

基因重组酵母发酵木糖产酒精的研究



WANG Zhou-fang

王周芳, 陈明, 王冰冰, 夏黎明*

(浙江大学 化学工程与生物工程系, 浙江 杭州 310027)

摘要: 以一株基因重组酵母为研究对象,探讨了厌氧条件下 pH 值、底物浓度、接种量、乙酸质量分数和葡萄糖添加量等关键因子对木糖发酵的影响。结果表明,重组酵母 *Saccharomyces cerevisiae* ZU-10 有较强的发酵木糖产乙醇的能力,在 80 g/L(相对木糖)、初始 pH 值 5.5、接种量 1.2 g/L(细胞干质量,相对培养液)、30 °C 下发酵 72 h,发酵液中乙醇质量浓度达到 28.9 g/L。发酵液中的乙酸质量分数低于 0.05% 时对发酵木糖影响不大。添加适量的葡萄糖可促进木糖发酵,在 30 g/L 木糖培养液中添加 40 g/L 葡萄糖,36 h 内木糖利用率从 79.0% 增加到 85.7%。

关键词: 木糖;乙醇发酵;基因重组酵母

中图分类号:TQ92;Q932

文献标识码:A

文章编号:0253-2417(2007)03-0033-04

Ethanol Fermentation on Xylose by a Recombinant Yeast

WANG Zhou-fang, CHEN Ming, WANG Bing-bing, XIA Li-ming

(Department of Chemical Engineering and Bioengineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract: The key affecting factors of ethanol fermentation on xylose by a recombinant yeast of *Saccharomyces cerevisiae* ZU-10 were investigated. Fermentation was performed with 80 g/L xylose and inoculum of 1.2 g/L (cell dry weight) at initial pH value 5.5, 30 °C under anaerobic condition, and 28.9 g/L ethanol was obtained within 72 h. Acetic acid of mass fraction lower than 0.05% in culture medium caused minor influence on xylose fermentation. Addition of glucose to culture medium favored fermentation of xylose, and 85.7% xylose was utilized within 36 h at 40 g/L glucose in culture medium containing 30 g/L xylose.

Key words: xylose; fermentation; recombinant yeast

当前石油能源危机日益严重^[1],中国是石油消费大国,但石油资源却相对贫乏,为减少对石油进口的依赖,原国家计委于 2001 年宣布将全面推广使用乙醇汽油^[2]。乙醇是可再生的最有发展前景的液态燃料^[3],目前国内主要以玉米、小麦等粮食淀粉经微生物发酵生产。我国拥有丰富且廉价的植物纤维资源,尤其是农林废弃物,生物转化植物纤维原料生产乙醇,对中国经济和社会的可持续发展具有重大意义。木糖是植物中含量仅次于葡萄糖的一种水解单糖,占水解糖的 35%,因此将木糖转化成乙醇是植物纤维生产乙醇的关键^[4]。自然界中发酵木糖的酵母菌有 *Pichia stipitis*、*Candida shehatae* 和 *Pachysohlen tannophilus*,但它们对酒精的耐受能力较差,发酵液中乙醇浓度低,且要求“半好氧”的发酵条件,不适合乙醇的工业化生产^[5]。传统的乙醇工业生产菌酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)具有易培养、耐高糖、厌氧发酵、乙醇得率高、乙醇耐受性高和发酵能力强等优点,但由于缺乏木糖代谢途径的关键酶,因而不能利用木糖,但它可以发酵木酮糖生成乙醇^[6]。作者以一株基因重组酵母 *S. cerevisiae* ZU-10 为研究对象,对厌氧条件下发酵木糖产乙醇的关键因子进行了研究。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器

木糖,浙江华康药业有限公司;木糖和木糖醇标准样, Sigma 公司;乙醇标准样,分析纯; Syltech

收稿日期:2006-05-22

基金项目:国家自然科学基金资助项目(20476091);浙江大学学科交叉预研基金资助项目(无编号)

作者简介:王周芳(1982-),女,浙江绍兴人,硕士生,主要从事生物化工方面的研究

* 通讯作者:夏黎明,博士生导师,主要从事可再生资源利用方面的研究。

model 500 高效液相色谱仪; Transgenomic IC Sep ICE-Coregel 87H3 (300 mm × 7.8 mm) 有机酸柱; Spectra-Physics 6040 XR 示差折光监测器。

1.2 菌种

S. cerevisiae ZU-10, 为本实验室构建的基因重组酵母, 带有来自 *Pichia stipitis* 的木糖还原酶、木糖醇脱氢酶以及木酮糖激酶基因, 可在厌氧条件下发酵木糖产乙醇。该菌种保存在以木糖为单一碳源的斜面培养基上。

1.3 培养基

斜面培养基 (g/L): 木糖 20, 蛋白胨 10, 酵母膏 5, 琼脂 20, 自然 pH 值。种子培养基 (g/L): 木糖 10, 葡萄糖 10, 蛋白胨 10, 酵母膏 5, 自然 pH 值。发酵培养基 (g/L): 木糖 80, 蛋白胨 3, 酵母膏 2, CaCl₂ 0.25, MgCl₂ 0.25, KH₂PO₄ 2.5, pH 值 5.5。

1.4 种子液的制备

斜面接种后于 30 °C 培养 48 h。将斜面菌种接入装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 的三角瓶中, 于 30 °C, 180 r/min 下培养 36 h。种子液于 4 000 r/min 下离心 5 min, 收集到的细胞沉淀用于接种发酵培养基。

1.5 乙醇发酵

所有乙醇发酵试验均在装有 50 mL 发酵培养基的 100 mL 三角瓶中进行, 瓶口塞上橡皮塞(插有针头)以控制厌氧条件, 置 30 °C, 120 r/min 的恒温振荡器内振荡发酵。除特别指明, 发酵液接种后初始细胞质量浓度均为 1.2 g/L (以干质量计, 下同), 发酵时间为 72 h。

1.6 分析方法

发酵产物(乙醇、木糖醇)及发酵液中残糖均由高效液相色谱法(HPLC)测定。待测发酵液先经 10 000 r/min 离心 10 min, 上清液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后进样测定。色谱条件为: 柱温 60 °C, 纯净水作流动相, 流速设定为 0.5 mL/min。

2 结果与讨论

2.1 pH 值对木糖发酵的影响

以稀 NaOH 和 H₂SO₄ 溶液调节发酵培养基的初始 pH 值分别为 2.5、3.5、4.5、5.5 和 6.5, 发酵时间为 72 h。由表 1 可知, 当发酵培养基初始 pH 值 2.5 ~ 6.5 范围内变化时, *S. cerevisiae* ZU-10 发酵木糖乙醇得率的变化很大。初始 pH 值的适宜范围为 4.5 ~ 5.5, 最适 pH 值为 5.5, 此时木糖利用率为 90.5%, 发酵液中乙醇质量浓度达到 28.9 g/L, 乙醇得率为 36%, 为理论得率的 78.3% (酵母发酵木糖产乙醇的理论得率为 46%^[7])。

表 1 发酵培养基初始 pH 值对木糖发酵的影响

Table 1 Effects of initial pH value in medium on xylose fermentation by *S. cerevisiae* ZU-10

初始 pH 值 initial pH value	残留木糖质量浓度/(g·L ⁻¹) residual xylose mass concn.	木糖利用率/% xylose consumed	乙醇质量浓度/(g·L ⁻¹) ethanol mass concn.	乙醇得率/% ethanol yield	占理论值/% account for theoretical yield
2.5	45.3	43.4	13.4	17	37.0
3.5	12.0	85.0	24.9	31	67.4
4.5	8.8	89.0	26.4	33	71.7
5.5	7.6	90.5	28.9	36	78.3
6.5	11.4	85.8	24.6	31	67.4

2.2 初始木糖质量浓度对木糖发酵的影响

将发酵培养基初始木糖质量浓度分别配制为 50、80、120、150 g/L, 控制不同的发酵时间, 探讨初始木糖质量浓度对发酵的影响。从表 2 可以看出, 随着木糖质量浓度的增加, 木糖利用率和乙醇得率均逐渐降低, 当木糖质量浓度高于 80 g/L 时, 发酵液中残留木糖质量浓度过高, 木糖利用率和乙醇得率迅速下降。可见在 *S. cerevisiae* ZU-10 发酵木糖的过程中, 存在着底物浓度抑制现象。Schvester 等^[8]有关酵母的研究发现, 当木糖质量浓度从 50 g/L 升至 200 g/L 时, *P. tannophilus* 发酵木糖的乙醇产量从 0.32 g/L 降到 0.14 g/L, *C. shehatae* 发酵木糖的乙醇产量从 0.45 g/L 降到 0.13 g/L。

表2 初始木糖质量浓度对木糖发酵的影响

Table 2 Effects of initial xylose mass concentration on xylose fermentation by *S. cerevisiae* ZU-10

木糖质量浓度/ (g·L ⁻¹) xylose mass concn.	发酵时间/h time	残留木糖质量浓度/ (g·L ⁻¹) residual xylose mass concn.	木糖利用率/% xylose consumed	乙醇质量浓度/ (g·L ⁻¹) ethanol mass concn.	乙醇得率/% ethanol yield	占理论值/% account for theoretical yield
50	60	5.4	89.2	18.4	37	80.4
80	72	7.6	90.5	28.9	36	78.3
120	84	44.8	62.7	30.8	26	56.5
150	96	83.6	44.3	25.8	17	36.9

2.3 接种量对木糖发酵的影响

不同的接种量水平对 *S. cerevisiae* ZU-10 发酵木糖影响较大(表3)。当接种量(以细胞干质量计,下同)为 0.3 g/L 时,发酵 72 h 后残留木糖质量浓度仍高达 56.8 g/L,木糖利用率仅为 29.0%,乙醇质量浓度只达到 8.7 g/L。随着接种量的增加,木糖利用率和乙醇得率均迅速增大。当接种量增至 1.8 g/L 时,残留木糖为 3.3 g/L,95.9% 的木糖被利用,乙醇质量浓度达 30.1 g/L。可见高密度接种有利于提高木糖利用速率和乙醇生产速率,但游离细胞发酵不易做到对酵母细胞的重复利用,将细胞固定化后再进行发酵将是一个很好的解决办法。

表3 接种量对木糖发酵的影响

Table 3 Effects of inoculum level on xylose fermentation by *S. cerevisiae* ZU-10

接种量/(g·L ⁻¹) inoculum	残留木糖质量浓度/ (g·L ⁻¹) residual xylose mass concn.	木糖利用率/% xylose consumed	乙醇质量浓度/ (g·L ⁻¹) ethanol mass concn.	乙醇得率/% ethanol yield	占理论值/% account for theoretical yield
0.3	56.8	29.0	8.7	11	23.9
0.6	23.4	70.8	17.2	22	47.8
1.2	7.6	90.5	28.9	36	78.3
1.8	3.3	95.9	30.1	38	82.6

2.4 乙酸质量分数对木糖发酵的影响

乙酸是植物纤维原料半纤维素水解液中的主要抑制因子^[9],在半纤维素水解过程中由半纤维素脱乙酰基产生,因此研究基因重组酵母 *S. cerevisiae* ZU-10 对乙酸的耐受性很有必要。从表4可看出,当发酵液中的乙酸质量分数低于 0.05% 时,对 *S. cerevisiae* ZU-10 发酵木糖的影响不大;乙酸质量分数高于 0.05% 时对木糖发酵产生较大的影响,当乙酸质量分数增至 0.2% 时,*S. cerevisiae* ZU-10 对木糖的发酵基本停止。应用 *S. cerevisiae* ZU-10 发酵植物纤维水解液生产乙醇,必须解决菌株对乙酸等抑制因子的耐受性问题,可以从菌种驯化及发酵前对水解液进行脱毒处理(如汽提、石灰中和、活性炭吸附等)两个途径入手。

表4 乙酸质量分数对木糖发酵的影响

Table 4 Effects of acetic acid mass fraction on xylose fermentation by *S. cerevisiae* ZU-10

乙酸质量分数/% acetic acid mass fraction	残留木糖质量浓度/ (g·L ⁻¹) residual xylose mass concn.	木糖利用率/% xylose consumed	乙醇质量浓度/ (g·L ⁻¹) ethanol mass concn.	乙醇得率/% ethanol yield	占理论值/% account for theoretical yield
0	7.6	90.5	28.9	36	78.3
0.025	10.1	87.4	27.9	35	76.1
0.05	18.4	77.0	23.0	29	63.0
0.1	31.2	61.0	21.1	26	56.5
0.2	69.9	12.6	3.5	4	8.7

2.5 葡萄糖添加量对木糖发酵的影响

以上各因素的考察均以纯木糖为发酵底物,但植物纤维原料水解液中通常是葡萄糖与木糖同时存在,如碱预处理后的秸秆水解液和氨爆破处理后的甘蔗渣水解液。发酵培养基初始木糖质量浓度被设定为 30 g/L,添加不同量的葡萄糖,探讨葡萄糖添加量对 *S. cerevisiae* ZU-10 木糖发酵的影响,发酵时间为 36 h。表5中结果表明,添加一定量的葡萄糖有利于提高木糖利用率,当葡萄糖质量浓度为 40 g/L 时,36 h 内木糖利用率达 85.7%,高于以木糖为唯一碳源时 79.0% 的木糖利用率。葡萄糖和木糖的共

发酵可以更充分地发酵木糖,这一特性对应用 *S. cerevisiae* ZU-10 发酵植物纤维水解液生产乙醇具有重要意义。

表 5 葡萄糖添加量对木糖发酵的影响

Table 5 Effects of glucose addition on xylose fermentation by *S. cerevisiae* ZU-10

葡萄糖质量浓度/(g·L ⁻¹) glucose mass concn.	发酵时间/h time	残留木糖质量浓度/(g·L ⁻¹) residual xylose mass concn.	木糖利用率/% xylose consumed	乙醇质量浓度/(g·L ⁻¹) ethanol mass concn.
0	36	6.3	79.0	8.8
20	36	4.8	84.0	17.9
40	36	4.3	85.7	27.2
60	36	4.4	85.3	36.7

2.6 葡萄糖和木糖共发酵的时间进程

以 30 g/L 木糖和 50 g/L 葡萄糖为复合碳源,研究了 *S. cerevisiae* ZU-10 对葡萄糖和木糖的共发酵的时间进程(见图 1)。共发酵结果表明,*S. cerevisiae* ZU-10 快速代谢培养基中的葡萄糖,接种后 12 h 内 50 g/L 葡萄糖便被酵母细胞完全利用,发酵液中乙醇质量浓度迅速上升到 24.9 g/L,但木糖代谢速度较慢,在前 12 h 仅有 27.7% 被利用。*S. cerevisiae* ZU-10 代谢葡萄糖速度快于木糖,是因为木糖的代谢途径比葡萄糖要复杂得多。葡萄糖和木糖的共发酵过程中也检测到少量的木糖醇存在于发酵液中。

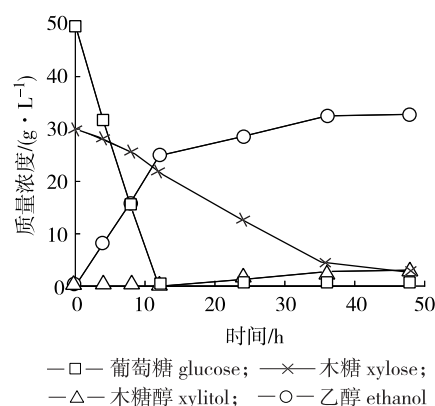


图 1 *S. cerevisiae* ZU-10 对葡萄糖和木糖的共发酵的时间进程

Fig. 1 Time course of cofermentation of glucose and xylose by *S. cerevisiae* ZU-10

3 结论

3.1 基因重组酵母 *S. cerevisiae* ZU-10 可以在厌氧条件下发酵木糖产乙醇,在 80 g/L 木糖、初始 pH 值 5.5、接种量(以细胞干质量计) 1.2 g/L 培养液中 30 °C 厌氧发酵 72 h,木糖利用率达 90.5%,发酵液中乙醇质量浓度达到 28.9 g/L。

3.2 当发酵液中的乙酸质量分数低于 0.05% 时,对 *S. cerevisiae* ZU-10 发酵木糖的影响不大;乙酸质量分数高于 0.05% 时对木糖发酵产生较大的影响,当乙酸质量分数增至 0.2% 时,*S. cerevisiae* ZU-10 对木糖的发酵基本停止。

3.3 添加适量的葡萄糖可促进木糖发酵,这一特性对应用 *S. cerevisiae* ZU-10 发酵植物纤维原料水解液生产乙醇具有重要意义。

参考文献:

- [1] SUN Y, CHENG J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review[J]. *Bioresource Technology*, 2002, 83: 1-11.
- [2] 季更生, 勇强, 余世袁. 不同培养条件对树干毕赤酵母戊糖发酵的影响[J]. *林产与化学工业*, 2004, 24(2): 25-28.
- [3] 张潇, 朱冬青, 王丹, 等. 粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)木糖发酵的研究[J]. *微生物学报*, 2003, 43(4): 466-472.
- [4] ZALDIVAR J, NIELSEN J, OLSSON L. Fuel ethanol production from lignocellulosic: a challenge for metabolic engineering and process integration[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 56: 17-34.
- [5] MONIRUZZAMAN M, DIEN B S, SKORY C D, et al. Fermentation of corn fibre sugars by an engineered xylose utilizing *Saccharomyces* yeast strain[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 1997, 13: 341-346.
- [6] YU S, JEPSSON H, HAHN-HAGERDAL B. Xylulose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and xylose-fermenting yeast strains[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1995, 44: 314-320.
- [7] HAHN-AGERDAL B, JEPSSON H, SKOOG K, et al. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts[J]. *Enzyme Microb Technol*, 1994, 16: 933-943.
- [8] SCHVESTER P, ROBINSON C W, MOO Y M. Xylose fermentation to ethanol by *Pachysolen tannophilus*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1983, 13: 131-152.
- [9] PALMQVIST E, HAHN-HAGERDAL B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysate. I. Inhibition and detoxification[J]. *Bioresource Technology*, 2000, 74: 17-24.