

氮源控制对玉米芯残渣同步糖化 发酵生产 2,3-丁二醇的影响

彭晓培,张翠英,李 维,陈 超,王永帅,肖冬光

(天津科技大学生物工程学院,天津 300457)

摘要: 以 2,3-丁二醇生产为研究对象,对同步糖化发酵系统中氮源控制的影响进行了研究。对于不同氮源,微生物表现出利用差异性,从而导致不同的发酵结果。结合以上特性,可以使用发酵过程补氮控制及不同氮源组合方式来达到氮源结构优化目的,从而获得更高的产物转化率。结果表明,利用发酵过程分批补氮方式获得了 27.625 g/L 的 2,3-丁二醇终产量,较单次投入酵母浸粉(21.273 g/L)提高了 29.86%,利用酵母粉与尿素组合的方式获得了 28.582 g/L 的 2,3-丁二醇终产量,较单独使用尿素(25.295 g/L)提高了 12.99%。

关键词: 玉米芯残渣; 2,3-丁二醇; 同步糖化发酵; 氮源控制; 纤维素酶

中图分类号:TQ923;TQ920;Q93-3 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2013)05-0037-04

Effects of Nitrogen Source Control on 2,3-butanediol Yield by Simultaneous Saccharification and Fermentation of Corncob Residue

PENG Xiaopei, ZHANG Cuiying, LI Wei, CHEN Chao, WANG Yongshuai and XIAO Dongguang
(Bioengineering College of Tianjin Science & Technology University, Tianjin 300457, China)

Abstract: The effects of nitrogen source control on 2,3-butanediol yield by simultaneous saccharification and fermentation of corncob residue were investigated. The results suggested that microbe presented certain difference in the use of different nitrogen source and further resulted in different fermenting effects. Accordingly, the methods including the addition of nitrogen during fermenting process and the combination of different nitrogen source were applied to optimize the structure of nitrogen source and further to achieve higher product conversion rate. The experimental results indicated that the final yield of 2,3-butanediol was as high as 27.625 g/L through batch addition of nitrogen during fermenting process (increasing by 29.86% than single addition of yeast extract powder (its yield was 21.273 g/L)), and the final yield of 2,3-butanediol was 28.582 g/L through the use of yeast powder and urea (increasing by 12.99% than using urea only(its yield was 25.295 g/L)).

Key words: corncob residue; 2,3-butanediol; simultaneous saccharification and fermentation; nitrogen source control; cellulose

氮源作为微生物生长的必需物质,在微生物发酵过程中起着至关重要的作用^[1]。目前,针对氮源控制的研究较少,仅局限于培养基优化过程当中对氮源种类及添加量的研究^[2-5]。这种较为粗放的氮源控制方式不可避免的会造成发酵产率低。

2,3-丁二醇(2,3-butanediol, 2,3-BD)是一种无色无味的透明液体,广泛应用于化工、食品、燃料和航空航天领域。作为石油替代战略中的重要平台化合物^[6],2,3-丁二醇的研究越来越受到重视。目前,利用生物法生产 2,3-丁二醇的报道较多,但由于其原材料(葡萄糖、蔗糖、

乳糖、甘油、淀粉水解液、糖蜜等)^[7-12]成本较高,不利于工业化生产,因此,选择一种廉价原材料来解决这一问题迫在眉睫。

作为地球上最丰富、最廉价的可再生资源,木质纤维原料在发酵工业中越来越受到重视。然而,葡萄糖阻遏效应的存在使得纤维素的酶解无法获得较高的糖浓度,因此,发酵使用的酶解液往往需要经过浓缩环节,从而大大增加了能耗。同时,由于纤维素酶较难回收利用,这就进一步增加了生产成本。利用同步糖化发酵的方法,可以避免葡萄糖阻遏作用,同时可以减少纤维素酶用量,从而大

收稿日期:2012-12-06

作者简介:彭晓培(1988-),硕士研究生,河南洛阳人,主要从事 2,3-丁二醇相关方向的研究工作。

通讯作者:肖冬光,天津科技大学教授,生物工程学院院长,博导,主要研究集中于燃料乙醇、活性干酵母、现代酿造技术方面,xdg@tust.edu.cn。

优先数字出版时间:2013-03-06;地址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20130306.1434.005.html>。

幅度降低生产成本。

本研究利用木糖工业废渣——玉米芯残渣进行同步糖化发酵生产 2,3-丁二醇,针对同步糖化发酵过程当中受纤维素酶解速率影响所体现出的氮源控制问题,从整个发酵过程中碳氮比及复合氮源方面进行研究,以期提高 2,3-丁二醇同步糖化发酵产物浓度。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

原料:粉碎后 1.5% NaOH, 80℃ 预处理 3 h^[13]的玉米芯残渣。

试剂及药品:NaOH, K₂HPO₄, KH₂PO₄, MgSO₄·7H₂O, 羧甲基纤维素钠均为分析纯;酸性纤维素酶,诺维信(中国)生物技术有限公司;酵母浸粉,北京奥博星生物技术有限公司;蛋白胨,北京奥博星生物技术有限公司;玉米浆,河北康欣制药有限公司。

菌种:肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)UV-4,实验室自行筛选。现保藏于天津科技大学生物工程学院发酵工程国家重点实验室。

菌种斜面培养基(g/L):葡萄糖 10,牛肉膏 5,蛋白胨 10,氯化钠 5,琼脂 20, pH6.5。

种子培养基(g/L):玉米芯水解液葡萄糖浓度 20,酵母浸粉 5,磷酸二氢钾 6,磷酸氢二钾 14,硫酸铵 2,柠檬酸钠 1,七水硫酸镁 0.4, EDTA 0.05, pH6.5。

发酵培养基(g/L):玉米芯残渣 100,尿素 1.61,柠檬酸钠 4,乙酸钠 4,磷酸氢二铵 1,硫酸镁 0.3,硫酸锰 0.1, pH5.5,纤维素酶添加量 40 FPIU/g 玉米芯残渣。

以上培养基均在 115℃ 下灭菌 20 min。

1.2 实验方法

1.2.1 2,3-丁二醇发酵

摇瓶发酵采用 250 mL 三角瓶,装液量 50 mL,接种量 5%,接种同时加入 40 FPIU/g 玉米芯残渣的纤维素酶,摇床转速 150 r/min,发酵温度 35℃。发酵过程中定时取样测剩余氮源及 2,3-丁二醇等的含量。

上罐发酵采用 5 L 全自动发酵罐(JS-8000,上海广世生物工程设备有限公司)进行,装液量 3.5 L,发酵温度 35℃,转速 300 r/min,通气量在前 12 h 为 1.5 vvm, 12 h 后为 1.0 vvm。

1.2.2 分析方法

玉米芯水解液中的还原糖含量采用 DNS 法测得。

发酵液中可发酵性氮含量的测定方式如下:在发酵体系中加入少量氮源及过量的碳源,发酵前后分别用凯氏定氮法测定发酵液中氮含量,分别记为 X₁ 和 X₂,则可发酵性氮含量为 X₁-X₂。可发酵性氮所占比例为(X₁-X₂)/X₁。

发酵液当中的各产物采用高效液相色谱法测定。色谱柱为 Aminex HPX-87H(300 mm×7.8 mm),柱温 65℃,流动相为 0.005 m 的硫酸溶液,流速为 0.6 mL/min^[14-15],检测器为 Agilent Technologies G1362A 示差折光检测器,外标法定量。

纤维素酶的滤纸酶活力的测定按照文献^[16]进行。

纤维素与木质素含量测定按照文献^[17]进行。

2 结果与讨论

2.1 不同氮源种类对同步糖化发酵生产 2,3-丁二醇的影响

不同氮源对同步糖化发酵的影响结果见图 1。

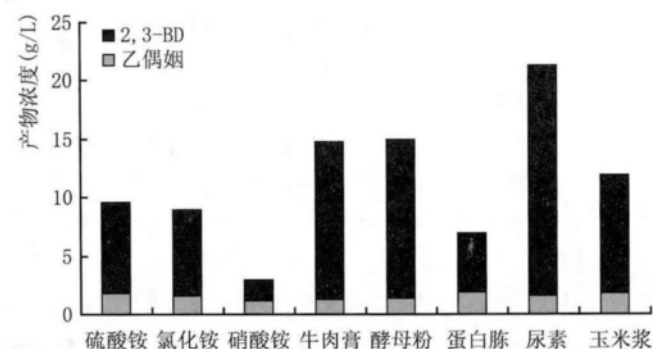


图 1 不同氮源对同步糖化发酵的影响

由图 1 可知,利用尿素作为氮源发酵 36 h 后可得到最高产量(2,3-丁二醇 + 乙偶姻)20.952 g/L,而利用酵母浸粉为氮源仅得到 14.994 g/L 的产物。然而,在前期利用葡萄糖与玉米芯残渣水解液进行的发酵实验当中,以酵母浸粉作为氮源优于以尿素作为氮源。由此可以推测,造成此结果的原因是发酵方式的改变所带来的碳氮比变化,即由普通发酵中碳源单次供给的较高碳氮比变为同步糖化发酵方式当中纤维素缓慢酶解的较低碳氮比。因此,在此得出如下推论:①菌株对不同氮源的利用速率存在差别;②发酵过程中任意时间段内的碳氮比均会对发酵造成较大影响。

为了验证以上推论,以下进行了一系列验证实验。

2.2 利用尿素及酵母浸粉进行同步糖化发酵的时间进程

为了检测氮源在同步糖化发酵进程当中的利用情况,设立尿素及酵母浸粉两个实验组(可发酵性氮含量均为 0.75 g/L),利用 5 L 发酵罐进行发酵验证,定点取样测量各项指标,结果见图 2。

由图 2 可以看出,当选择尿素为氮源时,氮源消耗速率较缓,同时可以获得较高的产物浓度(25.295 g/L, 72 h);当选择酵母浸粉为氮源时,在发酵初期,氮源浓度迅速降低,在 36 h 时已达到 0.2 g/L 以下,而 72 h 时所得产物浓度仅为 21.273 g/L。由此可见,不同种类氮源的消耗速率

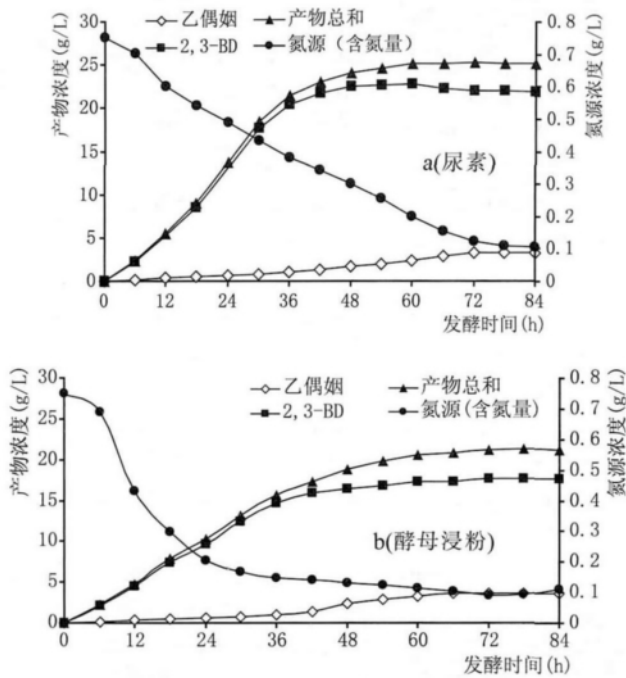


图2 不同氮源同步糖化发酵的时间进程

不同,造成了菌体生长状态的差异,从而对产物发酵造成影响。

2.3 分批补氮对同步糖化发酵的影响

为探究发酵过程中实时碳氮比对发酵所造成的影响,设计3组实验:5 L 发酵罐采用相同的培养条件,在不同时间点补入不同量的酵母浸粉(总量相同,0.75 g/L),观察其发酵情况。初始培养基中 a 组含有 0.25 g/L 氮源,b,c 组为 0.35 g/L 氮源,之后按照每隔一定时间向发酵体系加入定量氮源进行人为调控(ΔN),如每隔 12 h 使氮源浓度升高 0.25 g/L($\Delta N=0.25/12 h$)。这里所进行实验分别为 $\Delta N=0.25/12 h$, $\Delta N=0.2/12 h$, $\Delta N=0.1/6 h$,自 12 h 起添加,直至氮源添加量达到 0.75 g/L。表 1 为补充氮源时 2,3-丁二醇发酵影响的比较结果。

表 1 补充氮源时 2,3-丁二醇发酵影响的比较

项目	不同组别			
	未调控	组 a	组 b	组 c
初始浓度(g/L)	0.75	0.25	0.35	0.35
ΔN	-	0.25/12 h	0.2/12 h	0.1/6 h
72 h 总产物浓度(g/L)	21.273	25.35	26.433	27.625

表 1 实验结果显示,不同的氮源控制方式导致了不同的发酵结果,其中作为对照的未调控组在 72 h 时仅得到 21.273 g/L 的总产物浓度,而 3 个调控组所得总产物浓度均高于这一值(分别提高 19.17%,24.26%及 29.86%),证明了推论②,即在发酵的各个阶段维持较为理想的碳氮比有助于产物生成。对比 a、b、c 组,初始氮源浓度为 0.35 g/L 的 b、c 两组,其产物浓度高于初始氮源浓度为 0.25 g/L 的 a 组,导致这一结果的原因可能是发

酵开始阶段菌体增殖所导致的氮源需求较大,较高的初始氮源浓度保证了菌体的快速积累。另一方面,可以看到 c 组($\Delta N=0.1/6 h$)的产物浓度(27.625 g/L)高于 b 组($\Delta N=0.2/12 h$)(26.435 g/L),这进一步说明,发酵过程中维持合适的碳氮比对于产物生成具有积极影响,由此可见,如果采取氮源流加方式,将会取得更为理想的发酵结果。

2.4 混合氮源对同步糖化发酵的影响

为了进一步证实发酵过程中碳氮比的影响,在此选用另一种方式进行研究,将不同利用速率的氮源配合使用,以达到控制氮源利用速率的目的,即选用混合氮源。为了进一步证实以上论点,在此设计如下 3 组实验,选择酵母浸粉与尿素组成混合氮源,分别选用 3 种组合方案(总可发酵性氮量 0.75 g/L):a 酵母浸粉 1/4,尿素 3/4;b. 酵母浸粉 1/2,尿素 1/2;c. 酵母浸粉 3/4,尿素 1/4。在同步糖化发酵条件下得到如图 3 中 a,b,c 所示结果。

由图 3 可以看出,不同比例的混合氮源对发酵造成了较大影响,重点体现在氮源消耗情况与产物生成。其中,c 组(酵母浸粉 3/4,尿素 1/4)在发酵初期的氮源消耗速率最快,在 72 h 时总产物浓度为 23.905 g/L,较单纯使用酵母浸粉所得产物浓度有所提高。b 组得到了最高发酵产物浓度(28.582 g/L),较单纯使用尿素作为氮源(25.295 g/L)提高了 12.99%。3 组发酵初始阶段氮源消耗速率随酵母浸粉所占比例的升高而提高,但是总产物浓度则体现为 $b>a>c$ 。由此可见,产物浓度并非与氮源消耗速率成正相关,在不同时间范围内保证合适的碳氮比,从而使菌体维持有益于发酵进行的生长状态才是导致产物增加的直接因素。综上所述,可认为酵母浸粉 1/2,尿素 1/2 为合适的混合氮源比例。

3 结论

综合以上论述及验证实验得到如下结论:菌体对不同氮源的利用存在差异性,重点体现在消耗速率方面,在发酵初期相对更加明显;菌体在不同生长阶段,对碳氮比的需求有差异性,发酵过程中任意阶段的碳氮比均会对发酵产生较大影响,因此对氮源进行控制尤为重要。

采用补氮或混合氮源的方式进行氮源控制,均可以获得较为理想的效果。其中,选择 $\Delta N=0.1/6 h$ 的氮源控制可得到 27.625 g/L 产物浓度,较未调控组提高了 29.86%;利用 1/2 酵母浸粉、1/2 尿素的氮源混合方式可得到 28.582 g/L,较单纯使用尿素提高了 12.99%。该方法对其他物质的同步糖化发酵生产具有一定指导意义。

参考文献:

- [1] 吴伟伟,隆小华,刘兆普,等.氮源对 2 株海洋微藻生长及脂肪酸合成的影响[J].食品与发酵工业,2012,38(1):46-50.
- [2] 赵现方,王艳婕,武忠伟,等.莽草酸发酵培养基的最佳碳氮

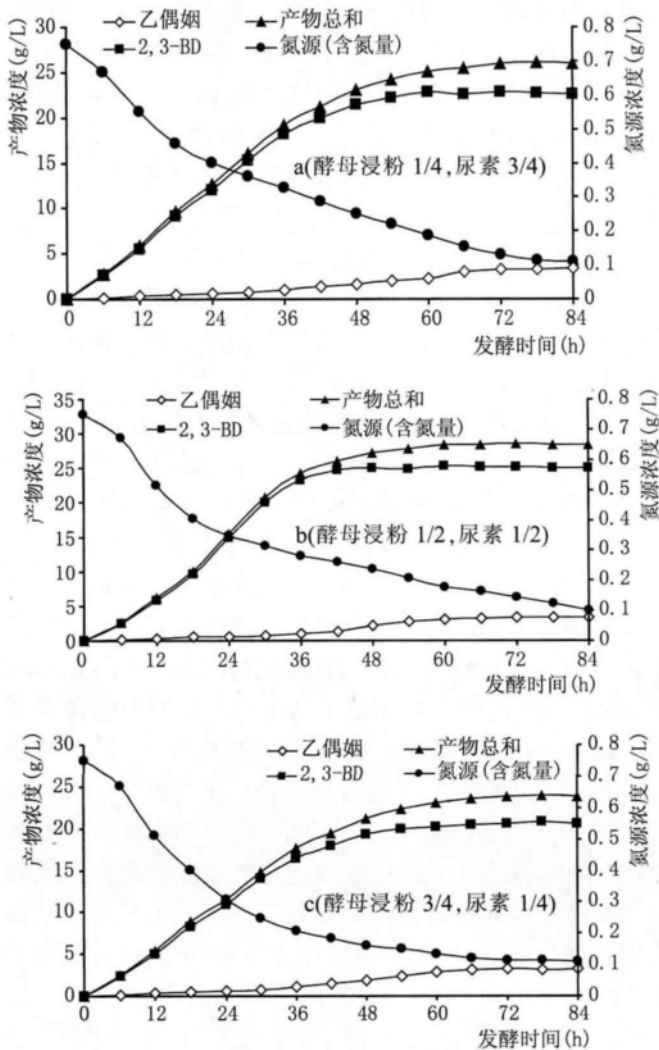


图3 混合氮源对同步糖化发酵的影响

源筛选[J].河南科技学院学报,2011,39(6):16-18.

- [3] 赵雅丽,刘占英,张海健,等.溶纤维丁酸弧菌产纤维素酶适宜的碳源和氮源研究[J].内蒙古工业大学学报,2011,30(4):478-481.
- [4] 林衍铨,马璐,应正河,等.碳源和氮源对绣球菌菌丝生长的影响[J].食用菌学报,2011,18(3):22-26.
- [5] 张亚丽,李涵,许秋瑾,等.不同形态氮对微囊藻叶绿素 α 合成

及产毒的影响[J].湖泊科学,2011,23(6):881-887.

- [6] Syu M J. Biological production of 2,3-butanediol[J]. Appl Microbiology Biotechnology, 2001, 55(1): 10-18.
- [7] Qin Jayang, Xiao Zijun, Ma Cuiqing, et al. Production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* using glucose and ammonium phosphate[J]. Chinese Journal of Chemical Engineering, 2006, 14(1): 132-136.
- [8] Nilgaganar S S, Bhosale S B, Dandage C N, et al. Potential of *Bacillus Licheniformis* for the production of 2,3-butanediol[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1996, 82(4): 408-410.
- [9] Biehl H, Zeng A P. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1998, 50(1): 24-29.
- [10] Lee H K, Maddox I S. Continuous production of 2,3-butanediol from whey permeate using immobilized in calcium alginate[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1986, 8(7): 409-411.
- [11] Perego P, Converti A. Effects of temperature, inoculum size and starch hydrolyzate concentration on butanediol production by *Bacillus Licheniformis*[J]. Bioresource Technology, 2003, 89(2): 125-131.
- [12] Afschar A S, Belgardt K H, Rossel C E V, et al. The production of 2,3-butanediol by fermentation of high test molasses[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1991, 34(5): 582-585.
- [13] 司阳. 利用玉米秸秆水解液发酵生产 2,3-丁二醇[D]. 杭州: 浙江大学, 2010.
- [14] Cogan M. Constitutive nature of the enzymes of citrate metabolism in *Streptococcus Lactis subsp. Diacetylactis*[J]. Journal of Dairy Research, 1981, 48: 489-495.
- [15] Cheng Keke, Liu Qing, Zhang Jianan, et al. Improved 2,3-butanediol production from corn cob acid hydrolysate by fed-batch fermentation using *Klebsiella oxytoca*[J]. Process Biochemistry, 2010, 45(4): 613-616.
- [16] 陈明, 王周芳, 夏黎明. 固定化基因重组酵母发酵木糖产乙醇[J]. 浙江大学学报: 工学版, 2008, 42(2): 290-293.
- [17] 秦伟军. 玉米芯生产乙醇工艺研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2010.

(上接第36页)

对照,在酯类组分、酸类组分以及酚类组分等特征成分存在共性,醇类组分含量的指标相差较大,以正丙醇最显著,异丁醇、正丁醇、异戊醇等组分的含量也有差异;醛类组分中以乙醛、乙缩醛、糠醛较显著。

本研究通过气相色谱检测数据对天朝上品酒进行定性和定量分析,其结果能够反映天朝上品酒“绵柔、醇和、酱香显著、舒适、协调”柔和酱香的特征。

参考文献:

- [1] 沈怡方. 白酒生产工艺全书[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998.

- [2] 胡国栋. 气相色谱法在白酒分析中的应用现状与回顾[J]. 食品与发酵工业, 2003(10): 65-69.
- [3] 吴天祥, 王利平, 刘杨岷. 气质联用(GC-MS)分析茅台王子酒的香气成分[J]. 酿酒, 2002, 29(4): 25-26.
- [4] 张晓磊, 胡国栋. 专用型国产气相色谱仪及 DNP 填充柱测定白酒中的主要香味组分[J]. 色谱, 2002, 20(5): 471.
- [5] 曹健君, 张肖克, 黄平. 中国白酒工业技术进步与发展[J]. 酿酒科技, 2005(5): 22-28.
- [6] 吴天祥, 田志强. 品鉴贵州白酒[M]. 北京: 北京理工大学出版社, 2012.