

doi:10.3969/j.issn.0253-2417.2013.04.007

树干毕赤酵母对玉米秸秆蒸汽爆破水解液 及其蒸馏釜底液中木糖的发酵



ZHAO Chen

赵晨, 方浩, 孔端男, 朱均均, 余世袁*

(南京林业大学 林木遗传与生物技术省部共建教育部重点实验室, 江苏 南京 210037)

摘要: 为了能够高效地利用木质纤维素水解液中的糖,采取了一种新的工艺路线:玉米秸秆水解液中的葡萄糖先被酿酒酵母转化为乙醇,并通过蒸馏将发酵液中的乙醇去除,然后再用驯化过的树干毕赤酵母将蒸馏釜底液中的木糖转化为乙醇。结果表明,蒸馏后的水解液中84.4 g/L木糖经过48 h发酵的乙醇得率和木糖利用率分别为80.4%和89.7%;高浓度抑制物的蒸馏釜底液中木糖的利用可以通过提高初始pH值的方法加以改善。初始pH值为5.5,蒸馏釜底液中乙酸为3.2 g/L时木糖利用率和乙醇得率分别为91.0%和76.3%(以木糖计)。由此充分表明,通过这种工艺路线酿酒酵母发酵液中的木糖可以被有效利用,从而较为经济地解决了木质纤维素制备燃料乙醇过程中木糖的利用问题。

关键词: 树干毕赤酵母;木质纤维素水解液;乙醇;发酵抑制物;乙酸

中图分类号:TQ351;TQ92

文献标识码:A

文章编号:0253-2417(2013)04-0037-06

Fermentation of Steam-exploded Corn Stover Hydrolysate and Its Distillation Residue by *Pichia stipitis*

ZHAO Chen, FANG Hao, KONG Duan-nan, ZHU Jun-jun, YU Shi-yuan

(Key Laboratory of Forest Genetics & Biotechnology, Ministry of Education,
Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: In order to utilize sugars in lignocellulosic hydrolysate efficiently, a novel technology was applied in present study. The glucose in the corn stover hydrolysate was converted to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* and the ethanol in the fermentation broth was removed by distillation. Then the xylose in the distillation residue was fermented to produce ethanol by an adapted *Pichia stipitis*. The results showed that the ethanol yield and xylose consumption ratio of 84.4 g/L xylose fermentation in the distilled hydrolysate were 80.4% and 89.7%, respectively, after 48 h fermentation. The utilization of xylose in distillation residue with higher inhibitor concentration could be improved by higher initial pH. The ethanol yield and xylose consumption ratio were 80.2% (76.3%) and 94.8% (91.0%), respectively, when the initial pH was 5.5 and the acetic acid in the distillation residue was 3.2 g/L. This fully indicated that xylose in *S. cerevisiae* culture broth can be effectively utilized by adapted *P. stipitis* by using this novel technological route. This novel method solved the problem of xylose utilization efficaciously in the process of ethanol production from lignocellulosic materials.

Key words: *Pichia stipitis*; lignocellulosic hydrolysate; ethanol; fermentation inhibitors; acetic acid

用可再生的木质纤维素液态燃料替代传统化石燃料是十分引人注目的,其中乙醇是最重要的候选者之一。通常,木质纤维素水解液中主要含有葡萄糖和木糖,因此有效地利用原料中的这两种糖是经济生产乙醇所必需的。然而,很少有微生物能够同时有效地利用这些糖^[1]。对于能高效利用木糖的酵母

收稿日期:2012-07-06

基金项目:国家林业局林业公益性行业科研专项(201004001);国家自然科学基金资助项目(31100432);江苏省自然科学基金资助项目(BK2011819)

作者简介:赵晨(1985-),女,陕西西安人,硕士,主要从事生物质资源生物转化的研究

*通讯作者:余世袁(1949-),男,教授,博士生导师,研究领域为林产资源生物化学加工利用; E-mail: shiyuanyu.nfu@gmail.com.

菌种研究已经经历了十几年,这些研究主要集中在细菌和真菌利用木糖基因的表达,和在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中引入磷酸戊糖途径来提高木糖的利用。虽然经过基因重组后的*S. cerevisiae*能够利用木糖,但是木糖的利用,乙醇的得率和产率都十分有限。这种限制归因于低的木糖吸收能力、辅因子的不平衡、戊糖磷酸途径的不完整和乙醇代谢途径中酶的失控^[2]。自然界中树干毕赤酵母(*Pichia stipitis*),依哈塔假丝酵母(*Candida shehatae*)和管囊酵母(*Pachysolen tannophilus*)能够利用葡萄糖和木糖,其中*P. stipitis*被认为是工业生产中最有前途的菌种之一,因为其乙醇得率较高,且其他副产物如木糖醇较少,但是*P. stipitis*利用葡萄糖产乙醇的效率较*S. cerevisiae*低,不能够用于大规模工业生产^[3]。本实验结合两种菌种的优点,对经过*S. cerevisiae*发酵后的水解液进行蒸馏,回收蒸馏釜底液中的木糖,并由可耐受一定抑制物的*P. stipitis*发酵生成乙醇,实现水解液中的葡萄糖和木糖的充分利用。整个发酵过程不经过任何物理、化学脱毒处理,从而进一步降低整个乙醇发酵工艺的复杂性和生产成本,使燃料乙醇的大规模生产更加可行。

1 实验

1.1 材料

1.1.1 微生物 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*),由南京林业大学生物化工研究所保藏。树干毕赤酵母(*Pichia stipitis*)P1-28,在玉米秸秆蒸汽爆破水解液中长期驯化^[4],并保藏于南京林业大学生物化工研究所。

1.1.2 水解液 蒸汽爆破玉米秸秆,产自内蒙古呼和浩特市,风干储存。预处理方式,蒸汽爆破,维持压力1.6 MPa,维压时间7 min。蒸汽爆破渣用蒸馏水按照固液比1:10(g:mL)洗涤,收集洗涤后液体用Ca(OH)₂调节pH值至6.0,离心去除沉淀,上清液保存于4℃冰箱中待用。水解液主要成分(g/L):葡萄糖0.60,木糖1.27,甲酸2.39,乙酸2.50,乙酰丙酸0.24,糠醛0.12,羟甲基糠醛(HMF)0.20。实验中根据需要另添加木糖或葡萄糖。

1.1.3 培养基

1.1.3.1 葡萄糖发酵 菌种保藏斜面培养基(g/L):葡萄糖20,蛋白胨5,酵母汁,琼脂20。活化、增殖培养基(g/L):葡萄糖20,蛋白胨5,酵母汁3。发酵培养基(g/L):葡萄糖150,尿素0.24,氯化锌0.08,硫酸镁0.08,氯化钙0.2并添加体积分数为80%水解液配制。

1.1.3.2 木糖发酵 活化、增殖培养基(g/L):木糖30,蛋白胨5,酵母汁3,并添加体积分数为80%的水解液。发酵培养基(g/L):蛋白胨0.5,酵母汁0.3,硫酸镁2,磷酸二氢钾4,七水硫酸镁1,添加一定浓度的蒸馏釜底液并调整木糖浓度到一定值。

1.2 方法

1.2.1 葡萄糖发酵 *S. cerevisiae*在150 r/min 30℃的恒温振荡器中活化并增殖至光密度(OD)为10左右,在相同转速和温度下进行厌氧发酵。活化和发酵均在250 mL的三角瓶中进行,培养基体积为100 mL。厌氧发酵时用插针头的橡皮塞封住三角瓶口。

1.2.2 含木糖水解液的制备 经*S. cerevisiae*厌氧发酵后的发酵液用减压旋转蒸发仪在16 000~18 000 Pa,(70±1)℃条件下进行蒸馏,将乙醇除去,用Ca(OH)₂调节pH值,4℃冷藏备用。

1.2.3 木糖发酵 *P. stipitis* P1-28在170 r/min 30℃的恒温振荡器中活化并增殖至OD为7~8,在150 r/min 30℃条件下进行发酵。活化和发酵均在250 mL的三角瓶中进行,培养基体积为50 mL。

1.3 分析方法

1.3.1 菌体浓度测定 取1 mL样品,离心后用生理盐水洗涤2次,稀释后用分光光度计于波长600 nm处测定吸光值OD_{600 nm},通过OD_{600 nm}的变化来监测菌体生长情况。

1.3.2 菌体干质量测定 菌体经105℃烘干质量恒定后称质量。

1.3.3 糖、乙醇及抑制物含量测定 用HPLC测定。色谱仪,Agilent-1100型高效液相色谱仪;色谱柱,

Bio-Rad Aminex HPX-87H (300 mm × 7.8 mm); 柱温, 55 °C; 流动相 5 mmol/L 的硫酸; 流速 0.6 mL/min; 检测器, 示差折光检测器 (RI); 进样量 10 μL。乙醇得率(y_a)、糖利用率(p)和乙醇生成速率(v)的计算可见公式(1)~(3):

$$y_a = w_a / (0.51m_g + 0.46m_x)$$

$$p = \frac{m_g + m_x}{m_{g0} + m_{x0}} \times 100 \%$$

$$v = w_a / t$$

式中: y_a —乙醇得率, %; p —糖利用率, %; v —乙醇生产速率, g/(L·t); w_a —生成乙醇质量浓度, g/L; m_g —消耗的葡萄糖质量浓度, g/L; m_x —消耗的木糖质量浓度, g/L; m_{g0} —初始葡萄糖质量浓度, g/L; m_{x0} —初始木糖质量浓度, g/L; t —发酵时间, h; 0.51, 0.46—分别为葡萄糖和木糖转化为乙醇的理论转化系数。

1.3.4 碳平衡计算 *P. stipitis* 的分子式假设 $CH_{1.83}O_{0.56}N_{0.17}$, 相对分子质量约为 25.14, 因此 1.0 g 的菌体(干质量)含有约 40 mol 碳元素; CO_2 的含量是通过碳的代谢去向和产物而估算的, 即生成 1 mmol 乙醇产生 1 mmol CO_2 , 1.0 g 干酵母呼吸产生 4.24 mmol CO_2 ^[5]。并假设 1 mmol 甲酸代谢产生 1 mmol CO_2 , 1 mmol 乙酸代谢产生 2 mmol CO_2 。碳回收率(Y)的计算公式:

$$Y = \frac{c_w}{c} \times 100 \%$$

式中: Y —碳回收率, %; c_w —生成的碳元素, mmol; c —消耗的碳元素, mmol。

2 结果与讨论

2.1 含木糖水溶液的制备

2.1.1 水解液中葡萄糖的发酵 含葡萄糖 140 g/L 的水解液经过 20 h 发酵生成乙醇 63 g/L, 酵母初始接入 OD 为 13。5 轮发酵的糖利用率、乙醇得率和 OD 如图 1。由图中可以看出 5 轮发酵的葡萄糖利用率均接近 100%, 乙醇得率在 *S. cerevisiae* 经过一轮发酵后也达到 90% 以上, 其平均值为 90.4%。整个发酵过程中发酵液中的木糖未被利用, 主要抑制物甲酸和乙酸也未被明显的转化。发酵结束后离心去除酵母并收集发酵液 4 °C 冷藏备用。

2.1.2 含木糖发酵液的蒸馏 *S. cerevisiae* 发酵结束后的发酵液中含有高浓度的乙醇, 若直接进行木糖发酵, 不仅由于乙醇压力过大, 发酵无法进行, 而且由于木糖发酵需要微氧条件, 高浓度的乙醇也会在这个过程中受到损失, 因此需要在木糖发酵前蒸馏出发酵液中的乙醇。将 2.1.1 节收集的发酵液进行减压蒸馏, 随着蒸馏的进行, 乙醇逐渐气化馏出。收集除去乙醇的发酵液备用。由于抑制物沸点高(常压下乙酸沸点 118 °C, 甲酸 101 °C, 木质素降解产物就更高了), 很难挥发, 浓度反而增高, 给发酵增加困难。

2.2 含木糖蒸馏釜底液的发酵

2.2.1 发酵参数和碳元素平衡 将 2.1.2 节中浓缩至体积为原来的 1/2 的蒸馏釜底液按照培养基中乙酸为 2.0 g/L 进行稀释, 此抑制物浓度是 *P. stipitis* P1-28 能够适应的浓度, 并调整发酵初始木糖质量

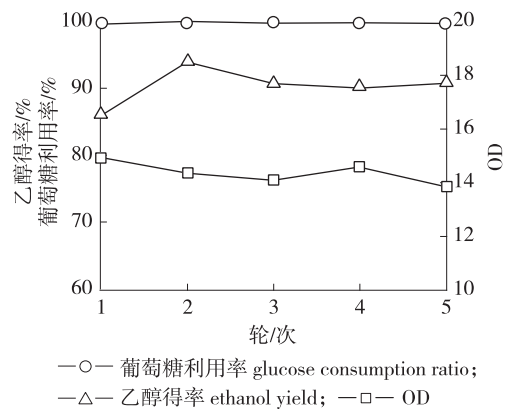


图 1 回收酿酒酵母在含 140 g/L 葡萄糖的水解液中发酵 5 轮的结果

Fig. 1 Fermentation of the hydrolysate with 140 g/L glucose by recycled *S. cerevisiae* for five times

浓度为 84 g/L。利用 *P. stipitis* P1-28 经过 48 h 发酵生成乙醇 28.0 g/L,乙醇得率和木糖利用率分别为 80.4 %、89.7 %。在乙醇质量浓度达到最大后的 3~6 h,生成的乙醇迅速减少,因此后期要及时结束发酵,否则乙醇会迅速降低。其发酵参数和碳平衡结果见表 1。由表 1 碳元素的平衡可知,在木糖发酵的前 24 h 消耗的碳元素与生成的碳元素相差不大,碳元素的回收率接近 100 %。24 h 之后到发酵末期碳元素回收率略有降低,但 48 h 的碳元素回收率为 84.7 %,仍保持在较高水平,并且在回收的碳元素中有 51.6 % 的碳元素流向乙醇,说明蒸馏釜底液中的 84 g/L 木糖能够被很好地转化为乙醇。

本实验中 138.0 g/L 葡萄糖经过 20 h 发酵产生 63.2 g/L 乙醇,84.4 g/L 木糖发酵经过 48 h 发酵产生 28.0 g/L 乙醇,乙醇基于底物的转化得率为 0.41 g/g,乙醇生成速率为 1.34 g/(L·h),此结果明显高于 Rudolf 等^[6]报道的利用 *S. cerevisiae* TMB3400 或 *P. stipitis* CBS6054 单独发酵的结果,其乙醇基于底物的转化得率分别为 0.30 g/g 和 0.27 g/g。

表 1 *P. stipitis* P1-28 在含 84 g/L 木糖的蒸馏釜底液中发酵时的发酵液参数和碳元素平衡

Table 1 Fermentation of the distillation residue with 84 g/L xylose using *P. stipitis* P1-28 and its carbon balance

发酵时间/h fermentation time	发酵参数 fermentation parameters			碳元素的平衡 carbon balance		
	木糖/(g·L ⁻¹) xylose	乙醇/(g·L ⁻¹) ethanol	OD	消耗的碳元素/ (mmol·L ⁻¹) consumed carbon	生成的碳元素/ (mmol·L ⁻¹) produced carbon	碳元素回收率/% carbon recovery
0	84.4		8.2			
12	73.3	5.7	10.3	486.4	521.7	107.3
24	53.3	13.4	11.7	1162.8	1139.6	98.0
36	26.8	22.6	13.2	2058.0	1828.9	88.9
48	8.7	28.0	14.4	2660.6	2254.8	84.7

2.2.2 抑制物质量浓度和 pH 值的影响 由于在蒸馏釜底液的木糖发酵中可能会遇到更高质量浓度的抑制物,因此尝试提高抑制物质量浓度用驯化的菌株 *P. stipitis* P1-28 进行木糖发酵。实验中将浓缩液稀释到一定倍数,使得最终培养基中的抑制物质量浓度逐步提高,并调节初始木糖质量浓度为 45 g/L,初始 pH 值为 5.5。图 2 为初始乙酸质量浓度为 2.2、2.7 和 3.2 g/L 蒸馏釜底液的发酵历程,其达到最大乙醇浓度所需要的时间分别为 36、39 和 42 h,最大乙醇质量浓度分别为 15.4、15.2 和 14.6 g/L,乙醇的生成和木糖的代谢随抑制物浓度的提高出现明显滞后。3 种发酵在 36、39 和 42 h 的糖利用率分别为 96.7 %、93.9 % 和 91.0 %,乙醇得率分别为 74.6 %、77.2 % 和 76.3 %,继续发酵 3 h 糖利用率提高不明显,但最大乙醇含量会迅速降低。因此,36、39 和 42 h 是乙酸质量浓度为 2.2、2.7 和 3.2 g/L 蒸馏釜底液的发酵的最佳发酵结束时间。将其发酵参数与发酵初始 pH 值为 5.2 时的值进行比较。结果显示发酵初始 pH 值由 5.2 提高至 5.5 后,乙醇得率由 61.2% 提高至 74.6 %,乙醇生成速率由 0.22 g/(L·h) 提高至 0.43 g/(L·h)。其中乙醇生成速率较发酵初始 pH 值为 5.2 的提高 2 倍左右。进一步提高抑制物浓度仅略微影响乙醇生成速率,其值由 0.43 g/(L·h) 降至 0.35 g/(L·h) 而并没有对乙醇得率造成很大的影响其值分别为 74.6 %、77.2 % 和 76.3 %。这是由于当水解液的 pH 值较低时,有机酸更多的表现为未解离的形式,通过质膜进入细胞内部后当环境 pH 值变为 7.4,有机酸则变为游离状态,积累在细胞质内,放出质子。由此造成细胞内部 pH 值降低,影响细胞活性^[7]。因此利用 *P. stipitis* P1-28 发酵蒸馏釜底液,当其中的抑制物浓度过高时可以通过适当提高发酵初始 pH 值的方法来解决。

为了进一步讨论发酵过程中抑制物浓度和 pH 值的变化情况,对其整个过程进行研究。图 3 是发酵液中乙酸质量浓度为 3.2 g/L 的发酵情况,在发酵前 24 h,由于有机酸的快速被菌体代谢,CO₂ 的溶解和铵盐的利用对 pH 值产生的影响小于有机酸的消耗对 pH 值产生的影响,因此表现为 pH 值上升;发酵后 24 h 由于有机酸特别是乙酸的消耗减慢,使 pH 值上升的因素的影响减弱,而 CO₂ 仍在大量排出,所以表现为 pH 值下降。3 种乙酸浓度分别为 2.2、2.7 和 3.2 g/L 的蒸馏釜底液发酵过程的 pH 值变化如图 4。pH 值变化的总趋势是发酵前 24 h pH 值逐步上升,后 24 h pH 值迅速下降。随着培养基中抑制

物浓度的提高,pH 值上升的越明显,当培养基中乙酸质量浓度为 3.2 g/L 时,其最大值为 6.3;培养基中乙酸质量浓度为 2.2 g/L 的发酵 pH 值上升的幅度最小,其最大值为 5.7。其最大 pH 值的差别可能是因为发酵初始有机酸含量的不同,酸含量越多,加入的 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 越多。因为在发酵过程中有机酸会被菌体代谢,因此培养基中含 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 越多其 pH 值也最大。发酵过程中 pH 值下降是因为代谢产物 CO_2 排出后溶于培养基产生 H_2CO_3 并由此产生 H^+ ,铵盐的利用也会使 pH 值下降^[8]。由此可见,整个发酵过程的 pH 值与水解液中的抑制物,主要是酸的浓度密切相关。因此,控制好 pH 值对蒸馏釜底液中的木糖进一步转化为乙醇十分重要。

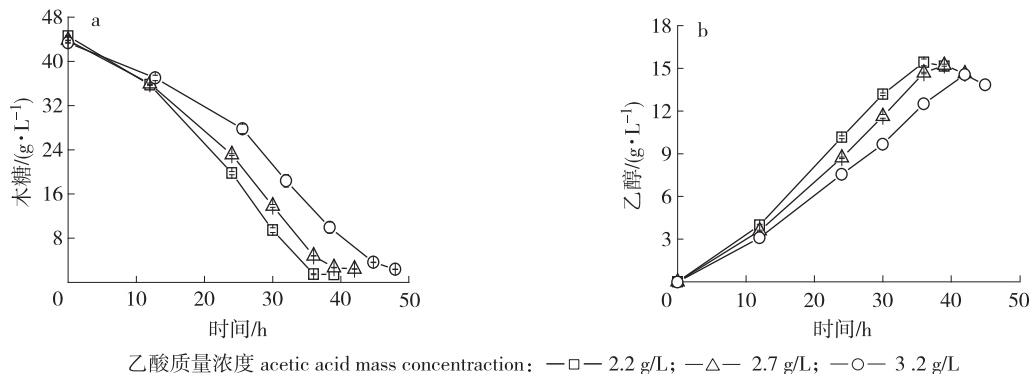


图2 发酵时木糖(a)和乙醇(b)的浓度变化

Fig.2 Concentration variation of xylose (a) and ethanol (b)

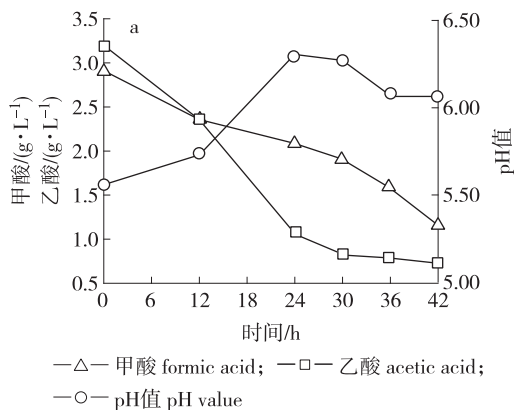


图3 蒸馏釜底液发酵时甲酸,乙酸和 pH 值的变化
Fig.3 Changes of formic acid, acetic acid and pH in fermentation of 45 g/L xylose distillation residue with 3.2 g/L acetic acid by *P. stipitis* P1-28

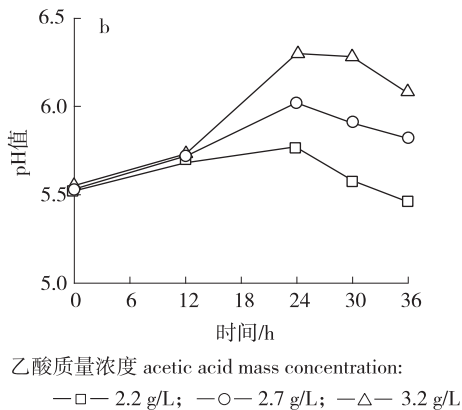


图4 *P. stipitis* P1-28 在含不同抑制物浓度的 45 g/L 木糖的蒸馏釜底液中发酵时 pH 值的变化
Fig.4 Changes of pH in fermentation of 45 g/L xylose distillation residue with different inhibitor concentration by *P. stipitis* P1-28

利用蒸馏回收后的水解液中木糖对用玉米秸秆等木质纤维素原料制备燃料乙醇有着重要的意义,选择合适的预处理方法,优化纤维素酶组分和酶解条件,提高木糖得率,使得水解液中含有更多可供发酵的木糖,进而提高乙醇产量,从而在现有菌种条件下解决木质纤维素中木糖的利用问题,使木质纤维素制备燃料乙醇更加可行。

3 结论

3.1 木质纤维素中的木糖可以利用 *P. stipitis* P1-28,经新的工艺路线发酵生成乙醇。新工艺路线为:将木质纤维素水解液中的葡萄糖先由酿酒酵母发酵生成乙醇,然后蒸馏出发酵液中的乙醇,最后将蒸馏釜底液中的木糖由驯化过的树干毕赤酵母进一步发酵生成乙醇。

3.2 当蒸馏釜底液中主要抑制物乙酸质量浓度为 2.0 g/L 时,84.4 g/L 木糖经过 48 h 发酵乙醇生成量达到最大,其值为 28.0 g/L,乙醇得率为 80.4%。由此表明利用新工艺路线发酵木质纤维素中木糖是十分可行的。

3.3 通过适当提高发酵初始 pH 值,*P. stipitis* P1-28 能够发酵含有更高抑制物浓度蒸馏釜液中的木糖。本实验中当 pH 值为 5.5,蒸馏釜底液中乙酸为 3.2 g/L 时,木糖利用率为 91.0%,乙醇得率为 76.3%。

参考文献:

- [1] LI Yuan, PARK J, SHIROMA R, et al. Bioethanol production from rice straw by a sequential use of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis* with heat inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* cells prior to xylose fermentation [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2011, 111 (6): 682-686.
- [2] LIU En-kai, HU Yun. Construction of a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain by combined approaches of genetic engineering, chemical mutagenesis and evolutionary adaptation [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2010, 48 (2): 204-210.
- [3] AGBOGBO F K, COWARD-KELLY G. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis* [J]. *Biotechnology Letters*, 2008, 30 (9): 1515-1524.
- [4] 赵晨, 方浩, 孔端男, 等. 树干毕赤酵母在水解液中的驯化及木糖发酵 [J]. *林产化学与工业*, 2011, 31 (6): 78-82.
- [5] YU S, JEPSSON H, HAHN-HÄGERDAL B. Xylulose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and xylose-fermenting yeast strains [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1995, 44 (3/4): 314-320.
- [6] RUDOLF A, BAUDEL H, ZACCHI G, et al. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated bagasse using *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400 and *Pichia stipitis* CBS6054 [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2008, 99 (4): 783-789.
- [7] PALMQVIST E, HAHN-HÄGERDAL B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition [J]. *Biore-source Technology*, 2000, 74 (1): 25-33.
- [8] AGBOGBO F K, WENGER K S. Production of ethanol from corn stover hemicellulose hydrolyzate using *Pichia stipitis* [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2007, 34 (11): 723-727.

学会园地

中国林学会关于召开第三届中国林业学术大会的通知

中国林学会定于 2013 年 9 月 12~13 日在福建省福州市召开第三届中国林业学术大会。林产化学化工分会经中国林学会批准承办“林产化学与工程技术发展”分会场(代号 S4),请林化行业企业、院校和科研院所等单位的科技人员积极参会。大会有关信息将随时在中国林学会网页(<http://www.csf.org.cn>)相关栏目发布,请及时上网查询。

凡报名参加本届大会(S4)的科技人员,请登录大会网页(<http://www.csf.org.cn/dahui/zc/>)按分会场注册个人信息,并将报名表以电子版形式同时发送至林化分会邮箱(chenqiang0729@163.com)。S4 分会场联系人:陈强,电话:025-85482492,手机:13451906386。

中国林学会林产化学化工分会

2013 年 7 月 12 日