

利用木糖高产乙醇酵母菌发酵条件的研究

赖 颖,李青芝,赵锦慧

(周口师范学院,河南 周口 466001)

摘 要: 以蒙假丝酵母 JS-73 为出发菌株,逐渐增加底物中木糖浓度,对该菌株利用木糖产乙醇的能力进行了驯化,并优化该菌利用木糖生产乙醇的工艺和培养基成分。结果表明,驯化后,木糖利用率为 67.21 %,酒精产量达到 7.41 g/L。确定了发酵培养基的最优组合为:木糖 60 g/L,酵母粉 0.6 g/L, K_2HPO_4 1.0 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4 g/L,在该条件组合下,菌株 JS-73 的乙醇产量为 10.27 g/L,是理论产量的 37.21 %。确定了发酵最优条件为:温度 31 °C, pH5, 转速 70 r/min,接种量 11 %,装液量 120 mL/250 mL,在此条件下,乙醇产量达最高,为 18.95 g/L。

关键词: 木糖; 乙醇; 发酵; 季也蒙假丝酵母

中图分类号: X172; TS261.1; TQ920; Q93-3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-9286(2013)05-0031-04

Study on the Fermentation Conditions of Xylose by *Pichia guilliermondii* to Produce Ethanol

LAI Ying, LI Qingzhi and ZHAO Jinhui

(Zhoukou Normal College, Zhoukou, He'nan 466001, China)

Abstract: In the experiment, *Pichia guilliermondii* JS-73 was used as the starting strain and then cultured to produce ethanol with increasing xylose content gradually in the substrate. The results indicated that the utilization rate of xylose was 67.21 % and the yield of ethanol was 7.41 g/L. Furthermore, the culture mediums had been optimized and it was composed of 60 g/L xylose, 0.6 g/L yeast powder, 1.0 g/L K_2HPO_4 and 0.4 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. In these conditions, ethanol yield of strain JS-73 reached up 10.27 g/L, 37.21 % of theoretical yield. The best fermenting conditions had been determined as follows: temperature at 31 °C, pH was 5, rotating speed was 70 r/min, inoculating quantity was 11 %, and liquid filling quantity was 120 mL/250 mL. In these conditions, the yield of ethanol reached up the highest as 18.95 g/L.

Key words: xylose; ethanol; fermentation; *Pichia guilliermondii*

随着人们对全球性能源危机的认识不断深化及环境保护意识的加强^[1],作为石油短缺大国和消费大国的中国,迫切需要寻找可以替代石油的能源。生物质能源因其清洁、可循环再生等优点被认为是最有希望的替代能源之一。作为生物质能源的一种,燃料乙醇已成为减轻石油需求的可替代燃料^[2]。巴西、美国、法国等已用甘蔗、玉米大量生产燃料乙醇^[3]。在我国,主要以玉米、陈化小麦和稻谷为原料。微生物发酵法生产的燃料乙醇作为一种可再生清洁能源,已经引起了人们的高度重视。

以木质纤维素为原料生产燃料乙醇受到越来越多的关注和研究,木质纤维素主要是由纤维素、半纤维素和木质素混合的材料。在植物纤维素中,纤维素、半纤维素占木质纤维素质量的 70 %,纤维素和半纤维素必须经过水解分别形成六碳糖和五碳糖后,才能被微生物利用而发酵生产乙醇。天然半纤维素水解产物的 85 %~90 %是木

糖。以植物纤维素原料中的木糖发酵生产乙醇,能使木质纤维素原料的乙醇发酵产量在原有的基础上增加 25 %。因此,降低纤维乙醇的生产成本,开发更为高效、经济的生产工艺,实现纤维素乙醇的工业化已成为当务之急^[4]。实现木糖发酵生产乙醇是决定植物纤维资源生产乙醇达到经济可行的关键因素。

本实验利用以木糖为唯一碳源筛选得到的季也蒙假丝酵母为出发菌株,对该菌株进行了驯化培养,乙醇产量提高率较为明显,随后又针对此菌株进行营养条件和培养条件的优化,得到高产燃料乙醇菌株。为该菌株在木质纤维素燃料酒精生产工艺中的应用提供了依据和基础。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂及仪器

菌种: 试验中使用的菌种是从土壤中以木糖液体培

基金项目: 周口师范学院青年科研基金项目(zknuqn201125B)。

收稿日期: 2013-03-11

作者简介: 赖颖(1981-),女,辽宁人,讲师,硕士研究生,主要从事发酵工程方向的研究。

优先数字出版时间 2013-04-08; **地址:** <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20130408.0927.006.html>。

培养基为筛选培养基分离得到的菌种(季也蒙假丝酵母 JS-73)。

木糖固体培养基:酵母粉 10 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 木糖 20 g/L, 琼脂粉 20 g/L, pH5。

木糖液体种子培养基:酵母粉 10 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 木糖 20 g/L, pH5。

木糖发酵培养基:木糖 60 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, 酵母粉 1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, pH5。

酵母木糖驯化培养基:木糖 20~70 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 酵母粉 10 g/L, 蒸馏水 1000 mL, pH5, 115 °C 下灭菌 30 min。

仪器及药品:旋转蒸发仪(上海亚荣), 高压蒸汽灭菌器(日本 ALP), 数显鼓风干燥箱(北京东联哈尔仪器制造有限公司), 培养箱(上海博迅), 摇床(北京东联哈尔仪器制造有限公司), 超级洁净工作台(北京东联哈尔仪器制造有限公司)等。

试剂及药品:酵母浸粉, 蛋白胨, 木糖, 丹磺酰氯, 琼脂粉, 重铬酸钾, SnCl_2 , 高碘酸等。

1.2 试验方法

1.2.1 分析方法

乙醇含量的测定采用重铬酸钾比色法^[5]; 木糖含量的测定采用丹磺酰氯(DNS)法^[6]; 木糖醇含量的测定采用高碘酸比色法^[7]。

1.2.2 突变株的驯化

为稳定和提高筛选酵母利用木糖发酵乙醇的能力, 将筛选菌株接入酵母木糖驯化培养基驯化培养 4 轮, 并逐步提高发酵液中的初始木糖含量。根据秸秆水解液中木糖含量, 将木糖含量的上限控制在 7%, 直至菌体适应木糖含量上限。将驯化后的菌株接种发酵, 测定其乙醇浓度、残糖浓度及 pH 值等参数, 研究其发酵性能。

用灭菌后的接种环挑取 2 环酵母菌接种至木糖浓度为 20 g/L 的 100 mL YEPD 液体培养基中, 30 °C 下摇床 90 r/min 连续培养 96 h, 其后以 6% 的接种量将菌液接入木糖浓度为 30 g/L 的液体培养基中, 30 °C 下摇床 90 r/min, 再次连续培养 96 h, 以此类推直至木糖浓度为 70 g/L 的液体培养基中培养完毕, 完成菌株的定向驯化。

1.2.3 发酵条件优化

1.2.3.1 氮源的确定

在培养基中添加氮源的种类对菌体代谢木糖有较大的影响, 含氮量过高会使副产物增多且会降低酵母菌对乙醇的耐受力从而影响乙醇产率。在以木糖为唯一碳源的基础培养基中, 添加不同的氮源(其浓度根据培养基中氮元素的摩尔浓度相同进行折算)。氮源包括: 酵母粉, 蛋白胨、牛肉膏、尿素、乙酸铵、 NH_4Cl 、 NH_4NO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 。

其中, 木糖的添加量为 2%。

挑取一环 4 °C 下保存的菌落于 100 mL YEPD 液体培养基中, 在 30 °C 和 100 r/min 的条件下活化培养 18~24 h, 将活化好的液体种子接种于每个三角瓶中, 接种量为 6%。将三角瓶在 100 r/min 的摇床中 30 °C 培养 96 h。

1.2.3.2 无机盐的优化

以 2% 木糖、2% 最佳氮源加入到基础培养基中, 按无机盐进行不同配比, 添加在配好的培养基中, 添加量为 3%。不同的无机盐配比(以 100 mL 液体培养基为例): a: K_2HPO_4 - MgSO_4 , b: K_2HPO_4 - ZnSO_4 , c: K_2HPO_4 - MnSO_4 , d: K_2HPO_4 - FeSO_4 , e: K_2HPO_4 - CuSO_4 , f: K_2HPO_4 - MgSO_4 - NaCl , g: K_2HPO_4 - MgSO_4 - CaCl_2 , h: K_2HPO_4 - MgSO_4 - ZnSO_4 , i: K_2HPO_4 - MgSO_4 - MnSO_4 , j: K_2HPO_4 - MgSO_4 - FeSO_4 , k: K_2HPO_4 - MgSO_4 - CuSO_4 。将活化好的液体种子接种于每个三角瓶中, 接种量为 6%。将三角瓶在 100 r/min 的摇床中 30 °C 培养 96 h。

1.2.3.3 营养条件的正交试验

参照上述单因素的试验结果, 对各个因素进行正交优化设计(表 1)。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平设计表 (g/L)

水平	因素			
	A: 木糖	B: 酵母粉	C: K_2HPO_4	D: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
1	40	0.4	1.0	0.4
2	50	0.5	2.0	0.5
3	60	0.6	3.0	0.6

1.2.3.4 发酵条件的优化

参照上述营养条件的试验结果, 对各个工艺条件因素进行正交优化设计(表 2)。

表 2 $L_9(4^5)$ 正交试验因素水平设计表

水平	因素				
	A: 温度(°C)	B: pH 值	C: 转速(r/min)	D: 接种量(%)	E: 装液量(mL/250 mL)
1	28	4.5	70	5	80
2	31	5.0	90	7	100
3	34	5.5	110	9	120
4	37	6.0	130	11	140

2 结果与讨论

2.1 驯化结果

通过 4 轮的驯化, 对菌株驯化结果进行分析, 结果见表 3。从表 3 可以看出, 对驯化前后的菌株 JS-73 进行发酵性能比较, 经过前 3 轮的驯化得出木糖利用率和乙醇产率都有所提高; 在第 3 轮驯化后乙醇产率为 12.75%, 木糖利用率提高了 72.44%, 相较于突变株 JS-73 乙醇产率提高了 1.36%, 木糖利用率提高了 11.33%; 第 7 轮

驯化后发现乙醇产率和木糖利用率都有所降低。

表 3 菌株驯化结果

JS-73 酵母菌	木糖利用率 (%)	乙醇产量 (g/L)	初始 pH 值	最终 pH 值
驯化前	41.11	4.39	5.5	3.56
驯化 1	51.23	4.76	5.5	3.12
驯化 2	54.55	5.61	5.5	3.01
驯化 3	57.44	5.75	5.5	2.17
驯化 4	59.21	6.37	5.5	3.11
驯化 5	62.55	6.68	5.5	3.12
驯化 6	65.44	7.12	5.5	3.01
驯化 7	67.21	7.41	5.5	3.14
驯化 8	54.55	5.37	5.5	3.11

2.2 不同氮源对乙醇产量的影响

按实验设计方法对不同氮源对乙醇产量的影响进行分析,图 1 为不同氮源对菌株 JS-73 产乙醇的影响。

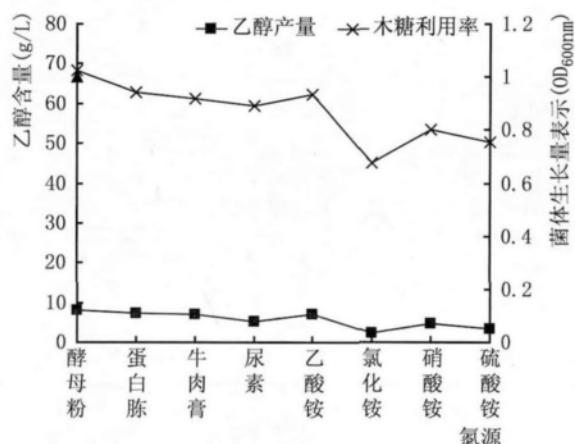


图 1 不同氮源对酒精产量的影响

从图 1 可以看出,在以酵母粉为氮源时,有利于菌株 JS-73 发酵木糖产生乙醇,且乙醇产率比其他氮源都高。确定最佳氮源为酵母粉。

2.3 不同无机盐的影响

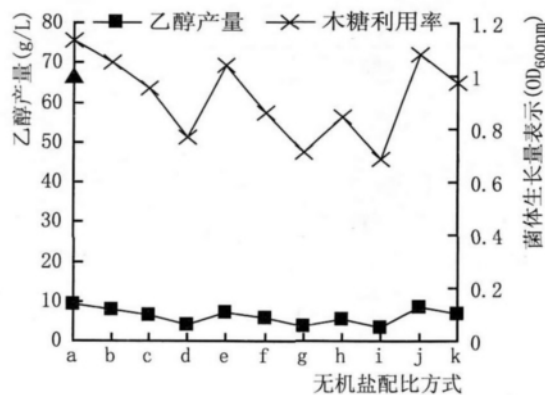
按实验设计方法对不同无机盐对乙醇产量的影响进行分析,图 2 为不同无机盐对菌株 JS-73 乙醇产量的影响结果。

从图 2 可看出,在以 a($K_2HPO_4-MgSO_4$)为无机盐配比方式时,乙醇产率最高,确定最佳无机盐配比方式。

2.4 营养条件的正交试验

按正交试验因素水平设计对营养条件对乙醇产量的影响进行实验优化,其结果分析见表 4。

从表 4 中可以看出,A、B、C、D 对乙醇产量的影响顺序是: $C>D>A>B$,最佳营养条件组合为 $A_3B_3C_1D_1$,即木糖 60 g/L,酵母粉 0.6 g/L, K_2HPO_4 1.0 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4 g/L。在最佳营养条件组合下,菌株 JS-73 的乙醇产量为 10.27 g/L,是理论产量的 37.21%。通过营养条件的优化,发现菌株 JS-73 的乙醇产量提高不是很多,因



a,b,c,d,e,f,g,h,i,j,k 分别为 a: $K_2HPO_4-MgSO_4$;b: $K_2HPO_4-ZnSO_4$;c: $K_2HPO_4-MnSO_4$;d: $K_2HPO_4-FeSO_4$;e: $K_2HPO_4-CuSO_4$;f: $K_2HPO_4-MgSO_4-NaCl$;g: $K_2HPO_4-MgSO_4-CaCl_2$;h: $K_2HPO_4-MgSO_4-ZnSO_4$;i: $K_2HPO_4-MgSO_4-MnSO_4$;j: $K_2HPO_4-MgSO_4-FeSO_4$;k: $K_2HPO_4-MgSO_4-CuSO_4$ 。

图 2 不同无机盐对酒精产量的影响

表 4 正交试验因素水平表 $L_3(3^4)$

试验号	因素与水平				乙醇产量 (g/L)
	A	B	C	D	
1	1 (40)	1 (0.4)	1 (1.0)	1 (0.4)	9.58
2	1	2 (0.5)	2 (2.0)	2 (0.5)	6.68
3	1	3 (0.6)	3 (3.0)	3 (0.6)	5.01
4	2 (50)	1	2	3	5.68
5	2	2	3	1	7.29
6	2	3	1	2	8.79
7	3 (60)	1	3	2	5.45
8	3	2	1	3	9.55
9	3	3	2	1	10.27
K_1	21.27	20.71	27.92	27.14	
K_2	21.76	23.52	22.63	20.92	
K_3	25.27	24.07	17.75	20.24	
k_1	7.09	6.90	9.31	9.05	
k_2	7.25	7.84	7.54	6.97	
k_3	8.42	8.02	5.92	6.75	
R	1.33	1.12	3.39	2.30	
顺序			$C>D>A>B$		
优水平	A_3	B_3	C_1	D_1	
优组合	$A_3B_3C_1D_1$				

此,后续可以通过发酵条件的优化来提高菌株 JS-73 的乙醇产量。

2.5 发酵条件的优化

按正交试验因素水平设计对发酵条件对乙醇产量的影响进行实验优化,其结果分析见表 5。

通过 2.4 试验结果确定菌株 JS-73 最佳营养条件之后,对菌株 JS-73 最佳发酵条件进行研究。从表 5 可以看出,A、B、C、D、E 对菌株 JS-73 乙醇产量影响顺序为: $B>C>A>D>E$,最优组合为 $A_2B_2C_1D_4E_3$,即温度为 31℃,pH5,转速为 70 r/min,接种量为 11%,装液量为 120 mL/250 mL。在此最优条件下,菌株 JS-73 发酵木糖

表5 正交试验因素水平表 $L_{16}(4^5)$

试验号	A:温度(°C)	B:pH值	C:转速(r/min)	D:接种量(%)	E:装液量(mL/250 mL)	乙醇产量(g/L)
1	28	4.5	70	5	80	7.08
2	28	5	90	7	100	6.68
3	28	5.5	110	9	120	11.01
4	28	6	130	11	140	10.68
5	31	4.5	90	9	140	7.29
6	31	5	70	11	120	18.95
7	31	5.5	130	5	100	9.45
8	31	6	110	7	80	12.55
9	34	4.5	110	11	100	10.27
10	34	5	130	9	80	13.58
11	34	5.5	70	7	140	10.68
12	34	6	90	5	120	7.01
13	37	4.5	130	7	120	7.68
14	37	5	110	5	140	10.29
15	37	5.5	90	11	80	9.79
16	37	6	70	9	100	7.45
K1	35.45	32.32	44.16	33.83	44.17	
K2	48.24	52.79	30.25	37.59	33.85	
K3	41.54	40.93	44.12	39.33	44.65	
K4	35.21	37.69	41.39	49.69	38.49	
k_1	8.86	8.08	11.04	8.45	11.04	
k_2	12.06	13.19	7.56	9.4	8.46	
k_3	10.39	10.23	11.03	9.83	10.62	
k_4	8.8	9.42	10.35	12.42	11.16	
R	3.26	5.11	3.48	3.02	2.7	
影响顺序	B>C>A>D>E					
优水平	A ₂	B ₂	C ₁	D ₄	E ₃	
优组合	A ₂ B ₂ C ₁ D ₄ E ₃					

产乙醇的产量最高,为 18.95 g/L。

3 结论

对驯化前后的菌株 JS-73 进行发酵性能比较,经过前 3 轮的驯化得出木糖利用率和乙醇产率都有所提高。在第 3 轮驯化后乙醇产率为 12.75%,木糖利用率提高了 72.44%,相比较于突变株 JS-73 乙醇产率提高了 1.36%,木糖利用率提高了 11.33%。第 7 轮驯化后发现乙醇产率和木糖利用率都有所降低。

以酵母粉为氮源时,有利于菌体 JS-73 发酵木糖产生乙醇,且乙醇产率比其他氮源都高。确定最佳氮源为酵母粉。以 $a(K_2HPO_4-MgSO_4)$ 为无机盐配比方式时,乙醇产率最高,确定最佳无机盐配比方式。从木糖、酵母粉、 K_2HPO_4 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 对乙醇产率的影响试验中发现, K_2HPO_4 是最大的影响因素,确定最佳营养条件组合为 $A_3B_3C_1D_1$ 。在最佳营养条件组合下,菌株 JS-73 的乙醇产量为 10.27 g/L,是理论产量的 37.21%。通过营养条件的优化,发现菌株 JS-73 的乙醇产量提高的不是很显著,因此后续可以通过发酵条件的优化来提高菌株 JS-73 的乙醇产量。在温度、pH 值、转速、接种量、装液量对菌株 JS-

73 乙醇产量影响试验中,最优组合为 $A_2B_2C_1D_4E_3$,在此条件下,乙醇产量为最高(18.95 g/L),该菌株具有较高的木糖和葡萄糖的利用能力,是具有同时发酵葡萄糖和木糖产酒精的天然菌株,显示了该菌株具有较好的研究潜力和应用前景。

参考文献:

- [1] 刘钺,杜风光,李晓.燃料乙醇生产中杂醇油的综合利用及经济效益分析[J].酿酒科技,2010(12):81-83.
- [2] 伍彦华,覃红梅,崔师泰,等.固定化酵母的选育及在木薯浓醪发酵生产燃料乙醇中的性能对比[J].酿酒科技,2010(7):31-33.
- [3] 路鹏,江滔,李国学.木质纤维素乙醇发酵研究中的关键点及解决方案[J].农业工程学报,2006,22(9):237-240.
- [4] 吴毅,赵鹏翔,李强.底物添加策略对纤维素乙醇同步糖化发酵的影响[J].酿酒科技,2012(11):91-94.
- [5] 贺应龙,熊兴耀,苏小军.五碳糖发酵生产乙醇的菌种研究进展[J].中国酿造,2010,217(4):8-11.
- [6] 蔡定域.实用白酒分析[M].成都:成都科技大学出版社,1994:543-544.
- [7] 方祥年,黄炜,夏黎明.半纤维素水解液中抑制物对发酵生产木糖醇的影响[J].浙江大学学报:工学版,2005,39(4):547-551.