

葡萄糖对树干毕赤酵母发酵木糖的影响

季更生¹, 王杏文², 勇 强², 余世袁²

(1. 江苏科技大学 生物与环境工程学院, 江苏 镇江 212018; 2. 南京林业大学 化学工程学院, 江苏 南京 210037)

摘要: 对树干毕赤酵母 *Pichia stipitis* 间歇发酵和连续发酵木糖葡萄糖混合液进行了研究。结果表明, 间歇发酵时葡萄糖对木糖发酵影响较小, 当发酵液中葡萄糖质量浓度小于 $10.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 树干毕赤酵母同步发酵利用葡萄糖和木糖。连续发酵木糖和葡萄糖时, 葡萄糖对木糖发酵影响较大, 以 $30.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖和 $15.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 木糖为发酵底物, 当稀释率 $D=0.08 \text{ h}^{-1}$ 时, 木糖利用率为 9.40%, 乙醇质量浓度为 $12.55 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 当稀释率 $D=0.04 \text{ h}^{-1}$ 时, 木糖利用率达 66.07%, 乙醇质量浓度达 $16.93 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。图 2 表 2 参 12

关键词: 林业工程; 树干毕赤酵母; 木糖发酵; 葡萄糖; 乙醇

中图分类号: TQ92; S785.0 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-5692(2008)02-0148-05

Ethanol fermentation with xylose and glucose mixtures and *Pichia stipitis*

JI Geng-sheng¹, WANG Xing-wen², YONG Qiang², YU Shi-yuan²

(1. College of Biological and Environmental Engineering, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang 212018, Jiangsu, China; 2. College of Chemical Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China)

Abstract: Using vegetable fibre to ferment ethanol can relieve energy crunch and improve environment protection. Here batch and continuous fermentation of xylose and glucose mixtures with *Pichia stipitis* were studied to provide basis for industrialized fermentation of ethanol. *P. stipitis* was cultured in a single-stage reactor with a mixture of 10.0, 20.0, 30.0, 40.0, 50.0, 60.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ glucose and 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0, 60.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ xylose. Results showed that with a residual glucose concentration of not more than $10.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ in a culture medium with batch fermentation, glucose and xylose could be fermented by *P. stipitis* synchronously. Then, for continuous ethanol fermentation, glucose had great effect on fermentation with xylose. When *P. stipitis* was cultured in a single-stage reactor with a mixture of $30.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ glucose and $15.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ xylose, at a dilution rate of 0.08 h^{-1} , 9.40% of the xylose was consumed, and the ethanol concentration was $12.55 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. However, when the dilution rate was 0.04 h^{-1} , 66.07% of the xylose was consumed, and the ethanol concentration was $16.93 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. [Ch, 2 fig. 2 tab. 12 ref.]

Key words: forest engineering; *Pichia stipitis*; xylose fermentation; glucose; ethanol

国际石油价格的攀升和全球环境保护的要求, 为燃料乙醇产业带来了很好的发展机遇^[1-4], 因为乙醇发酵可以利用可再生的植物纤维资源作为原料^[5-9]。据估计^[10], 作为植物纤维资源的最主要成分纤维素和半纤维素, 全球每年约以 1 640 亿 t 的速度不断再生, 其储藏的能量相当于目前全球石油年产量的 15~20 倍。而目前这一潜在资源的利用大约只有地球总储量的 0.5%。作者对树干毕赤酵母 *Pichia stipitis* 间歇发酵和连续发酵木糖葡萄糖生产乙醇以及葡萄糖对木糖发酵的影响进行了研究, 旨在为经济有效地实现工业化连续发酵植物纤维资源制备乙醇提供理论依据。

收稿日期: 2007-04-25; 修回日期: 2007-09-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39970597; 30070636)

作者简介: 季更生, 讲师, 博士, 从事林产生物化学加工研究。E-mail: jigsheng@126.com

1 材料与方法

1.1 菌种

树干毕赤酵母于4℃条件下保藏在木糖-蛋白胨-酵母浸汁-琼脂斜面培养基上。

1.2 酵母接种物制备

在斜面培养基中恒温30℃培养36~48 h后,将菌种接入装有50 mL活化培养液的250 mL三角瓶中,恒温30℃,摇床转速150 r·min⁻¹,活化培养48 h。酵母培养液离心(3 000 r·min⁻¹, 10 min),取酵母沉淀按实验具体要求稀释后作为发酵接种物。

1.3 间歇发酵

50 mL培养液置于带棉花塞的250 mL三角瓶内,在恒温振荡器内振荡发酵,发酵温度为(35±1)℃,振荡器转速150 r·min⁻¹,发酵时间为24 h。

1.4 连续发酵

采用如图1所示的连续培养发酵装置,罐工作体积为1.5 L;在一定流速下,营养盐和糖液连续流入发酵罐,通过溢出管保持发酵体积不变。控制发酵温度为(35±1)℃,通风量100~150 mL·min⁻¹。

1.5 分析方法

还原糖质量浓度测定:采用DNS(3,5-二硝基水杨酸)法测定^[11]。葡萄糖质量浓度测定:采用葡萄糖氧化酶-过氧化酶试剂法测定(测定试剂盒来自上海科欣生物技术研究所以)。酒精质量浓度测定:采用比重法测定^[12]。

1.6 计算方法

酒精得率=酒精质量浓度/(消耗葡萄糖质量浓度×0.51+消耗木糖质量浓度×0.46)×100%

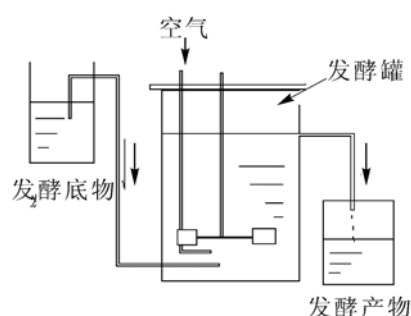


图1 单级连续发酵装置示意图

Figure 1 Sketch diagram for continuous fermentation reactor

2 结果与分析

2.1 葡萄糖对树干毕赤酵母间歇发酵木糖的影响

图2表示了不同初始质量浓度的葡萄糖对树干毕赤酵母间歇发酵木糖影响的实验结果。从图2可知,经过24 h发酵60.0 g·L⁻¹木糖基本上被发酵利用完。当葡萄糖初始质量浓度为10.0~50.0 g·L⁻¹时,木糖利用率在90.0%以上;当葡萄糖初始质量浓度为60.0 g·L⁻¹时木糖利用率达62.8%。树干毕赤酵母利用葡萄糖的速度要快于木糖,而且随着添加葡萄糖质量浓度的增加,树干毕赤酵母利用木糖的速度在不断减慢。从图2-A中可以看出,10.0 g·L⁻¹葡萄糖经4 h的发酵基本上被利用完;4 h后进行的基本上全部是木糖发酵。而从图2-B中可知,20.0 g·L⁻¹葡萄糖要经8 h左右的发酵才基本上被利用完;8 h后进行的基本上全部对木糖的利用。图2-C也显示了同样的规律,30.0 g·L⁻¹葡萄糖需要12~16 h才被消耗殆尽。从图2-A~C中还发现,酵母在发酵利用葡萄糖的同时,有部分的木糖也被同步发酵利用。从图2-D~F中来看,随着添加葡萄糖质量浓度的进一步增加,酵母发酵葡萄糖所需的时间也不断加长。但与前面不同的是由于开始时葡萄糖质量浓度相对较高,木糖发酵几乎没有进行,这就产生了所谓的“葡萄糖效应”,这种现象在图2-F表现得尤为明显:在发酵最初12 h,葡萄糖质量浓度一直维持在10.0 g·L⁻¹以上,这样高质量浓度的葡萄糖使得树干毕赤酵母几乎没有利用木糖,在后面12 h由于葡萄糖质量浓度进一步下降,才开始出现木糖被利用的现象。

因此,当葡萄糖初始质量浓度小于50.0 g·L⁻¹时,60.0 g·L⁻¹木糖在24 h内发酵完全。当发酵液中葡萄糖质量浓度小于10.0 g·L⁻¹时,树干毕赤酵母开始发酵利用木糖,表现出木糖葡萄糖同步发酵。

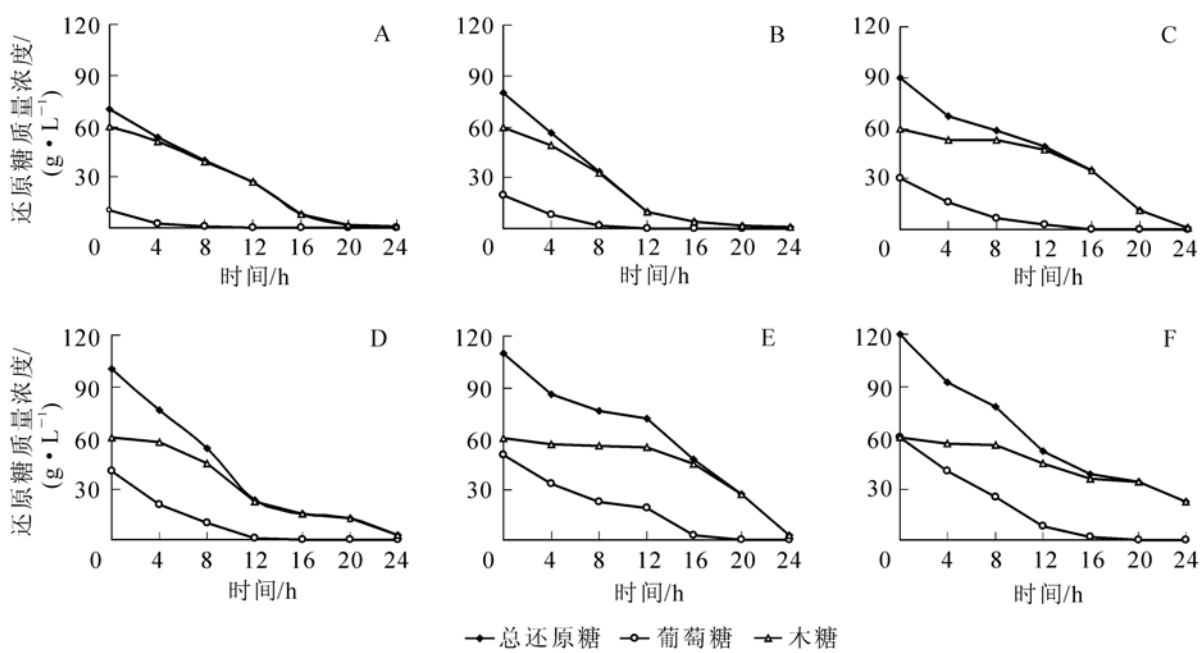


图2 葡萄糖对树干毕赤酵母间歇发酵木糖的影响

Figure 2 Effect of glucose on batch fermentation of xylose by *Pichia stipitis*

2.2 相同比例葡萄糖木糖混合液树干毕赤酵母连续发酵

表1列出了相同比例葡萄糖木糖混合液树干毕赤酵母连续发酵的结果，实验采用不同质量浓度比例为2:1的葡萄糖和木糖混合糖为基本发酵底物(稀释率 $D=0.08\text{ h}^{-1}$)。

随着流入底物质量浓度不断上升，溢出液中残留的还原糖质量浓度也不断上升，葡萄糖利用率从底物质量浓度为 $15.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时的99.30%一直下降到底物质量浓度为 $90.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时的54.43%；木糖利用率从底物质量浓度为 $15.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时的10.40%下降到底物质量浓度为 $90.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时的0.33%。尽管溢出液中乙醇质量浓度有上升的趋势，但由于总还原糖利用率下降，故乙醇质量浓度上升的幅度并不大。当流加的底物总质量浓度为15.0、30.0和 $45.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，由于底物质量浓度相对较低，发酵生成的产物乙醇质量浓度也相对较低，分别只有4.82、9.85和 $12.55\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ；这时产物乙醇对酵母菌的抑制作用也较小，因而乙醇得率相对较高，该值分别达到了90.88%、92.73%和93.06%。当流入底物总质量浓度大于等于 $60.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，乙醇质量浓度值维持为 $14.5\sim 15.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ；乙醇质量浓度的增高导致抵制酵母发酵作用加强，使得乙醇得率有所下降，该值仅维持在86.5%~88.0%范围之内。

表1 相同比例葡萄糖木糖混合液树干毕赤酵母连续发酵的结果

Table 1 Continuous fermentation of glucose and xylose with the same proportion by *Pichia stipitis*

流入/($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)		流出/($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)		还原糖利用率/%		乙醇质量浓度/ ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	乙醇得率/%
葡萄糖	木糖	葡萄糖	木糖	葡萄糖	木糖		
10.0	5.0	0.07	4.48	99.30	10.40	4.82	90.88
20.0	10.0	0.12	8.95	99.40	10.50	9.85	92.73
30.0	15.0	4.83	13.59	83.90	9.40	12.55	93.06
40.0	20.0	8.63	18.93	78.43	5.35	14.51	87.99
50.0	25.0	13.98	24.49	72.04	2.04	15.57	83.69
60.0	30.0	27.34	29.90	54.43	0.33	14.45	86.51

表 1 还展示了在连续发酵时葡萄糖和木糖被树干毕赤酵母所发酵利用的规律。从表 1 数据可看出,随着发酵液中葡萄糖质量浓度的升高,木糖的利用率在逐渐下降。当发酵液中葡萄糖质量浓度在 $0.07 \sim 4.83 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,木糖利用率大约为 $9.4\% \sim 10.5\%$ 。随着葡萄糖质量浓度进一步升高,木糖的利用率进一步下降。当葡萄糖质量浓度达到 $27.34 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,木糖利用率仅仅为 0.35% ,表现出了较强的“葡萄糖抑制效应”。

2.3 葡萄糖对树干毕赤酵母连续发酵木糖的影响

通过降低流入底物速度,可以降低发酵中的葡萄糖质量浓度,从而可以提高木糖的利用率。表 2 列出了在稀释率 $D=0.04 \text{ h}^{-1}$ 时,相同葡萄糖添加量对树干毕赤酵母连续发酵木糖的结果。实验采用不同质量浓度木糖为基本发酵底物,流入的葡萄糖质量浓度固定为 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。由表 2 可知,随着流入木糖质量浓度不断上升,溢出液中残留的还原糖质量浓度也不断上升,但流出葡萄糖质量浓度上升较慢,仅从最初的 $0.14 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 上升为 $2.65 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;而流出木糖的质量浓度上升幅度较大,从最初的 $3.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 上升为 $15.33 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。溢出液中乙醇质量浓度有上升的趋势,但上升的幅度并不大。乙醇得率相对变化较小,维持在 $85.5\% \sim 86.7\%$ 。

表 2 相同葡萄糖添加量对树干毕赤酵母连续发酵木糖的影响

Table 2 Effect of glucose on continuous fermentation of xylose by *Pichia stipitis*

流入/ $(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$		流出/ $(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$		还原糖利用率/%		乙醇质量浓度/ $(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	乙醇得率/%
葡萄糖	木糖	葡萄糖	木糖	葡萄糖	木糖		
30.0	0	0.14	0	99.53	0	13.86	91.01
30.0	10.0	0.28	3.25	99.07	67.50	15.83	86.68
30.0	15.0	0.33	5.09	98.90	66.07	16.93	85.98
30.0	20.0	0.92	8.46	96.93	57.70	17.22	85.50
30.0	25.0	1.52	12.73	94.93	49.08	17.42	86.37
30.0	30.0	2.65	15.33	91.17	48.90	17.69	85.47

从表 2 中还可看出,由于底物发酵液流入的速度下降,发酵液在发酵罐中的停留时间加长,葡萄糖的发酵较充分,其质量浓度维持在 $2.65 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下,所以,木糖的利用率相对较高,维持在 $48.90\% \sim 67.50\%$ 。因此,适当地延长发酵液停留时间,通过降低葡萄糖的残留质量浓度来提高木糖发酵利用率。

3 结论

树干毕赤酵母发酵木糖的研究结果表明,当葡萄糖初始质量浓度小于 $50.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, $60.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 木糖在 24 h 内发酵完全。当发酵液中葡萄糖质量浓度小于 $10.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,树干毕赤酵母同步发酵利用葡萄糖和木糖。

树干毕赤酵母连续发酵木糖和葡萄糖时,葡萄糖对木糖影响较大,表现出一定的“葡萄糖效应”。适当地延长发酵时间,可提高木糖发酵利用率。同样以 $30.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖和 $15.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 木糖为发酵底物,当稀释率 $D=0.08 \text{ h}^{-1}$ 时,木糖利用率为 9.40% ,乙醇质量浓度为 $12.55 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;当稀释率 $D=0.04 \text{ h}^{-1}$ 时,木糖利用率为 66.07% ,乙醇质量浓度为 $16.93 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

参考文献:

- [1] 徐惠娟,王世锋,龙敏南. 燃料酒精生产的研究进展[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2006, **45** (增刊): 37-42.
- [2] 李姝睿,高阳,徐晓红. 我国新型植物能源的现状与发展方向分析[J]. 农业与技术, 2005, **25** (5): 14-15.
- [3] 田春龙,郭斌,刘春朝. 能源植物研究现状和展望[J]. 生物加工过程, 2005, **3** (1): 14-19.
- [4] 李军,吴平治,李美茹,等. 能源植物的研究进展及其发展趋势[J]. 自然杂志, 2007, **29** (1): 21-25.

- [5] 勇强, 徐勇, 宋向阳, 等. 玉米秸秆生物法制取酒精的中间试验[J]. 纤维素科学与技术, 2006, **14** (3): 37-40.
- [6] 焦瑞身. 微生物工程[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 244-253.
- [7] 张慧, 周美. 生物转化植物纤维产酒精的研究进展[J]. 江苏化工, 2005, **33** (1): 22-25.
- [8] 朱圣东, 吴元欣, 喻子牛, 等. 植物纤维素原料生产燃料酒精研究进展[J]. 化学与生物工程, 2003, **20** (5): 8-11.
- [9] 赵怀礼, 贺延龄. 植物纤维废弃物生产酒精燃料的研究[J]. 西南造纸, 2002, **31** (4): 46-49.
- [10] 闵恩泽, 吴巍. 绿色化学与化工[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000.
- [11] MILLER G I. Use of ditrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. *Anal Chem*, 1959, **31** (3): 426-428.
- [12] 李兴华, 陈大舟. 酒精密度、质量浓度和温度常用数据表[M]. 北京: 中国计量出版社, 1997.

黄坚钦教授荣获浙江省第二届新农村建设带头人“金牛奖”

2008年1月4日, 黄坚钦教授荣获浙江省第二届新农村建设带头人“金牛奖”。

黄坚钦教授是浙江林学院林业与生物技术学院主持工作副院长, 临安山核桃产业省级区域创新服务中心主任, 浙江省“151”第二层次人才。20多年来, 黄坚钦先后攻克了特色干果山核桃嫁接、矮化、实生苗培育、人工授粉、病虫害防治等方面的难题。每突破一项难题, 就把相关技术、方法无偿传授给山核桃产区农民。据不完全统计, 黄坚钦研究的相关技术成果, 在山核桃产区的农民中推广和应用后, 每年为山核桃产区的农民增收上亿元, 被农民称为“山核桃的财神爷”。

据悉, “金牛奖”评选是浙江广电集团2006年推出的重点活动, 与浙江骄傲、风云浙商评选形成三大年度人选评选系列。第二届评选活动于2007年5月启动, 从基层组织的带头人、现代农业的带头人、农村公共事业的带头人当中推荐产生了80多名优秀典型, 由浙江电台新闻台和浙江电视台公共·新农村频道进行系列报道。经专家初评、复评确定20名典型作为候选人, 最后在全省范围内由群众投票选出“金牛奖”获得者。本届共收到选票360多万张。黄坚钦教授是其中唯一一名来自高校的获奖者。

黄坚钦在接受现场采访时表示, 这个奖不仅是个人的荣誉, 更是团队努力的结果。浙江林学院努力打造农林大学, 关心百姓, 服务新农村建设, 众多教师和科技工作者深入基层, 致力于实用技术研究和推广, 帮助农民增收致富, 自己只是其中的一位代表。

李 燕