

不同培养条件对树干毕赤酵母戊糖发酵的影响^{*}



季更生, 勇 强, 余世袁^{*}

(南京林业大学 化学工程学院, 江苏 南京 210037)

J I G S

摘 要: 研究了不同培养条件下, 树干毕赤酵母(*Pichia stipitis*) P₂ 生长和发酵戊糖(主要是木糖)生成酒精的规律。单独采用尿素作氮源, 树干毕赤酵母 P₂ 生长和发酵木糖情况良好, 与以蛋白胨为单一氮源相接近。研究表明, 树干毕赤酵母 P₂ 生长最适温度是 25~ 30 ℃, 最佳 pH 值范围是 4.6~ 5.8。当温度分别为 25 和 35 ℃时, 树干毕赤酵母 P₂ 发酵木糖的最适 pH 值范围分别为 3.4~ 4.2 和 3.8~ 5.0。

关键词: 树干毕赤酵母; 木糖; 发酵; 酒精

中图分类号: TQ92; Q532.2 文献标识码: A 文章编号: 0253- 2417(2004) 02- 0025- 04

EFFECTS OF CULTURE CONDITIONS ON FERMENTATION OF PENTOSE BY *PICHIA STIPITIS*

Ji Geng-sheng, YONG Qiang, YU Shi yuan

(College of Chemical Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: Effects of culture condition, including nitrogen source, pH value and temperature on pentose (mainly xylose) fermentation by *Pichia stipitis* P₂ were investigated. Both growth and xylose fermentation were as good with urea as a sole nitrogen source as with peptone as a sole nitrogen source. The optimum pH value and temperature range of the growth of *Pichia stipitis* P₂ were 4.6~ 5.8 and 25~ 30 ℃, respectively. When cultural temperature was 25 ℃ and 35 ℃, the optimum pH value range of the xylose fermentation by P₂ was 3.4~ 4.2 and 3.8~ 5.0, respectively.

Key words: *Pichia stipitis*; xylose; fermentation; ethanol

在我国, 能源供应紧张的形势已持续多年, 能源“瓶颈”一直制约着经济发展^[1]。我国是一个石油消费大国, 但是石油资源却相对贫乏。自 1993 年开始, 我国就成了石油净进口国, 国家每年都要花费大量的外汇用于换取石油, 为了减少石油的进口, 国家计委于 2001 年 4 月, 宣布向全国推广使用车用汽油酒精。目前我国的酒精主要以玉米、小麦、薯干等粮食为原料经过发酵生产而成, 而我国是一个人口大国, 粮食过剩只是暂时的现象, 粮食作为原料生产酒精决非长远之计。车用汽油酒精的推广必将增加粮食的供需矛盾。但我国有十分丰富的植物纤维资源, 尤其是农林废弃物资源, 开展利用农林废弃物生产燃料酒精的研究不仅可以解决长期以来困扰我国农林废弃物的利用问题, 而且可以缓解我国的粮食和能源紧张。因此, 利用植物纤维发酵生产酒精的研究, 具有十分重要的现实和长远的意义。

* 收稿日期: 2003- 09- 25

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(1973-), 男, 浙江义乌人, 博士生, 从事林产物物化学加工研究。

* 通讯联系人。

可再生性植物资源主要是由纤维素、半纤维素和木质素 3 大部分组成。在许多农作物秸秆中,半纤维素(尤其是木聚糖)的含量与纤维素含量相当。阔叶材和农作物秸秆中半纤维素的主要单糖是木糖。此外,阔叶材亚硫酸盐制浆废液中,木糖也占了相当大的比例。木糖在自然界中的丰富程度仅次于葡萄糖。有效地利用木糖和其他半纤维素单糖是植物纤维原料发酵生成酒精的关键。自 20 世纪 80 年代以来,至少发现了 40 余种酵母能够发酵木糖,目前人们研究得最多、最深入且最具有工业应用价值的 3 种酵母是:管囊酵母(*Pachysolen tannophilus*)、树干毕赤酵母(*Pichia stipitis*)和休哈塔假丝酵母(*Candida shehatae*),后来又发现,树干毕赤酵母在耐酒精能力和戊糖发酵速度等方面有一定的优势^[2]。

作者主要对影响树干毕赤酵母 P_2 戊糖发酵和生长的主要因素作初步的研究。实验采用的树干毕赤酵母 P_2 是南京林业大学生物化工研究所通过对菌种树干毕赤酵母(*P. stipitis*)长期的定向驯化及诱变而得,其特点是戊糖发酵能力强,且抗抑制能力也强。

1 材料与方法

1.1 菌种

树干毕赤酵母 P_2 于 4 °C 下保藏在木糖-蛋白胨-酵母浸汁-琼脂斜面培养基上。该菌种来源于美国标准菌种库库藏菌种 *P. stipitis* CBS5776,能够发酵木糖等戊糖。

1.2 培养基

1) 斜面培养基:每升含木糖 20 g,琼脂 25 g,酵母浸膏 3 g,蛋白胨 5 g, pH 值 5.0; 2) 发酵培养基:每升含 CaCl_2 0.25 g, MgSO_4 0.25 g, KH_2PO_4 2.5 g, 尿素 0.24 g, pH 值 5.0; 3) 活化培养基:每升含木糖 20 g, 酵母浸膏 3 g, 蛋白胨 5 g, pH 值 5.0; 4) 增殖培养基:每升含木糖 30 g, 葡萄糖 30 g, 蛋白胨 3 g, 酵母浸膏 2.5 g, CaCl_2 0.25 g, MgSO_4 0.25 g, KH_2PO_4 2.5 g, pH 值 5.0。

1.3 培养方法

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

1.4 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,除了特别说明,发酵温度(35±1) °C,振荡器转速 150 r/min,发酵时间 24~48 h。

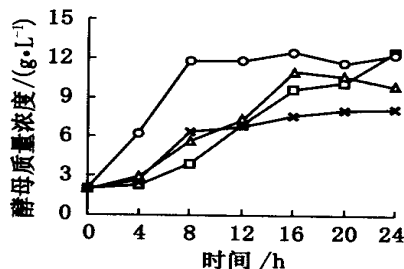
1.5 分析方法

还原糖浓度采用二硝基水杨酸(DNS)法测定^[2]。酒精浓度采用比重法测定^[3]。

2 结果与讨论

2.1 树干毕赤酵母生长规律的研究

2.1.1 不同氮源对树干毕赤酵母生长的影响 单独采用不同的氮源(蛋白胨、尿素、硫酸铵、硝酸钾),以木糖为酵母增殖碳源,培养 24 h,主要结果见图 1。树干毕赤酵母 P_2 利用不同氮源的方式和能力不同,当采用蛋白胨作为酵母生长的唯一氮源时,酵母很快进入对数生长期,几乎看不到适应性的迟滞期,而且仅用了 8 h 左右,酵母浓度就达到了最大,进入生长稳定期。其他 3 种氮源(尿素、硫酸铵、硝酸钾)都经过了约 4 h 左右的迟滞期,这是由于酵母利用 NH_4^+ 、 NO_3^- 等无机氮和尿素等简单有机氮之前,必须合成相应的转化酶或转运酶。经过 24 h,干酵母浓度分别达到了 12.44、9.88 和 8.18 g/L。硫酸铵和硝酸钾作为氮源增殖效果较差,而用尿素作唯一氮源增殖酵母时的酵母最终浓度(12.44 g/L)和用蛋白胨作唯一氮源时酵母最终浓度



—○— 蛋白胨 peptone; —□— 尿素 urea; —△— 硫酸铵 ammonium sulphate; —×— 硝酸钾 potassium nitrate

图 1 不同氮源条件下树干毕赤酵母 P_2 的生长曲线

Fig. 1 Growth curves of *P. stipitis* P_2 using different nitrogen sources

(12.28 g/L) 非常接近。

2.1.2 pH 值对树干毕赤酵母生长的影响 采用每升含 30 g 木糖和 30 g 葡萄糖的混合糖液作为树干毕赤酵母 P_2 增殖碳源, 再用 0.05 mol/L 不同初始 pH 值的柠檬酸-柠檬酸钠调控酵母培养液的 pH 值, 增殖时间为 36 h, 主要实验结果见图 2。从图 2 可以看出, 树干毕赤酵母 P_2 在 pH 值 3.0~4.0 这一较低 pH 值范围仍能正常生长, 显微镜下观察发现酵母生长情况与 pH 值 4.0 以上并无明显差异。在不同 pH 值(3.0~5.8)条件下, 酵母最终生长浓度与酵母得率(每消耗 1 g 糖的酵母产量)变化趋势相似, 酵母浓度大时酵母得率也高, 这是因为各种条件下被消耗的还原糖浓度相差不大。所以, 从酵母最终浓度和酵母得率角度考虑, 树干毕赤酵母 P_2 生长最适 pH 值范围为 4.6~5.8。

2.1.3 温度对树干毕赤酵母生长的影响 温度是影响酵母增殖的一个重要因素。本实验采用每升含 30 g 木糖和 30 g 葡萄糖的混合糖液作为树干毕赤酵母 P_2 的生长增殖的碳源, 用 0.5 g/L 尿素作为酵母增殖的氮源。1.0 g/L 酵母接种在 250 mL 装液量为 50 mL 带棉花塞的三角瓶中。控制摇床不同温度(25、30、35 和 40 °C), 转速 150 r/min。增殖培养时间为 24 h, 不同温度的酵母生长曲线见图 3。从图 3 中可以看出, 不同温度条件下, 树干毕赤酵母 P_2 的生长曲线是不同的, 经过 24 h 的连续增殖, 树干毕赤酵母 P_2 最后浓度也是不同的。在 4~8 h, 培养温度 35 °C 时, 酵母增殖较快, 在显微镜下观察酵母形态, 可以发现此时酵母细胞较小, 但出芽率较大, 部分酵母有 2~4 个芽细胞。在对数生长期 4 种温度(25、30、35 和 40 °C) 下的酵母生长速度分别为 0.496、0.896、0.804 和 0.698 g/(1h)。其中当温度为 30 °C 时树干毕赤酵母 P_2 的生长速度最快, 分别是 25、35 和 40 °C 时的 1.8、1.1 和 1.3 倍。所以, 从对数生长期酵母的生长速度考虑, 树干毕赤酵母 P_2 的最适生长温度范围为 30~35 °C。

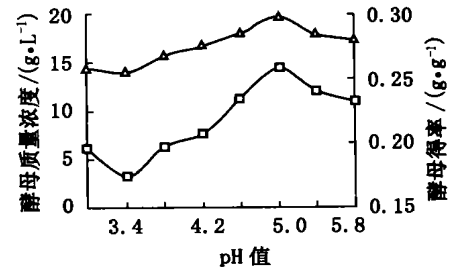
2.2 树干毕赤酵母发酵木糖规律

2.2.1 不同氮源对树干毕赤酵母木糖发酵的影响 实验以每升含 40.0 g 木糖为酵母发酵底物, 初始 pH 值调至 5.0 左右, 摇床转速 150 r/min, 温度(35 ± 1) °C。各种氮源的计量以各自的含氮量折算, 初始氮浓度控制为 0.5 g/L, 发酵周期为 36 h, 结果如表 1。采用不同氮源, 树干毕赤酵母 P_2 发酵木糖结果有明显的差异。从酒精浓度来看, 发酵效果最佳是采用蛋白胨作氮源, 酒精浓度为 17.29 g/L, 其他依次是尿素、硫酸铵和硝酸钾, 酒精浓度分别为 15.07、13.76 和 13.46 g/L。但从木糖利用率来看, 较大的两种氮源是蛋白胨和硫酸铵, 木糖利用率都超过了 90%, 分别为 96.57% 和 95.84%, 而采用尿素和硝酸钾则较低, 木糖利用率分别只有 86.40% 和 86.22%。

表 1 不同氮源条件下树干毕赤酵母 P_2 发酵木糖的实验结果

Table 1 Results of xylose fermentation with different nitrogen sources by *P. stipitis* P_2

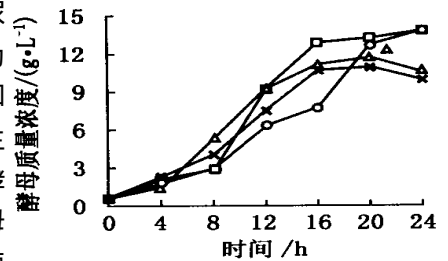
氮源 nitrogen sources	残糖浓度/(g·L ⁻¹) residual xylose concn.	酒精浓度/(g·L ⁻¹) ethanol concn.	木糖利用率/% xylose consumed	酒精得率与理论值之比/% ethanol yield/theoretical yield
蛋白胨 peptone	1.372	17.29	96.57	97.30
尿素 urea	5.440	15.07	86.40	94.79
硫酸铵 ammonium sulphate	1.664	13.76	95.84	78.03
硝酸钾 potassium nitrate	5.512	13.46	86.22	84.84



—△— 酵母浓度 yeast concn.;
—□— 酵母得率 yeast yield

图 2 pH 值对树干毕赤酵母 P_2 生长的影响

Fig. 2 Effects of pH value on the growth of *P. stipitis* P_2



—○— 25 °C; —□— 30 °C;
—△— 35 °C; —×— 40 °C

图 3 不同温度下树干毕赤酵母 P_2 的生长曲线

Fig. 3 Growth curves of *P. stipitis* P_2 at different temperature

2.2.2 温度和 pH 值对树干毕赤酵母木糖发酵的影响 采用 40 g/L 木糖作为树干毕赤酵母 P_2 的发酵底物, 发酵时间为 36 h, 实验的主要结果如表 2 所示。从表 2 中可以看出, 在 pH 值 3.0~ 5.8 条件下, 树干毕赤酵母 P_2 在 35 °C 发酵时, 木糖利用率和酒精浓度都比在 25 °C 时高。发酵温度为 35 °C 时, 40 g/L 木糖经过 36 h 的发酵, 最后发酵液中的残糖几乎都小于 10%, 不同 pH 值条件下的木糖利用率比较接近, 但酒精浓度则有明显的差异。当 pH 值为 3.8~ 5.0 时, 酒精浓度相对较高; 当 pH 值小于 3.8 时, 酒精浓度和木糖利用率都有所下降; 当 pH 值大于 5.0 时, 酒精浓度和酒精得率与理论值之比同样有所下降。所以温度为 35 °C 时, 树干毕赤酵母 P_2 发酵纯木糖的最适 pH 值范围为 3.8~ 5.0。当发酵温度降至 25 °C, 同样经过 36 h 的发酵, pH 值 3.0~ 5.8 下, 树干毕赤酵母 P_2 对木糖的消耗速度明显下降, 发酵液中最后的酒精浓度也随之下降。从表 2 还看出, 不同温度下, 树干毕赤酵母 P_2 最适的发酵 pH 值范围是不一样的。当发酵温度为 35 °C 时, pH 值 3.8~ 5.0 的范围内发酵液中的酒精浓度最高; 而当发酵温度为 25 °C 时, 酒精浓度和木糖利用率较高的 pH 值范围为 3.4~ 4.2。

表 2 温度和 pH 值对树干毕赤酵母木糖发酵的影响

Table 2 Effects of temperature and pH value on xylose fermentation by *P. stipitis* P_2

温度/ °C temp.	pH 值 pH value	残糖浓度/($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) residual xylose concn.	木糖利用率/% xylose consumed	酒精浓度/($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) ethanol concn.	酒精得率与理论值之比/% ethanol yield/theoretical yield
25	3.0	10.08	74.80	8.33	60.52
25	3.4	6.12	84.70	14.67	94.13
25	3.8	4.75	88.13	15.57	96.02
25	4.2	6.85	82.88	13.96	91.55
25	4.6	10.09	74.78	12.45	90.49
25	5.0	10.81	72.98	11.24	83.71
25	5.4	12.96	67.60	9.33	75.01
25	5.8	19.06	52.35	6.72	69.76
35	3.0	3.326	91.69	13.06	77.42
35	3.4	1.002	97.50	14.97	83.45
35	3.8	0.822	97.95	17.49	97.05
35	4.2	0.451	98.87	17.19	94.49
35	4.6	0.541	98.65	17.67	97.35
35	5.0	1.317	96.71	16.48	92.61
35	5.4	3.432	91.42	10.79	64.14
35	5.8	4.686	88.29	8.43	51.89

3 结论

树干毕赤酵母 *P. stipitis* P_2 是一种能较快发酵木糖等戊糖的酵母菌, 酵母的发酵速度与其生长速度有密切关系, 而酵母的生长速度与培养基的 pH 值、温度、氮源等有关。

3.1 单独采用尿素作氮源, 树干毕赤酵母 P_2 生长和发酵木糖情况良好, 与以蛋白胨为单一氮源相接近。研究还表明, 树干毕赤酵母 P_2 生长最适温度是 25~ 30 °C, 最佳 pH 值范围是 4.6~ 5.8。

3.2 不同温度条件下, 木糖酵母发酵的最适 pH 值范围是不同的。当温度分别为 25 和 35 °C 时, 树干毕赤酵母 P_2 发酵木糖的最适 pH 值范围分别为 3.4~ 4.2 和 3.8~ 5.0。

参考文献:

- [1] 陈静生, 蔡运龙, 王学军. 人类-环境系统及其可持续性[M]. 北京: 商务印书馆, 2001.
- [2] SLININGER P J, BOTHAS R J. Optimum pH and temperature conditions for xylose fermentation by *Pichia stipitis*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1990, 35(7): 727-731.
- [3] MILLER G L. Use of dirosalicyclic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. Analytical Chemistry, 1959, 31(3): 426-428.
- [4] 李兴华, 陈大舟. 酒精密度浓度和温度常用数据表[M]. 北京: 中国计量出版社, 1997.