

玉米秸秆糖化液发酵纤维燃料体系优化研究*

宋安东^{1,2}, 刘玉博¹, 董庸行^{1,2}, 杜风光²

1(河南农业大学生命科学学院, 河南 郑州 450002) 2(河南天冠企业集团, 河南 南阳, 473000)

摘要 研究了嗜鞣管囊酵母(*Pachysolen tannophilus*) P-01 发酵玉米秸秆糖化液生产纤维乙醇的体系。在原料酶解时用磷酸缓冲液(pH4.8, 0.0667 mol/L KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 溶液), 更适合 P-01 发酵; 玉米秸秆糖化液的发酵培养基配方为: 酵母膏 0.3 g/L, 蛋白胨 0.5 g/L, 尿素 0.2 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.1 g/L, 吐温 80 0.25 mmol/L, 聚乙烯醇 25 mg/L, L-谷氨酰胺 0.625 g/L, pH5.0; 添加油酸对发酵结果的影响不明显; 在发酵至 36 h 补料, 乙醇最终体积分数为 2.05%, 比对照(1.54%)提高了 33.17%。

关键词 玉米秸秆, 糖化液, 发酵, 燃料乙醇

目前, 世界各国经济发展都面临能源供应安全和生态环境保护的双重压力, 为了实现能源、环境和经济的持续协调发展, 各国都在致力于可再生能源的开发^[1,2]。以农作物秸秆为主的各类纤维类生物质原料替代粮食资源的燃料乙醇开发, 符合“不与人争粮, 不与粮争地, 不破坏环境”的原则, 是未来解决燃料乙醇可持续生产的根本途径。

近年来, 国内外在纤维乙醇领域开展了深入的研究, 取得较大的进展^[3,4]。河南农业大学微生物能源工程研究室已经对纤维素原料的预处理技术(稀酸、稀碱、蒸汽爆破和生物处理等)、纤维素酶和木聚糖酶的共水解技术、管囊酵母的戊糖和己糖共发酵技术等进行了系统的研究, 使纤维乙醇的产率得到显著提高^[5~8]。研究中发现, 稀酸预处理、双酶水解获得的玉米秸秆糖化液中含有一定浓度的糠醛、羟-甲基咪喃、乙酰丙酸等有毒物质, 对管囊酵母生长及发酵生产乙醇均有较大的影响。本文对嗜鞣管囊酵母 P-01 在发酵玉米秸秆糖化液的发酵体系进行了研究, 以提高菌体的生长速度、抗有毒物质的能力和耐乙醇能力, 以期对纤维乙醇产业化提供技术支撑。

1 材料与amp;方法

1.1 菌种

嗜鞣管囊酵母(*Pachysolen tannophilus*) P-01, 河南农业大学微生物能源工程研究室(IBEE)保藏。

1.2 玉米秸秆粉

第一作者: 博士, 副教授。

* 国家自然科学基金(70741032), 国家农业成果转化资金项目(2006D00070597), 中国博士后科学基金资助项目(20060400797), 河南省高等学校青年骨干教师资助项目
收稿日期: 2008-07-22, 改回日期: 2008-10-08

河南天冠集团试验中心提供, 粉碎 40 目备用。

1.3 酶制剂

纤维素酶(小麦专用复合酶)和木聚糖酶, 购于无锡杰能科酶制剂有限公司。

1.4 培养基

1.4.1 菌种活化培养基

木糖 20 g/L, 酵母膏 3 g/L, 蛋白胨 5 g/L, 琼脂 20 g/L, pH5.0。

1.4.2 种子培养基

木糖 20 g/L, 酵母膏 3 g/L, 蛋白胨 5 g/L, pH5.0, 每个 300 mL 三角瓶装 60 mL 培养基。

1.4.3 玉米秸秆糖化液制备

玉米秸秆粉用体积分数为 0.5% 的稀 HCl 121℃ 预处理 60 min 后, 加入蒸馏水并调节 pH 值至 5.0, 使液固比达到 10:1; 然后加入纤维素酶 25 g/kg 和木聚糖酶液 20 mL/kg, 120 r/min, 50℃ 处理 48 h, 过滤除渣得糖化液。

1.5 试验方法

1.5.1 菌种活化及扩大培养

将保藏菌种转接于活化培养基, 28℃ 培养 43 h; 然后接 3 环至装有 60 mL 种子液培养基的 300 mL 三角瓶中, 150 r/min, 28℃ 培养 24 h。

1.5.2 发酵

将种子液按 10% 的接种量(体积分数)接到发酵培养液中, 120 r/min, 30℃ 培养 72 h。

1.6 分析和计算

1.6.1 还原糖测定

斐林试剂滴定法^[9]。

1.6.2 乙醇含量测定

高效气相色谱法。采用高效气相色谱仪 Agilent

4890, Pona 柱 50m, 氢火焰离子化(FID)检测器, 进样温度 200℃, 检测器温度 250℃, 柱温: 初始 60℃, 保持 1min, 以 10℃/min 升至 200℃, 保持 1min, 运行时间总 16min, 内标物: 正丁醇(1.0%), 载气: N₂, 进样量 2μL。

1.6.3 计算

$$\text{糖醇转化率}/\% = \frac{\text{单位体积无水乙醇质量}}{\text{总还原糖质量}} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 不同缓冲液体系对糖化和发酵结果的影响

表 1 不同缓冲液体系酶解糖化液的发酵结果

缓冲体系	乙醇体积分数/%	初始总糖/g·L ⁻¹	残糖/g·L ⁻¹	糖利用率/%	糖醇转化率/%
蒸馏水	1.55	47.50	6.63	86.04	25.78
乙酸缓冲液	1.58	47.50	6.25	86.84	26.28
磷酸缓冲液	1.58	41.75	7.88	81.26	29.90
柠檬酸缓冲液	1.52	38.75	7.13	81.60	30.59

2.2 发酵基本培养基配方的优化

本实验室已经获得了 3 个适合于 P-01 菌种利用

缓冲液能使预处理后的玉米秸秆有一个稳定的酶解糖化体系。由表 1 可以看出, 用蒸馏水和乙酸缓冲液的糖化液初始总糖浓度较高, 均可达到 47.50 g/L, 但糖醇转化率只有 25.78% 和 26.28%; 用柠檬酸缓冲液的糖化液初始总糖浓度只有 38.75%, 但 P-01 糖醇转化率却可达到 30.59%; 磷酸缓冲液的糖化和发酵效果介于两者之间。因此, 磷酸缓冲液适宜酶解和发酵生产纤维乙醇。

纯葡萄糖和木糖发酵产生乙醇的培养基配方^[5], 将其应用于玉米秸秆糖化液的发酵中, 结果如表 2 所示。

表 2 发酵基本培养基筛选结果

配方 ¹⁾	乙醇体积分数/%	初始总糖/g·L ⁻¹	残糖/g·L ⁻¹	糖利用率/%	糖醇转化率/%
1	1.58	41.75	7.88	81.26	29.70
2	1.36	41.75	8.31	80.10	25.73
3	1.51	41.75	8.75	79.04	28.57

注: 1) 配方 1: 葡萄糖 40 g/L, 木糖 20 g/L, 酵母膏 0.3 g/L, 蛋白胨 0.5 g/L, 尿素 0.2 g/L, (NH₄)₂HPO₄ 0.1 g/L, 吐温 80 250μmol/L, 聚乙烯醇 25 mg/L, L-谷氨酰胺 0.625 g/L, pH 5.0。配方 2: 葡萄糖 40 g/L, 木糖 20 g/L, 酵母膏 0.3 g/L, 蛋白胨 0.5 g/L, 尿素 0.2 g/L, (NH₄)₂HPO₄ 0.1 g/L, 肌醇 200 mg/L, NaCl 145 mmol/L, CaCl₂ 2.5 mmol/L, pH 5.0。配方 3: 葡萄糖 40 g/L, 木糖 20 g/L, 酵母膏 0.3 g/L, 蛋白胨 0.5 g/L, 尿素 0.2 g/L, (NH₄)₂HPO₄ 0.1 g/L, 吐温 80 250μmol/L, 聚乙烯醇 25 mg/L, L-谷氨酰胺 0.625 g/L, 肌醇 200 mg/L, NaCl 145 mmol/L, CaCl₂ 2.5 mmol/L, pH 5.0。

表 2 结果表明, 酵母菌利用配方 1 发酵时, 乙醇浓度和糖醇转化率最高, 分别为 1.58% 和 29.70%。因此选配方 1 为出发培养基配方。

2.3 氮源对发酵的影响

由表 3 可知, 在秸秆糖化液发酵时, 添加 0.3 g/

L 的酵母膏和 0.5 g/L 的蛋白胨为补充氮源, P-01 的糖醇转化率由对照的 21.56% 提高到 28.61%; 而添加 3g/L 的酵母膏和 5g/L 的蛋白胨, P-01 的糖醇转化率为 25.70%。酵母膏和蛋白胨的添加量分别为 0.3g/L 和 0.5 g/L 时, P-01 发酵的效果较好。

表 3 不同氮源添加量对发酵的影响

处理	乙醇体积分数/%	初始总糖/g·L ⁻¹	残糖/g·L ⁻¹	糖利用率/%	糖醇转化率/%
蛋白胨 0%	1.16	42.5	11.25	73.53	21.56
酵母膏 0.3g/L	1.55	42.5	6.82	83.95	28.61
蛋白胨 0.5g/L	1.35	42.5	8.82	79.25	25.70
酵母膏 3g/L					
蛋白胨 5g/L					

2.4 油酸添加试验

油酸有助于增强酵母菌对乙醇和有毒物质的耐受能力、加速酵母的生长、降低残糖和提高发酵液

中的乙醇含量^[10]。表 4 结果显示, 随着油酸量的增加, P-01 发酵的乙醇浓度和残糖均无明显变化, 说明油酸对嗜鞣管囊酵母 P-01 发酵的影响不显著。

表 4 油酸对发酵的影响

油酸添加量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	乙醇体积分数/%	初始总糖/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	残糖/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	糖利用率/%	糖醇转化率/%
0	1.45	42.5	4.63	89.11	26.92
10	1.41	42.5	5.13	87.93	26.18
30	1.43	42.5	4.70	88.94	26.55
60	1.41	42.5	4.83	88.64	26.18

2.5 补料发酵试验

低浓度发酵高浓度补料的发酵方式具有提高原料利用率、降低初始培养基中某些物质对酵母菌发酵的抑制作用。由表 5 可知,在 36h 补料时,乙醇终含

量由对照的 1.54% 提高到 2.05%,且 P-01 的糖醇转化率略低于对照;而在其它时间点进行补料时,乙醇终含量、P-01 的糖醇转化率都比较低。

表 5 补料发酵结果

类别	乙醇体积分数/%	初始总糖/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	残糖/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	糖利用率/%	糖醇转化率/%
ck	1.54	42.32	6.25	85.23	28.71
24h 补料	1.80	57.30	15.50	72.95	24.79
36h 补料	2.05	57.30	14.63	74.47	28.23
48h 补料	1.94	57.30	13.44	76.54	26.71
60h 补料	1.77	57.30	15.63	72.72	24.37

3 结论与讨论

3.1 结论

酶解过程中分别用无菌水、乙酸缓冲液(pH4.8、0.2 mol/L 乙酸-乙酸钠溶液)、磷酸缓冲液(pH4.8、0.0667 mol/L KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 溶液)和柠檬酸缓冲液(pH 4.8、0.05 mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液)作为酶解体系,并比较了糖化液中还原糖浓度及 P-01 的糖醇转化率,结果表明磷酸缓冲液适合酶解糖化和发酵生产纤维乙醇;确定了适合 P-01 发酵秸秆糖化液的最佳配方;在利用秸秆糖化液发酵时,添加 0.3 g/L 酵母膏和 0.5 g/L 蛋白胨作为氮源有利于酵母菌发酵;油酸对 P-01 发酵结果的影响不显著;在低浓度发酵 36h 补料,乙醇终浓度比对照(1.54%)高出 33.17%,达到 2.05%。

3.2 讨论

通过调整玉米秸秆糖化液的发酵体系可以提高乙醇转化率,但乙醇终浓度依然较低,导致蒸馏成本过高,从而使工业化生产的成本偏高,因此提高乙醇终浓度是纤维乙醇生产中急待解决的关键问题之一^[11]。

嗜鞣管囊酵母 P-01 在发酵玉米秸秆糖化液生产纤维乙醇试验中总糖利用率较高,但糖醇转化率比较低,表明 P-01 在利用混合糖代谢生产乙醇的途径中副产物较多,同时糖化液中含有乙酸、糠醛等有毒物质,可能抑制乙醇产生。因此,可以通过基因工程手

段将支路代谢中的关键酶进行沉默或敲除以减少支路代谢,或者将抗乙酸、糠醛等有毒物质的基因导入到酵母菌中,使其能够在有毒物质存在的秸秆糖化液中发酵高产乙醇^[12,13],等等。构建乙醇产率高、分支代谢产物少且耐受性强的高效乙醇生产菌株将是纤维燃料乙醇菌株改良的重要工作。

参 考 文 献

- Alexander E Farrell, Richard J Plevin, Brian T Turner, et al. Ethanol can contribute to energy and environmental goals[J]. Science, 2006, 311(27): 506~508
- Robert F. Cellulosic ethanol: Biofuel researchers prepare to reap a new harvest[J]. Science, 2007, 315(16): 1488~1491
- Tara Graves, Neelakantam V, Narendranath, et al. Effect of pH and lactic or acetic acid on ethanol productivity by *Saccharomyces cerevisiae* in corn mash[J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2006, 33(6): 269~274
- Schmer M R, Vogel K P, Mitchell R B, et al. Net energy of cellulosic ethanol from switchgrass[J]. PNAS, 2008, 105(15): 464~469
- 宋安东, 谢慧, 耿欣, 等. 戊糖和己糖共发酵生产燃料乙醇发酵体系优化研究[J]. 郑州轻工业学院学报(自然科学版), 2006, 21(4): 18~20
- 宋安东, 任天宝, 谢慧, 等. 化学预处理对玉米秸秆酶解糖化效果的影响[J]. 化学与生物工程, 2006, 23(8): 31~33
- Cheng Keke, Ge Jingping, Zhang Jianan, et al. Fermentation of pretreated sugarcane bagasse hemicellulose hydroly-

- sate to ethanol by *Pachysolen tannophilus* [J]. *Biotechnol Lett*, 2007, (29): 1 051~1 055
- 8 Cheng Keke, Zhang Jianan, Ping Wenxiang, et al. Sugarcane Bagasse Mild Alkaline / Oxidative Pretreatment for Ethanol production by Alkaline Recycle Process [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2008, 151(1): 43~50
- 9 俞建瑛, 蒋宇, 王善利. 生物化学实验技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005. 128~133
- 10 Kyung Man You, Claire-Lise R, Douglas C K. Ethanol Tolerance in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* is Dependent on Cellular Oleic Acid Content [J]. *Applied And Environmental Microbiology*, 2003, 69(3): 1 499~1 503
- 11 Gregory Stephanopoulos. Challenges in Engineering Microbes for Biofuels Production [J]. *Science*, 2007, 315 (9): 801~804
- 12 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): 237~239
- 13 Cristobal Cara, Encarnacion Ruiz, Mercedes Ballesteros, et al. Production of fuel ethanol from steam-explosion pretreated olive tree pruning [J]. *Fuel*, 2008, 87(6): 692~700

Research on Optimum of Fermentation System During Fermentation Corn Stalk Saccharified Liquid to Fuel Ethanol

Song Andong^{1,2}, Liu Yubo¹, Dong Yonghang^{1,2},
Du Fengguang²

1(College of Life Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

2(Henan Tianguan Group, Nanyang 473000, China)

ABSTRACT Optimization of the fermentation conditions on corn stalk saccharified liquid to produce fuel ethanol by *Pachysolen tannophilus* P-01 was studied. The results showed that choosing the phosphoric acid buffer is more suitable for co-fermentation of fuel ethanol production, and the fermentation medium suitable for saccharified liquid of P-01 was selected as follows: 0.3 g/L yeast extract, 0.5 g/L peptone, 0.2 g/L carbamide, 0.1 g/L diammonium phosphate, 250 μmol/L tween 80, 25 mg/L PVA, 0.625 g/L L-glutamine, pH 5.0. The impact of oleic acid on fermentation was weak; feeding the batch culture at 36h, the final ethanol concentration reached 2.05%, improved by 33.17%.

Key words corn stalk, saccharified liquid, fermentation, fuel ethanol

全国白酒标准化浓香型白酒分技术委员会成立

2008年12月26日,全国白酒标准化技术委员会浓香型白酒分技术委员会成立大会暨第一届一次委员大会在五粮液集团召开。

我国的白酒有几千年的历史,是中华民族优秀而宝贵的民族遗产。改革开放后,白酒工业得到飞速发展,尤其是浓香型白酒,在龙头企业五粮液的带领下,成为中国白酒中发展最快、最大的酒种。目前,浓香型白酒成为我国数量最多、市场占有率最大的白酒主体酒种。2007年,全国白酒产量达到493.95万L,其中70%以上都是浓香型白酒。在出口方面,浓香型白酒更是独领风骚,仅五粮液集团一家的出口量就占到了白酒行业的95%。

此次全国白酒标准化技术委员会第一届浓香型白酒分技术委员的成立,是国标委制订的“标准以企业为主导,面向国际竞争”宗旨的结果,反映了国家标准委对浓香型白酒产业的重视,是浓香型白酒行业发展面临的契机。

全国白酒标准化技术委员会第一届浓香型白酒分技术委员会由25名委员组成,五粮液集团董事长王国春任主任委员,五粮液股份公司总经理陈林任秘书长,秘书处承担单位为四川省宜宾五粮液集团公司,主要负责浓香型白酒领域的国家标准制度修订工作。浓香型白酒分技术委员将围绕食品质量安全、产品质量、技术安全、环境友好、公益规范、健康绿色等目标系统开展浓香型白酒标准研究制定,使产品质量和生产过程更加满足国家政策和消费者的要求,规范产业行为,促进白酒行业健康快速发展;同时,通过这个平台,提高浓香型白酒标准化水平,加快我国白酒标准国际化进程,促进中国白酒走向国际市场。