

酿酒酵母 L610 利用菊糖生产乙醇发酵条件的研究

郭小宇, 刘志成, 杨帆*, 李宪臻

(大连工业大学生物工程学院, 辽宁大连 116034)

摘要 以1株能够直接利用菊糖产乙醇的酿酒酵母 L610 为出发菌株, 对其利用菊糖生产乙醇的发酵条件进行了一系列研究。结果表明, L610 最适乙醇发酵温度为 37 °C, 且 40 °C 高温发酵对其产乙醇能力无显著影响; L610 对酸性发酵环境有良好的耐受性, 当发酵液 pH 值降至 3.5 时, 其糖醇转化率及乙醇产量仍保持较高水平; 以 0.025 ~ 0.10 vvm 的通气量通气 12 h 有利于 L610 发酵菊糖产乙醇; L610 对 350 g/L 的高浓度菊糖有良好的转化率, 乙醇浓度和生产强度分别达到 129 g/L 和 1.35 g/(L·h); 当直接以 300 g/L 菊芋粗粉为唯一底物进行发酵时, L610 发酵产乙醇浓度达到 89.6 g/L, 为理论产量的 78.1%。本研究所取得的成果为酿酒酵母一步法发酵菊芋生产乙醇的工业化发展提供参考。

关键词 乙醇; 菊糖; 酿酒酵母; 发酵条件

中图分类号 Q939.97

文献标识码 A

文章编号 1005-7021(2018)04-0041-07

doi:10.3969/j.issn.1005-7021.2018.04.006

Fermentation Conditions of Ethanol Production Using Inulin by *Saccharomyces cerevisiae* L610

GUO Xiao-yu, LIU Zhi-cheng, YANG Fan, LI Xian-zhen

(Coll. of Bio-Engin., Dalian Engin. Uni., Dalian 116034)

Abstract Different fermentation conditions of ethanol production by a capable directly inulin-using *Saccharomyces cerevisiae* strain L610 as a starter were carried out a serial studies. The results showed as follows: the optimum ethanol production temperature by strain L610 was 37 °C, whereas high temperature at 40 °C had no significant effects on the ethanol fermentation capability of L610; L610 showed a good tolerance against acidic circumstances, when pH of fermentation broth declined to 3.5 the sugar-ethanol conversion rate could even remain at a fairly high level, when the fermentation tank was aerated at 0.025-0.10 vvm for 12 h, it was conducive to L610 to ferment inulin to produce ethanol, the concentration and production intensity reached up to 129 g/L and 1.35 g/(L·h) respectively, when crude Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) powder was directly used as the only substratum at 350 g/L, L610 could produce ethanol at concentration as high as 89.6 g/L, which was 78.1% of the theoretical ethanol yield. The outcome achieved in this work had laid a foundation for one-step fermentation of industrial ethanol production using Jerusalem artichoke by *S. cerevisiae* strains.

Keywords ethanol; inulin; *Saccharomyces cerevisiae*; fermentation conditions

研究报告表明, 中国在 2020 至 2030 年的能源消耗中非化石燃料的份额会提高至 44%, 未来 5 年内, 中国燃料乙醇产量需保持近 30% 的增长率才可以实现该目标^[1]。目前乙醇的生产原料主

基金项目: 国家自然科学基金项目(31671796); 辽宁省自然科学基金项目(201602059); 辽宁省高等学校杰出青年学者成长计划(LJQ2015009)

作者简介: 郭小宇 女, 博士研究生。研究方向为微生物和酶工程。Tel: 0411-86318692, E-mail: xiaoguo1987214@126.com

* 通讯作者。女, 博士, 硕士生导师。研究方向为分子微生物学及酶工程。Tel: 0411-86318692, E-mail: yang_fan@dpu.edu.cn

收稿日期: 2017-09-20

要是谷物与甘蔗等粮食作物,这会引起食品价格上升、粮食短缺以及很多环境问题,因此越来越多的研究已经开始致力于非粮食来源原料的探索,如木质纤维素和菊芋等^[2,3]。菊芋作为一种优良的燃料乙醇来源物质,具有抗逆能力强、不与粮食争地、产量高和价格低廉等天然优势^[4,8],因此,利用菊芋作为原材料替代玉米、淀粉生产乙醇,对于实现我国未来能源消耗配比目标、缓解我国能源作物与粮争地的现状意义重大^[9,10]。菊糖是菊芋中的主要碳水化合物组分,是由D-呋喃果糖通过 β -1,2糖苷键相连而成的多聚果糖^[5,11]。目前,仅有少数几类微生物能够直接利用菊糖生产乙醇,但其乙醇生产能力有限^[12-14]。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)在乙醇发酵工业中具有其他菌株无法比拟的优点,如乙醇生产能力强、适合高密度发酵、抗逆性强^[15],是利用菊糖生产乙醇的首选微生物。然而,由于菊糖酶活力较低,自然界中大多数酿酒酵母菌株都不能有效利用菊糖生产乙醇,制约了利用菊糖基生物质生产乙醇的工业化进程^[14,16]。我们在前期工作中从菊芋根际土壤中分离到一株能够直接利用菊糖生产乙醇的酿酒酵母L610,该菌株由于其自身菊糖水解释放关键酶—蔗糖转化酶SUC2的表达量高于其他酿酒酵母菌株^[17],故能够有效利用聚合度小于20的菊糖,其发酵110 g/L菊糖时的乙醇产量为37.2 g/L^[12]。然而,该菌株是否能够耐受高温、低pH及高底物浓度等苛刻的发酵条件,从而应用于菊糖基乙醇的工业化生产仍不清楚。因此,本研究以L610为出发菌株,考察了高温发酵、酸性环境、通气情况及高底物浓度对其发酵菊糖产乙醇性能的影响,同时评估了L610直接利用菊芋粗粉为唯一底物进行乙醇发酵的能力。本研究的开展为酿酒酵母L610的工业化应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种来源 酿酒酵母*Saccharomyces cerevisiae* L610由本实验室筛选并保藏。

1.1.2 培养基 YPD(g/L) 液体培养基:葡萄糖20,蛋白胨10,酵母浸粉10,pH 6.0;发酵培养基:酵母粉10,蛋白胨20, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5,菊糖根据实验设定进行添加。

1.1.3 试剂及仪器 菊糖(Inulin),上海蓝季科技发展有限公司;蛋白胨、酵母粉和琼脂,英国OXOID公司;菊芋粗粉由新鲜菊芋洗净、烘干、研磨制得;其他试剂皆为国产分析纯。AR2140型分析天平及S220型pH计,瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司;HPX-9082ME数显恒温培养箱,上海博迅实业有限公司医疗设备厂;Minitron三层摇床、1L四联式发酵罐,伊孚森生物技术(中国)有限公司;Avanti J-E高速离心机,美国贝克曼库尔特有限公司;6850型气相色谱,美国安捷伦有限公司;JH-752型紫外可见分光光度计,上海菁华科技仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 酿酒酵母L610的发酵培养 挑取酿酒酵母L610斜面保藏菌种1环接种到装有50 mL YPD液体培养基的250 mL三角瓶中,30℃、200 r/min恒温培养24 h。将活化后的种子液以5%的接种量接到装有400 mL发酵培养基的1L四联式发酵罐中进行培养,搅拌转速为200 r/min。

1.2.2 酿酒酵母L610对较高温度的耐受性实验 将酿酒酵母L610接种于初始菊糖质量浓度为200 g/L的发酵培养基中(pH 5.5),分别于30、34、37和40℃条件下进行发酵。每24 h对发酵液中的生物量、残留总糖浓度以及乙醇含量进行测定。

1.2.3 发酵过程中pH值的调控 设置两组实验,考察发酵过程中pH值的控制对乙醇产量的影响。实验组1中,通过添加NaOH使发酵液pH值恒定为5.5;实验组2中,发酵液初始pH值为5.5,发酵过程中不对pH值进行调控。每隔24 h,对发酵液中pH值、生物量、残留总糖浓度和乙醇浓度进行测定。

1.2.4 通气量和通气时间的调控 将酿酒酵母L610以5%的接种量接种于初始菊糖质量浓度为200 g/L的发酵培养基中(pH 5.5),4个发酵罐的通气量分别设定为0、0.025、0.050和0.100 vvm。同时,为了考察通气时间对菌株L610发酵产乙醇的影响,设定通气量0.025 vvm,4个发酵罐通气时间分别设定为12、24、36和48 h。每隔12 h对上述发酵液中的生物量、残留总糖浓度以及乙醇含量进行测定。

1.2.5 高菊糖浓度对酿酒酵母L610产乙醇性能

的影响 将酿酒酵母 L610 接种于初始菊糖质量浓度分别为 100、150、200、250、300、350 和 400 g/L 的发酵培养基中 (pH 5.5), 30 °C 发酵培养, 每 24 h 对发酵液中的生物量、残留总糖浓度以及乙醇含量进行测定。

1.2.6 酿酒酵母 L610 直接利用菊芋粗粉进行产乙醇发酵 挑取酿酒酵母 L610 斜面保藏菌种 1 环接种于只含有 30 g/L 菊芋粗粉的液体培养基中。37 °C、150 r/min 摇瓶振荡过夜培养, 制备种子液。将培养好的种子液以 5% 的接种量分别接种于 3 组装有 200 mL 发酵培养基 (只含有 200 g/L 菊芋粗粉) 的发酵罐中 (命名为 1#、2# 和 3#), 37 °C、450 r/min 下进行培养。发酵 12 h 后, 分别向 3 个发酵罐中补加 18.2、36.4 和 36.4 g 菊芋粗粉; 发酵 24 h 时, 向 3# 发酵液中再补加 18.2 g 菊芋粗粉。经过补料后, 1#、2# 和 3# 发酵液中菊芋粗粉的理论添加总量分别约为 250、300 和 350 g/L。每隔 12 h 对发酵液中的生物量、残留总糖浓度以及乙醇含量进行测定。

1.2.7 分析方法 ①发酵液生物量的测定: 采用比浊法, 将发酵液稀释一定倍数, 测定在 600 nm 波长下的吸光值 (OD_{600})。对照组为相应稀释发酵液于 10 000 g 离心 10 min 后的上清测得的 OD_{600} 。②发酵液残留总糖测定: 取 50 μ L 发酵液 10 000 g 离心 10 min 所得上清液, 加入 50 μ L 0.5 mol/L H_2SO_4 溶液和 400 μ L 水, 沸水浴 30 min 后, 加入 500 μ L 0.1 mol/L NaOH 溶液, 混匀。采用 3,5-二硝基水杨酸法 (DNS)^[17] 测定还原糖浓度。③发酵液中乙醇含量测定: 将发酵液于 10 000 g 离心 10 min。取上清通过 0.22 μ m 滤膜

过滤, 所得滤液进行气相色谱检测。气相色谱操作条件: 进样量 1 μ L, 检测器温度 260 °C。程序升温条件: 75 °C, 保持 5 min, 以 25 °C/min 升至 220 °C, 保持 10 min。

1.2.8 数据统计与分析 数据分析采用 SPSS 20.0 软件。数值表示为平均值 \pm S. D. 并通过单因素方法 (one-way ANOVA) 分析不同样品之间差异的显著性 ($P < 0.05$)。应用 Origin 8.0 软件作图。

2 结果与分析

2.1 酿酒酵母 L610 在较高温度下产乙醇性能的影响

提高酿酒酵母的耐热性以及高温胁迫条件下的发酵性能, 不仅可以减少发酵过程中冷却水的使用量, 节省工业生产成本, 还可以大大提高菊糖产乙醇的同步糖化发酵效率及菊糖基乙醇生产的经济性^[19]。因此, 本研究考察了酿酒酵母 L610 在较高温度下发酵菊糖产乙醇的性能。如表 1 所示, 当 L610 接种于初始菊糖浓度为 200 g/L 的发酵培养基中, 分别于 30、34、37 和 40 °C 条件下进行发酵 48 h 时, 均获得了较高的糖醇转化率。其中, 37 °C 条件下, 糖醇转化率及乙醇生产强度都达到最高值 ($P < 0.05$), 为 L610 最适发酵温度。当发酵温度为 40 °C, 乙醇生产强度虽然较其他条件有所降低, 但仍维持在较高水平。L610 与已报道的酿酒酵母 Y05 耐高温性能一致^[20], 因此, 酿酒酵母 L610 能够耐受较高温度发酵菊糖产乙醇, 适合菊糖基乙醇的工业化生产。

表 1 不同培养温度对 L610 发酵性能的影响

Table 1 The influence of temperature on the performance of ethanol fermentation of *S. cerevisiae* L610

培养温度/°C	OD_{600}	糖醇转化率/(g 乙醇 · (g 总糖) ⁻¹)	乙醇质量浓度/(g · L ⁻¹)	乙醇生产强度/(g · (L · h) ⁻¹)
30	48.50 \pm 1.16	0.42 \pm 0.003 5	69.08 \pm 0.72	1.44 \pm 0.015
34	48.90 \pm 0.88	0.42 \pm 0.001 7	70.10 \pm 1.21	1.46 \pm 0.025
37	46.76 \pm 1.70	0.43 \pm 0.004 7	72.30 \pm 0.36	1.51 \pm 0.008
40	35.10 \pm 0.03	0.42 \pm 0.000 8	61.77 \pm 1.89	1.29 \pm 0.039

2.2 发酵过程中 pH 的调控对酿酒酵母 L610 产乙醇性能的影响

培养环境的 pH 值对细胞中酶反应的正常进

行、蛋白质的正确折叠和功能发挥都十分重要。实际的乙醇发酵工艺中, 由于酿酒酵母产生乙酸等代谢物, 将导致发酵液 pH 值不断降低, 不利于

生物量的积累及乙醇的生产^[21]。而在乙醇工业化生产中,发酵液的体积一般在数吨以上,不易对发酵液的 pH 实施调控。因此,本研究考察了酿酒酵母 L610 对低 pH 值的耐受性及在低 pH 值条件下发酵菊糖产乙醇的能力。

将发酵液初始 pH 值设定为 5.5,其中实验组通过补加 1 mol/L NaOH 调控发酵过程中的 pH 值恒定在 5.5 左右;对照组不对发酵液的 pH 值进行控制。发酵结果如图 1A 所示,对照组在发

酵 12 h 之后,pH 值降至 3.5 左右,其生物量较之实验组有一定的下降($P < 0.05$),证明 pH 值的下降对 L610 的生长有一定的抑制作用。另一方面,虽然对照组的 pH 值下降显著,但发酵液残糖及乙醇产量与实验组相当(图 1B)($P > 0.05$),说明 L610 代谢菊糖的过程对低 pH 环境有一定的耐受力,pH 值的下降并不会影响 L610 发酵菊糖产乙醇的能力。该特性使得 L610 更适于今后在工业化乙醇生产中的应用。

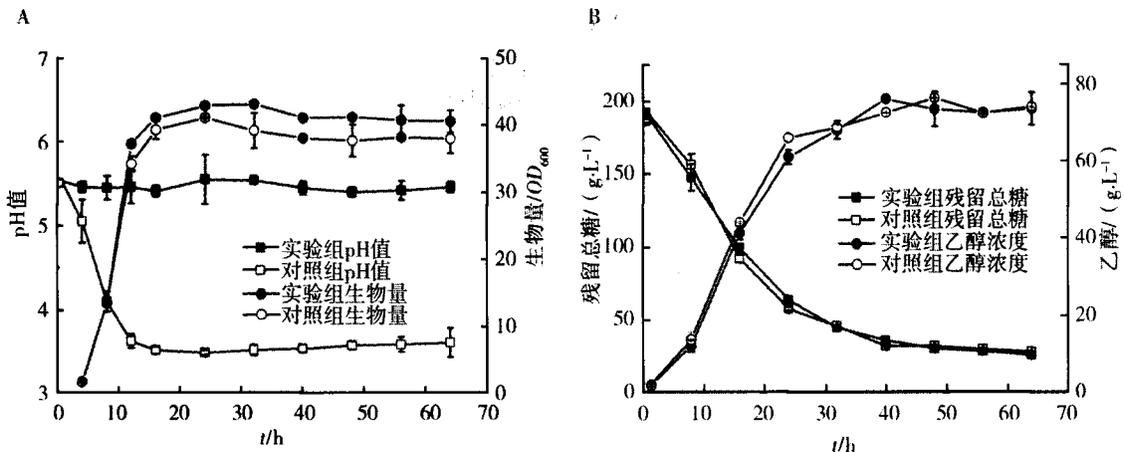


图 1 发酵过程中 pH 值的调控对 L610 发酵产乙醇性能的影响

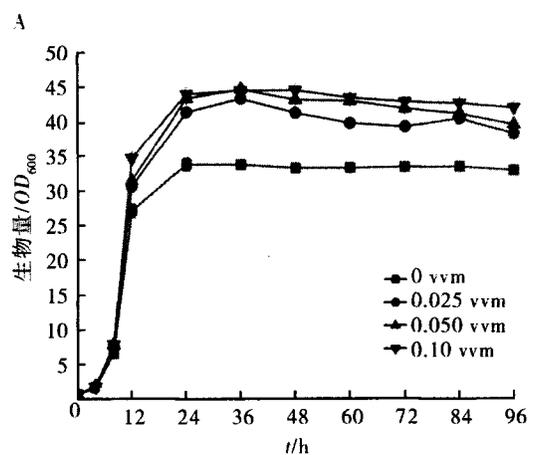
Fig. 1 The influence of pH regulation on the performance of ethanol fermentation of *S. cerevisiae* L610

2.3 发酵罐的通气情况对酿酒酵母 L610 产乙醇性能的影响

乙醇的生产与酵母菌的生长状况紧密关联。而采用适当的通气方式能够通过促进酵母菌生长,进一步增加细胞内菊糖酶活力并提高代谢碳源的水平^[22]。为了考察发酵罐的通气量对酿酒酵母 L610 发酵菊糖产乙醇性能的影响,将 4 个发酵罐的通气量分别设定为 0、0.025、0.050 和 0.100 vvm,每隔 12 h 对发酵液中的生物量、乙醇含量及残留总糖浓度进行测定。

如图 2A 及 2B 所示,通气条件下 L610 的生物量和总糖利用率较之不通气有显著提高($P < 0.05$),说明在厌氧条件下,细胞缺少氧分子协助,细胞活性受到环境胁迫的影响从而减慢了整体代谢速率。同时,由于细胞需要合成对抗该胁迫所需的蛋白质及其他代谢物质,造成碳源分流,从而影响了乙醇产量。然而,由于总通气量差别较小,不同通气量实验组之间的生物量及总糖利用率并无明显差异($P > 0.05$)。在发酵时间为 24

~60 h 时,通气条件下的乙醇产量显著高于不通气条件,而经 60 h 后继续发酵,不通气条件下的乙醇产量反而逐渐升高并超过通气条件下的乙醇产量,而通气量越少,乙醇产量越高(图 2C)($P < 0.05$)。分析原因可能为随着发酵时间的延长,通风所造成的乙醇损失逐渐增多,因此适当控制通气时间将有利于提高乙醇产量。



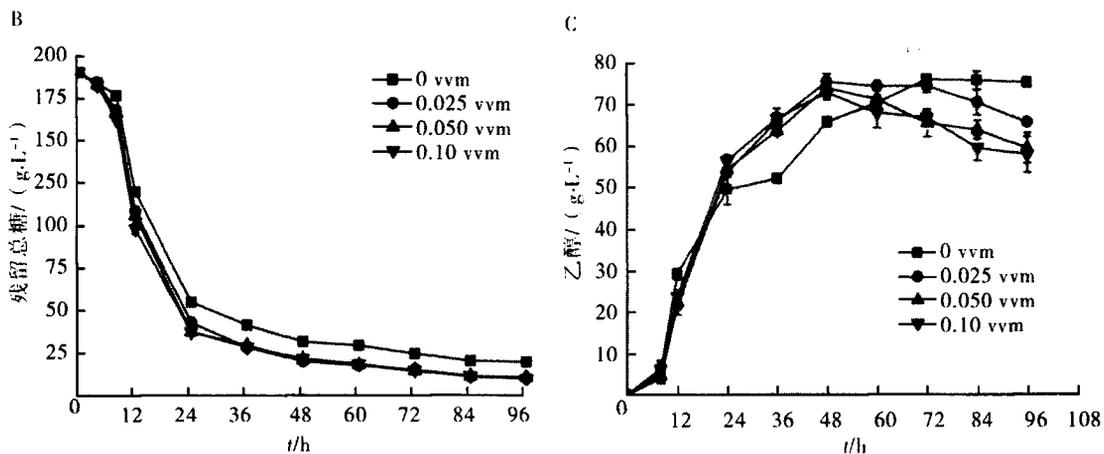


图2 通气量对 L610 发酵菊糖产乙醇性能的影响

Fig. 2 The influence of aeration rates on the performance of ethanol fermentation of *S. cerevisiae* L610

本研究接下来对通气时间与乙醇产量的关系进行了考察。4 联发酵罐(通风量 0.025 vvm)的通风时间分别设定为 12、24、36 和 48 h。发酵 60 h 后生物量、糖醇转化率及乙醇含量如表 2 所示,当通气时间设定为 12 h 时,发酵 60 h

时的生物量相对较低($P < 0.05$),但获得了相对较高的糖醇转化率及乙醇生产强度($P < 0.05$),因此,发酵罐通气时间为 12 h,令细胞较早进入厌氧发酵过程,更有利于 L610 发酵菊糖产乙醇。

表 2 通气时间对 L610 发酵产乙醇性能的影响

Table 2 The influence of aeration time on the performance of ethanol fermentation of *S. cerevisiae* L610

发酵参数	通气时间/h			
	12	24	36	48
生物量/ OD_{600}	39.04 ± 0.78	42.24 ± 0.84	40.76 ± 0.82	42.44 ± 0.85
糖醇转化率/ $(g \text{ 乙醇} \cdot (g \text{ 总糖})^{-1})$	0.43 ± 0.0028	0.40 ± 0.0006	0.37 ± 0.0045	0.39 ± 0.0053
乙醇浓度/ $(g \cdot L^{-1})$	77.7 ± 0.2	73.1 ± 0.2	68.6 ± 3.3	72.2 ± 0.7
乙醇生产强度/ $(g \cdot (L \cdot h)^{-1})$	1.29 ± 0.003	1.22 ± 0.003	1.14 ± 0.055	1.20 ± 0.012

2.4 高浓度菊糖对酿酒酵母 L610 产乙醇性能的影响

发酵高浓度菊糖产乙醇有利于节省能源消耗、劳力输入成本及设备维护费用,同时有利于增加乙醇的生产强度。然而,菊糖浓度过高将会产生不利于菌株生长的诸多因素,如高渗透压及高浓度代谢产物(乙醇、乙酸等)^[23]。因此,为了确定最适菊糖发酵浓度,本研究对一系列高浓度菊糖对酿酒酵母 L610 产乙醇性能的影响进行了考察。

如表 3 所示,当酿酒酵母 L610 在初始菊糖质量浓度为 150 ~ 350 g/L 的培养基中发酵 72 ~ 96 h 分别到达各自最大乙醇浓度时,均能获得较高的生物量,过低或过高的菊糖浓度均不利于菌株的增长。随着发酵培养基中初始菊粉

浓度的提高,所得乙醇的终浓度也会提高($P < 0.05$),但总糖利用率却逐渐降低,该结果可能是由于较高的渗透压以及乙醇等代谢产物导致。当初始菊糖质量浓度为 350 g/L 时,乙醇质量浓度高达 129.42 g/L,该结果较其他文献报道中野生酿酒酵母菌株发酵菊糖产乙醇浓度有显著提高^[16]。从表 3 可以看出,最高的乙醇生产强度($1.55 g/(L \cdot h)$)出现在初始菊糖质量浓度为 300 g/L 的条件下($P < 0.05$),因此,该浓度菊糖比较适合菊糖发酵产乙醇工艺。同时也说明酿酒酵母 L610 是一株适用于菊糖高浓度发酵的优良菌株。当菊糖质量浓度超过 350 g/L 时,高渗透压及高浓度代谢产物导致菌体生长代谢受到抑制,生物量显著降低($P < 0.05$),不利于乙醇生产。

表 3 不同初始菊糖浓度条件下 L610 的发酵性能

Table 3 The performance of ethanol fermentation of *S. cerevisiae* L610 under different initial inulin concentrations

初始菊糖浓度 /(g · L ⁻¹)	培养时间/h	OD ₆₀₀	糖醇转化率 /(g 乙醇 · (g 总糖) ⁻¹)	残糖 /(g · L ⁻¹)	乙醇生产强度 /(g · (L · h) ⁻¹)
100	48	40.38 ± 0.42	0.37 ± 0.000 5	5.97 ± 0.43	0.74 ± 0.001
150	72	49.80 ± 3.14	0.41 ± 0.001 1	15.48 ± 0.88	0.82 ± 0.002
200	72	53.55 ± 2.93	0.42 ± 0.001 9	23.86 ± 0.95	1.10 ± 0.005
250	72	55.77 ± 4.12	0.40 ± 0.009 1	34.78 ± 1.91	1.32 ± 0.021
300	72	51.81 ± 0.64	0.39 ± 0.005 3	46.92 ± 1.76	1.55 ± 0.022
350	96	50.04 ± 0.17	0.39 ± 0.001 8	60.55 ± 1.59	1.35 ± 0.006
400	96	43.35 ± 2.42	0.33 ± 0.017 4	102.80 ± 2.37	1.32 ± 0.069

2.5 酿酒酵母 L610 直接利用菊芋粗粉发酵产乙醇

为了实现酿酒酵母 L610 直接利用菊芋为碳源进行乙醇发酵,将新鲜菊芋切片、烘干并研磨成菊芋粗粉,制备成 200 g/L 菊芋粗粉为唯一组分的发酵培养基,37 °C、450 r/min 下进行 L610 的发酵罐培养,过程中不对 pH 值进行调控。在发酵过程中分别向三组发酵罐添加一定量的菊芋粗粉,使得补料后三组发酵罐中菊芋粗粉的理论添加总量分别为 250(1#)、300(2#)和 350 g/L(3#)。

发酵结果如图 3 所示,1#、2#和 3#实验组中,相应菊芋粗粉中总糖的利用率分别为 86.0%、84.0%和 73.3%(图 3A),乙醇质量浓

度分别于 60、60 和 72 h 达到相对最高值,分别为 69.0、89.6 和 92.0 g/L,分别相当于理论产量的 72.2%、78.1%和 68.7%(图 3B)。该结果表明,在 L610 以菊芋粗粉为碳源的发酵过程中适当地补加菊芋粗粉可以提高乙醇产量和糖醇转化率。但补料过多时,会造成培养基的粘度急剧上升,反而不利于菌体对于菊芋粗粉的降解和利用。已有文献报道酿酒酵母菌株 KC-CM50549 能够直接利用菊芋粗粉进行乙醇生产,当该菌株利用 180 g/L 菊芋粗粉进行发酵罐培养 36 h 时,乙醇产量为 36.2 g/L,达到理论产量的 70%^[23]。与之相比,L610 表现出更好的发酵性能,更适合工业化发酵菊芋粗粉生产乙醇。

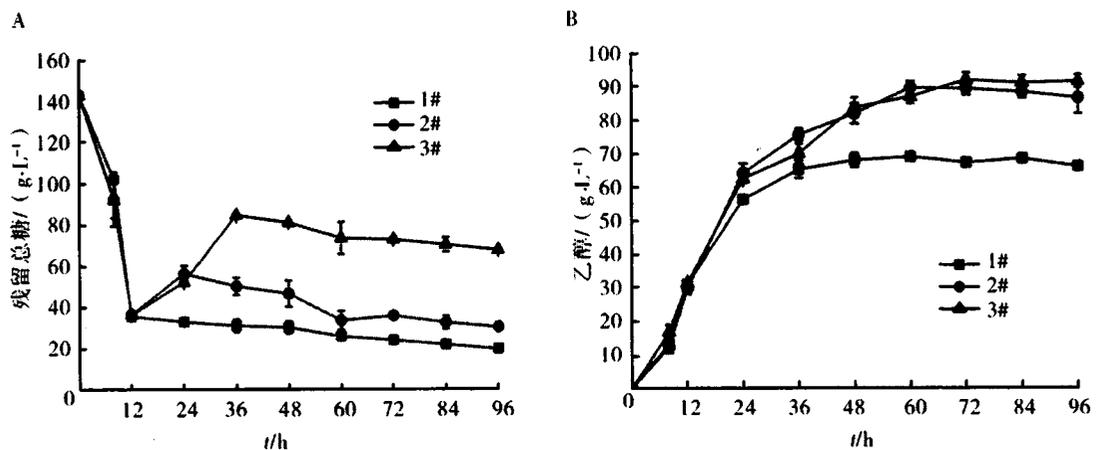


图 3 酿酒酵母 L610 以菊芋粗粉为原料发酵产乙醇结果

Fig. 3 Ethanol production by *S. cerevisiae* L610 using Jerusalem artichoke powder as substrate

3 讨 论

能够耐受乙醇工业化生产过程中的苛刻条件是实现酿酒酵母一步法发酵菊芋生产乙醇的关键因素。本研究以实验室前期分离获得的一株能够直接利用菊糖生产乙醇的酿酒酵母 L610 为出发菌株,考察了不同发酵条件对 L610 发酵菊糖产乙醇性能的影响。结果表明,高温、偏酸性及高底物浓度条件下酿酒酵母 L610 能够较好地生长,其产乙醇能力仍处于较高水平。适当的通气量和通气时间能够有效增加 L610 发酵菊糖产乙醇的生产强度。L610 能够直接利用高浓度菊芋粗粉为唯一底物进行发酵,其产乙醇能力约为理论产量的 78.1%。本研究所取得的结果证明,酿酒酵母 L610 具有一步法发酵菊芋生产乙醇的优良性能,且适用于乙醇的工业化生产。然而,L610 对菊芋粗粉中糖的利用能力仍然有限,这将制约该菌株转化菊芋粗粉生产乙醇能力的进一步提高。因此,今后的工作还需通过基因工程、酶工程及发酵工程手段,加强 L610 对菊芋粗粉中碳源的利用效率。

参考文献:

- [1] Bp. BP Energy Outlook[R]. London: BP p. l. c. 2014; doi: 10. 5555/jan. 010a. 2013.
- [2] Wang D, Li F, Wang S. Engineering a natural *Saccharomyces cerevisiae* strain for ethanol production from inulin by consolidated bioprocessing[J]. *Biotechnol Biofuels*, 2016, 9(1): 96.
- [3] Dziugan P, Balcerak M, Binczarski MJ, et al. Ozonation as an effective way to stabilize new kinds of fermentation media used in biotechnological production of liquid fuel additives[J]. *Biotechnol Biofuels*, 2016, 9(1): 150.
- [4] 黄玉玲, 隆小华, 刘兆普, 等. 酿酒酵母和克鲁维酵母发酵菊芋生产燃料乙醇[J]. *生态学杂志*, 2012, 31(12): 3187-3192.
- [5] 华艳艳, 赵鑫, 赵金, 等. 圆红冬孢酵母发酵菊芋块茎产油脂的研究[J]. *中国生物工程杂志*, 2007, 27(10): 59-63.
- [6] Onsoy T, Thanonkeo P, Thanonkeo S, et al. Ethanol production from Jerusalem artichoke by *Zymomonas mobilis* in batch fermentation[J]. *KMITL Sci Tech J*, 2007, 7(S1): 55-60.
- [7] Chi ZM, Zhang T, Cao TS, et al. Biotechnological potential of inulin for bioprocesses [J]. *Bioresour Technol*, 2011, 102(6): 4295-4303.
- [8] Xue C, Zhang X, Wang J, et al. The advanced strategy for enhancing biobutanol production and high-efficient product recovery with reduced wastewater generation[J]. *Biotechnol Biofuels*, 2017, 10(1): 148.
- [9] 周正, 曹海龙, 朱豫, 等. 菊芋替代玉米发酵生产乙醇的初步研究[J]. *西北农业学报*, 2008, 17(4): 297-301.
- [10] 程序. 现代生物能源第二波研发和产业化浪潮[J]. *中外能源*, 2014, 19(4): 16-22.
- [11] Zhang T, Chi Z, Zhao CH, et al. Bioethanol production from hydrolysates of inulin and the tuber meal of Jerusalem artichoke by *Saccharomyces* sp. W0[J]. *Bioresour Technol*, 2010, 101(21): 8166-8170.
- [12] Yang F, Liu Z, Dong W, et al. Ethanol production using a newly isolated *Saccharomyces cerevisiae* strain directly assimilating intact inulin with a high degree of polymerization[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2013, 61(4): 418-425.
- [13] Chi Z, Chi Z, Zhang T, et al. Inulinase-expressing microorganisms and applications of inulinases[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 82(2): 211-220.
- [14] Yuan B, Wang SA, Li FL. Expression of exoinulinase genes in *Saccharomyces cerevisiae* to improve ethanol production from inulin sources [J]. *Biotechnol Lett*, 2013, 35(10): 1589-1592.
- [15] 何秀萍. 国内酿酒酵母分子遗传与育种研究 40 年[J]. *微生物学通报*, 2014, 41(3): 450-458.
- [16] Lim SH, Ryu JM, Lee H, et al. Ethanol fermentation from Jerusalem artichoke powder using *Saccharomyces cerevisiae* KC-CM50549 without pretreatment for inulin hydrolysis[J]. *Bioresour Technol*, 2011, 102(2): 2109-2111.
- [17] Yang F, Liu Z, Wang X, et al. Invertase Suc2-mediated inulin catabolism is regulated at the transcript level in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14(1): 1-10.
- [18] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. *Anal Chem*, 1959, 31(3): 426-428.
- [19] Benjaphokee S, Hasegawa D, Yokota D, et al. Highly efficient bioethanol production by a *Saccharomyces cerevisiae* strain with multiple stress tolerance to high temperature, acid and ethanol [J]. *New Biotechnol*, 2012, 29(3): 379-386.
- [20] 胡毅, 周艳华, 赵国群. 发酵条件对一步法发酵菊芋生产乙醇的影响[J]. *中国酿造*, 2012, 31(5): 78-82.
- [21] 冯文婧, 杜宇辉, 刘家亨, 等. 一株耐受低 pH、高浓度乳酸及琥珀酸菌株的筛选与鉴定[J]. *微生物学通报*, 2014, 41(11): 2171-2181.
- [22] 蒋凯, 伍时华, 赵东玲, 等. 通气量对酿酒酵母 GGSF16 高浓度乙醇发酵的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2015, 41(5): 35-40.
- [23] 彭邴. 高糖胁迫下酿酒活性干酵母的耐性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2011.