

# 双酵母发酵秸秆水解糖产乙醇条件研究

马英辉<sup>1</sup>, 卢美欢<sup>1</sup>, 王联结<sup>2</sup>, 李利军<sup>1</sup>

(1.陕西省微生物研究所, 陕西 西安 710043; 2.陕西科技大学, 陕西 西安 710021)

**摘要:** 初步探讨了秸秆水解糖混菌发酵的最优条件。结果表明, 调整秸秆水解液中葡萄糖与木糖的比例为 3:2, 初始糖浓度为 100 g/L, 初始 pH 为 5.5, 在 32 °C 下进行嗜单宁管囊酵母和酿酒酵母混合发酵 44 h, 平均乙醇浓度为 35 g/L 左右, 最大糖醇转化率为 35.6%, 达到混合发酵理论值的 72.1%。从经济角度来看, 混糖发酵优于分步发酵。  
**关键词:** 微生物; 发酵; 秸秆; 水解液; 混菌发酵; 乙醇

中图分类号: Q93-3; TS262.2; TS261.4

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2012)01-0100-04

## Research on the Fermentation Conditions for Ethanol from Hydrolytic Sugar of Straw by Using Two Kinds of *S.cerevisiae*

MA Yinghui<sup>1</sup>, LU Meihuan<sup>1</sup>, WANG Lianjie<sup>2</sup> and LI Lijun<sup>1</sup>

(1. Shanxi Province Institute of Microbiology, Xi'an, Shanxi 710043; 2. Shanxi University of Science and Technology, Xi'an, Shanxi 710021, China)

**Abstract:** The optimum conditions for mixed fermentation of hydrolytic sugar of straw were summed up as follows: the optimum ratio of glucose and xylose was 3:2, initial sugar concentration was 100 g/L, initial pH was 5.5, fermentation temperature was at 32 °C, pachysolen tannophilus and *Saccharomyces cerevisiae* used for mixed fermentation for 44 h, the average ethanol concentration was about 35 g/L, and the highest sugar alcohol conversion rate was 35.6%, 72.1% of the theoretical value. Anyway, mixed sugar fermentation was economically better than step fermentation.

**Key words:** microbe; fermentation; straw; hydrolysate; mixed-fermentation; ethanol

随着国际石油价格的持续上涨, 越来越多的国家开始加大投入寻找石油的替代品。燃料乙醇是一种被寄予厚望的清洁能源, 然而其成本的高居不下致使现阶段还难以用其大规模替代石油, 而用以农作物秸秆为代表的木质纤维素类原料发酵生产乙醇是解决成本问题的关键<sup>[1]</sup>。对于秸秆的水解, 国内外一直致力于此类项目的研究, 也取得了可喜的成果, 而其中应用比较普遍的主要是酸酶法, 即先用超低酸结合气爆的方法水解半纤维素, 然后采用酶解法水解纤维素<sup>[2-3]</sup>。但秸秆水解后, 水解液中不但含有葡萄糖, 并且含有相当量的如木糖等杂多糖, 使得秸秆水解液的发酵不能同步进行。通过基因工程所构建的多底物菌种对其混糖发酵效果有所改善, 但其菌种的稳定性和发酵效率还有待进一步研究<sup>[4]</sup>。本实验以秸秆中半纤维素的酸水解液和纤维素的酶解液为原料进行混糖、混菌发酵, 考察其最优的发酵条件并与分步发酵进行了对比。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验原料和试剂

收稿日期: 2011-09-16

作者简介: 马英辉(1984-) 硕士 陕西省微生物研究所, 主要从事生物质高值化利用燃料乙醇研究。

优先数字出版时间: 2011-11-30; 地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20111130.1608.004.html>。

小麦秸秆半纤维素的酸水解液(中和后), 秸秆纤维素酶水解液。

嗜单宁管囊酵母(*Pachysolentannophilus* 1771), 购买于中国菌种保藏中心; 超酒干酵母(超级酿酒干酵母), 由河南南阳天冠集团提供。

纤维素酶 20000 U/g(滤纸酶活), 购于宁夏和氏璧生物科技有限公司。

5%乙醇溶液: 取 5 mL 无水乙醇定容至 100 mL; 重铬酸钾溶液: 称取 16.804 g 重铬酸钾溶于水, 用蒸馏水定容至 500 mL。

#### 1.2 培养基

麦芽斜面试培养基: 新鲜麦芽汁 100 mL, 2%琼脂。

超酒干酵母驯化培养基: 20 g/L 的无菌葡萄糖液。

混合菌增殖培养基: 葡萄糖 20 g/L、木糖 20 g/L、酵母膏 5 g/L、蛋白胨 5 g/L。

#### 1.3 实验方法

##### 1.3.1 混合糖的混菌发酵试验条件优化

混合菌种的培养: 将活化好的嗜单宁管囊酵母和超酒干酵母一起接入混合增殖培养基中, 于温度 35 °C、

120 r/min 恒温培养箱中进行增殖培养 40 h 左右。

将半纤维素水解液浓缩液和纤维素的酶解浓缩液进行混糖发酵, 接入嗜单宁管囊酵母和超酒活性干酵母的混合种子培养液, 加入 1% 的酵母膏和 1% 的蛋白胨作为氮源进行发酵, 分别考察不同底物比例(葡萄糖:木糖)、初始糖浓度、发酵时间、发酵温度(26~36 °C)和初始 pH(3.5~6.5)对发酵最终乙醇浓度的影响。

### 1.3.2 混糖混菌发酵与分步发酵效果对比

选择其最佳的混糖发酵条件, 分别与半纤维素水解液的木糖发酵和纤维素酶解葡萄糖液的发酵进行对比, 考察混糖发酵效果优劣。

## 1.4 检测方法

### 1.4.1 还原糖测定

总还原糖测定采用 DNS 法<sup>[5]</sup>, 木糖含量的测定采用地衣酚法<sup>[6]</sup>。

葡萄糖 = 总还原糖 - 木糖。

### 1.4.2 乙醇含量测定

采用重铬酸钾比色法测定乙醇含量<sup>[7]</sup>, 分别吸取 0、0.2 mL、0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL、1.0 mL、1.2 mL 的 5% 乙醇溶液于 50 mL 容量瓶中, 加入 10 mL 硫酸, 10 mL 重铬酸钾溶液, 以蒸馏水定容, 混匀后静置 30 min。在 594 nm 下测得吸光值, 然后以乙醇含量为横轴, 吸光值为纵轴得出乙醇标准曲线(图 1)。

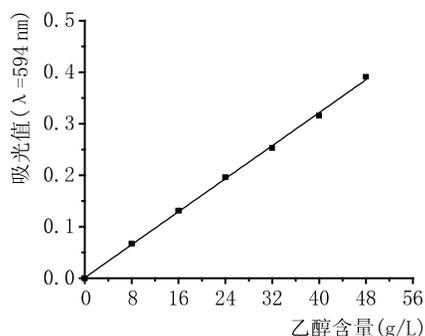


图 1 重铬酸钾乙醇标准曲线

$$\text{糖醇转化率} = \frac{V_1 \times C_1}{V_0 \times C_0} \times 100\%$$

式中:  $V_0, V_1$ ——发酵前和发酵后溶液的体积(L);

$C_0, C_1$ ——发酵前的还原糖浓度和发酵后的乙醇浓度。

## 2 结果与分析

### 2.1 混合糖混菌发酵优化

#### 2.1.1 不同碳源比例对混糖发酵的影响

对不同碳源比例对混糖发酵的影响进行分析, 结果见表 1。

由表 1 中可以看出:

①发酵液中随着木糖在混糖中所占比例的增加, 还原糖的可发酵性逐渐降低, 具体表现为残糖量很高, 特别是残留木糖, 乙醇生成浓度低。因为木糖液是由半纤

表 1 不同碳源比例对混糖发酵的影响

葡萄糖:木糖 (w:w)	残留 葡萄糖浓度 (g/L)	残留 木糖浓度 (g/L)	乙醇 生成浓度 (g/L)	糖醇 转化率 (%)
1:2	4.8	16.8	13.8	13.8
2:3	3.7	16.1	15.0	15.0
1:1	3.0	10.6	19.8	19.8
3:2	1.2	5.5	31.5	31.5
2:1	1.3	6.7	31.8	31.8

注: 初始糖浓度 100 g/L, 初始 pH 5.0, 温度 30 °C, 发酵时间 60 h。

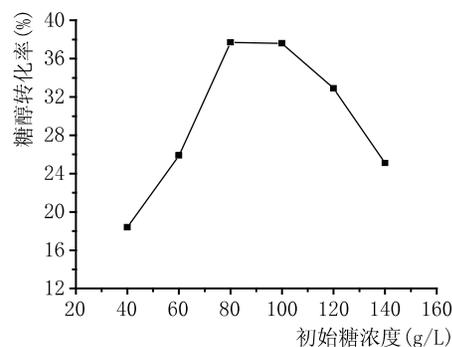
维素水解而来, 其中含有一定浓度的对菌体生长有害的物质<sup>[8]</sup>, 木糖浓度的增加相当于增加了发酵液中抑制剂的浓度。当木糖含量占一半以上时, 糖醇转化率都在 20% 以下。

②随着葡萄糖在混糖中所占比例的增加, 木糖的残留浓度有所增加, 糖醇转化率也呈现增高的趋势。这是因为在初始糖浓度相同的情况下, 木糖比例低有利于菌种的生长和代谢。葡萄糖是菌种生长和代谢的优先选择, 同时会对木糖产生底物遏制, 导致木糖利用的缓慢, 同时菌种生长得好也能够对抑制物产生足够的抗性, 使其抑制作用降到最低。

③当木糖在混糖中所占比例达到 40% 时, 发酵的糖醇转化率仍然维持在 30% 以上, 对乙醇的生成影响较小。在不影响乙醇生成的前提下, 应保持发酵液中葡萄糖与木糖的比例为 3:2。

#### 2.1.2 初始糖浓度对混糖发酵的影响

初始糖浓度往往影响发酵结果, 对初始糖浓度对混糖发酵的影响进行分析, 结果见图 2。



注: 葡萄糖:木糖 = 3:2, 初始 pH = 5.0, 温度 30 °C, 发酵时间 60 h。

图 2 不同初始糖浓度下的糖醇转化率

从图 2 中可以看出, 随着初始糖浓度的增加, 糖醇转化率出现先增加后减小的趋势。主要原因有两个:

①最佳的糖浓度对保持较高的糖醇转化率非常重要。因为如果糖度太低, 菌种生长后没有更多的底物来维持其代谢; 如果糖度太高, 会影响菌种生长, 致使转醇率也很低。

②糖浓度的升高, 随之带来的有毒物质的浓度也随着加大<sup>[9]</sup>。当达到酵母生长或发酵所能承受的最大底限

后,抑制物对乙醇发酵会有明显的抑制作用,这就是初始糖浓度超过 100 g/L 后糖醇转化率会降低的原因。而在糖浓度为 80 g/L 和 100 g/L 时,糖醇转化率都保持在比较高的水平,达到 35% 左右,说明在此浓度下,抑制剂并没有对发酵菌种产生高度抑制作用。因此,根据产乙醇效率可选择初始糖浓度为 100 g/L。

### 2.1.3 温度对混合发酵的影响

对温度对混糖发酵的影响进行分析,结果见表 2。

表 2 温度对混合糖发酵的影响

温度 (°C)	葡萄糖浓度 (g/L)	木糖浓度 (g/L)	乙醇浓度 (g/L)	糖醇转化率 (%)
20	27.9	23.9	11.7	11.7
24	19.5	17.1	13.9	13.9
28	8.3	4.7	27.3	27.3
32	1.2	2.7	35.5	35.5
36	1.5	2.0	30.6	30.6
40	13.4	9.5	24.4	24.4

注:初始糖浓度 100 g/L(葡萄糖:木糖=3:2),初始 pH 值=5.0,发酵时间 60 h。

由表 2 中可以看出,发酵温度对混合菌种混糖发酵的影响,无论是从残糖量还是糖醇转化率来说都是非常显著的:

①随着发酵温度的升高,残糖浓度经历一个先下降后升高的过程,因为菌种将底物转化为代谢产物必须在合适的温度下进行。温度低了,菌种生长缓慢,糖的转化率低,导致残糖量较高,乙醇产率低,如表 2 中 20 °C 和 24 °C 下的结果;温度高了,菌种产生乙醇途径中的酶活受到抑制,可能会改变菌种的代谢途径。另外,温度高了会增加乙醇对酵母的毒性<sup>[10]</sup>,糖量虽然消耗很大,而乙醇的产量却很低,如表 2 中 40 °C 下的发酵结果。

②乙醇浓度和糖醇转化率则正好与残糖量趋势相反,呈现先升高后下降的趋势,在 32 °C 时达到最大,糖醇转化率达到 36.5%。

### 2.1.4 初始 pH 值对混合发酵的影响

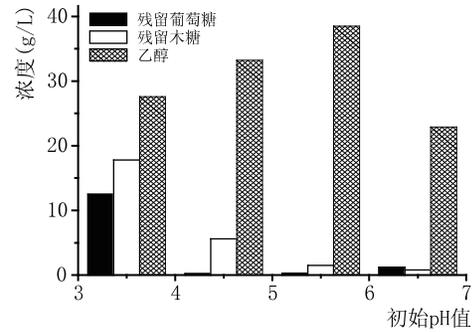
对初始 pH 值对混糖发酵的影响进行分析,结果见图 3。

由图 3 中可以看出,不同的 pH 值对共发酵的影响是显著的:

①pH 值在 3.5~6.5 范围内,随着初始 pH 值的升高,总的残糖量是逐渐减少的,而葡萄糖的残糖量随着 pH 值的变化更明显一些。这是因为葡萄糖是菌种最优先利用的碳源,随着 pH 值越来越合适,葡萄糖的利用率会迅速加快,而对木糖的利用是在葡萄糖先被利用后才逐渐开始的,并且当 pH 6.5 时,葡萄糖的残留量要略高于木糖。

②乙醇浓度呈现先升高后下降的趋势,在 pH 5.5 时,乙醇浓度达到最高,为 36 g/L 左右。

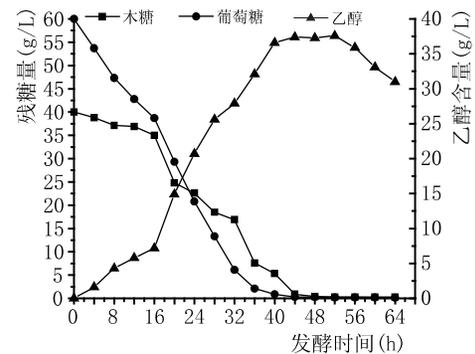
### 2.1.5 混菌混糖发酵时间的确定



注:初始糖浓度 100 g/L(葡萄糖:木糖=3:2),温度 32 °C,发酵时间 60 h。

图 3 不同初始 pH 值对混糖发酵的影响

对发酵时间对混糖发酵的影响进行分析,结果见图 4。



注:初始糖浓度 100 g/L(葡萄糖:木糖为 3:2),温度 32 °C,初始 pH 5.5。

图 4 混合发酵过程中残糖和乙醇浓度随时间的变化规律

从图 4 中可以看出:

①木糖和葡萄糖的含量随着发酵进行而呈现逐渐减少的趋势。在前 16 h 内葡萄糖变化明显快于木糖的消耗量,葡萄糖消耗量为 1/3 时,木糖稍有下降,只减少了 12.5%,这是由于葡萄糖的存在对利用木糖形成了底物阻遏,菌种优先利用葡萄糖。从乙醇的生成曲线可以看出在前 16 h 内的还原糖的消耗主要是用于菌种自身的生长和适应环境的耗能,乙醇的生成量很少,只有 7.2 g/L。

②从 16 h 后,乙醇浓度开始迅速上升,葡萄糖浓度呈现相反的趋势,这时乙醇的生成主要靠葡萄糖的代谢;木糖从发酵的 16 h 开始被利用,4 h 内下降了 10 g/L 左右,但由于木糖代谢发酵乙醇途径复杂,同时受到葡萄糖浓度及代谢产物和乙醇的抑制作用,所以木糖代谢在 24~32 h 内又呈现出缓慢消耗的趋势;32 h 后木糖含量高于葡萄糖,代谢开始占主导地位,这个时期内乙醇的生成主要是靠木糖代谢,但由于木糖含量少,所以到 44 h 时很快被消耗完,而葡萄糖在 40 h 时已经基本代谢完,所以 48 h 时混合糖发酵完全停止,乙醇浓度在 44 h 时积

累到最大浓度 35.4 g/L。

③继续延长发酵时间到 64 h, 乙醇浓度不再上升反而出现下降。这是因为还原糖消耗完全后, 菌种只能以乙醇作为碳源来维持自身的生长, 所以控制最佳的发酵时间能够获得最大的乙醇积累浓度, 而且在木糖与葡萄糖共存的发酵液中, 混菌模式下达到发酵的最佳时间会滞后于葡萄糖的单独发酵<sup>[11]</sup>。

## 2.2 混合发酵和分步发酵的效果对比

对混合发酵与分步发酵的效果进行对比, 结果见表3。

表3 混合发酵与分步发酵的效果对比

发酵条件	半纤维素水解液	秸秆纤维素的酶解液	混合糖发酵液(3:2)
初始糖浓度(g/L)	40	60	100
初始 pH 值	5.5	5.5	5.5
温度(°C)	32	32	32
时间(h)	44	44	44
菌种	嗜单宁管囊酵母	超酒酵母	嗜单宁管囊酵母、超酒酵母
乙醇浓度(g/L)	9.5	28.1	35.3
糖醇转化率(%)	23.75	46.83	35.3
乙醇产率(占理论值的比例, %)	51.6	91.8	72.1

从表3可以看出:

①对于半纤维素水解液中木糖的发酵, 糖醇转化率只有 23.75%, 占理论转化值的 51.6%。说明水解液中抑制性物质对菌种有一定的抑制作用, 阻断了嗜单宁管囊酵母对木糖的利用途径, 因此该发酵还远远达不到工业化生产的要求。

②采用纤维素的酶解糖液进行发酵, 因酶解液中物质比较单一, 不存在抑制性因子, 所以发酵效果较好, 发酵后乙醇浓度为 28.1 g/L, 乙醇产率可达到理论值的 91.8%。如果对分离的纤维素进行非等温同步糖化发酵(NSSF), 效果可能更好, 这样就避免了产物对纤维素酶的抑制作用。

③从混合糖发酵来看, 乙醇转化率并不是最高的, 它低于纯葡萄糖的乙醇发酵; 从乙醇浓度来看, 也低于分步发酵的乙醇浓度之和。这是因为当半纤维素的水解液与纤维素的酶解液混合后, 双方存在相互的抑制作用, 一是因为半纤维素水解液中存在发酵抑制剂, 因而它的加入会降低葡萄糖的可发酵性; 二是因为葡萄糖和木糖的共同存在, 葡萄糖会对木糖的利用起到底物遏制作用, 因为木糖的乙醇代谢途径非常复杂, 不但受到葡萄糖优先利用的阻遏, 还受到产物的反馈抑制, 在此实验中还受到酸性水解杂质的抑制作用。综合这些因素, 混合发酵的乙醇得率要稍低于分步发酵。

④混合发酵的条件控制非常重要, 如果控制好发酵条件, 乙醇的转化率也会达到较高的水平, 如表3中, 分步发酵的乙醇浓度总量为 37.6 g/L, 只比混合发酵的乙醇浓度高 2.3 g/L, 但毫无疑问, 混合发酵能够节约更多的设备成本, 从经济角度考虑在一定条件下还是选用混合发酵比较好。

## 3 结论

对秸秆水解糖的混菌发酵条件进行了初步探讨, 通过混合发酵和分步发酵的对比结果来看, 混合发酵提高了发酵液中半纤维素水解液的可发酵性, 降低了葡萄糖的发酵效率, 但从总的糖醇转化率和经济性考虑, 混合发酵具有独特的优势。另外, 采用基因工程的手段改造多底物乙醇发酵菌种将会大大提高利用己糖和戊糖混合发酵生产乙醇的工业可行性。

## 参考文献:

- [1] 马英辉, 王联结. 秸秆预处理的最新研究进展[J]. 纤维素科学与技术, 2009, 17(3): 71-77.
- [2] Martinez J, Negro MJ, Saez F, et al. Effect of acid steam explosion on enzymatic hydrolysis of *O. Nervosum* and *C. cardunculus* [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1990(24/25): 127-134.
- [3] Karr W E, Holtz apple M T. The multiple benefit of adding non-ionic surfactant during the enzymatic hydrolysis of corn stover[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1998(59): 419-427.
- [4] Eliasson A, Christensson C, Wahlbom C F, et al. Anaerobic xylose, fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* carrying, XYL1, XYL2, and XKS1 in mineral medium chemostat cultures[J]. Appl. Environ. Microbiol, 2002(66): 3381-3386.
- [5] 张水华, 许安邦, 董文斌, 等. 食品分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1996: 173.
- [6] 冯焱, 佟建明. 地衣酚-盐酸测定小麦中戊聚糖含量的研究[J]. 粮食与饲料工业, 2004(7): 11-13.
- [7] 魏冬梅, 张艳芳, 张予林. 利用比色法测定葡萄酒的酒精度[J]. 食品工业, 2001(4): 45-46.
- [8] 田沈, 徐鑫, 杨秀山, 等. 木质纤维素乙醇发酵研究进展[J]. 农业工程学报, 2006, 22(增刊 1): 221-224.
- [9] Laci S L, Lawford H G. Thermoanaerobacter ethanolicus growth and product yield from elevated levels of xylose or glucose in continuous cultures [J]. Applied and Environmental Microbiology. 1991, 57(2): 579-585.
- [10] 宋向阳, 陈枚, 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, 1(32): 115-118.
- [11] 李艳华, 张雯, 房彩琴, 等. 固定化混合菌种发酵玉米秸秆水解液的研究[J]. 北京化工大学学报, 2008, 35(5): 74-77.