

耐高温东方伊萨酵母乙醇发酵特性

王风芹, 汪媛媛, 陶西, 张瑞, 谢慧, 宋安东*

(河南农业大学生命科学院, 农业部农业微生物酶工程重点实验室, 郑州 450002)

摘要: 燃料乙醇作为一种可再生清洁能源, 越来越受到人们的广泛关注, 选育出一株耐高温乙醇发酵菌株对于提高乙醇发酵效率、降低能耗和生产成本具有重要意义。该文对分离自烟叶腐解物中的耐高温乙醇发酵菌株 HN-1 进行生理生化特性试验及分子生物学鉴定, 并对其发酵特性进行初步研究。结果表明: HN-1 菌株为东方伊萨酵母, 能够利用葡萄糖和果糖发酵生产乙醇, 但不能利用木糖、半乳糖等。该菌株的最适生长温度为 38℃, 乙醇发酵的合适温度范围为 38~45℃, 且随着发酵温度的升高, 乙醇生成速率加快, 发酵时间缩短。38℃乙醇发酵的最适葡萄糖浓度为 120 g/L, 乙醇产量为 58.19 g/L, 乙醇产率为 0.460 g/g。利用玉米秸秆水解液发酵, 乙醇产量为 20.74 g/L, 乙醇产率为 0.468 g/g, 达到葡萄糖理论转化率的 91.6%。该研究为生物乙醇的高温发酵提供了宝贵的菌种资源和技术支撑。

关键词: 发酵; 秸秆; 乙醇; 菌种鉴定; 东方伊萨酵母

doi: 10.3969/j.issn.1002-6819.2014.03.024

中图分类号: TK6

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2014)-03-0180-08

王风芹, 汪媛媛, 陶西, 等. 耐高温东方伊萨酵母乙醇发酵特性[J]. 农业工程学报, 2014, 30(3): 180-187. Wang Fengqin, Wang Yuanyuan, Tao Xi, et al. Ethanol fermentation characteristics of thermotolerant *Issatchenkia orientalis*[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2014, 30(3): 180-187. (in Chinese with English abstract)

0 引言

随着全球环境恶化和能源危机日益加剧, 能源问题成为国家安全和经济社会可持续发展的焦点。纤维乙醇因其原料来源广泛、清洁、可再生的特点被认为是 21 世纪发展循环经济的有效途径^[1]。乙醇高温发酵不仅可以降低发酵过程中的水耗和能耗, 而且可以解决糖化与发酵温度不协调的矛盾, 实现纤维乙醇的同步糖化发酵, 提高原料水解率和设备利用率, 缩短发酵周期, 达到降低生产成本的目的。然而传统乙醇发酵菌株的最适发酵温度在 28~33℃之间, 一般不超过 36℃^[2]。因此, 耐高温酵母菌种的分离选育研究一直都是国内外乙醇发酵研究的热点问题之一。田沈等^[3]经高温驯化得到一株麦芽糖假丝酵母菌株 Y8, 该菌株在 46℃下进行纤

维乙醇的同步糖化发酵, 最终乙醇浓度为 13.93 g/L。徐大鹏等^[4]筛选出一株耐高温酵母, 在 41℃、初始糖质量浓度 93 g/L 的条件下, 乙醇产率为 93%。Kwon 等^[5]利用 *Issatchenkia orientalis* IPE100 在 42℃条件下进行甜高粱秆固态发酵, 乙醇转化率达到理论值的 90.9%; 发酵玉米秸秆蒸汽爆破水解液时, 乙醇产量可以达到理论产值的 93.8%^[6]。刘秀颖等^[7]通过化学诱变和遗传重组方法获得的重组酿酒酵母 T44-2, 40 和 43℃发酵时, 乙醇产量分别达到 91.2 和 69.2 g/L。目前, 纤维乙醇高温发酵研究虽然已经取得了一定进展, 但是纤维水解液成分复杂, 目前成功应用于工业化生产的高温菌株并不多, 如果可以在提高温度耐受性的同时提高对高浓度还原糖的利用速率, 可进一步推动乙醇高温发酵技术的发展。

本文对分离自烟叶腐解物的一株耐高温酵母菌株进行了鉴定, 并研究了发酵温度、葡萄糖浓度等对菌体生长和乙醇发酵的影响, 以为乙醇高温发酵提供宝贵的菌种资源, 为该菌株的工业化应用提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 菌种

酵母菌株 HN-1, 由河南农业大学微生物能源工程研究室分离保存。

收稿日期: 2013-05-15 修订日期: 2013-12-21

基金项目: 863 计划生物和医药技术领域国家科技计划课题(子课题)(2012AA022301B); 河南省省院科技合作专项资金项目(102106000018); 国家级大学生创新创业训练计划项目(201310466009)

作者简介: 王风芹(1976-), 女, 河南安阳人, 博士, 副教授, 研究方向为生物质能源工程、微生物资源开发与利用等。郑州 河南农业大学生命科学院, 450002。Email: w_fengqin@163.com。

*通信作者: 宋安东(1972-), 男, 河南洛阳人, 博士, 教授, 研究方向为生物质能源工程、发酵工程等。郑州 河南农业大学生命科学院, 450002。Email: songl666@126.com

1.2 培养基

1.2.1 菌种活化培养基

葡萄糖 20 g, 酵母浸粉 10 g, 蛋白胨 20 g, 固体培养基加入琼脂粉 20 g, 蒸馏水定容至 1 L, 115℃ 灭菌 15 min。

1.2.2 发酵培养基

葡萄糖乙醇发酵培养基: 葡萄糖 50~150 g, 酵母粉 3 g, 蛋白胨 5 g, 尿素 0.2 g, 磷酸氢二铵 0.1 g, 蒸馏水定容至 1 L, pH 值 5.5, 115℃ 灭菌 15 min。

纤维水解液发酵培养基: 酵母粉 3 g/L, 蛋白胨 5 g/L, 尿素 0.2 g/L, 磷酸氢二铵 0.1 g/L, 玉米秸秆水解液 1 L, pH 值 5.5, 115℃ 灭菌 15 min。

玉米秸秆水解液的制备: 称取粉碎至 10 目的玉米秸秆 15 g 置于 300 mL 三角瓶中, 添加质量分数为 1% 的稀硫酸 120 mL (质量体积比=1:8), 搅拌均匀并于 121℃ 预处理 60 min。冷却至室温后用 10 mol/L NaOH 调 pH 值至 4.8, 每克干物料添加纤维素酶 10 U (滤纸酶活, filter paper activity, FPA)、木聚糖酶 200 U, 于 48℃, 120 r/min 振荡水解, 每 12 h 补稀酸预处理后的水洗烘干物料 5 g, 共 4 次, 每补 2 次干料同时补加 1 次酶, 结束糖化后用布氏漏斗过滤, 除去未糖化的秸秆残渣, 得玉米秸秆水解液。

1.3 菌种鉴定

生理生化试验: 参照文献[8]、[9]。

系统发育研究: DNA 提取方法采用苯酚/氯仿/异戊醇法, 具体方法参照文献[10]。18S rDNA 引物: 由上海生工生物工程公司合成。上游引物: 5'-GATVVGTGCCAGTAGTCATATG-3'; 下游引物: 5'-GCGCGTCTTCATCGATGC-3'。PCR 反应体系: 10×Reaction Buffer 5.0 μL, dNTPs (10 mmol/L) 1.0 μL, 正向引物 (10 μmol/L) 2.0 μL, 反向引物 (10 μmol/L) 2.0 μL, Taq 聚合酶 (5 U/μL) 0.5 μL, 模板 DNA 1.5 μL, 补加超纯水至 50 μL。PCR 扩增体系: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 52.8℃ 45 s, 72℃ 50 s, 30 个循环; 72℃ 10 min。Taq 聚合酶等试剂购自天根生化科技有限公司。

琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物片段长度与质量, 送上海生工生物工程公司测序, 测序所得序列和 GenBank 中获得的参比菌株的相应基因序列进行比对分析。

1.4 乙醇发酵

菌种活化: 将 HN-1 菌种接种至斜面培养基, 38℃ 培养 48 h 后, 取 3 环斜面活化菌种至装有 50 mL 液体活化培养基的 250 mL 三角瓶中, 38℃、

180 r/min 摇床培养 10 h。

乙醇分批发酵: 300 mL 三角瓶中配制葡萄糖乙醇发酵培养基并灭菌, 按体积分数为 10% 接种量接入预先培养好的酵母种子液, 总装液量为 240 mL, 试验设计相应温度下静置发酵, 每 12 h 取样测定菌体细胞干质量、乙醇及葡萄糖浓度。

间歇补料乙醇分批发酵: 第 1 种间歇补料发酵的初始糖质量浓度为 45 g/L, 于发酵的 24、48、72 和 96 h 分别补加 20 g/L 葡萄糖进行乙醇发酵; 第 2 种间歇补料发酵的初始糖浓度为 55 g/L, 分别在每 36、72 和 108 h 补加 20 g/L 葡萄糖进行乙醇发酵。初始装液量为 210 mL, 其他发酵条件同分批发酵。

1.5 测定方法

1.5.1 菌体细胞干质量测定

取发酵液 2 mL, 9 000 r/min 离心 10 min, 液体部分留样测定葡萄糖及乙醇浓度, 细胞沉淀用质量分数 0.85% NaCl 水洗 2 次后重悬浮, 用分光光度计测定 660 nm 处吸光值, 利用吸光值与菌体细胞干重标准曲线 ($y=1.4938x+0.0098$, $R^2=0.9993$) 换算细胞干质量。

1.5.2 菌体活细胞比例的测定

取稀释后的发酵液与适量美兰染液混合, 用血球计数板镜检计数死细胞与活细胞数目, 活细胞比例=活细胞数/(活细胞数+死细胞数)。

1.5.3 乙醇及葡萄糖、木糖浓度的测定

乙醇浓度使用气相色谱仪 (Agilent technologies 7890A GC System) 进行测定, 色谱柱: DB-FFAP (30 m×0.32 mm×1 μm); 检测器: FID (250℃); 进样温度: 200℃; 柱温: 60℃; 氮气: 25 mL/min; 氢气: 40 mL/min; 空气: 45 mL/min。

葡萄糖和木糖的浓度测定采用 P680 高效液相色谱 (DiodeX) 进行测定, 检测器: RI 101 示差折光 (Shodex) 检测器; 色谱柱: Xbridge Amide 3.5 (4.6 mm×250 mm, Waters); 流动相: $V_{乙醇}:V_{水}=8:2$, 流速: 0.8 mL/min, 柱温: 35℃。

1.5.4 数据分析

试验数据结合 DPS v7.05 软件处理系统进行显著差异性分析, 其中, 乙醇产率、实际/理论转化率计算公式如下:

$$\text{乙醇产率} = \frac{\text{乙醇浓度} - \text{初始乙醇浓度}}{\text{初始葡萄糖浓度} - \text{残留葡萄糖浓度}}$$

$$\text{实际/理论转化率} = \frac{\text{乙醇产率}}{0.511} \times 100\%$$

式中: 0.511 为 1 g 葡萄糖转化为乙醇的理论产量。

2 结果与分析

2.1 菌种鉴定

HN-1 菌株在液体活化培养基 28℃ 培养 48 h 后, 细胞呈椭圆形, 大小 (3~5) $\mu\text{m} \times$ (5~8) μm 。将菌液稀释涂布于琼脂平板上, 28℃ 培养 48 h, 菌落为乳白色, 直径 4 cm, 中央突起, 能够形成假菌丝。碳源利用情况表明, 该菌株可以利用葡萄糖和 D-果糖进行发酵, 但不能利用木糖、蔗糖等 (表 1)。HN-1 菌株经基因组 DNA 提取和 PCR 扩增, 得到 18S rDNA 部分基因序列, 对菌株 HN-1 及相关参比菌株的 18S rDNA 序列进行比对, HN-1 菌株与 *I. orientalis* 的亲缘关系最近, 序列同源性达 99%, 因此将 HN-1 菌株归为 *I. orientalis*。

表 1 HN-1 菌株发酵糖类试验结果
Table 1 Carbon utilization of strain HN-1

碳源 Carbon source	试验结果 Result	碳源 Carbon source	试验结果 Result
阴性对照	-	糊精	-
葡萄糖	+	可溶性淀粉	-
D-果糖	+	柠檬酸	-
木糖	-	琥珀酸	-
麦芽糖	-	乙醇	-
乳糖	-	甘油	-
D-半乳糖	-	肌醇	-
蔗糖	-	山梨醇	-
D-甘露醇	-	D-纤维二糖	-

注: -为阴性, +为阳性。
Note: -, Negative; +, Positive.

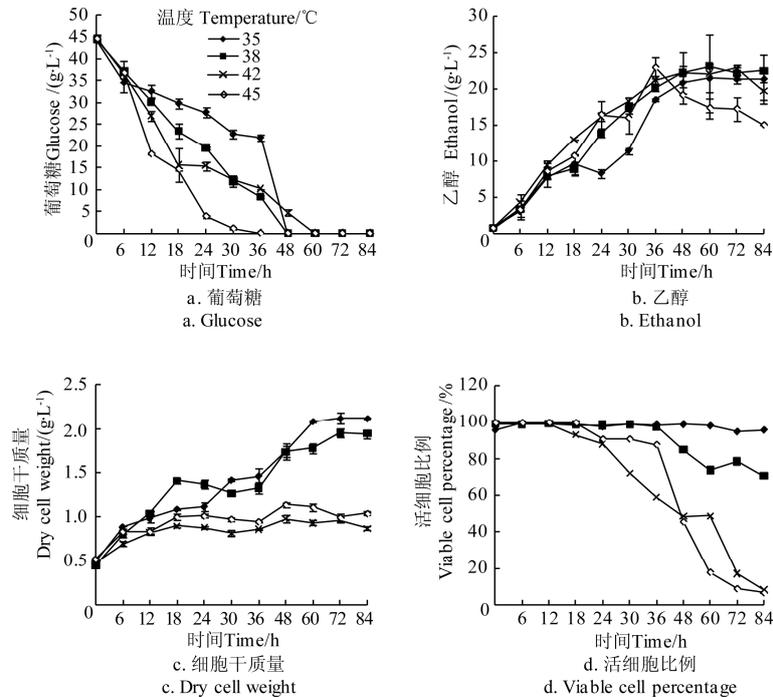


图 1 发酵温度对 HN-1 菌株乙醇发酵过程中葡萄糖消耗、乙醇产量、菌体生长和活细胞比例的影响

Fig.1 Effect of fermentation temperature on glucose consumption, ethanol production, cell growth and percentage of viable cells of strain HN-1 during ethanol fermentation

2.2 发酵特性研究

2.2.1 温度对乙醇发酵的影响

35、38、42 和 45℃ 4 个温度静置发酵结果如图 1 和表 2 所示。当发酵温度为 35 或 38℃ 时, 菌体生长速率和生物量相当, 菌体死亡现象不明显。发酵温度为 42 或 45℃ 时, 菌体生长速率和生物量显著下降, 随着发酵时间的延长, 菌体死亡现象明显 (图 1c、1d)。表明 40℃ 以上的高温不利于菌体的生长和细胞活性的维持。4 个发酵温度下, 乙醇产量分别为 21.43、23.12、22.84 和 22.89 g/L (图 1b, 表 2), 乙醇的最高产量差异不显著, 但随着发酵温度的升高, 葡萄糖利用速率和乙醇生成速率加快 (图 1a, 表 2), 乙醇发酵时间缩短, 分别于发酵的 60、60、48 和 36 h 达到最高 (图 1b)。说明温度的变化对发酵周期影响较大, 温度高, 乙醇生产速率快, 发酵周期短。38℃ 时, 乙醇浓度最高, 而且当温度高于 40℃ 时有较强的菌体致死作用, 因此选用 38℃ 为后期试验的发酵温度。

2.2.2 初始葡萄糖浓度对乙醇发酵的影响

HN-1 菌株发酵不同浓度葡萄糖底物产生乙醇的菌体生长、葡萄糖消耗和乙醇生成情况见图 2 和表 3。4 个浓度梯度下, 菌体均生长稳定, 随着初始糖浓度的提高, 发酵周期延长, 初始葡萄糖浓度为 120 g/L 时乙醇生成速率、葡萄糖利用速率及乙醇的产率均达到最高, 因此认为该菌株适合的初始葡萄糖质量浓度为 120 g/L (如图 2)。

表2 不同发酵温度下 HN-1 菌株乙醇发酵参数
Table 2 Data analysis of strain HN-1 with different fermentation temperature

温度 Temperature/ °C	24h 乙醇生成速率 Ethanol productivity before 24h/(g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	24h 葡萄糖利用率 Glucose utilization rate before 24h/(g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	乙醇产量 Ethanol production/(g·L ⁻¹)	乙醇产率 Ethanol yield/(g·g ⁻¹)	实际/理论转化率 Real/theoretical yield/%
35	0.31±0.03 cB	0.68±0.06 cC	21.43±1.84 aA	0.469	91.8
38	0.54±0.03 bA	1.04±0.01 bBC	23.12±0.35 aA	0.504	98.6
42	0.63±0.03 abA	1.22±0.08 bB	22.84±0.43 aA	0.495	96.9
45	0.65±0.08 aA	1.70±0.08 aA	22.89±1.52 aA	0.497	97.3

注：不同小写字母表示差异达 5%显著水平，不同大写字母表示差异达 1%显著水平，下同。
Note: Different small letters are significantly different at P<0.05, different capital letters are significantly different at P<0.01, the same as below.

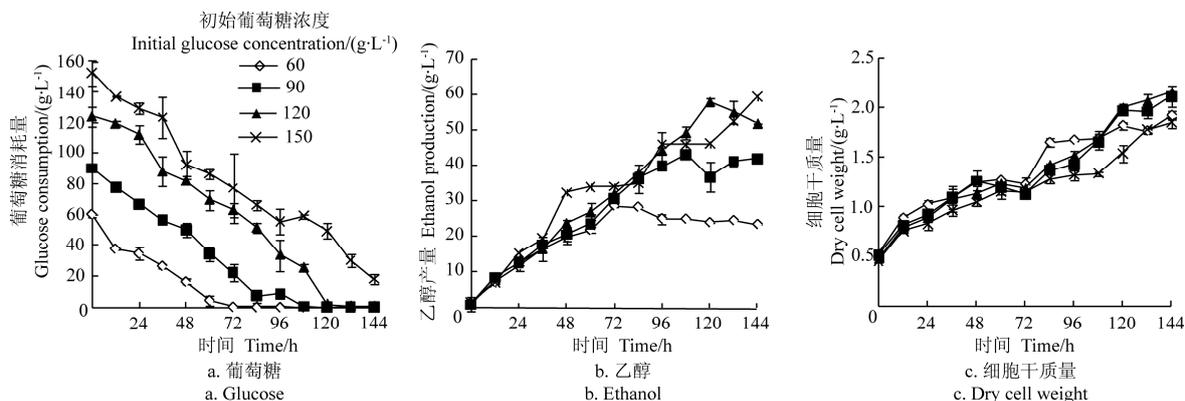


图2 初始葡萄糖浓度对 HN-1 菌株乙醇发酵过程中葡萄糖消耗、乙醇产量和菌体生长的影响
Fig.2 Effect of different glucose concentration on glucose consumption, ethanol production and cell growth of strain HN-1

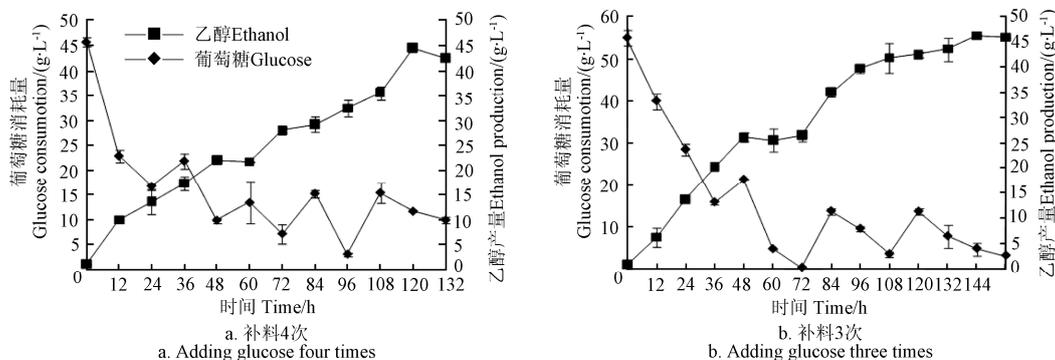
表3 不同初始葡萄糖浓度下 HN-1 菌株乙醇发酵参数
Table 3 Data analysis of strain HN-1 with different glucose concentration

葡萄糖质量浓度 Glucose concentration/ (g·L ⁻¹)	菌体干质量 Dry cell concentration/ (g·L ⁻¹)	乙醇产量 Ethanol production/ (g·L ⁻¹)	乙醇生成速率 Ethanol productivity/ (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	葡萄糖利用率 Glucose utilization rate/(g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	乙醇产率 Ethanol yield (g·g ⁻¹)	实际/理论转化率 Real/theoretical yield/%
60	1.91±0.04	28.77±0.25	0.38±0.06 aA	0.83±0.02 bB	0.457±0.07 aA	89.4
90	2.10±0.10	43.21±0.54	0.39±0.07 aA	0.83±0.03 bB	0.468±0.09 aA	91.6
120	2.15±0.01	58.19±1.05	0.48±0.02 aA	1.02±0.06 aA	0.460±0.02 aA	90.0
150	1.84±0.05	59.53±2.43	0.40±0.07 aA	0.93±0.07 abAB	0.386±0.02 aA	75.6

2.3 分批添加葡萄糖对乙醇发酵的影响

控制总糖浓度在 100 g/L 左右,2 种补料方式下间歇补加葡萄糖进行乙醇发酵,以探索补料对 HN-1 菌株乙醇发酵的影响。结果表明,与分批发酵相比,补料发酵的发酵周期明显延长(图 3),发酵结束

后培养基中有一定的葡萄糖残留。2 种补料发酵策略下,乙醇的产量分别为 44.59 和 46.0 g/L,乙醇产率分别为 0.418 和 0.455 g/g(表 4),低于传统的分批发酵,表明间歇补料发酵不适用于东方伊萨酵母的乙醇发酵。



注：图 a：初始葡萄糖 45 g/L，发酵 24，48，72 和 96 h 分别补加 20 g/L 葡萄糖；图 b：初始葡萄糖 55 g/L，发酵 36，72 和 108 h 分别补加 20 g/L 葡萄糖。
Note: Fig.a: Initial glucose 45 g/L, 20 g/L glucose added at 24, 48, 72, 96 h respectively; Fig.b: Initial glucose 55 g/L, 20 g/L glucose added at 36, 72, 108 h respectively.

图3 HN-1 菌株分批补糖乙醇发酵

Fig.3 Ethanol fermentation of strain HN-1 with fed batch cultivation

表 4 HN-1 菌株分批补糖乙醇发酵参数
Table 4 Data analysis of strain HN-1 by fed batch cultivation

补料方式 Feeding mode	总糖 Total glucose/(g·L ⁻¹)	残糖浓度 Residual glucose/(g·L ⁻¹)	乙醇产量 Ethanol production/(g·L ⁻¹)	乙醇产率 Ethanol yield/(g·g ⁻¹)	实际/理论转化率 Real/theoretical yield/%
a	104.17±0.08	9.84±0.63	44.59±0.07	0.418	81.7
b	99.75±0.18	3.01±0.15	46.04±0.01	0.455	89.0

注: a: 初始葡萄糖 45 g/L, 发酵 24, 48, 72 和 96 h 分别补加 20 g/L 葡萄糖; b: 初始葡萄糖 55 g/L, 发酵 36, 72 和 108 h 分别补加 20 g/L 葡萄糖。
Note: a: Initial glucose 45 g/L, 20 g/L glucose added at 24, 48, 72, 96 h respectively; b: Initial glucose 55 g/L, 20 g/L glucose added at 36, 72, 108 h respectively.

2.4 纤维水解液乙醇发酵

采用稀酸预处理和酶水解的方法制备纤维水解液, 其中初始葡萄糖和木糖的质量浓度分别为 43.08 和 27.13 g/L。HN-1 菌株在发酵 36 h 后乙醇浓度最高为 20.74 g/L (图 4)。发酵过程中葡萄糖消耗明显, 但基本不利用木糖, 乙醇完全由葡萄糖转化得到, 乙醇产率为 0.468 g/g, 为理论转化率的 91.6%, 乙醇生成速率 0.56 g/(L·h)。

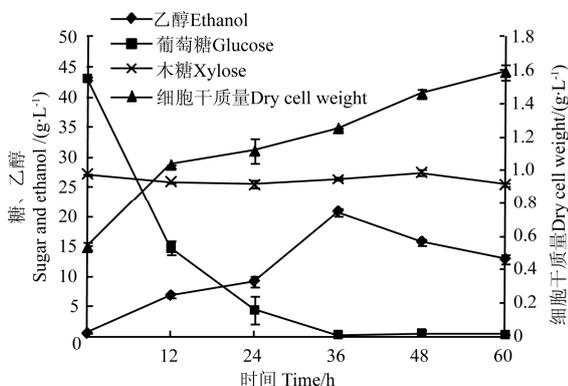


图 4 HN-1 菌株玉米秸秆水解液乙醇发酵

Fig.4 Ethanol fermentation of strain HN-1 with corn straw hydrolysate

3 讨论

酵母菌作为重要的乙醇发酵微生物, 在各个工业领域都有着广泛的应用, 在实际应用过程中, 经常面临高温胁迫影响酵母菌生产效率的问题, 因此, 选育耐高温且发酵性能强的酵母菌株对于工业生产意义重大。本文对实验室分离自烟叶腐解物的酵母菌 HN-1 菌株进行了鉴定和乙醇发酵特性的初步研究, 结果表明, 该菌株为东方伊萨酵母 (*Issatchenkia orientalis*), 在 35~45℃具有良好的发酵性能, 且随着发酵温度的提高, 发酵速率加快, 发酵时间缩短, 但高温不利于菌体生长和活性的维持。该结果与张良等^[2]对酿酒酵母的研究结果相似。今后, 可以通过定向改变酵母菌正常的生活条件, 积累定向变异, 获得生长、代谢稳定的耐高温乙醇酵母驯化菌株^[11]。

在纤维乙醇生产过程中, 蒸馏工艺能耗最大, 占总能耗的 60%~70%^[12], 姜芹等^[13]用 ASPEN 软件模拟发酵液中乙醇浓度对蒸馏能耗的影响, 结果

表明, 当乙醇浓度达到 5.7% 时, 蒸馏能耗较低, 是减少蒸馏成本较合理的乙醇浓度。理论上, 1 g 葡萄糖可以获得 0.511 g 乙醇, 现阶段, 纤维水解液中葡萄糖浓度在 2%~17.5%^[14-15]。由此可以推断高浓度糖发酵是降低纤维乙醇生产成本的关键因素之一。一般认为当葡萄糖质量浓度超过 150 g/L 时, 酵母菌的生长和代谢将会受到抑制, 本文研究结果表明, 当葡萄糖质量浓度为 120 g/L 时, 东方伊萨酵母乙醇发酵性能良好, 将其与近年来已报道的耐高温酵母菌发酵性能相比较可知^[16-20], HN-1 在实际生产中, 可以利用高浓度纤维水解液进行乙醇发酵, 同时避免大幅度温度变化对乙醇发酵性能的影响, 达到降低冷却和蒸馏成本的目的, 实现大宗发酵产品生产的低能耗和低污染, 获得可观的经济效益。

预处理及水解过程使水解液中含有有机酸 (包括甲酸、乙酸和少量的乙酰丙酸等)、糠醛、羟甲基糠醛、糖醛酸、己糖酸和芳香族化合物等有毒化合物^[21], 对微生物生长和代谢具有抑制作用。文献报道, 东方伊萨酵母对纤维水解液中的发酵抑制物具有突出的耐受性和脱毒效果^[22-23]。培养 80 h, 东方伊萨酵母对醋酸 4 000 mg/L、糠醛 400 mg/L、香草醛 90 mg/L、对羟基苯甲酸 40 mg/L、阿魏酸 100 mg/L 和愈创木酚 30 mg/L 的降解率可以达到 100%、100%、100%、14.3%、65.8%、78.6%^[24]。Kwon 等^[25]研究表明, 糠醛、羟甲基糠醛对东方伊萨酵母乙醇发酵产生影响的起始浓度分别为 5.56 和 7.81 g/L, 远高于水解液中的浓度 (糠醛为 0.153 g/L、羟甲基糠醛为 0.215 g/L)。HN-1 菌株同属东方伊萨酵母, 且分离自烟碱等有毒物质含量较高的烟叶腐解物中, 该菌株对木质纤维素水解液中有毒物质的耐受能力尚需进一步确定。

纤维水解液中的糖类以葡萄糖和木糖为主, 如果木糖能够充分发酵, 可以提高 25% 的乙醇产量, HN-1 对木糖无利用, 这极大的制约了其在纤维乙醇工艺中的应用, 针对传统的五碳糖代谢菌株在抑制物的耐受能力方面欠缺的特点, 可以考虑利用代谢工程原理, 通过分子遗传改造来获得木糖发酵能力^[26-27], 但是酵母菌株木糖代谢途径复杂, 有研究表明, 基于代谢途径几个基因的改造虽然得到了新的表型, 但是外源基因的表达水平并不高, 以及木

糖代谢中间产物的积累都会影响最终代谢产物的形成^[28-29]。因此, 现阶段也可以进行酵母菌混合发酵, 以提高水解液中总糖利用率。李丰田等^[30]将可以高效代谢葡萄糖及抑制物的 *S. cerevisiae* 和可以代谢木糖产乙醇的 *P. stipitis* 组成复合物进行联合培养, 乙醇产率为 0.43 g/g, 达到理论值的 85.1%, 脱毒、发酵效果显著。

4 结 论

1) 通过生理生化试验及 18S rDNA 序列分析, 确定 HN-1 菌株为东方伊萨酵母, 可以同化葡萄糖和果糖。

2) 东方伊萨酵母 HN-1 菌体生长最适温度为 38℃, 乙醇发酵的合适温度范围为 38~45℃, 随着发酵温度的升高, 乙醇生成速率加快, 发酵时间缩短。在此条件下发酵 45 g/L 葡萄糖, 乙醇产量为 22.84~23.12 g/L, 达理论转化率的 96.9%~98.6%。

3) 东方伊萨酵母 HN-1 38℃乙醇发酵的最适葡萄糖浓度为 120 g/L, 此时乙醇产量为 58.19 g/L, 乙醇产率为 0.460 g/g, 达理论转化率的 90.0%。

4) 东方伊萨酵母 HN-1 发酵玉米秸秆水解液, 乙醇产量为 20.74 g/L, 乙醇产率为 0.468 g/g, 达葡萄糖理论转化率的 91.6%。

[参 考 文 献]

- [1] 吴彦俊. 约束条件下燃料项目发展的模型及分析框架[J]. 农业工程学报, 2011, 27(1): 261-267.
Wu Yanjun. Model and analytic framework for fuel project development under constraint conditions[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2011, 27(1): 261-267. (in Chinese with English abstract)
- [2] 张良, 靳艳玲, 陈谦, 等. 耐高温酵母高浓度发酵生产燃料乙醇工艺优化[J]. 应用与环境生物学报, 2011, 17(3): 311-316.
Zhang Liang, Jin Yanling, Chen Qian, et al. Optimization of ethanol production by thermotolerant and high alcohol producing yeast using response surface analysis[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2011, 17(3): 311-316. (in Chinese with English abstract)
- [3] 田沈, 任普鲜, 周桂雄, 等. 一株酵母菌高温驯化与同步糖化发酵研究[J]. 太阳能学报, 2011, 32(3): 374-378.
Tian Shen, Ren Puxian, Zhou Guixiong, et al. Characteristics of a thermotolerant strain adapter for ethanol production in SSF[J]. Acta Energiæ Solaris Sinica, 2011, 32(3): 374-378. (in Chinese with English abstract)
- [4] 徐大鹏, 李云杰, 张栩, 等. 耐高温酵母菌的筛选及特性[J]. 生物加工过程, 2011, 9(3): 17-21.
Xu Dapeng, Li Yunjie, Zhang Xu, et al. Screening of thermotolerant yeast and its characteristics[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2011, 9(3): 17-21. (in Chinese with English abstract)
- [5] Kwon Y J, Wang F, Liu C Z. Deep-bed solid state fermentation of sweet sorghum stalk to ethanol by thermotolerant *Issatchenkia orientalis* IPE 100[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(24): 11262-11265.
- [6] Isono N, Hayakawa H, Usami A, et al. A comparative study of ethanol production by *Issatchenkia orientalis* strains under stress conditions[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2012, 113(1): 76-78.
- [7] 刘秀颖, 何秀萍, 卢莹, 等. 基于基因组 DNA 诱变的遗传重组改造乙醇工业酵母的耐热性及发酵性能[J]. 生物工程学报, 2011, 27(7): 1049-1056.
Liu Xiuying, He Xiuping, Lu Ying, et al. Improvement of thermal adaptability and fermentation of industrial ethanologenic yeast by genomic DNA mutagenesis-based genetic recombination[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2011, 27(7): 1049-1056. (in Chinese with English abstract)
- [8] 张纪忠. 微生物分类学[M]. 上海: 复旦大学出版社, 1990: 414-426.
- [9] 陶贤清, 陶能国. 一株异常汉逊酵母的分离与鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(1): 101-103.
Tao Xianqing, Tao Nengguo. Isolation and identification of a *Hansenula anomala* strain from local wine yeast[J]. Food and Fermentation Industries, 2010, 36(1): 101-103. (in Chinese with English abstract)
- [10] 张会彦, 卢鑫, 马晓燕, 等. 引起酸奶腐败的一株耐热酵母菌的分离及鉴定[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(12): 15-18.
Zhang Huiyan, Lu Xin, Ma Xiaoyan, et al. Isolation and identification of heat-resisting yeasts from deteriorative yogurt[J]. Institute of Food Science and Technology, 2009, 30(12): 15-18. (in Chinese with English abstract)
- [11] 庞会利, 李景原, 秦广雍. 耐高温乙醇酵母的研究现状及进展[J]. 酿酒科技, 2008(2): 99-102.
Pang Huili, Li Jingyuan, Qin Guangyong. Present research situation and progress in heat-resistance ethanol yeast breeding[J]. Liquor-making Science and Technology, 2008(2): 99-102. (in Chinese with English abstract)
- [12] 宋安东, 任天宝, 张百良, 等. 玉米秸秆生产燃料乙醇的经济性分析[J]. 农业工程学报, 2010, 26(6): 283-286.
Song Andong, Ren Tianbao, Zhang Bailiang, et al. Economic analysis for production of fuel ethanol with corn straw[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE),

- 2010, 26(6): 283—286. (in Chinese with English abstract)
- [13] 姜芹, 孙亚琴, 滕虎, 等. 纤维素燃料乙醇技术经济分析[J]. 过程工程学报, 2012, 12(1): 97—104. Jiang Qin, Sun Yaqin, Teng Hu, et al. Techno-economic analysis of cellulosic ethanol[J]. The Chinese Journal of Process Engineering, 2012, 12(1): 97—104. (in Chinese with English abstract)
- [14] Yang M H, Li W L, Liu B B. High-concentration sugars production from corn stover based on combined pretreatments and fed-batch process[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(13): 4884—4888.
- [15] 王晓娟, 冯浩, 王斌, 等. 两步法预处理制备生物质燃料乙醇[J]. 农业工程学报, 2012, 28(5): 194—200. Wang Xiaojuan, Feng Hao, Wang Bin, et al. Investigation of two-step pretreatment method for production of ethanol from lignocellulosic biomass[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2012, 28(5): 194—199. (in Chinese with English abstract)
- [16] Oberoi H S, Babbar N, Sandhu S K, et al. Ethanol production from alkali-treated rice straw via simultaneous saccharification and fermentation using newly isolated thermotolerant *Pichia kudriavzevii* HOP-1[J]. Journal of Industrial Microbiology, 2012, 39(4): 557—566.
- [17] Kwon Y J, Ma A Z, Li Q, et al. Effect of lignocellulosic inhibitory compounds on growth and ethanol fermentation of newly-isolated thermotolerant *Issatchenkia orientalis*[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(17): 8099—8104.
- [18] Dhaliwal S S, Oberoi H S, Sandhu S K, et al. Enhanced ethanol production from sugarcane juice by galactose adaptation of a newly isolated thermotolerant strain of *Pichia kudriavzevii*[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(10): 5968—5975.
- [19] Pessani N K, Atiyeh H K, Wikins M R, et al. Simultaneous saccharification and fermentation of Kanlow switchgrass by thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* IMB3: The effect of enzyme loading, temperature and higher solid loadings[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(22): 10618—10624.
- [20] Tomás-Pejó E, Oliva J M, González A, et al. Bioethanol production from wheat straw by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 in a simultaneous saccharification and fermentation fed-batch process[J]. Fuel, 2009, 88(11): 2142—2147.
- [21] 庄新姝, 王树荣, 袁振宏, 等. 纤维素超低酸水解产物的分析[J]. 农业工程学报, 2007, 23(2): 177—182. Zhang Xinshu, Wang Shurong, Yuan Zhenhong, et al. Analysis of cellulose hydrolysis products in extremely low acids[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2007, 23(2): 177—182. (in Chinese with English abstract)
- [22] 田沈, 周桂雄, 张兰波, 等. 两株高效代谢木质纤维素稀酸水解物产乙醇的酵母特性及耐毒研究[J]. 太阳能学报, 2010, 31(1): 1—4. Tian Shen, Zhou Guixiong, Zhang Lanbo, et al. Characteristics of two yeast strains for ethanol production from dilute-acid lignocellulosic hydrolysate in situ detoxification[J]. Acta Energetica Solaris Sinica, 2010, 31(1): 1—4. (in Chinese with English abstract)
- [23] Fonseca B G, de Oliveira Moutta R, de Oliveira Ferraz F, et al. Biological detoxification of different hemicellulosic hydrolysates using *Issatchenkia occidentalis* CCTCCM 206097 yeast[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnol, 2011, 38(1): 199—207.
- [24] 覃香香, 张厚瑞, 蔡爱华, 等. 东方伊萨酵母降解木糖醇发酵抑制物研究[J]. 广西科学, 2010, 17(4): 358—362. Qin Xiangxiang, Zhang Hourui, Cai Aihua, et al. Biodegradation of Xylitol Fermentation Inhibitors by *Issatchenkia orientalis*[J]. Guangxi Sciences, 2010, 17(4): 358—362. (in Chinese with English abstract)
- [25] Kwon Y J, Ma A Z, Li Q, et al. Effect of lignocellulosic inhibitory compounds on growth and ethanol fermentation of newly-isolated thermotolerant *Issatchenkia orientalis*[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(17): 8099—8104.
- [26] Kin S R, Lee K S, Kong I I. Construction of an efficient xylose-fermenting diploid *Saccharomyces cerevisiae* strain through mating of two engineered haploid strains capable of xylose assimilation[J]. Journal of Biotechnology, 2013, 164(1): 105—111.
- [27] Liu E, Hu Y. Construction of a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain by combined approaches of genetic engineering, chemical mutagenesis and evolutionary adaptation[J]. Biochemical Engineering Journal, 2010, 48(2): 204—210.
- [28] 何明雄, 祝其丽, 潘科, 等. 利用木质纤维素类生物质发酵生产乙醇重组菌株研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2009, 15(4): 579—584. He Mingxiong, Zhu Qili, Pan Ke, et al. Progress in ethanol production with lignocellulosic biomass by different recombinant strains[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2009, 15(4): 579—584. (in Chinese with English abstract)
- [29] 刘巍峰, 张晓梅, 陈冠军, 等. 木糖发酵酒精代谢工程的研究进展[J]. 过程工程学报, 2006, 6(1): 139—143. Liu Weifeng, Zhang Xiaomei, Chen Guanjun, et al. Metabolic engineering for improving ethanol fermentation of xylose by yeasts and bacteria[J]. The Chinese Journal of Process Engineering, 2006, 6(1): 139—143. (in Chinese with English abstract)
- [30] 李丰田, 田沈, 于泳, 等. 酵母菌复合培养物对木质纤维素稀酸水解液原位脱毒乙醇发酵[J]. 太阳能学报, 2009, 30(11): 1582—1586. Li Fengtian, Tian Shen, Yu Yong, et al. Ethanol

production from dilute-acid hydrolysate in situ detoxification by co-culture of yeasts[J]. *Acta Energeiae*

Solaris Sinica, 2009, 30(11): 1582—1586. (in Chinese with English abstract)

Ethanol fermentation characteristics of thermotolerant *Issatchenkia orientalis*

Wang Fengqin, Wang Yuanyuan, Tao Xi, Zhang Rui, Xie Hui, Song Andong*

(Key Laboratory of Enzyme Engineering of Agricultural Microbiology, Ministry of Agriculture, College of Life Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: As a renewable and clean energy, bio-ethanol has been received widespread attention in recent years. Ethanol fermentation at high temperature can reduce the consumption of cooling water and energy in the process of fermentation, it also solve the problems caused by saccharification and uncontrolled fermentation temperature, resulting in the simultaneous saccharification and fermentation of cellulosic ethanol. Therefore, the fermentation period can be shorten and the production cost be reduced. A thermotolerant yeast strain HN-1 isolated from rotting tobacco leaves was identified and its ethanol fermentation characteristics was investigated in this study. The phylogenetic analysis indicated that phylogenetic strain HN-1 behaved like *Issatchenkia orientalis*. This strain used glucose and D-fructose but could not use xylose, maltose, lactose, sucrose, starch and cellobiose as sole carbon source to produce ethanol. When HN-1 was cultivated in 50 g/L glucose liquid medium, the highest biomass was obtained at 35 and 38°C. Increasing the cultivation temperature to 42 and 45°C decreased the biomass growth and intensified the cell death. There was no major difference between ethanol productions (21.43~23.12 g/L) fermented at 35~45°C from 50 g/L glucose. When increasing the fermentation temperature, the ethanol productivity was increased from 0.31 g/(L·h) at 35°C to 0.65 g/(L·h) at 45°C after 24h fermentation. The fermentation time was shortened. When the fermentation was conducted at 38°C, 28.77, 43.21, 58.19 and 59.53 g/L ethanol were produced from 60, 90, 120 and 150 g/L glucose with yields of 0.457, 0.468, 0.460 and 0.386 g/g and productivities of 0.38, 0.39, 0.48 and 0.40 g/(L·h) The results also indicated that fed batch fermentation could not enhance the ethanol production. Strain HN-1 could utilize corn straw hydrolysate with 43.08 g/L glucose and 27.13 g/L xylose to produce 20.74 g/L ethanol. The glucose conversion rate was 0.468 g/g, which was 91.6% of the theoretical yield. Noxylose was utilized during the fermentation. This research provides a valuable thermotolerant strain. It is expected that it will be beneficial for industrialized production of bio-ethanol with high temperature fermentation.

Key words: fermentation; straw; ethanol; strain identification; *Issatchenkia orientalis*

(责任编辑: 刘丽英)