

戊糖己糖混合糖发酵生产乙醇的主要影响因素

宋向阳, 陈 牧, 毛连山, 云彩琴, 勇 强, 余世袁

(南京林业大学化学工程学院, 林木遗传与生物技术省部共建教育部重点实验室, 江苏 南京 210037)

[摘要] 以树干毕赤酵母为发酵菌株, 高混合糖(木糖、葡萄糖)为发酵底物, 确定树干毕赤酵母高糖浓度发酵时所需的条件. 研究表明, 在高糖浓度乙醇发酵中, 树干毕赤酵母较为适宜的发酵温度为 30℃, 发酵 24 h 残糖浓度和乙醇浓度分别为 0.1 g/L 和 32.5 g/L 添加硫酸铵 1.1 g/L + 微量元素发酵效果较好, 乙醇浓度为 33.2 g/L. 由典型发酵过程中各物质浓度变化曲线可知, 酵母优先利用葡萄糖, 发酵 12 h 葡萄糖和木糖的还原糖利用率分别为 89.3%、10.7%. 待 12 h 葡萄糖几乎被消耗完后, 对木糖的利用开始占主导地位, 乙醇浓度随着糖的不断消耗而逐渐提高. 发酵 28 h 时乙醇浓度最高, 达到 33.2 g/L.

[关键词] 戊糖, 发酵, 乙醇, 影响因素

[中图分类号] Q53 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2009)01-0115-05

Main Factors of Influence for Fermentation of Pentose and Hexose Producing Ethanol

Song Xiangyang, Cheng Mu, Mao Lianshan, Yun Caiqin, Yong Qiang, Yu Shiyuan

(College of Chemical Engineering, Nanjing Forestry University, Key Laboratory of Forest Genetic & Biotechnology
Ministry of Education, Nanjing 210037, China)

Abstract Fermentation of glucose-xylose mixture to ethanol was investigated with *Pichia stipitis*. To definite the conditions of high sugars concentration fermentation through changes of cultivation conditions. The results of study showed that it was fit for 30℃ of temperature in high sugars concentration fermentation. And the concentration of left sugars and ethanol were 0.1 g/L, 32.5 g/L respectively for fermentation in 24 h. It was better for adding $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and trace elements in fermentation. The concentration of ethanol was 33.2 g/L. Glucose was first used by yeast from typical curve of fermentation. The utilization rates of glucose and xylose were 89.3%, 10.7% respectively. It was a main use of xylose after 12 h. The concentration of ethanol increased with less of sugars. The concentration of ethanol reached maximum in 28 h of fermentation which was 33.2 g/L.

Key words pentose, fermentation, ethanol, factors of influence

随着全球能源危机的加剧, 人们越来越重视燃料乙醇的开发利用. 传统的以淀粉质为原料的乙醇生产消耗了大量粮食, 增加了粮食供给的紧张局势. 而利用可再生的绿色生物质资源如农林废弃物制备燃料乙醇, 一是能变废为宝, 二是能减轻对粮食的依赖, 三是能减少汽车尾气对环境的污染, 四是能寻求可替代能源的有效途径^[1, 2]. 因此, 以植物纤维资源生物降解并发酵制备燃料乙醇的技术成为目前的研究热点^[3]. 而高糖浓度发酵又是制备燃料乙醇研究的难点之一^[4]. 高糖浓度乙醇发酵特点是能明显地提高单位设备的生产率和利用率. 高糖浓乙醇发酵因为增加了单位体积醪液中可发酵性糖的含量, 增加了单位体积醪液中乙醇的含量和其它固形物的含量, 减少了拌料过程中水的投入, 能节约相当数量的水, 极大地降低了蒸煮、发酵、蒸馏和浓缩干燥过程中的能量消耗^[5]. 但高糖浓乙醇发酵时间长, 高糖浓度底物可能导致发酵罐中高浓度残糖, 由于产物抑制、高渗透压和营养不足等因素造成发酵不完全^[6]. 本文采用混合糖(木糖、己糖)为碳源, 通过培养因素的改变来确定树干毕赤酵母高糖浓度发酵时所需的工艺条件. 为工业化高糖浓度发酵制备乙醇的生产工艺提供理论基础.

收稿日期: 2008-10-10

基金项目: 863 计划 (2008AA05Z401)、江苏高校自然科学重大基础研究 (06KJA22015)、江苏省高技术研究计划 (BG2005327) 资助项目.

通讯联系人: 宋向阳, 副教授, 博士, 研究方向: 生物化工. E-mail: xiangyangsong@hotmail.com

1 材料与方 法

1.1 菌种

树干毕赤酵母 (*Pichia stipitis*) P2 能够发酵戊糖和己糖, 由南京林业大学生物化工研究所通过对来源于美国标准菌库藏菌种 *Pichia stipitis* CBS 5776 长期的定向驯化和诱变所得, 在抗抑制物和戊糖发酵能力上均优越于其出发菌种.

1.2 原料

以木糖、葡萄糖为发酵底物.

1.3 培养基 (单位 g/L)

酵母菌种及酵母细胞增殖的培养基: 木糖 20.0 蛋白胨 5.0 酵母汁 3.0 酵母细胞发酵的培养基: 木糖 20.0 葡萄糖 50.0 CaCl₂ 0.3 MgSO₄ 0.3 KH₂PO₄ 2.5 CO(NH₂)₂ 0.2 (NH₄)₂SO₄ 1.1.

1.4 分析测定

1.4.1 还原糖测定

采用 3,5-二硝基水杨酸 (DNS)法测定^[7].
将试管斜面菌种接入液体酵母细胞培养基, 在 30℃、150 r/min 条件下活化 2 d 后进行戊糖 (己糖) 发酵, 初始 pH 为 5.0.

1.4.2 乙醇含量

采用高效液相色谱 (HPLC) 法测定乙醇含量^[8].

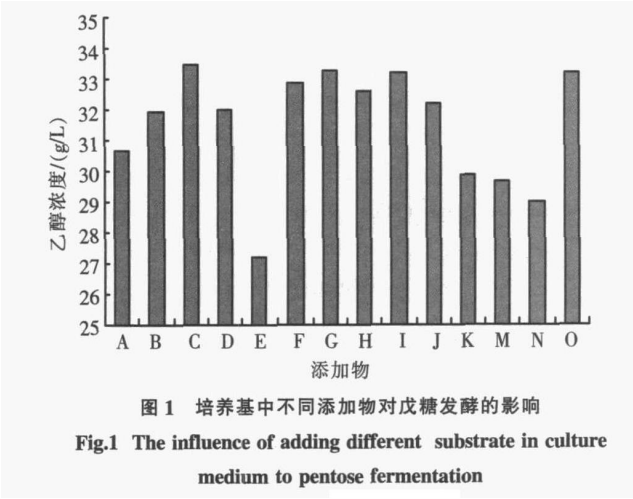
2 结果与分 析

2.1 不同添加物对发酵的影响

酵母在发酵过程中除需有效氮源和氧之外, 还需要 S、P、Mg²⁺、Ca²⁺ 等无机成分及其它一些营养因子. 无机盐类是微生物生命活动不可缺少的物质, 其主要功能是参与构成菌体成分、作为酶的组成部分, 或维持酶的活性、调节渗透压等. 其中 MgSO₄、KH₂PO₄ 和 CaCl₂ 对微生物的生长和发酵影响最大.

本试验在混合糖 (葡萄糖与木糖比率为 2:1) 80.9 g/L, CaCl₂ 0.3 g/L, MgSO₄ 0.5 g/L, KH₂PO₄ 3.0 g/L 的基本培养基基础上, 向培养基里添加不同物质, 研究其对发酵的影响, 发酵温度为 30℃, 摇床转速为 150 r/min, 结果如图 1 所示.

从图 1 中可以看出, 添加物不同, 发酵效果有很大差别, 主要表现在乙醇浓度的变化上. 其中乙醇浓度显著增高的是添加物质 C (麦芽汁 3.0 g/L + 微量元素^①)、G (黄豆粉 3.0 g/L + 微量元素 + 麦芽汁 3.0 g/L)、P (微量元素)、I (L-谷氨酰胺 0.6 g/L + 微量元素), 其乙醇浓度依次为 33.4、33.2、33.2、33.2 g/L, 显著高于对比样不添加任何物质 A 以硫酸铵作为氮源时的乙醇浓度 30.6 g/L, 除了 M、N、



A: 硫酸铵 1.1 g/L; B: 硫酸铵 1.1 g/L + ZnSO₄ · 7H₂O 10 mg/L; C: 硫酸铵 1.1 g/L + 麦芽汁 3.0 g/L + 微量元素; D: 硫酸铵 1.1 g/L + 黄豆粉 3.0 g/L + 微量元素; E: 尿素 0.5 g/L + L-谷氨酰胺 0.6 g/L; F: 硫酸铵 1.1 g/L + 微量元素 + 组合生长因子; G: 硫酸铵 1.1 g/L + 黄豆粉 3.0 g/L + 微量元素 + 麦芽汁 3.0 g/L; H: 硫酸铵 1.1 g/L + 麦芽汁 3.0 g/L + 黄豆粉 3.0 g/L; I: 尿素 0.5 g/L + L-谷氨酰胺 0.6 g/L + 微量元素; J: 硫酸铵 1.1 g/L + 黄豆粉 3.0 g/L; K: 尿素 0.5 g/L; L: 硫酸铵 1.1 g/L + 麦芽汁 3.0 g/L; M: 硫酸铵 1.1 g/L + L-谷氨酰胺 0.6 g/L; N: 硫酸铵 1.1 g/L + 泛酸钙 1.0 g/L; O: 硫酸铵 1.1 g/L + 微量元素

① 本文中微量元素配方均为: EDTA · 2Na 0.3 g ZnSO₄ · 7H₂O 0.1 g MnCl₂ · 4H₂O 0.02 g CoCl₂ · 6H₂O 0.006 g CuSO₄ · 5H₂O 0.007 g FeSO₄ · 7H₂O 0.06 g KIO₃ 0.02 g (NH₄)₂MoO₄ 0.009 g 溶于 100 mL 无菌水中, 每 50 mL 发酵液中加入微量元素溶液 0.5 mL 组合生长因子配方 V_H 0.03 g V_B 5 g 溶于 100 mL 无菌水中, 每 50 mL 发酵液中加入 0.5 mL.

L、E 添加后降低了最终乙醇浓度外, 其它如 R、D、F、H、J 的添加也都不同程度地提高了乙醇浓度, 有利于发酵的进行。

Katarzyna Kotarska 等人^[9]曾研究报道添加 2 g/L 的黄豆粉后乙醇浓度高于对比样 21%, 而添加 1 g/L 泛酸钙后乙醇浓度低于对比样 20%; H. K. Sreenath, T. W. Jeffries^[10]研究报道添加 10 mg/L Zn^{2+} 能提高酵母对糖的利用率及乙醇生产效率。在本试验中, 虽然添加物质 C (麦芽汁 3 g/L + 微量元素) 后乙醇浓度最高, 但考虑到实际生产中成本太高, 因此选择添加物 P (+ 微量元素), 乙醇浓度达 33.2 g/L, 既能保证发酵效果, 又能降低发酵成本。

2.2 不同温度对发酵的影响

浓醪发酵制备乙醇过程中酵母对温度敏感。在较低的温度区间, 酵母发酵能力随温度上升而增加, 发酵产生乙醇的速度加快; 在较高的温度区间, 酵母发酵酶系活力呈现钝化, 发酵产生乙醇的能力下降。由于高温增加了乙醇对酵母的毒性, 要求在浓醪发酵时选择耐高温酵母菌株来提高酵母的耐性^[11]。

由种子培养温度试验可知, 菌株的最适生长温度为 30℃, 因此, 在 30℃ 前后设置了几个不同温度, 以 80.9 g/L 的混合糖 (葡萄糖与木糖比率为 2:1) 为碳源, 硫酸铵为氮源, 摇床转速 150 r/min, 发酵周期为 24 h, 以期获得树干毕赤酵母的最适发酵温度, 试验结果如表 1 所示。

表 1 不同温度对发酵的影响

Table 1 The influence of different temperature to pentose fermentation

发酵温度 / ℃	残糖浓度 / (g/L)	乙醇浓度 / (g/L)	发酵后酵母 浓度 / (g/L)	糖利用率 / %	乙醇得率为理论 得率的百分数 %	发酵后 pH
27	2.0	30.5	12.2	97.5	78.4	4.4
30	0.1	32.5	12.2	99.8	81.7	4.4
33	6.5	27.2	12.1	91.8	73.9	4.5
35	13.7	27.0	11.5	83.0	86.7	4.5
38	25.9	20.8	9.9	67.9	74.6	4.6

从表 1 中可以看出, 发酵温度对高糖浓度乙醇发酵的影响非常显著, 随发酵温度升高, 残糖浓度经历一个先下降而后上升的过程, 而乙醇浓度、乙醇得率变化规律则与之相反。当温度为 27~38℃ 之间时, 随温度升高, 残糖浓度由 27℃ 时的 2.01 g/L 降至 30℃ 时的 0.1 g/L 时又升高到了 38℃ 时的 25.9 g/L, 同时乙醇浓度由 30.5 g/L 升至 32.5 g/L, 又降低到 25.9 g/L, 发酵后酵母浓度则随着发酵温度的升高而逐渐降低。这主要是因温度升高使得糖消耗的酶促反应加快, 因此糖利用率上升较快。当温度超过 30℃ 时, 随着温度的升高, 高温抑制酵母的生长, 发酵酶系钝化, 代谢活力明显降低, 发酵速度明显减慢, 酵母的数量逐渐减少, 活性也逐渐降低, 导致酵母的发酵能力减弱。由于酶促反应增加速度不及温度升高引起酶失活反应速度, 因此残糖浓度上升, 糖利用率下降, 发酵不彻底, 并且当发酵温度超过 35℃ 时, 残糖浓度上升速度明显加快, 糖利用率也大幅度下降, 当发酵温度升至 38℃ 时, 残糖浓度高达 25.9 g/L, 而糖利用率仅为 74.6%。

王杏文研究得出树干毕赤酵母发酵制备乙醇的最适温度为 35℃ 左右^[12], 本试验研究得出最适发酵温度要偏低一些, 可能是在高糖浓度乙醇发酵中, 由于糖浓度很高, 溶液的渗透压增加, 膜的完整性容易遭到破坏。同时在高温条件下, 酵母细胞耐受乙醇的能力也降低, 又有利于与酵母菌竞争葡萄糖的乳酸菌的生长, 从而影响发酵效率, 增加了生产成本。因此, 在高糖浓度乙醇发酵中, 树干毕赤酵母较为适宜的发酵温度为 30℃, 残糖浓度和乙醇浓度分别为 0.1 g/L 和 32.5 g/L。

2.3 不同初始 pH 对发酵的影响

pH 是微生物生长和产物合成的非常重要的状态参数, 是代谢活动的综合指标。pH 会影响各种酶活、基质利用速率和细胞结构, 从而影响菌的生长和产物的合成^[13]。本试验以 80.9 g/L 的混合糖 (葡萄糖与木糖比率为 2:1) 为碳源, 采用 0.05 mol/L 的柠檬酸 - 柠檬酸钠调节发酵液的 pH, 考察不同初始 pH 对树干毕赤酵母

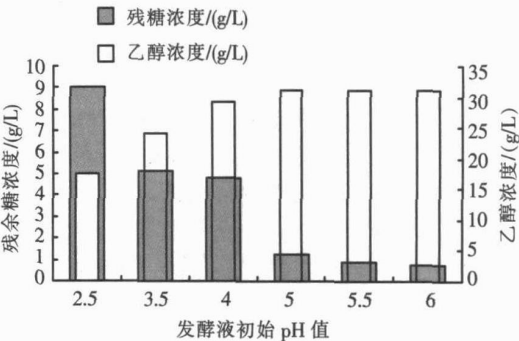


图 2 不同初始 pH 对发酵的影响

Fig.2 The influence of different initial pH to fermentation

发酵制备乙醇的影响,发酵温度为 30℃,发酵周期为 24 h 结果如图 2

由图 2 可知,当发酵液的初始 pH 由 2.5 上升到 6.0 的过程中,残糖浓度逐渐降低,乙醇浓度逐渐升高.当 pH 为 2.5 时,残糖浓度高达 9.0 g/L,乙醇浓度仅为 17.5 g/L,显微镜下观察酵母细胞大部分已变形,丧失发酵能力.当 pH 范围在 3.5~5.0 范围之内时,残糖浓度变化范围不大,而乙醇浓度有较大幅度的提高,由 24.1 g/L 提高到 31.0 g/L. 低的 pH 环境下,酵母消耗的糖并不是全部用来合成产物,可能一部分用来积累抵抗恶劣环境的能量.继续提高发酵液的 pH,乙醇浓度也相应提高,但幅度很小.因此,树干毕赤酵母发酵制备乙醇的最适 pH 范围为 5.0~6.0,但工业上高的 pH,如越接近杂菌杆菌适宜生长繁殖的 pH 7.0 值,发酵液越容易被染菌.因此调控 pH 范围为 5.0~5.5 较为适宜.

2.4 高混合糖浓度发酵历程

树干毕赤酵母在以 80.9 g/L 的混合糖(葡萄糖与木糖比率为 2:1)为碳源,1.1 g/L 硫酸铵为氮源,温度为 30℃,摇床转速为 150 r/min 的条件下进行发酵.典型发酵过程中总还原糖浓度、葡萄糖和木糖的浓度、乙醇浓度等参数随发酵时间的变化规律如图 3

从发酵过程中葡萄糖和木糖的浓度变化趋势来看,酵母迅速地利用葡萄糖,发酵 12 h 后,葡萄糖的利用率就达到 89.3%,而木糖利用率仅达 10.7%.因此,木糖的利用速率较慢,发酵 24 h 后木糖利用率才达到 79.3%.酵母优先利用葡萄糖,待 12 h 葡萄糖几乎被消耗完后,酵母开始消耗木糖,随着葡萄糖量的减少,对木糖的利用开始占主导地位.由于木糖代谢途径复杂,同时受到葡萄糖代谢产物及生成的乙醇的抑制作用,代谢速率逐渐变缓.从发酵过程中乙醇浓度变化曲线可知,乙醇浓度随着糖的不断消耗而逐渐提高,发酵 24 h 乙醇浓度达 30.9 g/L,发酵 28 h 时乙醇浓度最高,达到 33.2 g/L,继续延长发酵时间,糖浓度几乎不再下降,乙醇浓度随着发酵时间的延长而开始下降,可能主要的原因是在残糖浓度很低的情况下,酵母以乙醇为碳源.因此,控制一定的发酵时间对于获得最大乙醇浓度非常重要.

3 结 论

- (1) 添加硫酸铵 1.1 g/L+ 微量元素发酵效果较好,乙醇浓度为 33.2 g/L
- (2) 在戊糖己糖混合糖乙醇发酵中,树干毕赤酵母较为适宜的发酵温度为 30℃,残糖浓度和乙醇浓度分别为 0.1 g/L 和 32.5 g/L
- (3) 树干毕赤酵母高糖浓度发酵制备乙醇时,最适宜的 pH 范围为 5.0~5.5
- (4) 由典型发酵过程中各物质浓度变化曲线可知,酵母优先利用葡萄糖,发酵 12h 葡萄糖和木糖的还原糖利用率分别为 89.3%、10.7%.待 12 h 葡萄糖几乎被消耗完后,对木糖的利用开始占主导地位,乙醇浓度随着糖的不断消耗而逐渐提高.发酵 28 h 时乙醇浓度最高,达到 33.2 g/L,继续延长发酵时间,糖浓度几乎不再下降,乙醇浓度随着发酵时间的延长而开始下降,即酵母开始利用乙醇作为碳源.

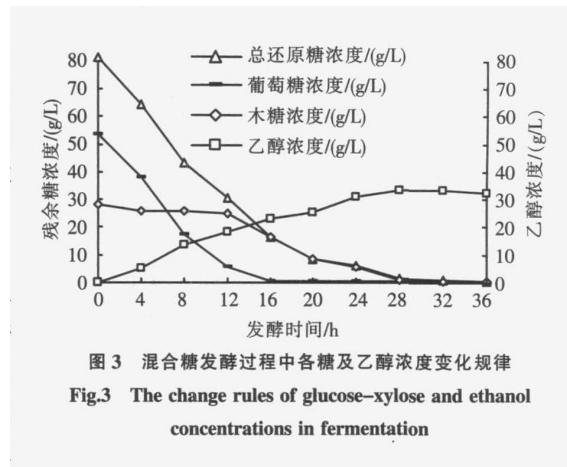


图 3 混合糖发酵过程中各糖及乙醇浓度变化规律
Fig.3 The change rules of glucose-xylose and ethanol concentrations in fermentation

[参考文献]

[1] 黄琴, 贺稚非. 纤维素物质生产乙醇研究进展 [J]. 粮食与油脂, 2008, 5: 8-10

[2] 赵党阳, 郭夏丽, 王岩. 木糖与葡萄糖共同发酵产燃料乙醇条件的优化研究 [J]. 酿造科技, 2008, 164(2): 49-51.

[3] 彭惠, 毛忠贵, 武国干, 等. 嗜热菌厌氧乙醇菌 JW 200 中乙醛脱氢酶的纯化 [J]. 南京师大学报: 自然科学版, 2007, 30(1): 78-81.

[4] 李永飞, 吕欣, 段作营, 等. 高浓度酒精补料发酵工艺的研究 [J]. 酿酒, 2003, 30(4): 31-33

[5] Thomas K C, Hynes S H, Ingledew W M, et al. Practical and theoretical considerations in the production of high concentrations of alcohol by fermentation [J]. Department of Applied Microbiology and Food Science, 1996, 3: 321-331.

[6] Casey G P, Magnus C A, Ingledew W M, et al. High gravity brewing. Nutrient enhanced production of high concentrations of ethanol by brewing [J]. Biotechnol Lett, 1983, 5: 429-434.

- [7] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. AnalChem, 1959 31(3): 426-428
- [8] 宋向阳, 李鑫, 毛连山, 等. 分批添料对戊糖、己糖同步发酵制备乙醇的影响 [J]. 南京林业大学学报, 2008 32(16): 9- 12
- [9] Katarzyna Kotarska. Effect of various activators on the course of alcoholic fermentation[J]. Journal of Food Engineering 2006 77: 965-971.
- [10] Sreenath H K, Jeffries T W. Production of ethanol from wood hydrolyzate by yeasts[J]. BioresourceTechnology 2000 72 253-260
- [11] 罗希, 何华坤, 刘莉, 等. 高浓度发酵制备红薯燃料乙醇的研究 [J]. 酿酒科技, 2008 169(7): 32-35
- [12] 王杏文. 游离及固定化酵母连续发酵制取乙醇 [D]. 南京: 南京林业大学, 2007 23-27
- [13] 储炬, 李友荣. 现代工业发酵调控学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2002

[责任编辑: 孙德泉]