

## 通气量和菊粉浓度对克鲁维酵母乙醇发酵的影响

高教琪, 袁文杰, 陈丽杰, 韩锡铜, 白凤武

大连理工大学生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116024

高教琪, 袁文杰, 陈丽杰, 等. 通气量和菊粉浓度对克鲁维酵母乙醇发酵的影响. 生物工程学报, 2013, 29(3): 325–332.  
Gao JQ, Yuan WJ, Chen LJ, et al. Effect of the aeration and inulin concentration on the ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* YX01. Chin J Biotech, 2013, 29(3): 325–332.

**摘要:** 马克斯克鲁维酵母能够利用集成生物加工技术发酵菊芋生产乙醇, 具有非粮燃料乙醇生产潜力。文中研究了该技术中的两个关键因素 (通气量和底物浓度) 对于 *K. marxianus* YX01 乙醇发酵过程和菊粉酶活性的影响。研究表明, 底物浓度对乙醇得率影响不大, 底物浓度为 250 g/L 时, 发酵终点乙醇浓度为 84.74 g/L, 但乙醇得率由低浓度 50 g/L 的 86.4% (理论值), 降为 84.7%。通气能够加速 *K. marxianus* YX01 的乙醇发酵过程, 但降低了乙醇得率, 当底物浓度为 250 g/L 时, 乙醇得率由不通气的 84.7% 降为 1.0 vvm 时的 73.3%。随底物浓度的升高及通气量的降低, *K. marxianus* YX01 分泌的菊粉酶活力表现出降低的趋势。在不通气及底物浓度为 250 g/L 时, 菊粉酶的活性为 6.59 U/mL, 而底物浓度 50 g/L, 通气量 1.0 vvm 时的酶活力为 21.54 U/mL。乙醇发酵过程中的副产物甘油随通气量的降低及底物浓度的升高而增大, 而乙酸的浓度随通气量的增大及底物浓度的升高而升高。

**关键词:** 马克斯克鲁维, 乙醇发酵, 通气量, 菊粉浓度, 菊粉酶

## Effect of aeration and inulin concentration on ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* YX01

Jiaoqi Gao, Wenjie Yuan, Lijie Chen, Xitong Han, and Fengwu Bai

School of Life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, Liaoning, China

**Abstract:** Consolidated bioprocessing technology can be used for *Kluyveromyces marxianus* YX01 to produce ethanol from *Jerusalem artichoke*, which is one of the potential processes to produce biofuel from non-cereal crops. In this study,

**Received:** September 11, 2012; **Accepted:** November 9, 2012

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 21106016), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. DUT11SM13), the Ph.D Programs Foundation of Liaoning Province (No. 20111028).

**Corresponding author:** Wenjie Yuan. Tel/Fax: +86-411-84706308; Email: ywj@dut.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 21106016), 中央高校基本业务费 (No. DUT11SM13), 辽宁省博士启动基金 (No. 20111028) 资助。

we combined the aeration rate with the substrate concentration to conduct cross-over experiments for *K. marxinaus* YX01, and studied ethanol fermentation and the influence of inulin enzyme activity. The substrate concentration had a little repressive effect on ethanol productivity. When substrate concentration reached 250 g/L under anaerobic conditions, ethanol concentration was 84.8 g/L, and ethanol yield was reduced from 86.4% (50 g/L substrate concentration) to 84.7% of the theoretical value. Aeration rate could accelerate *K. marxinaus* YX01 ethanol fermentation, but reduced ethanol yield. When substrate concentration reached 250 g/L under aeration at 1.0 vvm, ethanol yield was reduced from 84.7% under anaerobic conditions to 73.3% of the theoretical value. With increased concentration of the carbon source and reduced aeration rate, the inulinase of *K. marxinaus* YX01 reduced and the concentration of glycerol increased, however, the acetic acid increased with the increased concentration of the carbon source and aeration rate. When substrate concentration reached 250 g/L under anaerobic conditions, inulinase activity was only 6.59 U/mL; when substrate concentration reached 50 g/L under aeration at 1.0 vvm, inulinase activity was 21.54 U/mL.

**Keywords:** *Kluyveromyces marxinus*, ethanol fermentation, aeration rate, inulin concentration, inulinase

生物燃料, 作为目前化石燃料的主要替代物, 是未来能源工业的重要发展方向<sup>[1]</sup>。生物乙醇是目前为止研究最早、技术最为成熟的生物质能源产品。它既可以作为燃料直接使用, 也可以与汽油和柴油以一定比例配混使用。生物乙醇因其具有较高的辛烷值, 而且无毒, 对环境污染程度较小, 一直以来都被公认为最有可能替代化石能源的生物质能源之一<sup>[2]</sup>。利用淀粉质原料生产乙醇研究较早, 技术也相对比较成熟, 已经在包括中国在内的世界各国实现工业化生产。然而, 中国人口多、耕地少的基本国情, 严重制约了目前粮食类淀粉质原料燃料乙醇产业的规模化发展, 所以, 寻找新的非粮作物代替淀粉质原料进行乙醇的工业化生产将是未来中国燃料乙醇的主要发展方向<sup>[3]</sup>。

我国已将菊芋作为重点发展的非粮能源植物列入生物产业发展的“中华人民共和国国民经济和社会发展第十一个、第十二个五年规划纲要”中。菊芋俗称洋姜或鬼子姜, 与其他农作物相比具有适应性强、耐贫瘠、耐寒、耐旱、种植简易及产量高等特点<sup>[4]</sup>, 不仅可以为生物能源产品生产开辟新的原料来源, 而且有助于生态环境

保护。菊芋块茎中的主要成分是菊粉, 是由果糖残基以  $\beta$ -2,1 键连接而成的线形多聚物<sup>[5]</sup>, 可以被多种微生物分解产生低聚果糖或果单糖, 继而发酵生产乙醇<sup>[6-9]</sup>。

集成生物加工 (Consolidated bioprocessing, CBP) 系统集水解酶生产、底物水解和发酵为一体, 在乙醇发酵的应用方面具有非常突出的优点, 是目前利用许多非粮作物生产燃料乙醇经济上最具有竞争能力的技术路线<sup>[10-11]</sup>。马克斯克鲁维酵母可分泌菊粉酶, 将菊粉水解为果糖并发酵生产乙醇, 因此是利用 CBP 技术发酵菊芋生产乙醇的理想菌株<sup>[12]</sup>。

目前, 利用 CBP 技术发酵菊粉类原料生产乙醇的研究已进行多年<sup>[6,10-11,13]</sup>, 主要的研究内容是菌株的筛选、发酵工艺的开发等方面, 但发酵时间长, 乙醇收率低的问题仍然存在<sup>[14]</sup>。

菊粉酶的活性是影响 CBP 技术的关键, 而通气量和底物浓度是影响菊粉酶活性的关键因素<sup>[15-17]</sup>。目前国内外尚没有文献对 CBP 技术中的这两个因素进行报道。对于克鲁维乙醇发酵过程, 也没有文献对其代谢过程进行报道。本文研究通气量和底物浓度交互作用下的菊粉酶活性及乙醇

发酵情况,并通过测定发酵过程中的主要副产物,增加对克鲁维酵母CBP技术发酵菊芋生产乙醇过程关键因素的了解,为乙醇发酵条件下的菊粉酶调控打下基础,以提高菊芋发酵的生产效率。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

马克斯克鲁维酵母 *Kluyveromyces marxianus* YX01 (ATCC8554, 本实验室驯化后保存)。

#### 1.1.2 主要试剂

菊粉(菊芋的热水抽提物)购于内蒙古亿利生物技术有限公司,经实验测定100 g菊粉水解可得到85 g还原糖;蛋白胨、酵母浸粉、3,5-二硝基水杨酸、硫酸、NaOH等均为国产分析纯以上级产品。

#### 1.1.3 培养基

种子培养基:4% (W/V) 菊粉,2% (W/V) 蛋白胨,1% (W/V) 酵母粉,pH自然。121℃灭菌15 min后使用。

发酵培养基:①50 g/L菊粉,2% (W/V) 蛋白胨,1% (W/V) 酵母粉,pH自然。121℃灭菌15 min后使用;②135 g/L或250 g/L菊粉,2% (W/V) 蛋白胨,1% (W/V) 酵母粉,pH自然。115℃灭菌15 min后使用。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 50 g/L菊粉在不同通气量条件下的发酵情况

5 L发酵罐中装入2 L含有50 g/L菊粉的发酵培养基,分别按10%的接种量接种培养24 h的种子液,在通气量分别为0、0.5、1.0 vvm的条件下,30℃、150 r/min进行批式培养。分别在0、4、8、12、24、36、48、60、72 h时取样,

测定生物量、总糖、还原糖、乙醇和酶活,考察在50 g/L菊粉、不同通气量条件下 *K. marxianus* YX01的发酵情况。

#### 1.2.2 135 g/L菊粉在不同通气量条件下的发酵情况

5 L发酵罐中装入2 L含有135 g/L菊粉的发酵培养基,发酵条件同1.2.1。分别在0、12、24、36、48、60、72、96 h时取样,测定生物量、总糖、还原糖、乙醇和酶活,考察在135 g/L菊粉、不同通气量条件下 *K. marxianus* YX01的发酵情况。

#### 1.2.3 250 g/L菊粉在不同通气量条件下的发酵情况

5 L发酵罐中装入2 L含有250 g/L菊粉的发酵培养基,发酵条件同1.2.1。分别在0、6、12、24、36、48、60、72、96、120 h时取样,测定生物量、总糖、还原糖、乙醇和酶活,考察在250 g/L菊粉、不同通气量条件下 *K. marxianus* YX01的发酵情况。

#### 1.2.4 分析方法

酶活的测定:参照文献[18]。菊粉酶活性单位定义:一定条件下,以菊粉为底物,每分钟产生1 μmol果糖所需酶量(U)。

生物量的测定:采用OD值法,将菌液适当稀释,在620 nm处测量其吸光值。

还原糖测定:取适当稀释倍数的发酵上清液,采用DNS法测定糖浓度。

乙醇测定:详见文献[19]。

发酵液甘油和乙酸的分析方法:将发酵液在10 000×g下离心5 min,取上清液,采用高效液相色谱(HPLC)测定。离子交换柱型号为Aminex HPX-87H。流动相为50 mmol/L的硫酸

溶液 (HPLC grade), 流速为 0.5 mL/min, 柱温为 50 °C, RI 检测器的温度为 50 °C。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同菊粉浓度、不同通气量条件下的乙醇发酵情况比较

不同菊粉浓度在不同的通气量下表现出基本相同的规律。以 250 g/L 菊粉浓度为例, 由图 1 可见, 通气量为 1.0 vvm 和 0.5 vvm 时, 在发酵前 24 h, 总糖浓度快速下降, 36 h 左右基本已经

达到终点; 而不通气情况下, 100 h 左右才到达终点; 还原糖消耗速率方面, 通气量为 1.0 vvm 和 0.5 vvm 时, 在前 12 h 左右基本保持稳定, 或稍有上升, 之后迅速下降直至终点时维持在较低水平; 在不通气时, 前 24 h 还原糖浓度会上升, 之后维持一定时间稳定, 最后下降至较低水平。通气条件的乙醇发酵过程明显快于不通气条件, 且 0.5 vvm 与 1.0 vvm 并未表现出明显差异, 乙醇浓度在发酵 24 h 时已达到最高; 而不通气条件下, 乙醇浓度持续升高, 到发酵 120 h 达到最高。

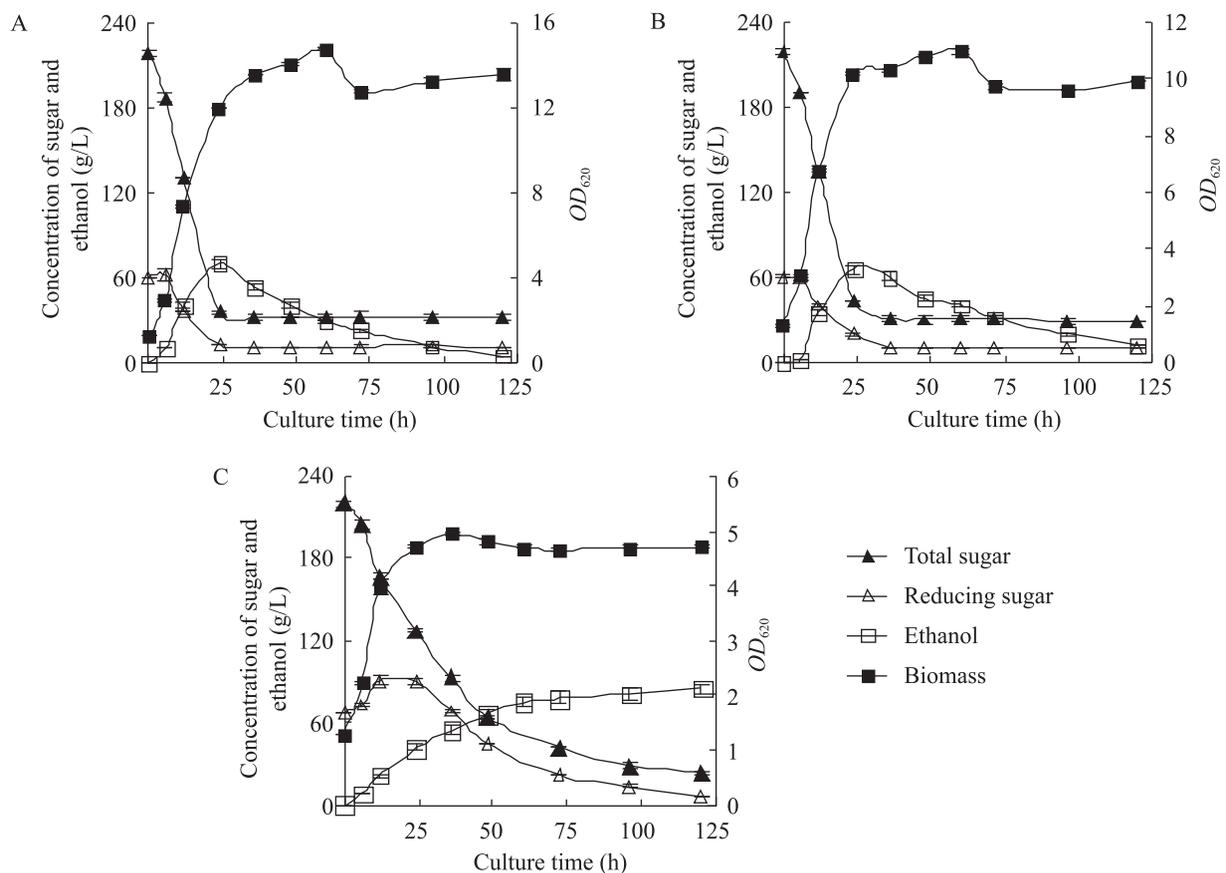


图 1 250 g/L 初始碳源浓度时不同通气条件下 *K. marxinaus* YX01 发酵情况

Fig. 1 Fermentation of *K. marxinaus* YX01 under different aeration rates at 250 g/L. (A) 1.0 vvm. (B) 0.5 vvm. (C) 0.0 vvm.

出现这种现象可能是由于接种后 *K. marxinaus* YX01 分泌的菊粉酶迅速将底物降解成为供其自身利用的果糖等还原糖, 通气情况下, 糖的利用速率快, 没有出现还原糖的积累; 但在乙醇浓度方面, 不通气时达到 84.74 g/L, 明显高于 1.0 vvm 和 0.5 vvm 时, 是由于在有氧且碳源不足情况下, 乙醇作为碳源被重新利用, 并且大通气量导致部分乙醇挥发。通气量为 1.0 vvm 和 0.5 vvm 时的发酵情况类似, 其原因可能是由于在 1.0 vvm 时的生物量略高于 0.5 vvm, 导致在发酵过程中, 培养基中的溶氧情况相似, 而溶氧并非通气量是培养过程中的关键因素。

表 1 显示了不同菊粉浓度以及不同通气量条件下发酵终点 *K. marxinaus* YX01 状况。不通气时乙醇发酵性能明显较通气条件有明显提高, 其中最高的乙醇得率为 0.442, 达到了理论值的 86.4%; 在 135 g/L 时, 乙醇发酵结果也较为理

想, 不通气条件乙醇得率为 0.438, 达到理论值的 85.7%; 在 250 g/L, 不通气条件下, 乙醇得率为 0.433, 为理论值的 84.7%。但是, 随着初始底物浓度的增加, 乙醇发酵结果有所下降, 而且终点时残糖浓度也明显增加, 这种现象可能由于高浓度底物对于微生物的生长有一定影响, 而且糖转化形成了较高浓度的乙醇, 对微生物在发酵后期的生长产生了较为严重的抑制作用。

## 2.2 *K. marxinaus* YX01 在不同发酵条件下菊粉酶的表达情况

由图 2 可以看出, *K. marxinaus* YX01 菊粉酶的表达受到高浓度碳源的抑制, 而且通气条件下酶活高于不通气条件下的酶活。在 50 g/L 时, 1.0 vvm 条件下, 最高酶活力为 21.54 U/mL, 而不通气条件下只有 9.34 U/mL; 但是, 当糖浓度达到 250 g/L 时, 酶活力受通气量的影响作用不再显著, 在所有情况下, 菊粉酶活力都处于相对

表 1 *K. marxinaus* YX01 在不同菊粉浓度、通气量条件下的发酵情况

Table 1 Comparison of the fermentation by *K. marxinaus* YX01 under conditions of different inulin concentrations and aeration rates

$V$ (vvm)	$S_0$ (g/L)	$S_T$ (g/L)	$X$	$P$ (g/L)	$Y_{p/s}$	$\eta$ (%)	$Q_p$ (g/(L·h))
1.0	43.35±0.71	5.26±0.18	6.84±0.03	15.75±0.79	0.413±0.012	80.9±2.4	1.97±0.14
	122.73±1.63	14.19±0.71	12.58±0.06	40.48±1.02	0.376±0.018	73.6±3.5	3.37±0.12
	219.66±2.59	31.49±1.40	14.84±0.06	70.45±2.05	0.373±0.010	73.3±2.0	2.94±0.12
0.5	43.35±0.71	4.61±0.11	5.89±0.11	15.52±1.25	0.401±0.015	78.4±2.9	1.94±0.22
	122.73±1.63	14.37±0.71	10.48±0.03	39.87±0.89	0.368±0.002	72.0±0.4	3.32±0.10
	219.66±2.59	30.85±1.32	11.02±0.08	66.05±2.12	0.350±0.008	68.5±1.6	2.75±0.12
0.0	43.35±0.71	4.58±0.19	4.43±0.02	17.12±1.02	0.442±0.006	86.4±1.2	0.47±0.04
	122.73±1.63	12.41±0.15	4.55±0.03	48.33±1.33	0.438±0.004	85.7±0.8	0.81±0.03
	219.66±2.59	23.78±1.32	4.95±0.26	84.74±3.37	0.433±0.011	84.7±2.1	0.88±0.05

$V$ : aeration rate;  $S_0$ : initial sugar concentration;  $S_T$ : residual sugar concentration;  $X$ : biomass ( $OD_{620}$ );  $P$ : ethanol production;  $Y_{p/s}$ : yield of ethanol (ratio of ethanol production and sugar consumption);  $\eta$ : fermentation efficiency ( $Y_{p/s}/0.511$ );  $Q_p$ : ethanol productivity.

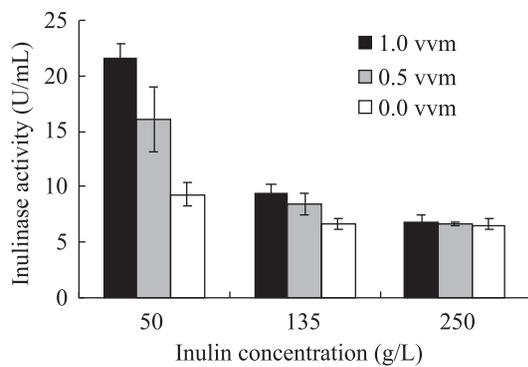


图2 发酵96 h时菊粉酶在不同发酵条件下的表达活性  
Fig. 2 Inulinase activity under different conditions at 96 h.

较低水平,是由于较高的糖浓度对于菊粉酶产生了严重的抑制作用。综合图1的结果,可以看到菊粉酶的活力与乙醇的发酵速度呈正相关,说明CBP技术中糖的水解速率是工艺的关键控制点。

### 2.3 不同发酵条件下发酵液中副产物的分析

在乙醇发酵过程中,甘油和乙酸等副产物会伴随乙醇的产生而产生,这对于乙醇的发酵来说是不利的,它导致了发酵效率的降低。

由图3可以看出,不同的发酵条件对于甘油

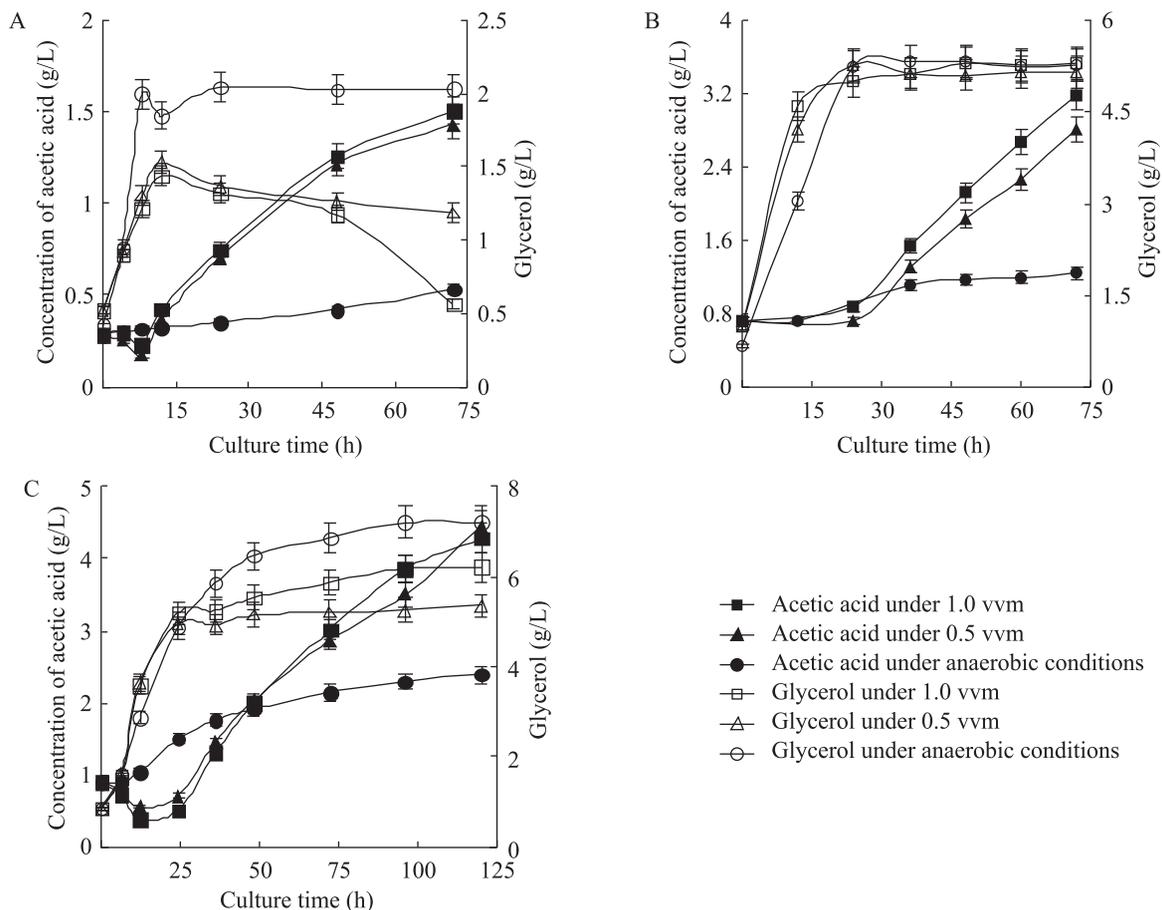


图3 不同初始碳源浓度和不同通气量条件下甘油和乙酸浓度随时间的变化

Fig. 3 Concentration changes of glycerol and acetic acid under conditions of different inulin concentrations and aeration rates. (A) 50 g/L. (B) 135 g/L. (C) 250 g/L.

的含量具有较大影响。甘油的生产伴随着乙醇发酵过程,且表现出同样的趋势。随着初始碳源浓度的增加,甘油的合成量明显增加,这主要是由于细胞在高渗条件下,大量合成甘油可以保护细胞不受损伤,在 250 g/L 时,甘油含量是 50 g/L 时的 3 倍;但是随着通气量的增加,甘油的合成受到了抑制,这可能是由于较高的氧化环境不利于甘油途径的进行。甘油具有保护细胞、调节细胞的氧化还原水平等作用<sup>[20]</sup>,所以在一定程度上来说,甘油的积累有利于细胞生长,但是在乙醇的生产工业中,甘油的合成分流了流向乙醇的碳源,降低了乙醇得率,同时在精馏过程中,甘油只能作为废水排放,造成了碳源的浪费<sup>[21]</sup>。

另一种副产物乙酸主要来自于乙醛或乙醇的氧化。乙酸也是随着发酵过程的延长而逐渐积累,但是与甘油相反,乙酸的产量随着通气量的增加而增高。这可能由于在高通气条件下,流向甘油途径的碳受到抑制,而流向乙醇、乙酸的碳增加。但是由表 1 结果来看,高通气量降低了乙醇的得率,可能是由于部分乙醇在有氧条件下被氧化形成乙酸的原因。

### 3 讨论

目前有关通气量和底物浓度对 *K. marxinaus* 乙醇发酵和菊粉酶表达影响的研究并不多。我们的研究表明,相对厌氧和高底物浓度的条件不利于 *K. marxinaus* YX01 菊粉酶的分泌但有利于乙醇发酵,酶和乙醇的产率受通气量影响显著,随通气量增大,菊粉酶活力上升而乙醇得率随之降低,这与 Bernardo 等<sup>[15]</sup>的研究结果相似。较高的底物浓度严重抑制了菊粉酶活力但对乙醇得率影响不是很明显,但是菊粉酶活力的降低,

延长了发酵时间,大大降低了乙醇生产效率<sup>[22]</sup>。

发酵过程副产物主要为乙酸和甘油,且与酿酒酵母乙醇发酵过程副产物的变化趋势有相似之处<sup>[20]</sup>。实验证明,乙酸和甘油对菊粉酶活性没有明显抑制作用,但无疑副产物的产生降低了乙醇产量。发酵过程中,与乙醇对于细胞的毒害作用相比,副产物乙酸由于浓度相对较低,其毒害作用影响不大。

解决高效菊粉酶活力和高乙醇产量之间的矛盾是利用 *K. marxinaus* 实现菊粉类物质 CBP 技术的关键。今后的研究工作可从以下两个方面开展:一是进一步确定满足菊粉酶高表达与乙醇高得率的通气条件;二是找到调控菊粉酶表达的相关转录因子,利用分子生物学的方法进行改造,实现其在乙醇发酵条件下的可控表达。

### REFERENCES

- [1] Ragauskas AJ, Williams CK, Davison BH, et al. The path forward for biofuels and biomaterials. *Science*, 2006, 311(5760): 484-489.
- [2] Rosamond LN, Adam L, Marshall B, et al. The ripple effect: biofuels, food security, and the environment. *Environment*, 2007, 49(9): 30-43.
- [3] Heaton EA, Flavell RB, Mascia PN, et al. Herbaceous energy crop development: recent progress and future prospects. *Curr Opin Biotechnol*, 2009, 19(3): 202-208.
- [4] Kosaric N, Cosentino GP, Wieczorek A. The Jerusalem artichoke as an agricultural crop. *Biomass*, 1984, 5(1): 1-36.
- [5] Kays S, Nottingham S. *Biology and Chemistry of Jerusalem artichoke*. London: CRC Press, 2007: 1-20.
- [6] Wang JM, Zhang T, Chi Z, et al. 18S rDNA integration of the exo-inulinase gene into chromosomes of the high ethanol producing yeast *Saccharomyces* sp. W0 for direct conversion of

- inulin to bioethanol. *Biomass Bioenerg*, 2011, 35(7): 3032–3039.
- [7] Bajpai P, Margaritis A. Ethanol production from *Jerusalem artichoke* juice using flocculent cells of *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol Lett*, 1986, 8(5): 361–364.
- [8] Bajpai P, Margaritis A. Kinetics of ethanol production by immobilized *Kluyveromyces marxianus* cells at varying sugar concentrations of *Jerusalem artichoke* juice. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1987, 26(5): 447–449.
- [9] Chang BL, Yuan WJ, Zhao XQ, et al. Ethanol fermentation from *Jerusalem artichoke* juice with self-flocculating yeast *Saccharomyces cerevisiae* flo. *Chin J Process Eng*, 2009, 9(4): 796–800 (in Chinese).  
常宝磊, 袁文杰, 赵心清, 等. 自絮凝颗粒酵母发酵菊芋汁生产乙醇. *过程工程学报*, 2009, 9(4): 796–800.
- [10] Yuan WJ, Ren JG, Zhao XQ, et al. One-step Ethanol Fermentation with *Kluyveromyces marxianus* YX01 from *Jerusalem artichoke*. *Chin J Biotech*, 2008, 24(11): 1931–1936 (in Chinese).  
袁文杰, 任剑刚, 赵心清, 等. 一步法发酵菊芋生产乙醇. *生物工程学报*, 2008, 24(11): 1931–1936.
- [11] Yu J, Jiang JX, Zhang YQ, et al. Simultaneous saccharification and fermentation of *Jerusalem artichoke* tubers to ethanol with an inulinase-hyperproducing yeast *Kluyveromyces cicerisporus*. *Chin J Biotech*, 2010, 26(7): 982–990 (in Chinese).  
俞静, 江佳稀, 张永强, 等. 鹰嘴豆孢克鲁维酵母利用菊芋原料同步糖化与发酵生产乙醇. *生物工程学报*, 2010, 26(7): 982–990.
- [12] Fonseca GG, Heinzle E, Wittmann C, et al. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 79(3): 339–354.
- [13] Yang M, Yuan WJ, Feng LH. Production of fuel ethanol from uncooked *Helianthus tuberosus* by consolidated bio-processing (CBP) fermentation. *J Anhui Agri Sci*, 2012, 40(9): 5438–5441 (in Chinese).  
杨梅, 袁文杰, 凤丽华. 菊芋生料联合生物加工发酵生产燃料乙醇. *安徽农业科学*, 2012, 40(9): 5438–5441.
- [14] Yang M, Yuan WJ. Effect of different impellers on fuel ethanol production from uncooked *Jerusalem artichoke* by consolidated bio-processing fermentation. *J Jinlin Inst Chem Technol*, 2012, 29(1): 71–75 (in Chinese).  
杨梅, 袁文杰. 搅拌桨对菊芋联合生物加工发酵生产燃料乙醇的影响. *吉林化工学院学报*, 2012, 29(1): 71–75.
- [15] Bernardo O, Silva-Santisteban Y, Converti A, et al. Effects of carbon and nitrogen sources and oxygenation on the production of inulinase by *Kluyveromyces marxianus*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2009, 152(2): 249–261.
- [16] Gill PK, Sharma AD, Harchand RK, et al. Effect of media supplements and culture conditions on inulinase production by an actinomycete strain. *Bioresour Technol*, 2003, 87(3): 359–362.
- [17] Bernardo O, Silva-Santisteban Y, Filho FM. Agitation, aeration and shear stress as key factors in inulinase production by *Kluyveromyces marxianus*. *Enzym Microb Technol*, 2005, 36(5/6): 717–724.
- [18] Zhang SF, Yang F, Wang Q, et al. High-level secretory expression and characterization of the recombinant *Kluyveromyces marxianus* inulinase. *Process Biochem*, 2012, 47(1): 151–155.
- [19] Yuan WJ, Zhao XQ, Ge XM, et al. Ethanol fermentation with *Kluyveromyces marxianus* from *Jerusalem artichoke* grown in salina and irrigated with a mixture of seawater and freshwater. *J Appl Microbiol*, 2008, 105(6): 2076–2083.
- [20] Michnick S, Roustan JL, Remize F, et al. Modulation of glycerol and ethanol yields during alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressed or disrupted for GPD1 encoding glycerol 3-phosphate dehydrogenase. *Yeast*, 1997, 13(9): 783–793.
- [21] Ferguson P, Mulholland H, Barron D, et al. Sucrose-supplemented distillery spent wash as a medium for production of ethanol at 45 °C by free and alginate-immobilized preparations of *Kluyveromyces marxianus* IMB3. *Bioprocess Eng*, 1998, 18(4): 257–259.
- [22] Yuan WJ, Chang BL, Ren JG, et al. Consolidated bioprocessing strategy for ethanol production from *Jerusalem artichoke* tubers by *Kluyveromyces marxianus* under high gravity conditions. *J Appl Microbiol*, 2012, 112(9): 38–44.

(本文责编 陈宏宇)