

管囊酵母发酵生产乙醇的实验研究

田毅红, 雷照方, 龚大春

(三峡大学化学与生命科学院, 湖北 宜昌 443002)

摘要: 嗜鞣管囊酵母(*Pachysolen tannophilus*)As2.1585 可以直接发酵木糖产乙醇。研究了供氧水平、培养基初始 pH 值、接种量等条件对嗜鞣管囊酵母 As2.1585 发酵产乙醇的条件。结果表明, 在温度 28 ℃、转速 100 r/min 条件下, 嗜鞣管囊酵母发酵木糖产乙醇适宜在高好氧条件下进行, 产乙醇的最适初始 pH 值为 5.0, 最适接种浓度 2%, 当水解液木糖浓度为 3 g/100 mL 时, 最大乙醇浓度为 0.8 g/100 mL, 是理论得率的 85%。

关键词: 乙醇; 嗜鞣管囊酵母; 湿氧化; 发酵; 木糖

中图分类号: TS262.2; TS261.4; TQ028.8

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2008)01-0045-03

Experimental Research on Xylose Fermentation by *Pachysolen tannophilus* to Produce Ethanol

TIAN Yi-hong, LEI Zhao-fang and GONG Da-chun

(Chemistry & Life Science College Of Three Gorges University, Yichang, Hubei 443002, China)

Abstract: Xylose fermentation directly by *Pachysolen tannophilus* As2.1585 could produce ethanol. The effects of the relative technical conditions including the aeration level, the initial substrate pH value and the inoculation quantity on ethanol production were investigated. The results indicated that when the temperature and the rotating speed were kept at 28 ℃ and 100 r/min respectively, the fermentation should be carried out under high-aerobic conditions with the initial pH value as 5.0 and the optimum inoculation quantity as 2%, and when the concentration of hydrolysis xylose was 3%, the maximum ethanol yield rate was 0.8 g/100 mL (85% of theoretical yield).

Key words: ethanol; *Pachysolen tannophilus*; wet oxidation; fermentation; xylose

木质纤维素的主要成分包括纤维素、半纤维素和木质素 3 部分。细胞壁中的半纤维素和木质素通过共价键连接成网络结构, 纤维素镶嵌在其中。不同物质中纤维素、半纤维素和木质素的含量不同, 麦草秸秆中的主要成分为纤维素 30%、半纤维素 50%、木质素 15%^[1]。纤维素原料制备酒精的研究报道逐年增多^[2], 但天然半纤维素水解产物的 85%~90% 是木糖, 如何充分利用好半纤维素是生物量利用率的关键之一。酵母木糖代谢产生乙醇的理论得率为 0.46 g 乙醇/g 木糖, 低于葡萄糖乙醇发酵的理论得率 0.51 g 乙醇/g 葡萄糖^[3]。目前, 半纤维素微生物转化尚存在以下几个问题: 可发酵半纤维素的主要组成糖(木糖)的微生物较少。虽然已发现了发酵木糖的微生物^[4], 但它们耐乙醇浓度较低, 副产物较多, 对发酵条件要求苛刻^[5]。为此, 本文探讨了用湿氧化法^[6] 预处理半纤维素微生物转化生产乙醇的可行性, 研究了直接发酵木糖产酒精的一种微生物嗜鞣管囊酵母 (*Pachysolen tannophilus*)As2.1585 的最优发酵工艺条件。

1 材料与方法

1.1 菌种

嗜鞣管囊酵母 (*Pachysolen tannophilus*)As2.1585, 本实验室保藏。

1.2 培养基

斜面培养基: 麦芽汁琼脂培养基, 琼脂 2%。

市购麦芽粉碎, 称取 500 g, 加水 2 L, 于 55 ℃ 糖化至加碘溶液不显蓝色为止(6~7 h) 以纱布过滤, 装瓶加棉塞于 0.15 MPa, 15 min 湿热使杂质沉淀。取出冷却, 再经 4 层纱布过滤得麦芽汁。

液体种子培养基: 液体麦芽汁培养基, 高压灭菌锅 0.14 MPa 灭菌 30 min。

麦草秸秆水解液的制备^[9]: 采用湿氧化法, 称取过筛后的小麦秸秆原料, 配制成料液比为 1:15 的混悬液, 加入 2 g/L Na₂CO₃, 在 130 ℃ 下通入压强为 1.2 MPa 的氧气, 反应 10 min, 反应完成后, 取所得混悬液进行抽滤得水解液调节 pH 为 5.0。

发酵培养基^[9]为: 麦草秸秆湿氧化水解液木糖 3%,

收稿日期: 2007-09-25

作者简介: 田毅红(1969-)女, 陕西人, 硕士, 讲师, 主要从事发酵方面的研究。

酵母粉 0.4%, 蛋白胨 0.6%, 尿素 0.04%, K_2HPO_4 0.01%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.02%, 用盐酸调 pH, 0.14 MPa 高压灭菌 30 min。

1.3 培养方法

斜面培养: 28 °C 培养 72 h。

种子培养: 28 °C 培养 48 h。

发酵培养: 培养时间 60~72 h, 摇床转速范围为 0~150 r/min。

1.4 测定方法

总糖含量的测定: 3,5-二硝基水杨酸法(DNS法)^[8]。

木糖含量的测定: 苔黑酚显色吸光光度法^[9-11]。

乙醇浓度的测定: 取发酵液 100 mL, 经蒸馏得乙醇溶液, 用重铬酸钾滴定^[12-13]。

pH 值的测定: 精密 pH 试纸, 上海经济区试剂公司。

2 结果与分析

2.1 不同碳源比例对乙醇发酵的影响

取不同比例的木糖和葡萄糖, 使发酵液总碳源浓度为 6%, pH 为 5.0, 装液量为 100 mL/250 mL, 接种量为 2%, 摇床转速为 100 r/min, 培养温度为 28 °C, 培养时间为 72 h。具体碳源情况见表 1。

表 1 不同碳源比例对发酵产乙醇的影响 (g/100 mL)

木糖和葡萄糖 糖质量比	发酵液终止 pH值	残留还原 糖浓度	残留木 糖浓度	乙醇 浓度
单一木糖	3.3	1.9	1.9	1.418
2:1	2.8	3.42	1.31	0.65
1:1	3.0	2.6	1.23	0.51
1:2	2.5	2.03	0.31	0.43
单一葡萄糖	2.1	0.3	—	0.35

由表 1 可以看出, 嗜鞣管囊酵母发酵产乙醇时, 培养基中木糖比例越高, 产乙醇浓度越高。葡萄糖比例越高, 发酵液中 pH 下降越多, 以单一葡萄糖做碳源时, 还原糖浓度下降了很多, pH 下降到 2.1, 但产乙醇量很少, 可能是管囊酵母不能利用葡萄糖产乙醇, 发酵产生了有机酸, 故后面的实验主要讨论以木糖作碳源, 即以湿氧化法水解液中的木糖作为碳源。

2.2 培养条件的优化

湿氧化法是在高温加压条件下, 木质纤维素、水和氧气共同参加反应, 加入 Na_2CO_3 可防止纤维素破坏, 使半纤维素和木质素溶解于碱液中, 而与纤维素分离, 得到的水解液的主要成分是木糖, 经浓缩可以作为管囊酵母发酵的碳源, 本实验探讨了利用水解液木糖发酵产乙醇的工艺条件。

2.2.1 不同的摇床转速对发酵的影响

将水解液浓缩, 使其中的木糖浓度为 3 g/100 mL,

发酵液初始 pH 为 5.0, 装液量 100 mL/250 mL, 接种量 2%, 培养温度 28 °C, 摇床转速见表 2。

表 2 摇床转速对发酵的影响

项目	培养时间(h)			
	60	60	72	72
摇床转速(r/min)	0	100	0	100
发酵液 pH 值	5.0	4.5	5.0	4.3
残留木糖浓度(g/100 mL)	2.9	1.7	2.7	0.9
乙醇浓度(g/100 mL)	0.02	0.37	0.1	0.72
乙醇得率(g/g)	0.20	0.284	0.333	0.343
乙醇得率占理论得率百分数(%)	43.5	61.7	72	746

由表 2 可以看出, 摇床转速对发酵影响很大, 嗜鞣管囊酵母在摇床转速为 0, 即在低供氧的条件下几乎不产乙醇, 然而在微好氧的条件下, 发酵 72 h 乙醇浓度为 0.72 g/100 mL。

2.2.2 不同的装液量对发酵的影响

发酵液初始 pH 为 5.0, 接种量为 2%, 培养温度为 28 °C, 摇床转速 100 r/min。不同的装液量对发酵的影响结果见表 3。

表 3 不同装液量对发酵结果的影响

培养 时间 (h)	装液量 (mL/mL)	残留木 糖浓度 (g/100mL)	乙醇浓度 (g/100mL)	乙醇 得率 (g/g)	乙醇得率占理 论得率百分数 (%)
60	50/250	0.953	0.8	0.391	85
60	100/250	1.80	0.39	0.325	71
60	150/250	2.26	0.27	0.365	79
72	50/250	0.26	0.90	0.328	71
72	100/250	1.3	0.51	0.3	65.2
72	150/250	1.90	0.26	0.236	51.3

由表 3 可知, 供氧水平(以装液量体现)对嗜鞣管囊酵母发酵木糖产乙醇影响较大, 摇床转速为 100 r/min, 装液量为 50 mL/250 mL 发酵效果最好, 100 mL/250 mL 次之, 150 mL/250 mL 发酵效果最差。说明嗜鞣管囊酵母发酵木糖产乙醇在较高的供氧水平下较好, 发酵 72 h 时发酵液中乙醇浓度要高于 60 h 时, 但乙醇对糖的得率有所下降。

2.2.3 不同的初始 pH 对发酵的影响

装液量为 100 mL/250 mL, 接种量为 2%, 培养温度 28 °C, 摇床转速 100 r/min。不同的初始 pH 对发酵的影响结果见表 4。

从表 4 可以看出, 初始 pH 在一定范围 (pH4.5~6.0) 内对发酵影响不大, pH5.0 最好。从发酵时间来考察, 72 h 时发酵液中乙醇浓度虽然有所增加, 但乙醇转化率却下降了, 分析原因可能有两种可能: 菌体生长消耗了部分木糖; 部分乙醇挥发了, 发酵产乙醇的速率比乙醇挥发的速率快。

表4 不同的初始pH对发酵的影响

培养时间(h)	初始pH	残留木糖浓度(g/100mL)	乙醇浓度(g/100mL)	乙醇得率(g/g)	乙醇得率占理论得率百分数(%)
60	4.5	0.92	0.78	0.375	81.5
60	5.0	0.91	0.81	0.39	85
60	6.0	0.90	0.79	0.38	82.6
72	4.5	0.34	0.76	0.286	62.1
72	5.0	0.28	0.75	0.275	60
72	6.0	0.28	0.74	0.27	58.7

2.2.4 不同的接种量对发酵的影响

装液量为 100 mL/ 250 mL, 初始 pH 为 5.0, 培养温度 28 , 摇床转速为 100 r/min。不同接种量对发酵的影响实验结果见表 5。

表5 不同的接种量对发酵的影响结果

培养时间(h)	接种量(%)	残留木糖浓度(g/100mL)	乙醇浓度(g/100mL)	乙醇得率(g/g)	乙醇得率占理论得率百分数(%)
60	1	1.62	0.384	0.312	67.8
60	2	1.60	0.55	0.39	85
60	3	1.77	0.535	0.39	85
72	1	0.98	0.480	0.238	51.7
72	2	1.02	0.50	0.252	54.8
72	3	1.71	0.35	0.271	58.9

由表 5 分析可知, 接种量为 2 %和 3 %时发酵效果几乎一样, 但是生产上从经济的角度考虑接种量选 2 %较好。从发酵的时间上来考察, 72 h 时乙醇浓度略有上升, 但乙醇的转化率大大下降了, 说明 60 ~ 72 h 这段时间乙醇挥发得比较多或菌体生长繁殖利用木糖比较多。

3 结论

实验结果表明: 管囊酵母不能发酵葡萄糖产乙醇。在温度为 28 、转速为 100 r/min 的条件下, 管囊酵母

发酵产乙醇适宜在高供氧水平下进行, 当摇瓶装液量为 50 mL/250 mL, 发酵液初始 pH 为 5.0 ~ 6.0, 最适接种浓度 2 %, 水解液木糖浓度为 3 g/100 mL 时, 最大乙醇得率为 0.39 g/g, 是理论得率的 85 %。由于湿氧化法形成的水解液中糠醛之类的副产物较少, 对微生物的毒害作用较小, 进行乙醇发酵是可行的。

参考文献:

- [1] 戴红霞. 稻草秸秆纤维素生产酒精的工艺条件探索[D]. 大庆: 大庆石油学院, 2005.
- [2] 常秀莲. 木质纤维素发酵酒精的探讨[J]. 酿酒科技, 2001, 104(2): 39-42.
- [3] 钟桂芳, 傅秀辉, 孙君社, 张博润. 发酵木糖生产酒精的及其应用前景[J]. 微生物学, 2004, 24(1): 42-44.
- [4] 陈艳萍, 勇强, 刘超纲, 徐勇, 余世袁. 戊糖发酵微生物及其选育[J]. 纤维素科学与技术, 2001, 9(3): 57-61.
- [5] 刘健, 陈洪章, 李佐虎. 木糖发酵生产乙醇的研究[J]. 工业微生物, 2001, 31(2): 36-41.
- [6] 龚大春, 董光辉, 田毅红. 湿氧化法纤维素预处理工艺研究[A]. 纤维素会议论文集[C].
- [7] 宋安东, 康怀彬. 以木糖为原料的酒精发酵研究[J]. 郑州轻工业学院学报(自然科学版), 2003, 18(3): 41-43.
- [8] 董晓燕. 生物化学实验[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003. 34-37.
- [9] 王文岭, 黄雪松. DNS法测定木糖含量时最佳测定波长的选择[J]. 食品科学, 2006, (4): 196-198.
- [10] 张蕴玉, 陆艳, 沈叶帆. 槐耳冲剂主要成分的含量测定[J]. 江苏药学与临床研究, 1999, 7(2): 39-40.
- [11] 吴灵静, 马灵芝, 施猛. 不同产地的天冬药材中多糖含量的比较研究[J]. 药物鉴定, 2004, 13(2): 50-51.
- [12] 杨宇民. 容量分析法测定酱制品中乙醇含量[J]. 中国调味品, 1995, (10): 29-30.
- [13] 林仁权, 胡文兰, 陈国亮. 重铬酸钾氧化分光光度法测定酒中乙醇含量[J]. 浙江预防医学, 2006, 18(3): 78-79.

国家酒类及加工食品质量检验监督中心 实验基地奠基仪式在泸州举行

本刊讯: 国家酒类及加工食品质量检验监督中心实验基地奠基仪式于 2008 年 1 月 6 日在泸州酒业集中发展区隆重举行。四川省质量技术监督局局长刘云夏、中国食品工业协会白酒专业委员会常务副会长、秘书长马勇、四川省食品工业协会副会长陈吉福、四川省酿酒协会专家组副组长、四川大学教授胡永松、四川省产品质量监督检验检疫院院长李永全、四川省酒类及加工食品质量监督检验中心主任钟杰、贵州省轻工科学研究所所长、《酿酒科技》总编黄平、贵州茅台酒股份有限公司副总经理吕云怀、泸州市人民政府市长朱以庄、泸州市政协主席刘俊泽、泸州市市委常委、秘书长喻双、泸州市人大党组书记、副主任林海云以及泸州市江阳区委书记陈文、区长郑蓉等领导出席奠基仪式, 四川省质量技术监督局有关部门领导、四川省产品质量监督检验检疫院副院长、副书记、泸州市相关部门领导、泸州老窖股份有限公司董事长谢明、总经理张良等参加了奠基仪式。省内外 30 多家酒类企业派代表参加了奠基仪式, 《东方卫视》、《四川卫视》等 10 多家新闻媒体到会采访报道。

奠基仪式由泸州市副市长李继郁主持, 朱以庄市长、马勇秘书长和刘云夏局长分别发表了热情洋溢的讲话。国家酒类及加工食品质量检验监督中心实验基地建在“泸州酒业集中发展区”内, 规划占地 17600m², 建筑面积 7145m², 建筑风格采取川南民居仿古式建筑, 与整个园区保持协调一致, 总投资约 4000 万元, 项目计划于 2008 年 10 月底前完成。建成后的实验基地将具备年检测白酒及其原料、包材 1 万余批次的综合检测能力。“泸州酒业集中发展区”目前已引进投资项目 30 个, 协议总投资 8.4 亿元, 完成总投资 6.7 亿元。到 2010 年, 集中发展区白酒产量将达到 25 万吨以上, 实现产值和服务业收入超过 100 亿元, 打造成中国白酒最大的 OEM 园区。刘云夏局长宣布“实验基地项目开工”, 省市有关领导培土奠基。与会领导和代表兴致勃勃地参观了酒业集中发展区, 对集中区的建设速度赞叹不已。(小雨)