源蛋白胨和尿素，蛋白胨和尿素对酵母的生长和菊粉水解酶生产的促进作用基本上一样。在三种无机氮源中，磷酸二氢铵、硫酸铵和碳酸铵对酵母的生长和菊粉水解酶的生产的促进作用依次降低；磷酸二氢铵更利于酵母生产和酶的生产可能由于其还能提供部分磷源，可以促进 DNA 的合成；碳酸铵作为氮源的效果最差可能由于其在水溶液中呈现一定的碱性，不利于酵母的生长和菊粉水解酶的生产。因此，在以酵母提取物、蛋白胨、尿素、磷酸二氢铵、硫酸铵和碳酸铵这六种物质作为氮源培养 *S. cerevisiae* DQ1 时酵母提取物是最佳的选择。

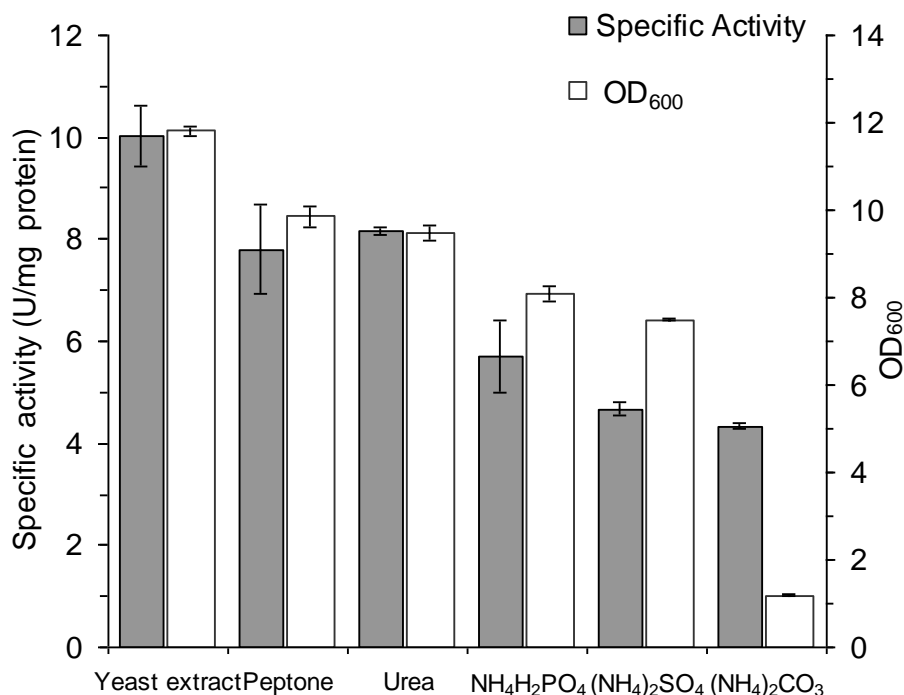
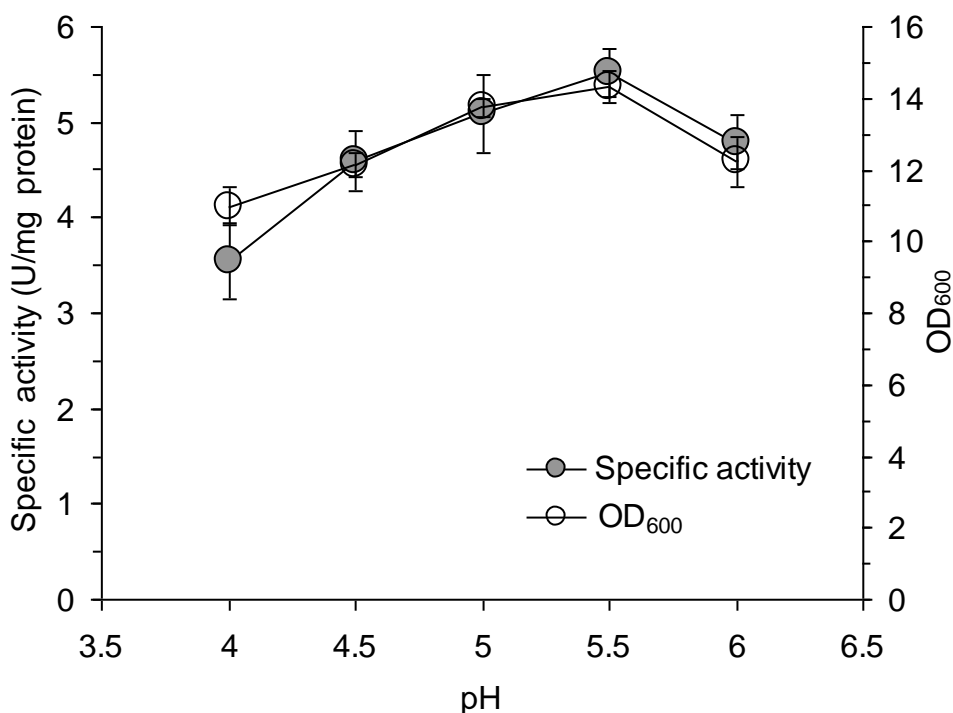


图 3.7 不同氮源对 *S. cerevisiae* DQ1 中菊粉水解酶生产的影响

Fig. 3.7 Effect of different nitrogen sources on the production of inulin hydrolysing enzyme(s) from *S. cerevisiae* DQ1

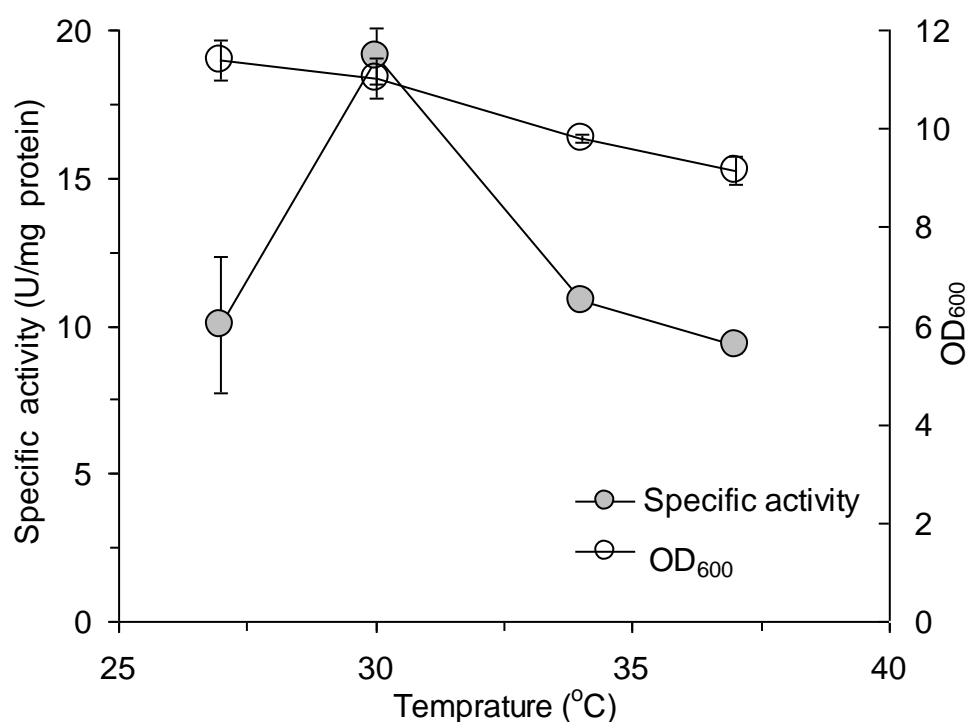
3.2.8 pH 对 *S. cerevisiae* DQ1 中菊粉水解酶生产的影响

在不同 pH(4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0)的柠檬酸缓冲液配置培养基培养 *S. cerevisiae* DQ1, 观察其生产菊粉水解酶的情况。如图 3.8 所示, 在 pH 4.0 - 5.5 范围内, 随着 pH 的升高 *S. cerevisiae* DQ1 菌体的 OD 值逐渐升高, 菊粉水解酶的比活也逐渐变大, 但当 pH 值大于 5.5 以后 *S. cerevisiae* DQ1 的 OD 值和菊粉水解酶的比活都会有较大的下降, 说明 pH 5.5 时最有利于菊粉水解酶的生产。在 3.2.4 中已知菊粉水解酶在 pH 5.5 时的酶活接近于最佳 pH 5.0 时的酶活且在 pH 5.5 时有很好的稳定性, 所以 *S. cerevisiae* DQ1 可以在 pH 5.5 的发酵体系中为发酵系统提供高的菊粉水解酶活。

图 3.8 pH 对 *S. cerevisiae* DQ1 中菊粉水解酶生产的影响Fig. 3.8 Effect of pH on the production of inulin hydrolysing enzyme(s) from *S. cerevisiae* DQ1

3.2.9 温度对 *S. cerevisiae* DQ1 中菊粉水解酶生产的影响

在不同温度 (27, 30, 34, 37 °C) 下培养 *S. cerevisiae* DQ1, 观察其生长和生产菊粉水解酶的情况。如图 3.9 所示, 从 27 °C 升高到 30 °C 时, OD 值基本上不变, 但酵母菌产生的比活却有大幅的提高; 从 30 °C 到 37 °C, 随着温度的升高 OD 值会缓慢下降, 但菊粉水解酶的比活却会迅速下降, 说明 30 °C 最有利于菊粉水解酶的生产。由于菊粉水解酶在 30 °C 的酶活只有 50 °C 最佳酶活的一半, 所以在 *S. cerevisiae* DQ1 应用到发酵过程中时, 需要综合考虑酶活和产酶两个方面, 选取一个折中的温度作为产酶和发酵的温度, 因此对发酵温度优化是十分必要的。

图 3.9 温度对 *S. cerevisiae* DQ1 中菊粉水解酶生产的影响Fig. 3.9 Effect of temperature on the production of inulin hydrolysing enzyme(s) from *S. cerevisiae* DQ1

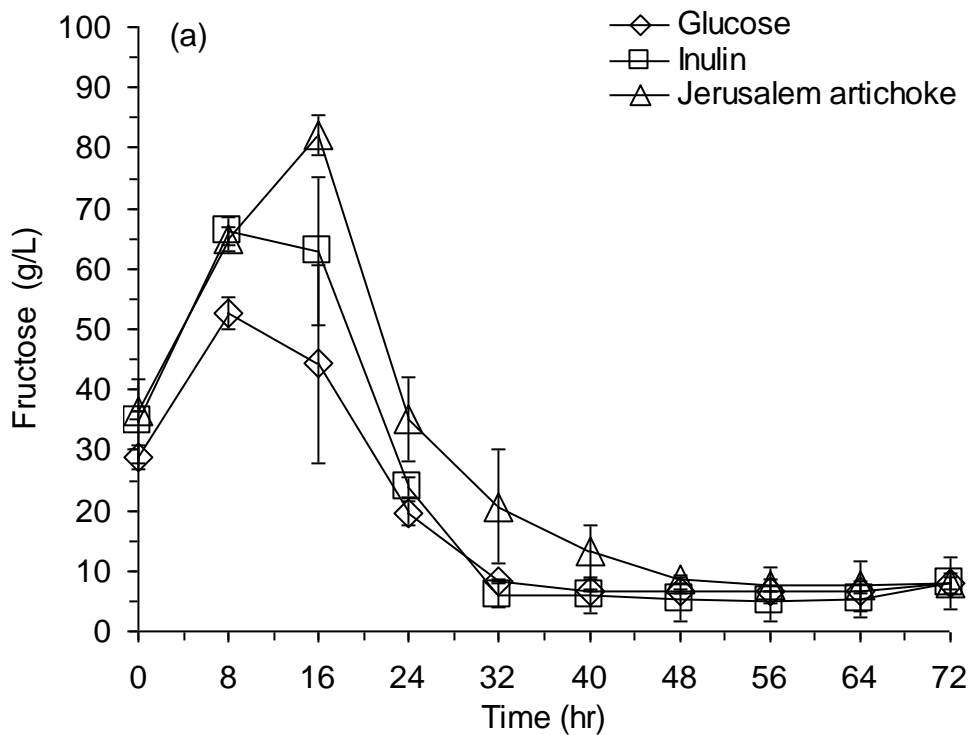
3.3 利用新型螺旋桨生物反应器整合生物加工高固含量菊芋生产乙醇

目前已有很多利用菊芋发酵生产乙醇的报道,但是大多都是用菊芋汁进行发酵生产乙醇,其中在进行固液分离的时候会有大量的糖类残留在菊芋渣中,这就限制了这种菊芋乙醇生产方式的工业化应用。高固体含量的整合生物加工可以实现高浓度乙醇的生产,进而降低乙醇的精馏能耗,但是高的固体含量也会带来很多问题,如发酵体系粘度变高,固液混合效果变差,进而影响发酵的效果。为了解决这个问题,我们使用了已经在高固体含量玉米秸秆同步糖化发酵中成功使用的新型螺旋桨生物反应器,以期在高固体含量菊芋的同步糖化与发酵中取得理想的发酵效果。(注:在所有的发酵实验中,产生的游离葡萄糖非常少且不同条件下葡萄糖的变化差异很小,故所有发酵实验的葡萄糖数据均未列出。)

3.3.1 不同碳源培养种子对菊芋同步糖化发酵的影响

由 3.2.6 可知,不同碳源培养种子时得到的菌量和菊粉水解酶的酶活是不一样的,因此,我们有必要研究不同碳源培养种子时对菊芋整合生物加工的影响。这里我们选定了三种菊芋发酵中常用的种子培养碳源:葡萄糖、菊粉和菊芋粉末。如图 3.10(a)所示,三种碳源培养的种子对发酵前 16 小时果糖的积累影响非常大,以菊粉和菊芋粉末培养的酵母种子比以葡萄糖培养的酵母种子在前 16 小时积累的果糖多很多,其中以菊芋粉

末培养的种子在 16 小时积累的果糖最多，果糖浓度达到了 81 g/L，这可能由菊粉和菊芋粉末培养的种子有较高的菊粉酶活所致；16 小时之后，三种方式的发酵体系中果糖都迅速下降，到发酵后期果糖都基本消耗完全。图 3.10(b)表示的三种碳源原培养的种子对乙醇生产的影响，从图中可以看出用葡萄糖培养的种子生产乙醇的速率比用菊粉和菊芋粉末培养的种子生产乙醇的速率要高，并且用葡萄糖培养的种子最终生成乙醇的浓度也是最高的，这可能由于葡萄糖培养的种子前期没有在发酵液中积累过多的果糖，避免了高糖所致的高渗透压。因此，三种碳源中以葡萄糖为碳源培养种子最有利于整合生物加工的进行，在后面的实验中均使用葡萄糖为碳源培养酵母作为发酵用种子。



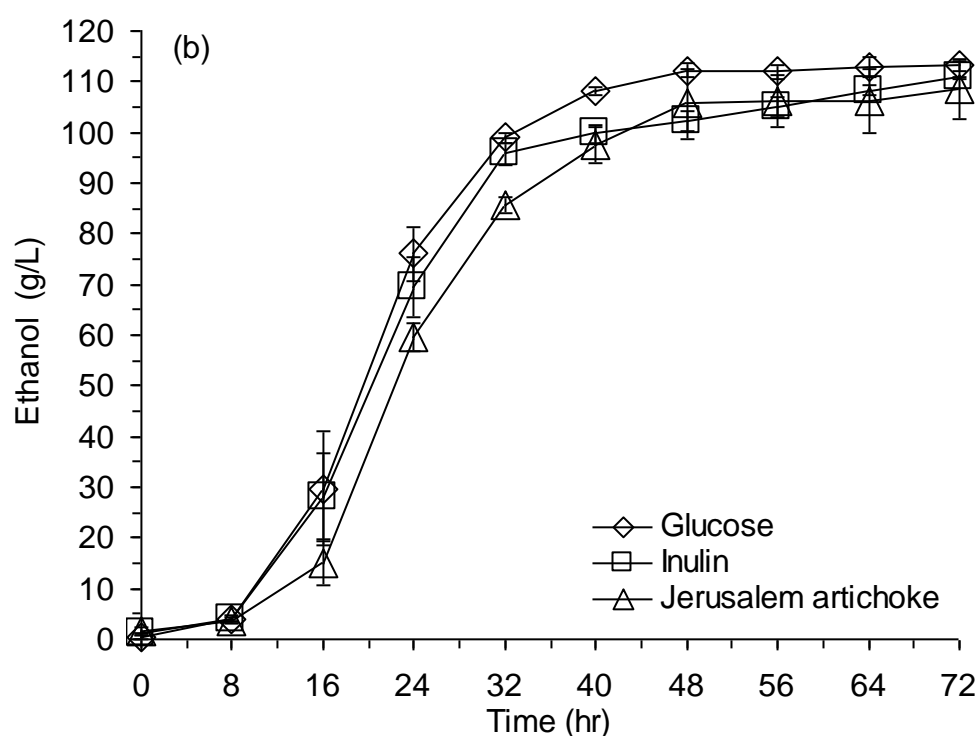


图 3.10 不同碳源培养种子对菊芋整合生物加工的影响

Fig. 3.10 CBP at yeast seeds cultured by different carbon resources

3.3.2 pH 对菊芋整合生物加工的影响

由于 *S. cerevisiae* DQ1 倾向于在微酸的环境里生长发酵且在酸性环境下发酵不容易染菌，因此这里选定 pH 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 作为考察 pH 对菊芋整合生物加工影响的基准。从图 3.11(b)可以看出在前 8 个小时内发酵基本上未启动，处于延滞期，因此这个阶段主要进行菊粉的糖化。从图 3.11(a)可以看出前 8 个小时当 pH 为 4.5, 5.0 和 5.5 时，果糖积累最多，说明这三个 pH 时菊粉酶活最大，这与 3.2.8 中的结果是一致的。16 小时之后各个 pH 下的果糖都迅速消耗，到 32 小时时就基本上没有净果糖的生成。由图 3.11(b)看出 pH 5.0 和 5.5 时，乙醇的生产速率最快，pH 3.5 的情况下乙醇生成速率最慢，到发酵后期（32 小时之后）pH 5.0 的发酵速率开始小于 pH 5.5，pH 5.5 最终在 48 小时生产了最大浓度的乙醇 113.5 g/L，其相应的得率为 81.5%。

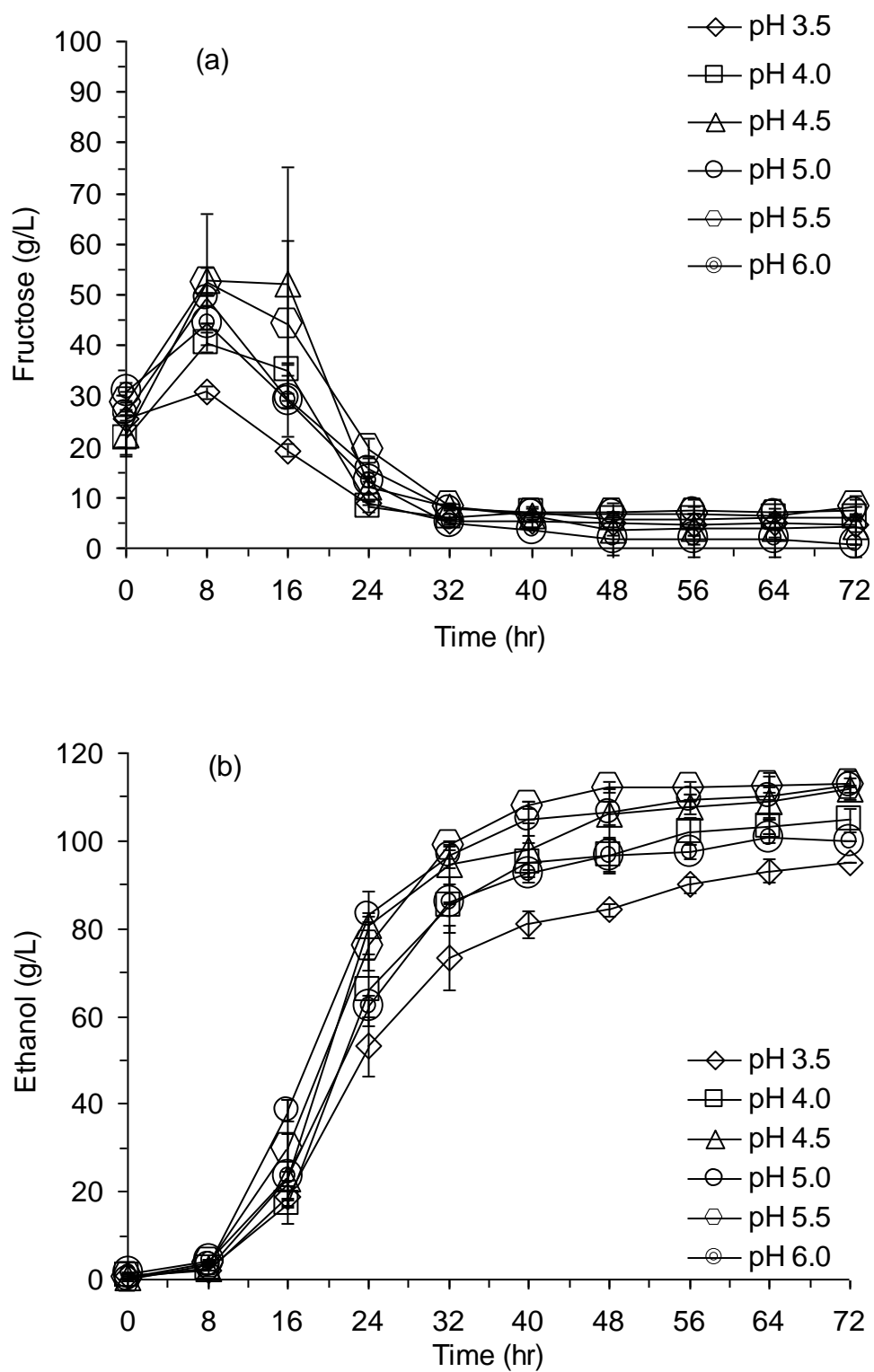
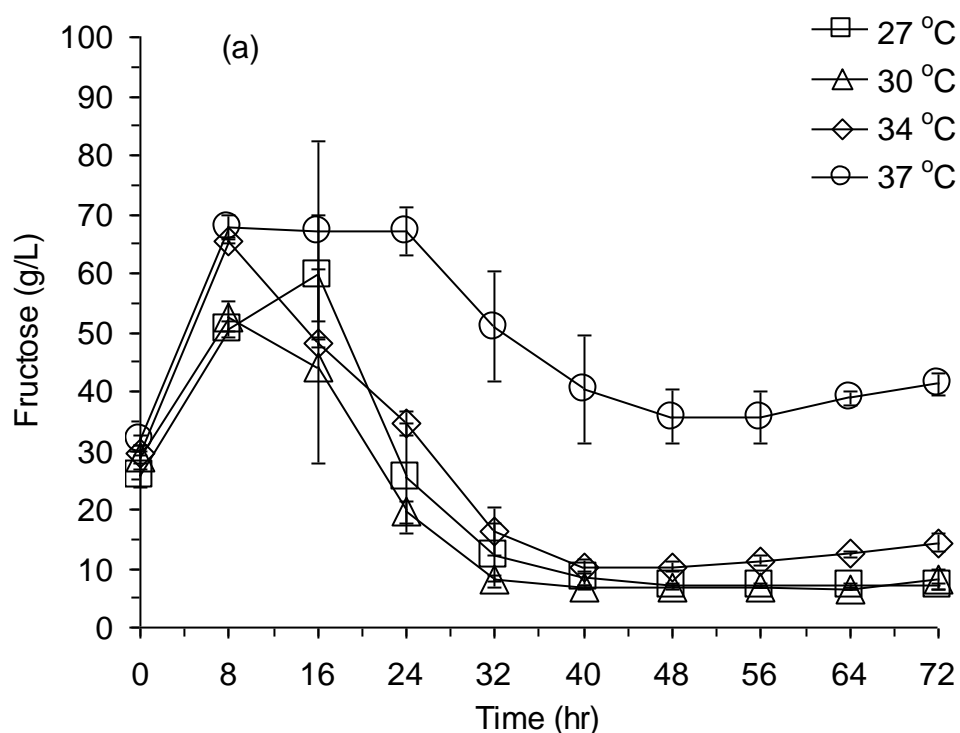


图 3.11 pH 对菊芋整合生物加工的影响

Fig. 3.11 CBP at different pH

3.3.3 温度对菊芋整合生物加工的影响

温度高于 37 °C 时 *S. cerevisiae* DQ1 在高浓度乙醇中的生长和发酵会受到较大的抑制以致无法生长，无法进行高浓度乙醇的发酵生产，而温度低于 27 °C 时，乙醇发酵不易控制，对于大规模乙醇生产更是不切实际。因此我们选择的考察温度范围为 27 - 37 °C。如图 3.12(b)所示，前 8 个小时内发酵基本上未启动，处于延滞期，因此这个阶段主要进行菊粉的糖化。从图 3.12(a)可以看出，果糖的积累量随着温度的升高而增大；当温度为 34 °C 和 37 °C 时前 8 个小时果糖积累最多，说明这两个温度下菊粉酶活最大，这与 3.2.9 中的结果是一致的。37 °C 时整个发酵过程中果糖都消耗很慢，到发酵结束时仍有 50 g/L 果糖残余，说明温度较高时菊粉水解酶的酶活提高了，但酿酒酵母的发酵能力下降了，因而不利于同步糖化发酵的进行。由图 3.12(b)看出 30 °C 是最优的乙醇生成温度，得到了最高的乙醇浓度 113.5 g/L，其相应的得率为 81.5%。由于高温和高乙醇浓度对酵母细胞的协同毒害作用，在更高的温度下同步糖化与发酵反而不利于乙醇的生成，而 27 °C 时由于不能够产生足够的菊粉酶活，也不利于同步糖化发酵生产乙醇的正常进行。



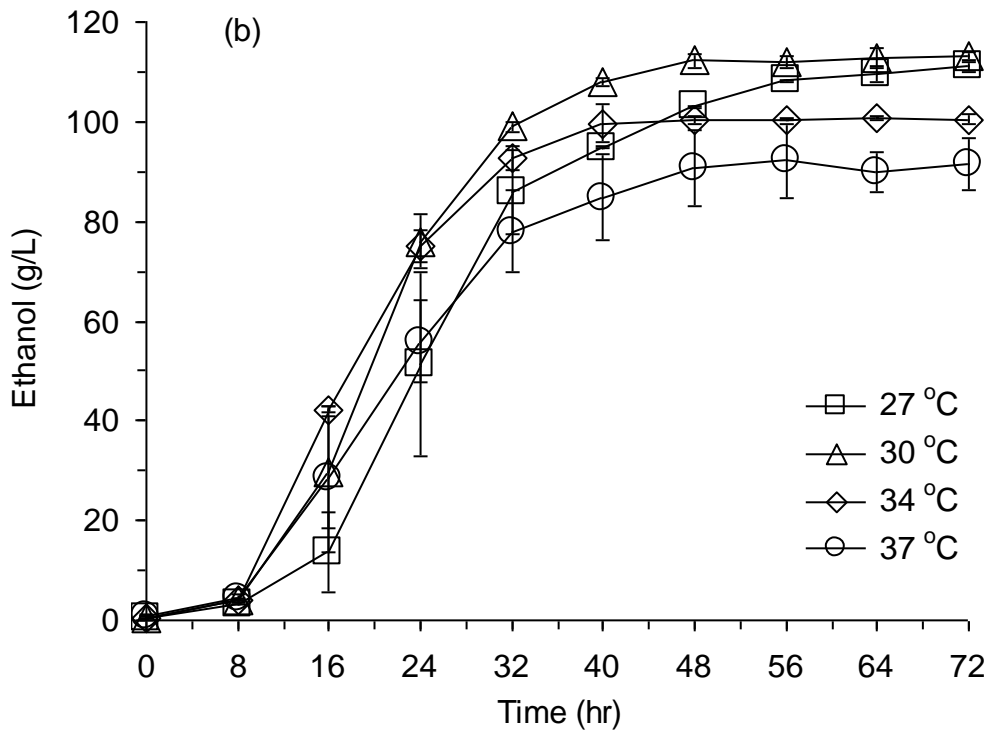


图 3.12 温度对菊芋整合生物加工的影响

Fig. 3.12 CBP at different temperature

3.3.4 固体含量对菊芋整合生物加工的影响

发酵生产高浓度的乙醇有利于降低下游乙醇精馏的能耗，而高浓度乙醇的生产必然需要高固体含量的菊芋发酵醪，高固体含量的菊芋发酵体系往往会对发酵结果产生较大的影响。为了寻找可以得到满意得率的最高固体含量，我们考察了不同固体含量对菊芋同步糖化与发酵的影响，固含量范围为 20% 到 35%。如图 3.13(a)所示，果糖的积累会随着固体含量的增加而增大；在固体含量为 20% - 30% 时果糖大部分可以被酵母利用完，基本没有果糖的残余；固体含量增加到 35% 时，果糖消耗十分缓慢，在 72 小时有最大的果糖残余 56 g/L。从图 3.13(b)可以看出固体含量为 20% - 30% 时生产乙醇的浓度会随着固体含量的增大而增加，在固体含量为 30% 时得到最大的乙醇浓度 113.5 g/L；固体含量增加到 35% 时，乙醇的浓度会大幅下降到 101.6 g/L。这个结果表明在高的固体含量下，整合生物加工的限速步骤不再是菊粉的糖化而是酵母的发酵能力。

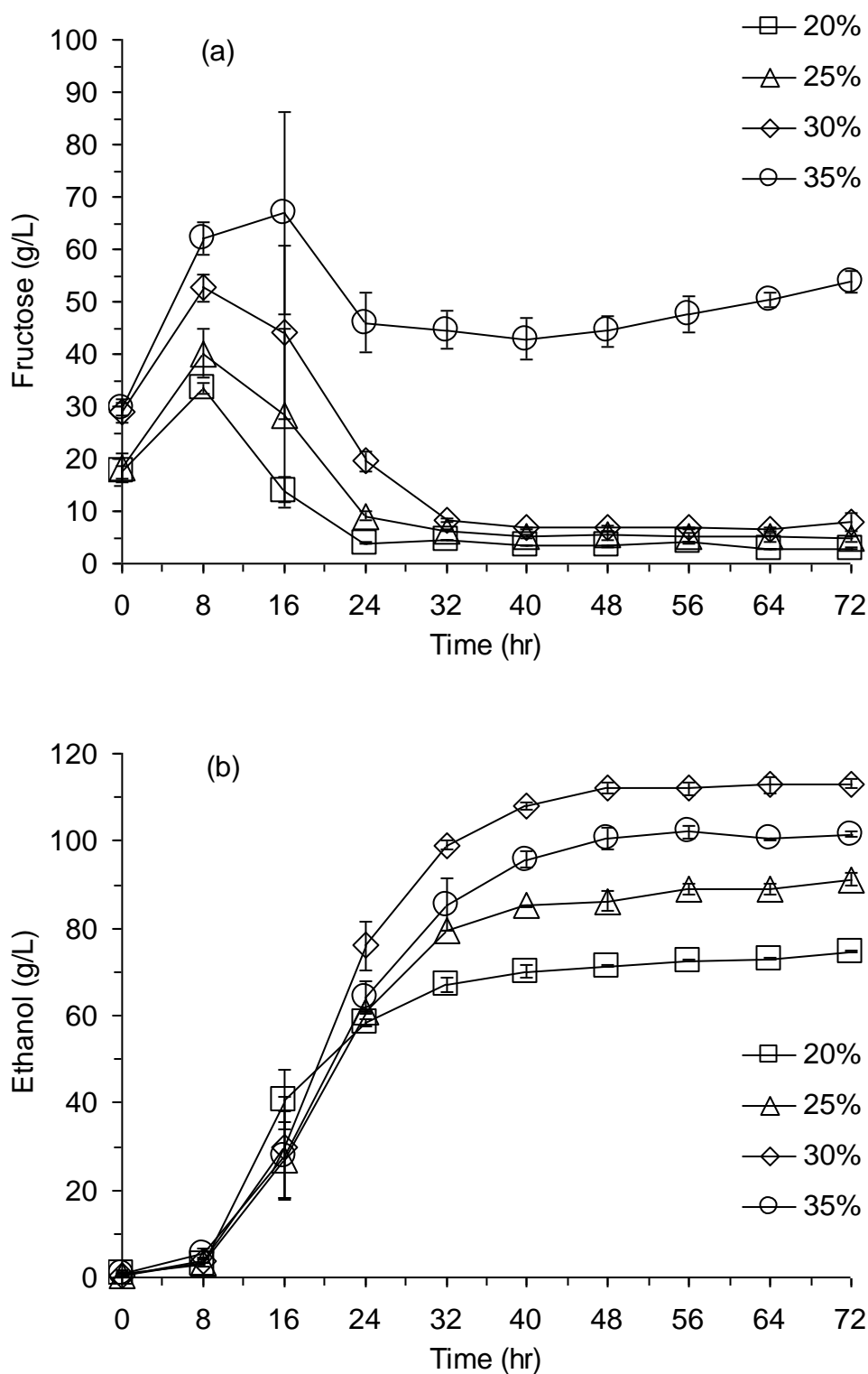
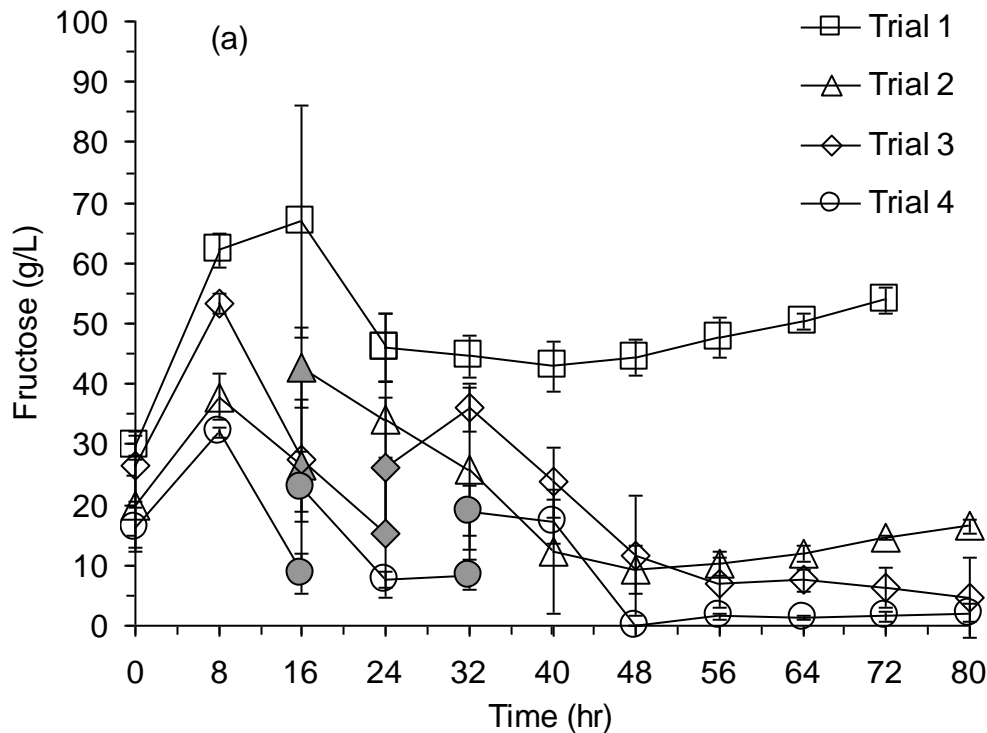


图 3.13 固体含量对菊芋整合生物加工的影响

Fig. 3.13 CBP at different Jerusalem artichoke tubers loading

3.3.5 各种补料方式对 35% 固体含量下菊芋同步糖化发酵的影响

尽管非常高的菊芋固体含量不利于整合生物加工的进行,但是如果我们能够保证得到令人满意的乙醇得率,利用非常高的菊芋固体含量得到更高浓度的乙醇还是有必要的。前面分析影响同步糖化发酵的限速步骤是酵母的生长和发酵能力受到了抑制,因此我们期望通过分批补料的方法逐渐提高菊芋的固体含量,以驯化酵母提高其生长和发酵的能力,实现更高浓度乙醇的生产。如图 3.14 所示,我们设置了 3 种分批补料方式来考察不同分批补料方式对同步糖化发酵的影响。方式 1 是对照组,该组实验是在初始一次性加料达到 35% 的固体含量,这种方式果糖积累很高,乙醇的浓度和得率分别为 101.6 g/L 和 56.6%。方式 2 在初始时刻加入大约 60% 的菊芋粉末达到 20% 的固体含量,在 16 小时加入剩下的 40% 的物料达到 35% 的固体含量,在这种补料方式下果糖的残留大大降低,生产乙醇的浓度和得率分别为 115.0 g/L 和 64.9%。方式 3 在初始时刻加入大约 85% 的菊芋粉末达到 30% 的固体含量,在 24 小时加入剩下的 15% 的物料达到 35% 的固体含量,在这种补料方式下果糖的残留进一步降低为 14.2 g/L,生产乙醇的浓度和得率分别为 128.7 g/L 和 73.5%。方式 4 有 3 次补料操作:初始时刻加入大约 60% 的菊芋粉末达到 20% 的固体含量,在 16 小时加入 25% 的物料达到 30% 的固体含量,最后在 32 小时加入剩下的 15% 的菊芋粉末达到 35% 的固体含量,在这种补料方式下果糖的残留减少到最低为 4.2 g/L,生产乙醇的浓度和得率分别为 128.1 g/L 和 73.1%,这与第 3 种补料方式的结果基本上是一致的。



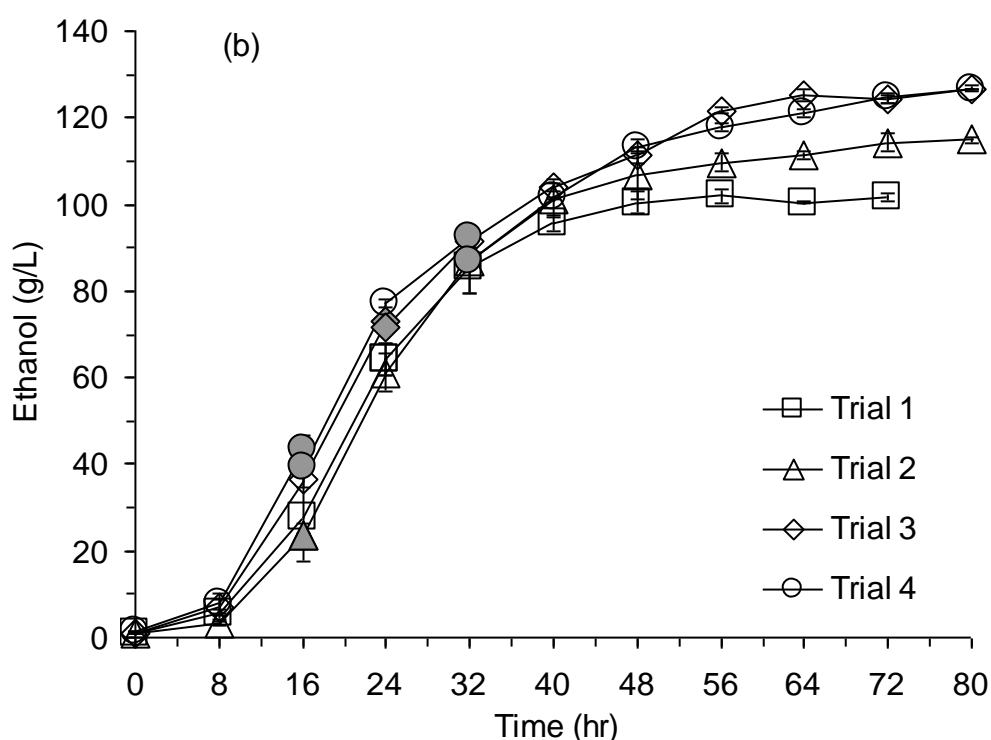


图 3.14 各种补料方式对 35% 固体含量下菊芋整合生物加工的影响。图中实心点代表补料时间点

Fig. 3.14 High titer ethanol production by fed-batch fermentation of Jerusalem artichoke tubers loading 35.0% (w/w). The solid legends indicate the feeding time

3.4 添加极少量纤维素酶对高固体含量下菊芋整合生物加工的影响

在 35% 固体含量下菊芋整合生物加工的结果很不理想，主要是酵母菌的生长和发酵能力下降所致，而高固体含量下所带来的高的体系粘度对传质的抑制则是酵母生长和发酵能力下降的一个主要原因。除了提高酵母菌的生长和发酵能力，通过一定措施改善发酵体系的环境也是提高发酵效果的一个选择，如降低体系的粘度。这一部分尝试添加极少量的纤维素酶来考察其对高固体含量下菊芋同步糖化与发酵的影响。

3.4.1 添加少量纤维素酶下 30% 固体含量菊芋的整合生物加工

如图 3.15 所示，添加极少量纤维素酶（0.51 FPU/DM）的整合生物加工比没添加纤维素酶的情况积累更低的果糖浓度，而添加极少量纤维素酶也比没添加纤维素酶最终生成的乙醇浓度略低。据报道，双子叶植物的细胞壁上含有大量的纤维素和果胶，这两种物质交织成网状，具有很好的吸水功能^[54]，因此在添加了纤维素酶的体系里纤维素和果胶形成的网状结构被破坏，释放出一部分水，进而降低了上清液中乙醇的浓度。所以，我们在 30% 的固体含量下不能判定添加了纤维素酶的发酵体系会得到更大的乙醇产量，但至少我们可以判定添加了纤维素酶不会比没添加纤维素酶的发酵效果差。

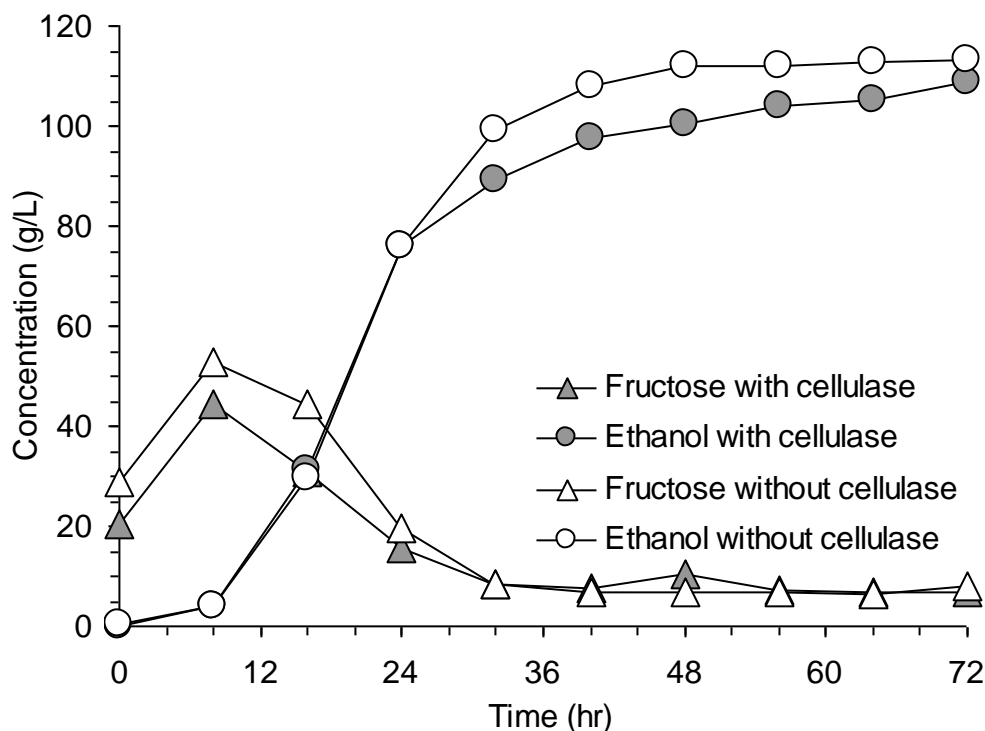


图 3.15 添加少量纤维素酶下 30% 固体含量菊芋的整合生物加工

Fig. 3.15 CBP of Jerusalem artichoke tubers loading 30% (w/w) with a little cellulase addition

3.4.2 添加少量纤维素酶下 35% 固体含量菊芋的同步糖化与发酵

如图 3.16 所示, 在 35% 固体含量条件下, 添加极少量纤维素酶 (0.51 FPU/DM) 的整合生物加工比没添加纤维素酶的情况积累更低的果糖浓度; 添加少量纤维素酶后果糖可以迅速被酵母利用, 40 小时候后基本上没有明显的果糖的积累, 而没有添加纤维素酶的发酵醪中果糖代谢十分缓慢, 72 小时发酵液中积累了约 56 g/L 的果糖。添加极少量纤维素酶后产生的乙醇浓度 (122.1 g/L) 也比没添加纤维素酶的发酵液的乙醇浓度 (101.6 g/L) 高出很多。虽然在添加了纤维素酶的体系里纤维素和果胶形成的网状结构被破坏, 释放出一部分水, 进而降低了上清液中乙醇的浓度, 但最终的到的乙醇浓度仍然比没有添加纤维素酶的体系高出很多, 因此, 在 35% 的超高固体含量发酵体系中添加少量纤维素酶可以大大提高生产乙醇的浓度。

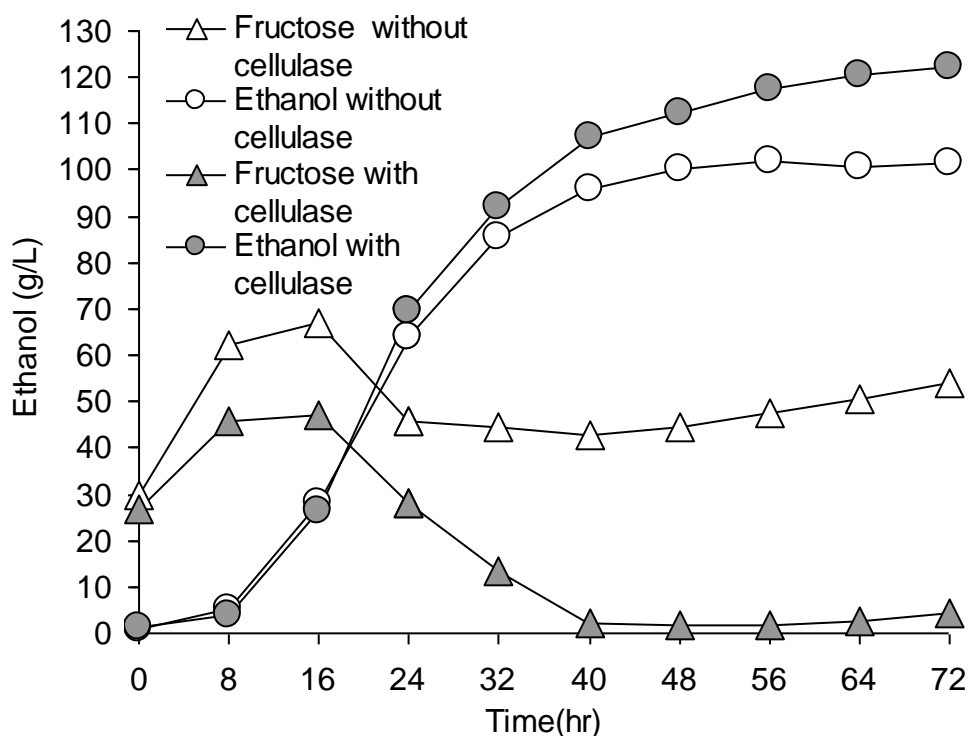


图 3.16 添加少量纤维素酶下 35% 固体含量菊芋的整合生物加工

Fig. 3.16 CBP of Jerusalem artichoke tubers loading 35% (w/w) with a little cellulase addition

3.4.3 添加少量纤维素酶对发酵醪液粘度的影响

粘度均是由 ARES 旋转流变仪 (TA Instruments, Inc., New Castle, DE) 测得。如图 3.17 所示, 没有添加纤维素酶的发醇醪的粘度为 2.34 PaS, 添加了少量纤维素酶 (0.51 FPU/DM) 后粘度为 1.88 PaS, 没有添加纤维素酶的粘度要比添加了少量纤维素酶的发醇醪的粘度高出 24.6%。所以, 添加少量的纤维素酶, 会降低发醇醪的粘度, 改善发醇环境, 故可以促进高固体含量下的乙醇浓度的提高。

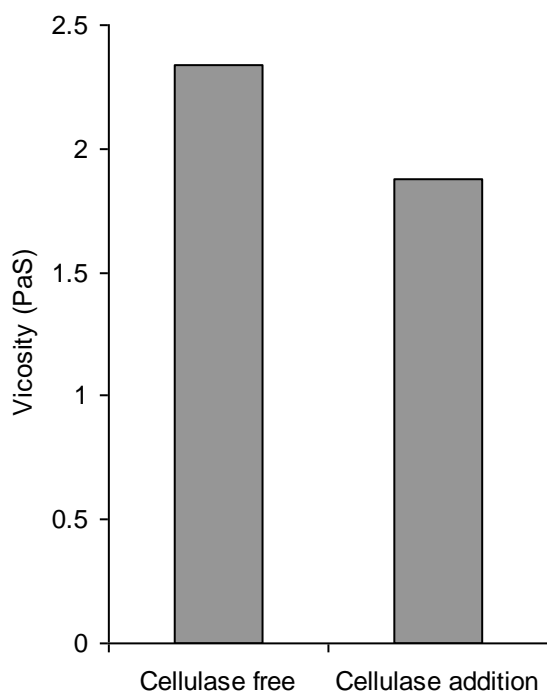


图 3.17 添加和未添加少量纤维素酶的发酵后醪液粘度的对比

Fig.3.17 Viscosity comparison of fermentation broth with or without a little cellulase

3.4.4 添加少量纤维素酶对发酵醪中颗粒粒径的影响

添加极少量纤维素酶可以降低超高固含量菊芋发酵体系的粘度，而发酵醪中颗粒粒径的大小对其粘度影响非常大，因而考察发酵体系中的粒径分布可以对纤维素酶降低菊芋发酵体系粘度的机制有更深刻的认识。菊芋发酵醪的粒度分布是用 Mastersizer 2000 粒度分析仪测定的。如图 3.18 所示，菊芋发酵醪液中的颗粒大小处于 0.1-1000 μm 之间；没有添加纤维素酶的发酵液比添加了纤维素酶的发酵液有更多的粒径大小在 100-1000 μm 之间的颗粒，相反地，添加了纤维素酶的发酵醪比没有添加纤维素酶的发酵醪有更多的粒径大小在 0.1-100 μm 之间的颗粒。因此，添加纤维素酶后，发酵醪中很多大颗粒变成粒径较小的颗粒，进而降低了发酵醪的粘度。

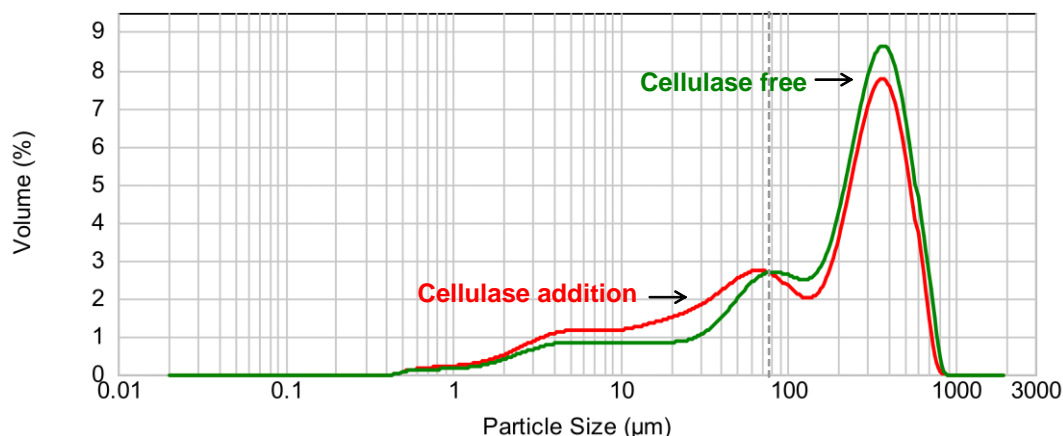


图 3.18 添加少量纤维素酶对发酵醪中颗粒粒径的影响

Fig. 3.18 Particle distribution of fermentation broth with or without a little cellulase

3.5 以菊芋块茎为物料的整合生物加工对比

以菊芋块茎进行高固体含量发酵生产乙醇可以减少大量的糖损耗，而进行整合生物加工可以大大降低酶的成本，因此以菊芋块茎为物料进行整合生物加工是一种很有工业应用潜力的菊芋发酵技术。表 3.2 总结了各种以菊芋块茎为物料的整合生物加工 (CBP) 菌株的发酵情况。所参考文献中的研究都很难生产接近工业生产的乙醇浓度，主要受限于发酵物料的混合或者菌株的耐受能力，而本论文通过使用新型螺带式生物反应器和一株耐受高乙醇浓度的 CBP 酵母 *S. cerevisiae* DQ1，实现了 128.7 g/L 乙醇的生产，这是目前报道中利用菊芋块茎高固体含量下生产得到的最高乙醇浓度。

表 3.2 以菊芋块茎为物料的整合生物加工 (CBP) 菌株

Table 3.2 Consolidated bioprocessing (CBP) strains using Jerusalem artichoke tuber as feedstocks

菌株名称	菌株类型	乙醇浓度	参考文献
<i>K. marxianus</i> ATCC 8554	野生菌株	88.0 g/L	[115]
<i>K. cicerisporus</i> Y179	野生菌株	97.0 g/L	[114]
<i>K. marxianus</i> Y179	野生菌株	94.2 g/L	[116]
<i>S. cerevisiae</i> Y-481	野生菌株	91.0 g/L	[119]
<i>Saccharomyces</i> sp. W0	工程菌	95.5 g/L	[124]
<i>S. cerevisiae</i> KCCM50549	野生菌株	36.2 g/L	[118]
<i>S. cerevisiae</i> DQ1	紫外突变株	128.7 g/L	本论文

第 4 章 结论与展望

4.1 结论

4.1.1 对酿酒酵母 *S. cerevisiae* DQ1 中的菊粉水解酶进行了鉴定、亚细胞定位和生理生化表征。实验结果表明, *S. cerevisiae* DQ1 存在很高的菊粉水解酶酶活并且酶活主要存在于酵母的胞内和周质空间。通过葡聚糖柱层析分离和 SDS-PAGE 蛋白电泳分析发现该酶的分子量大约为 35 kDa。另外, 该酶的最适酶活条件为 pH 5.5 和温度 50 °C, 最适产酶条件为 pH 5.5, 温度 30 °C, 且所用碳源和氮源分别为菊粉和酵母提取物。

4.1.2 酿酒酵母 *S. cerevisiae* DQ1 在新型螺带式生物反应器进行发酵过程中, 发酵条件如不同种子培养基、不同 pH、不同温度和不同固体含量都对其发酵有一定的影响。其中, a. 葡萄糖培养的种子菊粉水解酶酶活最低但更有利于高浓度菊芋乙醇的生产; b. 酿酒酵母适于在偏微酸的环境发酵生产乙醇, pH 5.5 时可以得到最高浓度的乙醇; c. 高温和高乙醇浓度双重毒害作用不利于高浓度乙醇的生产, 适中的温度更有利于高浓度菊芋乙醇的生产, 其中 30 °C 最佳; d. 高固体含量的菊芋发酵可以产生高浓度的乙醇, 但是在超高固体含量 35% 时乙醇的发酵受到了抑制。最佳发酵条件: 葡萄糖培养种子, pH 5.5, 30 °C, 30% 固体含量, 在此发酵条件下的乙醇浓度为 113.5 g/L, 相应得率为 81.5%。

4.1.3 在超高固体含量 35% 下, 乙醇的生产受到严重抑制, 主要原因是超高固体含量的发酵体系粘度很高, 影响发酵体系的传质, 进而影响到酵母菌的生长和发酵能力。针对影响发酵的原因, 主要从改善发酵环境和提高酵母耐受能力两个方面的改进来提高乙醇的生产。a. 通过添加极少量纤维素酶, 降解菊芋细胞壁上的纤维素, 降低颗粒粒径的大小, 进而降低发酵体系的粘度, 该措施将菊芋乙醇的生产浓度提高到了 122.1 g/L; b. 通过分批补料的方式, 对酿酒酵母实现驯化作用, 提高其耐受能力, 解除酵母的生长和发酵抑制, 该措施将菊芋乙醇的生产浓度提高到了 128.7 g/L。

4.1.4 以菊芋块茎为原料发酵生产乙醇, 使用可以进行整合生物加工的菌株进行发酵可以大大降低酶的成本, 因此以菊芋块茎为物料进行整合生物加工是目前菊芋发酵产业中最有工业应用潜力的发酵技术。以前的研究者受限于高固含量条件下发酵物料的混合困难, 或者受限于菌株的乙醇耐受能力, 都很难实现接近工业生产的乙醇浓度。本论文中通过使用新型螺带式生物反应器和一株耐受高乙醇浓度的 CBP 酵母 *S. cerevisiae* DQ1, 实现了最高 128.7 g/L 乙醇的整合生物加工生产。

4.1.5 本论文选用的物料为菊芋, 是一种价格低廉的非粮作物; 以菊芋块茎粉直接进行发酵, 避免了固液分离时的糖损耗, 简化了发酵工艺; 利用可以生产菊粉水解酶的酿酒酵母同步糖化与发酵生产乙醇, 避免另外添加价格不菲的菊粉酶; 使用新型螺带式生物反应器, 使得高固体含量发酵体系得以实现, 提高了生物乙醇的浓度, 为降低后续精馏能耗打下了基础。因此, 本论文综合考虑了生物乙醇生产成本的各个方面, 实现了乙醇

生产的能耗和成本的大幅降低。

4.2 展望

4.2.1 本论文对 *S. cerevisiae* DQ1 中菊粉水解酶的定位, 分子量和一些生理生化特征进行了考察, 对该菊粉水解酶有了一个初步的认识, 但是该酶的作用类型 (内切酶或者外切酶)、存在形式 (单体或者多聚体)、基因的定位以及是否同菊粉酶属于同一家族等还不清楚, 有待于进行深入研究。

4.2.2 本论文在 35% 固体含量体系下实现了高浓度乙醇的生产, 但是乙醇得率从 30% 固体含量下的 81.5% 下降到了 35% 固体含量下的 73.5%, 因此, 我们需要认真权衡由于乙醇浓度的升高降低的精馏能耗与乙醇得率下降导致的成本提高之间的利弊, 需要做一个成本估算, 或者可以尝试通过添加一些氮源或者通入少量氧气的办法来促进细胞膜物质的生成, 提高酵母耐受性, 减少副产物生成, 提高乙醇浓度和得率。

4.2.3 因为酿酒酵母有优良的抑制物和乙醇耐受性, 便于实现高浓度乙醇的生产, 所以现在的研究者们把酿酒酵母选为构建整合生物加工 (CBP) 木质纤维素的平台微生物, 但是现在的工程酵母并不尽如人意。本论文中使用的 *S. cerevisiae* DQ1 实现了菊芋的整合生物加工, 是一个简单的整合生物加工模型, 通过对该酵母的研究或许可以为木质纤维素整合生物加工体系的建立提供借鉴。

4.2.4 以往的研究有利用纤维素酶提取苹果渣或菊芋渣中的果胶的尝试^[125, 126], 但把果胶的酶法提取与其他加工过程分开进行, 浪费人力物力。本论文中通过添加少量纤维素酶实现了超高固体含量菊芋发酵生产高浓度乙醇, 同时自然可以去除菊芋发酵渣中的纤维素, 提高菊芋发酵渣中果胶的含量, 实现果胶提取过程中的关键一步。该过程可以看做是高浓度乙醇生产和果胶提取的过程集成, 据报道, 我国果胶的年需求量在 1500 吨以上, 目前 80% 需要进口, 而且需求量呈增长趋势^[126, 127], 因此, 共同从菊芋中生产燃料乙醇和果胶可以为菊芋燃料乙醇的生产带来额外利润, 对菊芋燃料乙醇产业化很有益处, 但生产的优化条件仍需进一步探索。

参考文献

- [1] Ulusarslan D, Gemici Z, Teke I. Currency of district cooling systems and alternative energy sources. *Energy Educ Sci Technol Part A*. 2009, 23:31-53
- [2] Kan A. General characteristics of waste management: a review. *Energy Educ Sci Technol Part A* 2009, 23:55-69
- [3] Kim S, Dale BE. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass Bioenergy*. 2004, 26:361-75
- [4] Dufey A. Biofuels production, trade and sustainable development: emerging issues. Environmental Economics Programme, Sustainable Markets Discussion Paper No. 2, International Institute for Environment and Development (IIED), London, September, 2006
- [5] Lin Y, Tanaka S. Ethanol fermentation from biomass resources: Current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2006, 69:627-42
- [6] Greenergy International Limited. Bioethanol - A Greenergy perspective, London. 2007
- [7] Ottinger RL. Experience with promotion of renewable energy: successes and lessons learned, parliamentarian forum on energy legislation and sustainable development. Cape Town, South Africa. 2005
- [8] Zarzycki A, Polska W. Bioethanol production from sugar beet - European and Polish perspective. In: The first TOSSIE workshop on technology improvement opportunities in the european sugar industry, Ferrara, Italy, January 25-26, 2007
- [9] Larsson J. A Cost benefit analysis of bioethanol production from cereals in Sweden - a case study approach. MSc Thesis, Cranfield University. 2006
- [10] 于航, 周林, 袁鹏. 中国燃料乙醇产业发展概况. *粮食与食品工业*. 2009, 16(4):34-37
- [11] Bisson LF, Fraenkel DG. Involvement of kinases in glucose and fructose uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983, 80:1730-1734
- [12] Özcan S, Johnston M. Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1999, 63:554-569
- [13] Lagunas R. Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev*. 1993, 10:229-242
- [14] Boles E, Hollenberg CP. The molecular genetics of hexose transport in yeasts. *FEMS Microbiol Rev*. 1997, 21:85-111
- [15] Schaaff I, Heinisch J, Zimmermann FK. Overproduction of glycolytic enzymes in yeast. *Yeast*. 1989, 5:285-290
- [16] Schmitt HD, Zimmermann FK. Genetic analysis of the pyruvate decarboxylase reaction in yeast glycolysis. *J Bacteriol*. 1982, 151:1146-1152

- [17] Gasch, AP. The environmental stress response: a common yeast response to diverse environmental stresses. In: Hohmann, S. & Mager, P.W.H. (eds). Topics in current genetics 1: Yeast stress responses, Springer-Verlag, Berlin, 2003, 11-70
- [18] Henschke, PA. Stuck fermentation: causes, prevention and cure. In: Allen, M., Leske, P.& Baldwin, G. (eds). Proc. Seminar: Advances in Juice Clarification and Yeast Inoculation, Austral. Soc. Vitic. Oenol., Melbourne, Vic. Adelaide SA. 1997, 30-41
- [19] Spayd SE, Andersen-Bagge J. Free amino acid composition of grape juice from 12 *Vitis vinifera* cultivars in Washington. Am J Enol Vitic. 1996, 47:389-402
- [20] Dukes B, Goldspink B, Elliott J, Frane R. Time of nitrogenous fertilization can reduce fermentation time and improve wine quality. In: Rantz, J.M. (ed). Proc. Int. symposium on Nitrogen in Grapes and Wines. Am. Soc. Enol. Vitic., Davis, CA. 1991, 249-254
- [21] Mauricio JC, Valero E, Millan C, Ortega JM. Changes in nitrogen compounds in must and wine during fermentation and biological aging by for yeasts. J Agric Food Chem. 2001, 49:3310-3315
- [22] Casey GP, Ingledew WM. Ethanol tolerance in yeasts. Critic Rev Microbiol. 1986, 13:219-280
- [23] Alexandre H, Charpentier C. Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. J Ind Microb Biotechnol. 1998. 20:20-27
- [24] Walker GM, Maynard AI. Accumulation of magnesium ions during fermentative metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. J Ind Microbiol Tech. 1997, 18:1-3
- [25] Jones RP. Roles of replicative deactivation in yeast-ethanol fermentations. Crit Rev Biotechnol. 1990, 10:205-222
- [26] Viegas CA, Rosa MF, Correia ISA, Novais JM. Inhibition of yeast growth by octanoic and decanoic acids produced during ethanol fermentation. Appl Environ Microbiol. 1989, 55:21-28
- [27] Torrea-Goni D, Ancin-Azpilicueta C. Nitrogen metabolism in Chardonnay musts inoculated with killer strains of *Saccharomyces cerevisiae*. J Biosc Bioeng. 2002, 94:15-22
- [28] Gafner J, Schutz M. Impact of glucose-fructose-ratio on stuck fermentations: Practical experiences to restart stuck fermentations. Vitic Enol Sci. 1996, 51:214-218
- [29] Casey GP, Ingledew WM. Ethanol tolerance in yeasts. CRC Crit Rev Biotechnol. 1986, 13:219-280
- [30] Jakobsen M, Piper JU. Performance and osmotolerance of different strains of lager yeast in high gravity fermentation. MBAA Tech Quart. 1989, 26:56-61
- [31] Thomas KC, Ingledew WM. Production of 21% (v/v) ethanol by fermentation of very high gravity (VHG) wheat mashes. J Ind Microbiol. 1992, 10:61-68
- [32] Bafrcov áP, Kmogrovibov áD, Sl ávikov áI, P ákov áJ, D öm ény Z. Improvement of very

- high gravity ethanol fermentation by media supplementation using *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett.* 1999, 21:337-341
- [33] Pereira FB, Guimarães PMR, Teixeira JA, Domingues L. Optimization of low-cost medium for very high gravity ethanol fermentations by *Saccharomyces cerevisiae* using statistical experimental designs. *Bioresour Technol.* 2010, 101:7856-7863
- [34] Theerarattananoon K, Lin YH, Peng DY. Metabolic heat evolution of *Saccharomyces cerevisiae* grown under very-high-gravity conditions. *Process Biochem.* 2008, 43:1253-1258
- [35] Breisha GZ. Production of 16% ethanol from 35% sucrose. *Biomass Bioenerg.* 2010, 34:1243-1249
- [36] Reddy LVA, Reddy OVS. Rapid and enhanced production of ethanol in very high gravity (VHG) sugar fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: role of finger millet (*Eleusine coracana* L.) flour. *Process Biochem.* 2006, 41:726-729
- [37] Pradeep P, Reddy OVS. Effect of supplementation of malted cowpea (*Vigna unguiculata* L.) flour in the enhancement of yeast cell viability and ethanol production in VHG fermentation. *Asian J Microbiol Biotech Env Sc.* 2008, 10:767-772
- [38] Pereira FB, Guimarães PMR, Teixeira JA, Domingues L. Optimization of low-cost medium for very high gravity ethanol fermentations by *Saccharomyces cerevisiae* using statistical experimental designs. *Bioresour Technol.* 2010, 101:7856-7863
- [39] Bvochora JM, Read JS, Zvauya R. Application of very high gravity technology to the cofermentation of sweet stem sorghum juice and sorghum grain. *Ind Crop Prod.* 2000, 11:11-17
- [40] Nuanpeng S, Laopaiboon L, Srinophakun P, Klanrit P, Jaisil P, Laopaiboon P. Ethanol production from sweet sorghum juice under very high gravity conditions: batch, repeated-batch and scale-up fermentation. *Elect J Biotechnol.* 2011, 14(1). doi:10.2225/vol14-issue1-fulltext-2
- [41] Jones AM, Thomas KC, Ingledew WM. Ethanolic fermentation of blackstrap molasses and sugarcane juice using very high gravity technology. *J Agric Food Chem.* 1994, 42:1242-1246
- [42] Thomas KC, Ingledew WM. Fuel alcohol production: effects of free amino nitrogen on fermentation of very-high gravity wheat mashes. *Appl Environ Microbiol.* 1990, 56:2046-2050
- [43] Thomas KC, Hynes SH, Jones AM, Ingledew WM. Production of fuel alcohol from wheat by VHG technology: effect of sugar concentration and fermentation temperature. *Appl Biochem Biotechnol.* 1993, 43:211-226
- [44] Thomas KC, Dhas A, Rossnagel BG, Ingledew WM. Production of fuel alcohol from hull-less barley by very high gravity technology. *Cereal Chem.* 1995, 72:360-364

- [45] Thomas KC, Ingledew WM. Production of fuel alcohol from oats by fermentation. *J Ind Microbiol.* 1995, 15:125-130
- [46] Ingledew WM, Thomas KC, Hynes SH, McLeod JG. Viscosity concerns with rye mashes used for ethanol production. *Cereal Chem.* 1999, 76:459-464
- [47] Wang S, Thomas KC, Sosulski K, Ingledew WM. Grain pearling and very high gravity (VHG) fermentation technologies for fuel alcohol production from rye and triticale. *Process Biochem.* 1999, 34:421-428
- [48] Bvochora JM, Read JS, Zvauya R. Application of very high gravity technology to the cofermentation of sweet stem sorghum juice and sorghum grain. *Ind Crop Prod.* 2000, 11:11-17
- [49] Devantier R, Pedersen S, Olsson L. Characterization of very high gravity ethanol fermentation of corn mash. Effect of glucoamylase dosage, pre-saccharification and yeast strain. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005, 68:622-629
- [50] Devantier R, Scheithauer B, Villas-Boas SG, Pedersen S, Olsson L. (2005) Metabolite profiling for analysis of yeast stress response during very high gravity ethanol fermentations. *Biotechnol Bioeng.* 2005, 90:703-714
- [51] Wu X, Wang D, Bean SR, Wilson JP. Ethanol production from pearl millet by using *Saccharomyces cerevisiae*. Paper No. 067077, 2006 ASABE annual international meeting, Portland, Oregon. 2006
- [52] Wang FQ, Gao CJ, Yang CY, Xu P. Optimization of an ethanol production medium in very high gravity fermentation. *Biotechnol Lett.* 2007, 29:233-236
- [53] Gibreel A, Sandercock JR, Lan J, Goonewardene LA, Zijlstra RT, Curtis JM, Bressler DC. Fermentation of barley by using *Saccharomyces cerevisiae*: examination of barley as a feedstock for bioethanol production and value-added products. *Appl Environ Microbiol.* 2009, 75:1363-1372
- [54] Srichuwong S, Fujiwara M, Wang X, Seyama T, Shiroma R, Arakane M, Mukojima N, Tokuyasu K. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of very high gravity (VHG) potato mash for the production of ethanol. *Biomass Bioenerg.* 2009, 33:890-898
- [55] Pradeep P, Goud GK, Reddy OVS. Optimization of very high gravity (VHG) finger millet (*ragi*) medium for ethanolic fermentation by yeast. *Chiang Mai J Sci.* 2010, 37:116-123
- [56] Yingling B, Zongcheng Y, Honglin W, Li C. Optimization of bioethanol production during simultaneous saccharification and fermentation in very high-gravity cassava mash. *Antonie van Leeuwenhoek.* 2011, 99:329-339
- [57] Zhang L, Chen Q, Jin Y, Xue H, Guan J, Wang Z, Zhao H. Energy-saving direct ethanol production from viscosity reduction mash of sweet potato at very high gravity (VHG). *Fuel*

Process Technol. 2010, 91:1845-1850

[58] Zhang L, Zhao H, Gan M, Jin Y, Gao X, Chen Q, Guan J, Wang Z. Application of simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from viscosity reducing of raw sweet potato for bioethanol production at laboratory, pilot and industrial scales. Bioresour Technol. 2011, 102:4573-4579

[59] Srikanta S, Jaleel SA, Ghildyal NP, Lonsane BK. Techno-economic feasibility of ethanol production from fresh cassava tubers in comparison to dry cassava chips. Food/Nahrung. 2006, 36:253-258

[60] Jones AM, Ingledew WM. Fuel alcohol production: optimization of temperature for efficient very-high-gravity fermentation. Appl Environ Microbiol. 1994, 60:1048-1051

[61] Lin YH, Chien WS, Duan KJ. Correlations between reduction-oxidation potential profiles and growth patterns of *Saccharomyces cerevisiae* during very-high-gravity fermentation. Process Biochem. 2010, 45:765-770

[62] Rautio JJ, Huuskonen A, Vuokko H, Vidgren V, Londesborough J. Monitoring yeast physiology during very high gravity wort fermentations by frequent analysis of gene expression. Yeast. 2007, 24:741-760

[63] Smogrovicova D, Patkova J, Domeny Z, Navratil M. Improvement in beer fermentation under very high gravity conditions by entrapped yeast. Minerva Biotechnol. 2000, 12:331-336

[64] Patkova J, Smogrovicova D, Domeny Z, Bafrcova P. Very high gravity wort fermentation by immobilised yeast. Biotechnol Lett. 2000, 22:1173-1177

[65] Virkajarvi I, Vainikka M, Virtanen H, Home S. Productivity of immobilized yeast reactors with very-high-gravity worts. J Am Soc Brew Chem. 2002, 60:188-197

[66] Lin YH, Chien WS, Duan KJ, Chang PR. Effect of aeration timing and interval during very-high-gravity ethanol fermentation. Process Biochem. 2011, 46(4):1025-1028

[67] Bayrock DP, Ingledew WM. Application of multi-stage continuous fermentation for production of fuel alcohol by very high gravity fermentation technology. J Ind Microbiol Biotechnol. 2001, 27:87-93

[68] Bai FW, Anderson WA, Moo-Young M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. Biotechnol Adv. 2008, 26:89-105

[69] Lin YH, Bayrock DP, Ingledew WM. Evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* grown in a multi-stage chemostat environment under increasing levels of glucose. Biotechnol Lett. 2002, 24:449-453

[70] Belcher A.. The world looks to higher-tech to advance fuel ethanol production into the 21st century. Int Sugar J. 2005, 107(1275):196-199

[71] 云占友, 白凤武, 冯朴荪. 全面认识谷物原料清液发酵生产酒精. 食品与发酵工业. 1998, 24(1):67-69

- [72] van Zyl WH, Lynd LR, den Haan R, McBride JE. Consolidated bioprocessing for bioethanol production using *Saccharomyces cerevisiae*. *Adv Biochem Engin/Biotechnol.* 2007, 108:205-235
- [73] Banat IM, Nigam P, Singh D, Marchant R, McHale AP. Review: Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part I - Yeasts in general. *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* 1998, 14:809-821
- [74] 胡剑锋, 邱树毅. 菊芋发酵生产酒精的研究进展. *酿酒科技.* 2009, 8:11-15
- [75] Schorgendorfer K, Schwab H, Lafferty RM. Molecular characterization of *Bacillus subtilis* levanase and a C-terminal deleted derivative. *J Biotechnol.* 1988, 7:247-258
- [76] Igarashi T, Takahashi M, Yamamoto A, Etoh Y, Takamori K. Purification and characterization of levanase from *Actinomyces viscosus* ATCC 19246. *Infect Immun.* 1987, 55:3001-3005
- [77] Uchiyama T. Action of *Arthrobacter ureafaciens* inulinase II on several oligofructances and bacterial levans. *Biochim Biophys Acta.* 1975, 397:153-163
- [78] Kim WY, Byun SM, Uhm TB. Hydrolysis of inulin from Jerusalem artichoke by inulinase immobilized on aminoethyl cellulose. *Enzyme Microb Technol.* 1982, 4:39-244
- [79] Cruz-Guerrero A, Garcia-Pena I, Barzana E, Garcia-Garibay M, Gomez-Ruiz L. *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278: A wild inulinase hyperproducing strain. *J. Ferment.Bioeng.* 1995, 80:159-163
- [80] Wenling W, Huiying WW, Shiyuan W. Continuous preparation of fructose syrups from Jerusalem artichoke tuber using immobilized intracellular inulinase from *Kluyveromyces* sp. Y-85. *Process Biochem.* 1999, 34:643-646
- [81] Cazetta ML, Martins PMM, Monti R, Contiero J. Yacon (*Polymnia sanchifolia*) extract as a substrate to produce inulinase by *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. *J Food Eng.* 2005, 66:301-305
- [82] Bajpai P, Margaritis A. Immobilization of *Kluyveromyces marxianus* cells containing inulinase activity in open pore gelatin matrix: 1. Preparation and enzymatic properties. *Enzyme Microb Technol.* 1985, 7:373-376
- [83] Bajpai P, Margaritis A. Characterization of molecular-sieve-bound inulinase. *J Ferment Technol.* 1987, 65:239-242
- [84] Barranco-Florido E, Garcia-Garibay M, Gómez-Ruiz L, Azaola A. Immobilization system of *Kluyveromyces marxianus* cells in barium alginate for inulin hydrolysis. *Process Biochem.* 2001, 37:513-519
- [85] Ettalibi M, Baratti JC. Purification, properties and comparison of invertase, exoinulinases and endoinulinases of *Aspergillus ficuum*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1987, 26:13-20

- [86] Uhm TB, Chung MS, Lee SH, Gourronc F, Housen I, Kim JH, Van Beeumen J, Haye B, Vandenhaute J. Purification and characterization of *Aspergillus ficuum* endoinulinase. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1999, 63:146-151
- [87] Kim CH, Rhee SK. Fructose production from Jerusalem artichoke by inulinase immobilized on chitin. *Biotechnol Lett.* 1989, 11:201-206
- [88] Derycke DG, Vandamme EJ. Production and properties of *Aspergillus niger* inulinase. *J Chem Technol Biotechnol.* 1984, 34:45-51
- [89] Azhari R, Selak AM, Ilan E, Sideman S, Lotan N. Purification and characterization of endo- and exo-inulinase. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1989, 11:105-117
- [90] Chen G, Sun Z, Wang Y, Qian X. Purification and properties of inulinase from *Aspergillus niger*. *Journal of Microbiology.* 1997, 37:362-367
- [91] Nakamura T, Nagatomo Y, Hamada Y, Nishino Y, Ohta K. Occurrence of two forms of extracellular endoinulinase from *Aspergillus niger* mutant 817. *J Ferment Bioeng.* 1994, 84:134-139
- [92] Chiang CJ, Lee WC, Sheu DC, Duan KJ. Immobilization of β -fructofuranosidases from *Aspergillus* on methacrylamide-based polymeric beads for production of fructooligosaccharides. *Biotechnol Progr.* 1997, 13:577-582
- [93] Skowronek M, Fiedurek J. Selection of biochemical mutants of *Aspergillus niger* resistant to some abiotic stresses with increased inulinase production. *J Appl Microbiol.* 2003, 95:686-692
- [94] Kochhar A, Gupta AK, Kaur N. Purification and immobilization of inulinase from *Aspergillus candidus* for producing fructose. *J Sci Food Agric.* 1999, 79:549-554
- [95] Arand M, Golubev AM, Neto JRB, Polikarpov I, Wattiez R, Korneeva OS, Eneyskaya EV, Kulminkaya AA, Shabalin KA, Shishliannikov SM, Chepurnaya OV, Neustroev KN. Purification, characterization, gene cloning and preliminary X-ray data of the exo-inulinase from *Aspergillus awamori*. *Biochem J.* 2002, 362:131-135
- [96] Kaur A, Sharma D, Harchand RK, Singh P, Bhullar SS, Kaur A. Production of a thermostable extracellular inulinase by *Aspergillus fumigatus*. *Indian J Microbiol.* 1999, 39:99-103
- [97] Gill PK, Manhas RK, Singh P. Hydrolysis of inulin by immobilized thermostable extracellular inulinase from *Aspergillus fumigatus*. *J Food Eng.* 2006, 76:369-375
- [98] Tanaka K, Uchiyama T, Ito A. Formation of di-D-fructofuranose 1,2':2,3'-dianhydride form by an extracellular inulase of *Arthrobacter ureafaciens*. *Biochim Biophys. Acta.* 1972, 284:248-256
- [99] Kato K, Araki T, Kitamura T, Morita N, Mouri M, Suzuki Y. Purification and properties of a thermostable inulinase (β -D-fructan fructohydrolase) from *Bacillus stearothermophilus*

KP1289. Starch. 1999, 51:253-258

[100] Liebl W, Brem D, Gotschlich A. Analysis of the gene for β -fructosidase (invertase, inulinase) of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* and characterization of the enzyme expressed in *Escherichia coli*. Appl Microbiol Biotechnol. 1998, 50:55-64

[101] Sachs RM, Low CB, Vasavada A, Sully MJ, Williams LA, Ziobro GC. Fuel alcohol from Jerusalem artichoke. California Agriculture. 1981:4-6

[102] Toran-diaz I, Jain VK, Allais JJ, Baratti J. Effect of acid or enzymatic hydrolysis on ethanol production by *Zymomonas mobilis* growing on Jerusalem artichoke juice. Biotechnology Letters. 1985, 7(7):527-530

[103] Favala TE, Allais J, Baratti J. Kinetics of batch fermentations for ethanol production with *Zymomonas mobilis* growing on Jerusalem artichoke juice. Biotechnol Bioeng. 1986, 28(6):850-856

[104] Allais JJ, Torres EF, Baratti J. Continuous production of ethanol with *Zymomonas mobilis* growing on Jerusalem artichoke juice. Biotechnol Bioeng. 1987:778-782

[105] Zhang T, Chi Z, Zhao CH, Chi ZM, Gong F. Bioethanol production from hydrolysates of inulin and the tuber meal of Jerusalem artichoke by *Saccharomyces* sp. W0. Bioresource Technology. 2010, 101:8166-8170

[106] Kazuyoshi O, Shigeyuki H, Toyohiko N. Production of high concentrations of ethanol from inulin by simultaneous saccharification and fermentation using *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. J Appl Environ Microbiol. 1993, 59(3):729-733

[107] Toyohiko N, Yasuko O, Shigeyuki H, et al. Ethanol Production from Jerusalem artichoke tubers by *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. J Ferment Bioeng. 1996, 81(6):564-566

[108] Katarzyna S, Jacek N, Zbigniew C. Use of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed with *Kluyveromyces fragilis* for improved ethanol production from Jerusalem artichoke tubers. Biotechnol Letters. 2004, 26:845-848

[109] Chang B, Yuan W, Zhao X, Bai F. Ethanol production from Jerusalem artichoke juice using self-flocculating yeast. Journal of Biotechnology. 2008, 136S:S269-S275

[110] 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

[111] Duvnjak Z, Kosaric N, Kliza S. Production of alcohol from Jerusalem artichokes by Yeasts. Biotechnol Bioeng. 1982, 24(11):2297-2308

[112] Margaritis A, Bajpai P. Ethanol production from Jerusalem artichoke tubers (*Helianthus tuberosus*) using *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces rosei*. Biotechnol Bioeng. 1982, 24(4):941-953

[113] Rosa MF, Correia IS, Novais JM. Production of ethanol at high temperatures in the

- fermentation of Jerusalem artichoke juice and a simple medium by *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology Letters*. 1987, 9(6):441-444
- [114] Yu J, Jiang J, Zhang Y, Li Y, Liu J. Simultaneous saccharification and fermentation of raw Jerusalem artichoke tubers to ethanol using an inulinase-hydroproducing yeast *Kluyveromyces cicerisporus*. *Journal of Biotechnology*. 2008, 136S:S402-S459
- [115] Yuan WJ, Zhao XQ, Ge XM, Bai FW. Ethanol fermentation with *Kluyveromyces marxianus* from Jerusalem artichoke grown in salina and irrigated with a mixture of seawater and freshwater. *Journal of Applied Microbiology*. 2008, 105:2076-2083
- [116] Yuan WJ, Chang BL, Ren JG, Liu JP, Bai FW, Li YY. Consolidated bioprocessing strategy for ethanol production from Jerusalem artichoke tubers by *Kluyveromyces marxianus* under high gravity conditions. *Journal of Applied Microbiology*. 2012, 112(1):38-44
- [117] Chi ZM, Zhang T, Cao TS, Liu XY, Cui W, Zhao CH. Biotechnological potential of inulin for bioprocesses. *Bioresource Technology*. 2011, 102:4295-4303
- [118] Lim SH, Ryu JM, Lee H, Jeon JH, Sok DE, Choi ES. Ethanol fermentation from Jerusalem artichoke powder using *Saccharomyces cerevisiae* KCCM50549 without pretreatment for inulin hydrolysis. *Bioresource Technology*. 2011, 102:2109-2111
- [119] Barthomeuf C, Regeat F, Pourrat H. High-yield ethanol production from Jerusalem artichoke tubers. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1991, 7:490-493
- [120] 杨利博, 赵卫利, 张桂, 赵国群. 高菊粉酶活酿酒酵母的诱变选育. *中国酿造*. 2010, 218:139-142
- [121] Zhang J, Chu DQ, Huang J, Yu ZC, Dai GC, Bao J. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation at high corn stover solids loading in a helical stirring bioreactor. *Biotechnol Bioeng*. 2010, 105(4):718-728
- [122] Rene S, Louise L, Philipp G. Porosity of the yeast cell wall and membrane. *Journal of Bacteriology*. 1974, 118(2):534
- [123] Phelps CF. The physical properties of inulin solutions. *J Biochem*. 1965, 95:41-47
- [124] Zhang T, Chi Z, Zhao CH, Chi ZM, Gong F. Bioethanol production from hydrolysates of inulin and the tuber meal of Jerusalem artichoke by *Saccharomyces* sp. W0. *Bioresource Technol*. 2010, 101(21):8166-8170
- [125] Shkodina OG, Zeltser OA, Selivanov NY, Ignatov VV. Enzymic extraction of pectin preparation from pumpkin. *Food hydrocolloids*. 1998, 12:313-316
- [126] 辛民昌. 一种从菊芋渣和/或菊苣渣中连续提取果胶、膳食纤维的方法. 中国发明专利. 2009, 专利号: CN 102018202 A
- [127] 张静. 一种用提取菊糖后的废弃物洋姜渣生产果胶的方法. 中国发明专利. 2008, 专利号: CN 101747447 A

致谢

本论文从选题、实验设计、实施到论文撰写都是在导师鲍杰教授的精心指导和帮助下完成的，鲍老师对科研工作的严谨和对教学工作的负责，对我产生了深刻的影响。在实验过程中给予我很多启迪和建议，并时刻关心我的论文进展。在此，谨表示我最真挚的感谢和崇高敬意，在今后的日子里我一定会恪守导师的谆谆教诲，在学习和工作的道路上勤耕不辍。

感谢辛秀娟老师、胡凤仙老师、张建老师和高秋强老师的指导和帮助。

感谢楚德强师兄在各种基本实验技术上对我的悉心指导，在我遇到困难时为我提供的极大帮助及给予我的很多有益的指点。

感谢同级同学赵凯、王玉梅、邢恒维、王远、安克红等和方镇宏、张瑶、涂毅等师弟师妹，正是你们和我一起走过了这段艰难的实验过程，一起分析解决难题，一起分享成功的喜悦。

感谢涂毅、张瑶、方镇宏、崔振阳、李昆、包艳文、吴倩、孟佼和徐洁在菊芋处理上所给予的帮助。

在此我还要特别感谢我父母的支持与鼓励。

再次感谢所有关心和帮助过我的老师、朋友，谢谢你们！