

# 限制性供氧对木糖发酵制备乙醇的影响

宋向阳, 欧阳嘉, 蔡梅松, 勇 强

(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, 木糖为发酵底物, 通过限制性供氧发酵木糖制备乙醇. 结果表明, 搅拌转速和通风量是影响传氧系数的重要变量. 搅拌转速对传氧系数的影响大于通风量. 在 275~350 r/min 内搅拌转速的改变可引起传氧系数的显著改变. 在通风量为 2.0 L/L·h 通过改变搅拌转速调节供氧量, 当搅拌转速为 350 r/min 时发酵效果最佳, 木糖利用率为 91.7%, 乙醇浓度达 14.3 g/L. 当通风量为 3.0 L/L·h 搅拌转速为 300 r/min 时, 木糖利用率和乙醇浓度均达到最大值, 分别为 96.3% 和 15.0 g/L.

[关键词] 限制性供氧, 木糖, 发酵, 乙醇

[中图分类号] Q53 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2010)04-0063-05

## Effect of Limited Providing Oxygen on Fermentation of Xylose to Ethanol

Song Xiangyang, Ou Yangjia, Cai Meisong, Yong Qiang

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

**Abstract** Fermentation of xylose to ethanol was investigated with *Pichia stipitis* by limited providing oxygen. The results showed that the speed of stirring and air rate was main factor for oxygen transfer rate. Effect of stirring speed on oxygen transfer rate was more than that of air rate. The change of stirring speed led to great change of air rate between 275 and 350 round per minute. To control oxygen transfer rate by the change of stirring speed when air rate was 2.0 L/L·h. It was the best effect of stirring speed at 350 r/min. The rate of consumed xylose was 91.7%. The concentration of ethanol reached 14.3 g/L. When air rate was 3.0 L/L·h and stirring speed was 300 r/min, the rate of consumed xylose and stirring speed both reached maximum values which were 96.3%, 15.0 g/L respectively.

**Key words** limited providing oxygen, xylose, fermentation, ethanol

木糖发酵需要限制供氧<sup>[1-4]</sup>, 由于氧可作为终端电子受体来缓解木糖代谢起始两步的部分氧化还原失衡. 在低比氧气利用速率下, 电子转移系统不能够重新氧化呼吸和发酵产生的全部 NADH, 导致细胞内的 NADH 水平上升, 使得 NAD<sup>+</sup>-木糖醇脱氢酶活性下降, 最终导致木糖醇的积累. 一般来讲, 木糖发酵的最佳溶解氧张力 DOT (dissolved oxygen tension) 很低, 难以用溶氧电极测出. 因此, 可通过氧传递速率 OTR (oxygen transfer rate) 来表达木糖发酵中的需氧量, 但这只能表示这一发酵罐整体的耗氧规律. 而酵母的耗氧是与细胞密度有关的, 因而比氧气消耗速率(呼吸强度)是更重要的发酵参数. 木糖发酵制备乙醇的菌种较多<sup>[5-8]</sup>, 本文以树干毕赤酵母为发酵菌株, 木糖为发酵底物, 通过限制性供氧来提高糖利用率及乙醇得率, 为工业化高糖浓度分批添料发酵制备乙醇的生产工艺提供理论基础.

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

树干毕赤酵母 (*Pichia stipitis*) P<sub>2</sub> 能够同步发酵戊糖和己糖, 由南京林业大学生物化工研究所通过

收稿日期: 2010-04-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30871992)、"863"计划资助 (2008AA05Z401).

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

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酵菌种.

1.2 培养基及培养条件 (单位 g/L)

菌种培养基: 木糖 20.0, 蛋白胨 5.0, 酵母汁 3.0, pH 值 5.0, 增殖培养基: 木糖 30.0, 葡萄糖 30.0, 蛋白胨 3.0, 酵母浸膏 2.5,  $\text{CaCl}_2$  0.25,  $\text{MgSO}_4$  0.25,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.5, pH 值 5.0, 发酵培养基: 木糖 45.0,  $\text{CaCl}_2$  0.25,  $\text{MgSO}_4$  0.25,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.5,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.57, pH 值 5.0

1.3 分析测定

1.3.1 还原糖测定

采用 3,5-二硝基水杨酸 (DNS)法测定<sup>[9]</sup>.

1.3.2 酵母浓度测定法

取适当稀释的含酵母发酵液, 采用比浊法 (620 nm)测定<sup>[10]</sup>.

1.3.3 乙醇含量

采用高效液相色谱 (HPLC)法测定乙醇含量. 方法如下: 测定样品先经 10 000 r/min 离心 5 min, 上清液经 0.22  $\mu\text{m}$  的滤膜过滤, 再用于 HPLC 分析, 采用外标法测定.

HPLC 操作条件: Agilent 1100 色谱仪, 色谱柱为 Bio-Rad Aminex HPLC-87H (7.8  $\times$  300 mm),

洗脱液为 0.005 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 流速 0.6 mL/min, 柱温 55 $^\circ\text{C}$ , 进样量 10  $\mu\text{L}$ , 示差折光检测器.

1.3.4 溶氧系数  $K_L\alpha$  的测定

Mettler Toledo 溶氧电极在线测定发酵液溶解氧浓度, 动态法<sup>[11]</sup>测定发酵罐的溶氧系数. 在稳定发酵状态下, 液相中溶解氧浓度的变化与氧从气相向液相传递的速率及酵母细胞吸氧速率有关. 即

$$\frac{dC_L}{dt} = K_L\alpha(C^* - C_L) - rx,$$

方程重排得:

$$C_L = C^* - \frac{1}{K_L\alpha} \left( rx + \frac{dC_L}{dt} \right),$$

式中:  $C_L$  为溶解氧浓度 (mmol  $\text{O}_2$  /L);  $C^*$  为传质界面氧平衡浓度 (mmol  $\text{O}_2$  /L);  $K_L\alpha$  为传氧系数 ( $\text{h}^{-1}$ );  $r$  为比耗氧速率 (mmol  $\text{O}_2$  /g $\cdot$ h);  $x$  为酵母浓度 (g/L).

动态法求溶氧系数的方法是在发酵稳定的情况下, 停止输入空气, 此时式 (1) 中  $K_L\alpha(C^* - C_L) = 0$

式 (1) 变为:  $\frac{dC_L}{dt} = - rx$ .

这段时间  $C_L$  与  $t$  呈线性关系, 根据  $C_L$  与  $t$  的关系求出斜率  $- rx$ . 求得  $rx$  后, 以  $rx + \frac{dC_L}{dt}$  为横坐标,  $C_L$

为纵坐标, 作图为一一直线. 直线斜率为  $-\frac{1}{K_L\alpha}$ , 从而求出传氧系数  $K_L\alpha$ .

2 结果与分析

2.1 不同操作条件下发酵罐的传氧性能

生化反应的重要操作之一是寻求一个使氧的供应与微生物对氧的需要能达到动态最优匹配的  $K_L\alpha$  (传氧系数) 值, 以期得到理想的 OTR (氧传递速率).  $K_L\alpha$  是通风量和搅拌转速的函数, 对于发酵罐发酵来说, 影响溶氧的操作变量主要是通气量和搅拌转速.

本实验采用 10 L 发酵罐, 在底物木糖浓度为 45.0 g/L, 酵母浓度约为 8.0 g/L, 温度为 35 $^\circ\text{C}$  时测定了通风和搅拌对传氧系数的影响. 在 2.0 L/L $\cdot$ h 的通风量下测定了搅拌转速对传氧系数的影响, 结果如图 1A 所示; 在 300 r/min 的搅拌转速下测定了通风量对传氧系数的影响, 结果如图 1B 所示.

由图 1A 可知, 随着搅拌转速的增加, 相应传氧系数随之增大, 在 275~350 r/min 增大的速率较快. 搅拌转速为 300 r/min 时传氧系数为 178.5  $\text{h}^{-1}$ , 搅拌转速为 350 r/min 时传氧系数增加为 299.5  $\text{h}^{-1}$ , 搅拌转速只增加了 50 r/min, 而传氧系数却增加了约 70.0%. 搅拌转速增加到 350 r/min 以上时, 传氧系数随搅拌

转速增大的趋势变缓. 搅拌转速从 350 r/min 增加到 400 r/min

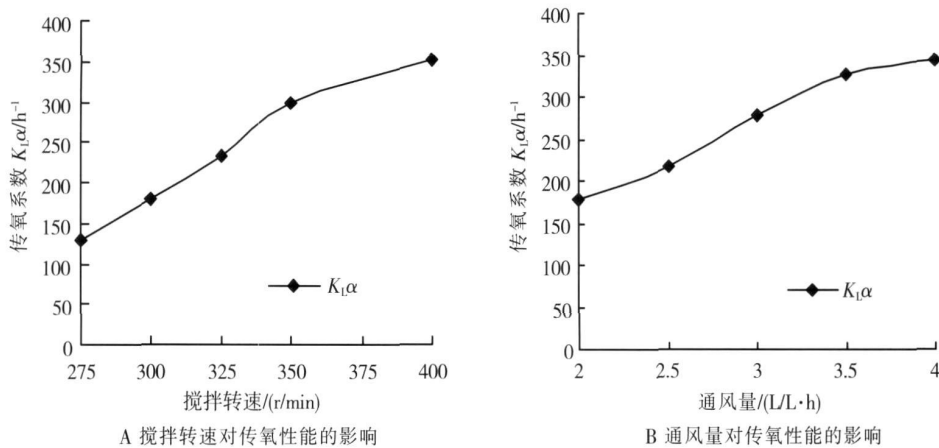


图 1 搅拌转速和通风量对传氧性能的影响  
Fig.1 Effect of speed of stirring and air rate on oxygen transfer capability

传氧系数只增加了约 18.0%。  
图 1B 中, 在通风量分别为 2.0 2.5 3.0 3.5 4.0  $\text{L/L}\cdot\text{h}$  时, 对应的传氧系数分别为 178.5 216.4 278.3 326.5 343.4  $\text{h}^{-1}$  表现为随着通风量的增大, 传氧系数相应增加, 其中通风量从 2.5  $\text{L/L}\cdot\text{h}$  增加到 3.0  $\text{L/L}\cdot\text{h}$  时, 传氧系数增加最大, 3.0  $\text{L/L}\cdot\text{h}$  以上时增加不明显. 通风量由 2.0  $\text{L/L}\cdot\text{h}$  增加到 4.0  $\text{L/L}\cdot\text{h}$  增加了一倍, 传氧系数增加了约 92.0%。  
由以上可知, 搅拌转速和通风量是影响传氧系数的重要变量. 搅拌转速对传氧系数的影响大于通风量. 在 275~350 r/min 内搅拌转速的改变可引起传氧系数的显著改变.

2.2 搅拌转速对木糖发酵的影响

搅拌转速能明显改变传氧性能和溶氧水平, 进而影响戊糖发酵的效果. 本实验在底物木糖浓度为 45.0 g/L, 初始酵母浓度约为 12.0 g/L, 发酵温度 35℃, 通风量 2.0  $\text{L/L}\cdot\text{h}$  下, 研究了搅拌转速对木糖发酵的影响, 结果如图 2 和图 3 所示.

从图 2 和图 3 可以看出, 从 250~350 r/min 随着搅拌转速的增加, 残糖浓度逐渐降低, 乙醇浓度逐渐增加. 在搅拌转速为 350 r/min 时, 乙醇浓度最高, 达 14.3 g/L, 其平均乙醇生产速率达到 0.6 g/L·h, 乙醇得率达到理论得率的 75.3%; 残糖浓度仅有 3.7 g/L, 木糖利用率达 91.7%, 平均木糖利用速率达 1.7 g/L·h. 在搅拌转速为 300 r/min 时, 乙醇浓度为 13.0 g/L, 比 350 r/min 时降低了 8.8%; 乙醇得率达到理论得率的 77.7%, 比 350 r/min 时略高; 残糖浓度为 8.6 g/L, 木糖利用率达 80.98%, 比 350 r/min 时降低了 10.7%. 在搅拌转速下降为 250 r/min 时, 木糖利用率急剧下降, 只有 54.6%, 残糖浓度高达 20.4 g/L; 乙醇浓度仅有 8.11 g/L, 比 350 r/min 时降低了 43.3%; 其乙醇得率达到理论得率的 71.7%, 比 350 r/min 时低 3.6%. 因此, 搅拌转速低于 350 r/min 时, 因溶解氧不能充分被溶解利用, 且木糖发酵时是兼厌氧发酵过程, 对氧需求更为敏感, 故搅拌转速 350 r/min 是一个分界点.

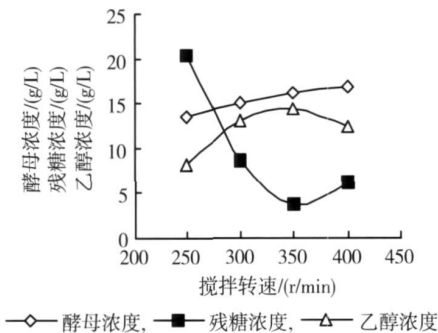


图 2 搅拌转速对木糖发酵的影响

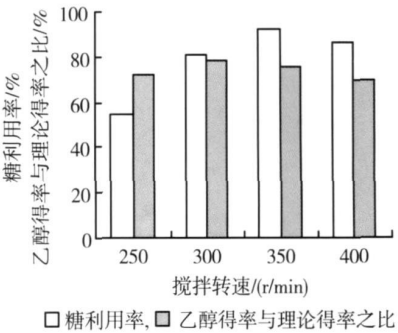


图 3 搅拌转速对木糖发酵的糖利用率和乙醇得率的影响

Fig.2 Effect of speed of stirring on xylose fermentation Fig.3 Effect of the rate of consumed xylose and the rate of obtained ethanol on xylose fermentation

而当搅拌转速从 350 r/m in 升高到 400 r/m in 时,则出现了相反的趋势. 搅拌转速为 400 r/m in 时,乙醇浓度为 12.4 g/L,比 350 r/m in 时降低了约 13.0%;乙醇得率达到理论得率的 69.4%,比 350 r/m in 时低约 6.0%;残糖浓度为 6.2 g/L,木糖利用率达 86.3%,比 350 r/m in 时降低了 5.4%.

这可能是搅拌转速过高时,超过了木糖发酵时酵母对氧的需求,乙醇浓度为 12.4 g/L,比 350 r/m in 时降低了约 13.0% .

因此,在通风量为 2.0 L/L·h 通过改变搅拌转速调节供氧量,当搅拌转速为 350 r/m in 时发酵效果最佳,木糖利用率为 91.7%,乙醇浓度达 14.3 g/L.

2.3 通风量对木糖发酵的影响

通风量也能通过改变发酵罐的传氧性能和溶氧水平,进而影响木糖发酵的效果. 本实验在底物木糖浓度为 45.0 g/L,初始酵母浓度为 12.0 g/L,搅拌转速为 300 r/m in,发酵温度 35℃下,研究了通风量对木糖发酵的影响,结果如图 4和图 5所示.

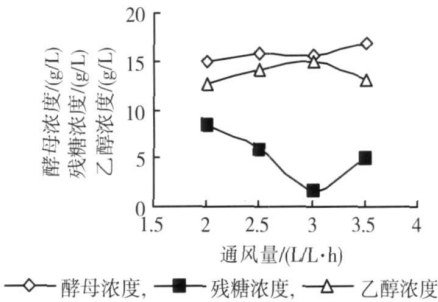


图 4 通风量对木糖发酵的影响

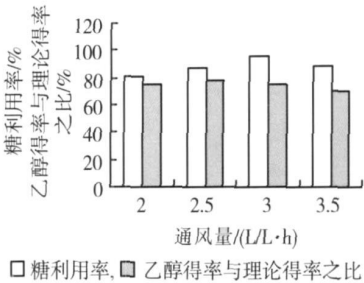


图 5 通风量对木糖发酵的糖利用率和乙醇得率的影响

Fig.4 Effect of oxygen transfer rate on xylose fermentation

Fig.5 Effect of oxygen transfer rate on the rate of consumed xylose and the rate of obtained ethanol of xylose fermentation

从图 4和图 5可以看出,当通风量从 2.0 L/L·h 增加到 3.0 L/L·h 时,残糖浓度逐渐降低,乙醇浓度逐渐增加,在通风量为 3.0 L/L·h 时乙醇浓度为 15.0 g/L,达到最大值,其平均乙醇生产速率达 0.6 g/L·h 乙醇得率达到理论得率的 75.4%;残糖浓度仅有 1.7 g/L,木糖利用率达 96.3%,平均木糖利用速率达 1.8 g/L·h 在通风量为 2.5 L/L·h 时,乙醇浓度为 14.1 g/L,比 3.0 L/L·h 时降低了 6.4%;乙醇得率达到理论得率的 78.1%,比 3.0 L/L·h 时略高;残糖浓度为 5.8 g/L,木糖利用率达 87.0%,比 3.0 L/L·h 时降低了 9.3%. 在通风量下降为 2.0 L/L·h 时,木糖利用率下降到 81.1%,残糖浓度达 8.5 g/L;乙醇浓度仅有 12.6 g/L,比 3.0 L/L·h 时降低了 16.0%.

当通风量从 3.0 L/L·h 升高到 3.5 L/L·h 时,乙醇浓度降低到 13.0 g/L,比 3.0 L/L·h 时降低了 13.7%;乙醇得率达到理论得率的 70.4%,比 3.0 L/L·h 时低约 5%;残糖浓度为 5.0 g/L,木糖利用率达 89.0%,比 3.0 L/L·h 时降低了约 7.0%.

可见,在搅拌转速为 300 r/m in,通过改变通风量调节供氧量,最佳的通风量为 3.0 L/L·h 此条件下的木糖利用率和乙醇浓度达到最高,分别为 96.3% 和 15.0 g/L.

通风量对溶氧水平的影响如图 6 所示. 从图 6 可以看出,通风量对溶氧水平的影响要小于搅拌转速. 当通风量为 2.0 L/L·h 时, DOT (溶解氧张力) 时而掉零,时而在 0~3% 之间波动; 2.5 L/L·h 时,主发酵期的 DOT 主要在 3% 左右波动,波动的幅度较大; 3.0 L/L·h 时, DOT 水平要略高于 2.5 L/L·h 时的 DOT,大约在 4~9% 之间波动. 3.5 L/L·h 时, DOT 水平进一步升高,大约在 10~15% 之间波动. 因通风量为 3.0 L/L·h 此条件下的木糖利用率和乙醇浓度达到最高,分别为 96.3% 和 15.0 g/L 故 3.0 L/L·h 时, DOT 在 4~9% 之间溶解氧最适合,即最有利于木糖发酵制备乙醇.

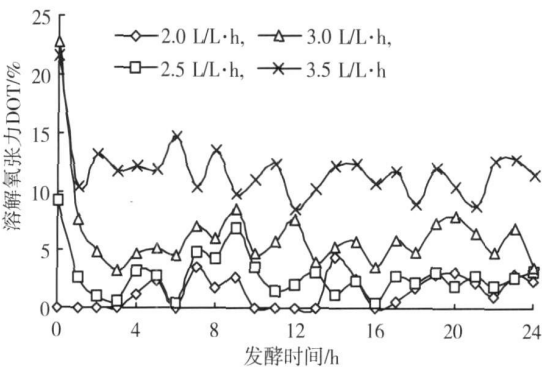


图 6 不同通风量下的 DOT 时变曲线

Fig.6 The time-varying curve of difference oxygen transfer rate for DOT

### 3 结论

(1) 搅拌转速和通风量是影响传氧系数的重要

变量. 搅拌转速对传氧系数的影响大于通风量. 结果表明, 在 275~350 r/min 内搅拌转速的改变可引起传氧系数的显著改变.

(2) 在通风量为 2.0 L/L·h 通过改变搅拌转速调节供氧量, 当搅拌转速为 350 r/min 时发酵效果最佳, 木糖利用率为 91.7%, 乙醇浓度达 14.3 g/L.

(3) 当通风量为 3.0 L/L·h 搅拌转速为 300 r/min 时, 传氧系数为  $299.5 \text{ h}^{-1}$ , DOT 在 4~9% 之间溶解氧最适合, 即最有利于木糖发酵制备乙醇. 此条件下的木糖利用率和乙醇浓度达到最高, 分别为 96.3% 和 15.0 g/L.

### [参考文献]

- [1] Bruinenberg PM, de Bot PH M, van Dijken JP, et al. NADH-linked aldose reductase: The key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose by yeasts[J]. Appl Microbiol Biotechnol 1984, 19(25): 256-260.
- [2] Delgenes JP, Moletta R, Navarro JM. Fermentation of D-xylose, D-glucose, L-arabinose mixture by *Pichia stipitis*: effect of the oxygen transfer rate on fermentation performance[J]. Biotechnol Bioeng 1989, 34: 398-402.
- [3] Rizzi M, Hanwart K, Bui Thanh N A, et al. A kinetic study of the  $\text{NAD}^+$ -xylitol dehydrogenase from the yeast *Pichia stipitis* [J]. J Ferment Bioproc 1989, 67: 25-30.
- [4] Rizzi M, Klein C, Schulze C. Xylose fermentation by yeast 5. Use of ATP balances for modeling oxygen-limited growth and fermentation of yeast *Pichia stipitis* with xylose as carbon source[J]. Biotechnol Bioeng 1989, 34: 509-514.
- [5] 宋向阳, 陈牧, 毛连山, 等. 戊糖己糖混合糖发酵生产乙醇的主要影响因素[J]. 南京师大学报: 自然科学版, 2009, 32(1): 115-119.
- [6] Jeffries TW, Kurtzman CP. Strain selection, taxonomy, and genetics of xylose-fermenting yeasts[J]. Enzym Microb Technol 1994, 16: 922-932.
- [7] Sanchez S, et al. Comparative study of the fermentation of D-glucose/D-xylose mixtures with *Pachysolen tannophilus* and *Candida shehatae* [J]. Bioprocess Engineering 1999, 21: 525-532.
- [8] Sanchez S, et al. The fermentation of mixtures of D-glucose and D-xylose by *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* or *Pachysolen tannophilus* to produce ethanol[J]. J Chem Technol Biotechnol 2002, 77: 641-648.
- [9] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. Anal Chem, 1959, 31(3): 426-428.
- [10] 季更生, 勇强, 余世袁. 发酵抑制剂对树干毕赤酵母戊糖发酵的影响[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2007, 31(6): 133-135.
- [11] 高孔荣. 发酵设备[M]. 北京: 轻工业出版社, 1991: 116-119.

[责任编辑: 顾晓天]