

木糖与葡萄糖共发酵产燃料乙醇条件的优化研究

赵党阳, 郭夏丽, 王 岩

(郑州大学化工学院, 河南 郑州 450001)

摘 要: 对酵母菌 M-3 进行了葡萄糖和木糖共发酵产乙醇条件的优化研究。结果表明, 发酵的最优条件为: pH 5, 温度 34 , 转速 70 r/min, 初始糖浓度 60 g/L, 葡萄糖与木糖的质量比为 2 1。在该条件下, 发酵所得燃料乙醇浓度为 23.0 g/L, 糖醇转化率为 38.3 %。

关键词: 木糖; 葡萄糖; 燃料乙醇; 发酵

中图分类号: TS262.2; TS261.4; TS261.1; TQ920

文献标识码: A

文章编号: 1001- 9286(2008) 02- 0049- 03

Study on the Optimization of Fuel Ethanol Production Conditions by Co-fermentation of Xylose and Glucose by Yeast M-3

ZHAO Dang-yang, GUO Xia-li and WANG Yan

(School of Chemical Engineering of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450001, China)

Abstract: The co-fermentation conditions of xylose and glucose by yeast M-3 to produce fuel ethanol were studied. The results showed that the optimum conditions were as follows: initial pH value was 6.5 and the temperature was at 34 , rotating speed was at 70 r/min, initial sugar concentration was 60 g/L, and mass ratio of glucose and xylose was 2 1. Under the above conditions, the produced fuel ethanol concentration was 23.0 g/L and the conversion rate of sugar to ethanol was 38.3 %.

Key words: xylose; glucose; fuel ethanol; co-fermentation

随着全球能源危机的加剧, 人们越来越重视燃料乙醇的生产。传统的以淀粉质为原料的乙醇生产成本太高, 而利用玉米秸秆等农作物废弃物生产燃料乙醇, 不仅成本低, 同时能缓解废弃物对环境的污染, 又能减轻燃料生产对粮食的依赖。因此, 以木质纤维素原料生产燃料乙醇的技术成为当前的研究焦点。木质纤维原料的水解液中主要含有葡萄糖和木糖 2 种成分^[1]。同时发酵这 2 种糖生产燃料乙醇, 能够充分利用原料, 降低生产成本。20 世纪 80 年代开始, 世界范围内掀起了木糖与葡萄糖共同发酵的研究热潮, 并取得了一定的成果。Ingram 利用基因技术构建菌种 E.coli KO11, 该菌几乎可以发酵木质纤维原料水解液中所有的糖分, 乙醇生产能力比较高^[2]。山东大学也研究了粗糙脉孢菌对木糖和葡萄糖的共同发酵, 并取得了一定的成果^[3]。

本实验利用实验室自行筛选的 M-3 酵母菌对木糖和葡萄糖的共同发酵进行了研究, 以期对纤维素燃料乙醇的工业化生产提供一些技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌种

酵母菌 M-3, 由郑州大学环境与生态研究所筛选。

1.1.2 混合发酵培养基

混合糖(葡萄糖和木糖, 按实验要求称量), 酵母膏 2 g/L, 磷酸二氢钾 1 g/L, 硫酸镁 0.5 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 121 下灭菌 30 min, 备用。

1.2 试验方法

250 mL 的摇瓶中装入 50 mL 的混合发酵培养基, 接入 M-3 发酵菌。考察在不同 pH、不同发酵温度、不同摇床转速、不同初始糖浓度、葡萄糖与木糖的不同比例等因素对乙醇发酵的影响。通过单因素影响实验和正交实验, 确定优化的发酵条件。

1.3 测定方法

乙醇测定用氧化还原反应比色法^[4]。

酵母菌生长测定: 利用分光光度计, 以灭菌的培养基为空白, 比色皿厚度为 0.5 cm, 波长 600 nm, 测定培养液的 OD 值。用该值表示酵母菌的生长量。

木糖含量测定: 1 mL 糖化液加 4 mL 地衣酚试剂, 保温 20 min, 于 660 nm 处测 OD 值, 结合木糖标准曲线计算木糖含量。

收稿日期: 2007- 11- 01

作者简介: 赵党阳(1983-), 男, 河南镇平县人, 硕士研究生, 主要从事生物质能方面的研究工作。

总糖和葡萄糖含量测定: 总糖含量测定用 DNS 法, 总糖含量减去木糖含量即得葡萄糖含量。

2 结果与分析

2.1 温度对发酵的影响

温度是影响微生物代谢的重要因素之一。在适宜的温度范围内, 温度升高, 微生物代谢速率相应提高; 过高或过低的温度均会降低代谢速率。因此, 在不同的温度下对酵母菌 M-3 进行了发酵试验。试验结果见表 1。

表 1 温度对发酵的影响

温度 (℃)	葡萄糖 浓度 (g/L)	木糖 浓度 (g/L)	乙醇 浓度 (g/L)	糖醇 转化率 (%)	菌体 生长量 (OD ₆₀₀)	终 pH
28	4.12	5.19	6.4	10.7	0.64	3.90
30	3.97	4.88	10.3	17.2	1.27	4.02
32	3.85	4.26	15.4	25.7	1.40	4.05
34	3.62	3.90	19.8	33.0	1.92	4.14
35	3.74	4.12	18.1	30.2	1.39	3.91

从表 1 可看出, 随着温度的升高, 乙醇浓度逐渐增加。在 34℃ 时乙醇产量最大, 为 19.8 g/L, 此时的糖醇转化率为 33.0%。当温度超过 34℃ 时, 乙醇浓度就开始降低。同时菌体生长量也表现出类似的变化规律, 表明一定量的酵母菌数是乙醇发酵的必要条件。随着乙醇浓度的增加, 相应的有机酸副产物的量减少, 因此, 发酵液的终止 pH 也有所上升。

2.2 初始 pH 对发酵的影响

微生物的代谢与 pH 有密切的关系, 为此, 试验了初始 pH 对发酵的影响, 以考察不同初始 pH 对发酵的影响。结果见图 1 所示。

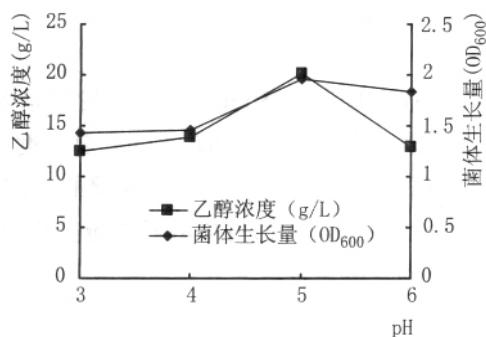


图 1 初始 pH 对发酵的影响

图 1 表明, pH 为 5 时, 乙醇浓度最高为 20.2 g/L, 且有最高的菌体生长量, 葡萄糖浓度为 0.7 g/L, 木糖浓度为 11.5 g/L, 表明初始 pH 为 5 时, 既有利于菌体生长, 又有利于乙醇发酵。

2.3 摇床转速对发酵的影响

在培养容器体积与装液量相同的情况下, 摇床转速与溶解氧有密切关系, 而溶解氧是影响木糖发酵的重要

因素之一。在 250 mL 的摇瓶中装入 50 mL 的发酵液, 葡萄糖与木糖质量比为 2:1, pH5, 温度 34℃, 考察不同摇床转速对发酵的影响, 结果见图 2。

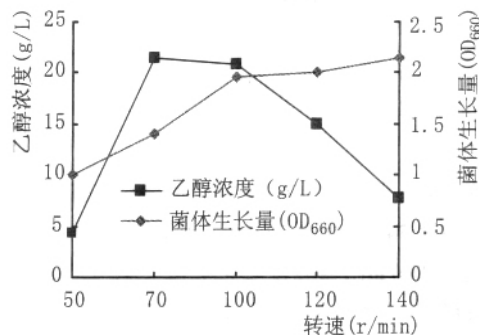


图 2 摇床转速对发酵的影响

从图 2 可以看出, 摇床转速对乙醇发酵影响较大, 转速为 70 r/min 时, 乙醇浓度达到最大。高于或者低于 70 r/min, 乙醇浓度均减小; 摇床转速对菌体量也有明显影响, 随着转速的加大, 菌体量逐渐增加。在低转速条件下 (< 70 r/min), 发酵液中溶解氧少, 酵母菌 M-3 生长量低, 从而影响了酵母菌的发酵能力; 在高转速条件下 (> 70 r/min), 发酵液中的溶解氧较充足, 菌体的有氧呼吸作用增强, 菌体繁殖速率增加而乙醇产量降低。研究表明, 酵母菌木糖发酵需要微好氧条件^[9], 而葡萄糖发酵需在厌氧条件下进行。在转速为 70 r/min 时, 乙醇浓度最高, 表明此时有利于木糖发酵。在实际生产中, 由于葡萄糖和木糖共存于木质纤维素的水解糖液中, 可以在发酵初期, 加大通气量使酵母菌迅速繁殖以扩增酵母菌细胞, 随后减小通气量, 维持微好氧状态, 使酵母菌充分发酵木糖和葡萄糖高效产生乙醇。

2.4 混合液中葡萄糖与木糖质量之比对发酵的影响

混合液初糖浓度为 60 g/L, 选取葡萄糖与木糖质量之比为 1:1、2:1、3:1, 研究 2 种单糖质量比对发酵的影响, 结果见表 2。

表 2 葡萄糖和木糖比例对发酵的影响

葡萄糖 与木糖 比例	葡萄糖 浓度 (g/L)	木糖 浓度 (g/L)	乙醇 浓度 (g/L)	糖醇 转化率 (%)	菌体 生长量 (OD ₆₀₀)
1:1	2.79	5.84	9.9	16.5	1.01
2:1	3.62	3.90	23.0	38.3	1.41
3:1	4.18	2.86	16.4	27.3	1.54

从表 2 可以看出, 葡萄糖与木糖之比为 1:1 时, 乙醇浓度和糖醇转化率最低; 两者之比为 2:1 时, 乙醇浓度和糖醇转化率最高。随着葡萄糖与木糖比例增大, 菌体量逐渐增加。由于葡萄糖是微生物生长繁殖优先选择的良好碳源, 因此, 随着葡萄糖浓度的增加, 菌体量增加。当质量比为 1:1 时, 即葡萄糖与木糖浓度均为 30 g/L 时, 木糖浓度相对于酵母菌菌体量过剩, 从而产生木糖发酵

乙醇的基质抑制作用,导致乙醇产量很低。当质量比为 3.1 时,由于葡萄糖浓度较高,菌体量加大,但木糖量相应减少,致使乙醇产量也不高。而质量比为 2.1 时,糖醇转化率最高,表明此时的木糖量和菌体量均有助于乙醇的产生。

2.5 初始糖浓度对发酵的影响

发酵液中糖的浓度对微生物的生长和发酵起着直接的作用,而且直接影响了单位发酵设备的产量和生产成本。研究初始浓度对发酵的影响至关重要。

葡萄糖与木糖质量比为 2.1, 研究不同初始糖浓度对发酵的影响。初始糖浓度越大, 菌体生长量越大, 在 100 g/L 糖浓度下菌体生长量最大, 表明酵母菌 M-3 能够耐受高糖浓度。糖醇转化率在 60 g/L 时达到最大, 表明高糖浓度不利于乙醇发酵。

表 3 初始糖浓度对发酵的影响

初始 糖浓度 (g/L)	葡萄糖 浓度 (g/L)	木糖 浓度 (g/L)	乙醇 浓度 (g/L)	糖醇 转化率 (%)	菌体 生长量 (OD ₆₀₀)
20	3.00	3.15	6.3	31.6	1.12
40	2.35	1.22	13.5	33.8	1.36
60	3.62	3.90	21.5	35.8	1.41
80	4.82	5.12	25.7	32.1	1.92
100	6.02	6.32	31.8	31.8	2.00

2.6 发酵条件的正交实验设计

通过单因素试验,初步确定了温度、pH、摇床转速的最适值。为了考察这 3 个因素在组合条件下如何影响发酵,对 3 因素进行了正交试验^[9],结果见表 4。

表 4 发酵条件的正交试验

试验号	因素				
	pH (A)	温度(°C) (B)	转速(r/min) (C)	空白 (D)	乙醇浓度 (g/L)
1	1(5)	1(30)	1(70)	1	18.5
2	1	2(32)	2(100)	2	12.8
3	1	3(34)	3(120)	3	17.1
4	2(5.5)	1	2	3	11.3
5	2	2	3	1	10.6
6	2	3	1	2	18.5
7	3(6)	1	3	2	19.9
8	3	2	1	3	9.2
9	3	3	2	1	9.9
均值 1	16.133	16.567	15.400	13.000	
均值 2	13.467	10.867	11.333	17.067	
均值 3	13.000	15.167	15.867	12.533	
极差 R	2.666	6.700	4.534	4.534	

从表 4 可以看出,第 7 号试验得到的乙醇浓度最高,为 19.9 g/L,可以确定组合 A₃B₁C₃ 为最佳组合。

从各因子极差分析 R_B>R_C>R_A,表明,在发酵条件中,对乙醇浓度影响最大的因素是发酵温度,其次是转速,而 pH 对乙醇浓度的影响最小。

从因素均值来看,A₁>A₂>A₃,B₁>B₃>B₂,C₃>C₁>C₂,根据此结果可以确定,最佳发酵条件组合为 A₁B₁C₃,这与第 7 号试验的条件只有 pH 不一致。分析各因素的均值,发现温度的均值 1 和均值 3 以及转速的均值 1 和均值 3 均差别不大,加之,pH 对乙醇浓度的影响最小,由此分析推测,A₁B₃C₁ 有可能也是最佳组合。由上述单因素实验得知,其他条件不变,在 pH5、温度 34℃、转速 70 r/min 的条件下,发酵所得燃料乙醇浓度可高达 23.0 g/L。从而证明了 A₁B₃C₁ 也是最佳组合。由此,A₃B₁C₃ 和 A₁B₃C₁ 均为最优组合,从降低能耗的角度出发,选择 A₁B₃C₁ 为最佳组合。

3 结论

3.1 通过对 M-3 共发酵葡萄糖和木糖混合液产乙醇试验研究,得出共发酵葡萄糖和木糖生产乙醇的最优条件为 pH5、温度 34℃、转速 70 r/min,初始糖浓度 60 g/L,葡萄糖与木糖的比为 2.1。

3.2 酵母菌利用葡萄糖的能力大于木糖,并且是优先利用葡萄糖。通过正交试验分析各个因素,发现温度对发酵过程最关键,其次是转速,影响最小的是 pH。

参考文献:

- [1] Delgenes J P, Escare M C. Biological production of industrial chemicals, i.e. xylitol and ethanol, from lignocelluloses by controlled mixed culture systems[J]. Industrial Crops and Products, 1998, (7): 101-111.
- [2] Peter F. Gomez, L. O. Ingram. Cloning, sequencing and characterization of the alkaline phosphatase gene (phoD) from *Zymomonas mobilis* [J]. FEMS Microbiology Letters, 1995, 125: 237-245.
- [3] 史文龙. 酒精生产酵母菌株木糖代谢工程及其发酵工艺的初步研究[D]. 济南: 山东大学, 2005.
- [4] 王兴红, 江东福, 马萍, 等. 低含量乙醇的简便测定方法[J]. 生物学报, 1995, (3): 28-29.
- [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, (2): 36-41.
- [6] 孙培勤, 刘大壮. 实验设计数据处理与计算机模拟[M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 2001.

国产葡萄酒占市场八成以上份额

本刊讯: 据中国酿酒协会发布的国内葡萄酒与烈性酒数据分析调查, 王朝、长城、张裕三大厂家占据了我国葡萄酒市场 85% 的份额。预计 2008 年至 2011 年间, 中国葡萄酒年消费量以 70% 以上的速度增长, 将成为全球第八大葡萄酒消费国。近年来, 全球葡萄酒消费平均年增长速度仅有 1%, 而亚洲葡萄酒消费年均增速接近 8%。(小小)