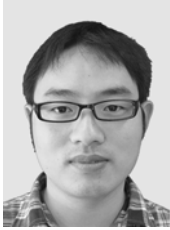


doi:10.3969/j.issn.0253-2417.2013.02.016

利用玉米芯同步糖化发酵产 2,3-丁二醇的研究



JIANG Xing

蒋 兴, 夏黎明*

(浙江大学 化学工程与生物工程系, 浙江 杭州 310027)

摘 要: 以玉米芯为原料, 采用同步糖化发酵 (SSF) 工艺, 将玉米芯酶水解及 2,3-丁二醇发酵耦合在一起同步进行。通过对 SSF 主要工艺参数的研究, 确立了适宜的工艺条件为: 纤维素酶添加量 25 FPIU/g (以底物计, 下同), 纤维二糖酶添加量 15 IU/g, 木聚糖酶添加量 300 IU/g, 底物质量浓度 100~120 g/L, pH 值 6.0, 36 °C。底物质量浓度为 120 g/L 时, SSF 周期 36 h, 2,3-丁二醇质量浓度可达 46.02 g/L, 产率为 1.28 g/(L·h), 转化率为 0.424 g/g (以纤维素及半纤维素为参照)。

关键词: 2,3-丁二醇; 同步糖化发酵; 玉米芯; 纤维素; 半纤维素

中图分类号: TQ35; Q932

文献标识码: A

文章编号: 0253-2417(2013)02-0091-04

Production of 2,3-Butanediol from Corncob by Simultaneous Saccharification and Fermentation Process

JIANG Xing, XIA Li-ming

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

Abstract: Production of 2,3-Butanediol from corncob was carried out by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) process. The optimal SSF conditions were obtained as 100 – 120 g/L substrates were treated by 25 FPIU/g substrate cellulose, 15 IU/g substrate cellobiase and 300 IU/g substrate xylanase under pH 6.0 and 36 °C environment. The concentration, productivity and conversion rate of 2,3-butanediol were 46.02 g/L, 1.28 g/(L·h) and 0.424 g/g (based on cellulose and hemicellulose) respectively by SSF treatment for 36 h when the substrate concentration is 120 g/L.

Key words: 2,3-butanediol; simultaneous saccharification and fermentation; corncob; cellulose; hemicellulose

2,3-丁二醇广泛应用于化工、食品、燃料和航空航天领域, 是石油替代战略中的重要平台化合物^[1]。化学法生产 2,3-丁二醇是以石油裂解时产生的四碳类碳氢化合物在高温、高压下水解生产得到的, 该方法难度大, 生产成本低, 过程繁琐, 难以实现大规模工业化生产, 从而也限制了 2,3-丁二醇用途的开发^[2]。传统的 2,3-丁二醇发酵工业主要以玉米、小麦等粮食淀粉或甘蔗汁为原料^[3], 我国人多地少, 粮食供应形势严峻, 以淀粉或糖为原料的生产成本偏高。本研究以玉米芯为原料, 采用同步糖化发酵工艺 (SSF) 生产 2,3-丁二醇, 旨在探索利用可再生纤维素资源生产 2,3-丁二醇的新途径。

1 实 验

1.1 纤维原料

1 kg 玉米芯粉碎至 0.85 mm, 加入 8 L 2% NaOH 溶液, 在 25 °C 下预处理 24 h, 过滤得到的残渣水洗至中性后备用。该玉米芯残渣^[4]的组成为: 纤维素 55.5%, 半纤维素 34.9%, 木质素 6.9%, 其它 2.7%。

收稿日期: 2012-04-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21176227)

作者简介: 蒋 兴 (1986-), 男, 浙江台州人, 硕士生, 主要从事生物化工方面的研究

* 通讯作者: 夏黎明, 教授, 博士生导师, 主要从事纤维素资源生物转化与利用方面的研究; E-mail: xialm@zju.edu.cn。

1.2 菌种

Klebsiella oxytoca ZU-03, 本实验室保藏菌种。

1.3 酶制剂

纤维素酶液:450 FPIU/mL, 纤维二糖酶液:160 IU/mL, 木聚糖酶粉:5 000 IU/g, 3种酶均由实验室自制。

1.4 培养基

斜面培养基(g/L): 葡萄糖 10, 酵母膏 5, 蛋白胨 10, 琼脂 20, pH 值 6.0。

种子培养基(g/L): 葡萄糖 20, 酵母膏 5, 蛋白胨 10, pH 值 6.0。

同步糖化发酵培养基(g/L): 玉米芯残渣 100, 玉米浆粉 30, CaCO₃ 3, K₂HPO₄ 20, MgSO₄·7H₂O 0.3, FeSO₄ 1, pH 值 6.0。以上培养基均在 121 °C 下, 灭菌 30 min。

1.5 同步糖化发酵

在装有 50 mL 同步糖化发酵培养基的 250 mL 三角瓶中接入 5 mL 菌种, 加入一定量的纤维素酶 25 FPIU/g(以底物计, 下同)、纤维二糖酶 15 IU/g、木聚糖酶 300 IU/g, 32 °C, pH 值 6.0, 摇瓶转速 150 r/min 的条件下进行同步糖化发酵(SSF)。上述条件若有改变将另作说明。

1.6 分析方法

1.6.1 酶活力测定 滤纸酶活力, 纤维二糖酶活力按照 IUPAC 推荐的国际标准方法测定^[5], 一个滤纸酶活力国际单位(FPIU)等于酶促反应生成 1.0 μmol 葡萄糖(以还原糖表示)的酶量; 一个纤维二糖酶活力国际单位(IU)等于标准反应条件下每分钟生成 2.0 μmol 葡萄糖的酶量。木聚糖酶活力按照文献[6]测定, 一个木聚糖酶活力国际单位(IU)等于每分钟分解底物释放出 1.0 μmol 木糖所需要的木聚糖酶量。

1.6.2 2,3-丁二醇质量浓度测定 高效液相色谱法测定, 色谱柱为 Transgenomic IC Sep ICE-Coregel 87H(300 mm × 7.8 mm), 柱温 60 °C, 流动相为 0.005 mol/L H₂SO₄, 流速为 0.4 mL/min, 检测器为 Spectra-Physics 6040 XR 示差折光检测器, 外标法定量。

1.6.3 2,3-丁二醇的转化率 转化率(Y)的计算公式为: $Y = C_1/C_2$, 其中 C₁ 为 2,3-丁二醇质量浓度, g/L, C₂ 为底物中综纤维素(纤维素及半纤维素)的质量浓度, g/L。

2 结果与讨论

2.1 不同条件对 SSF 的影响

2.1.1 纤维素酶的用量 预处理后的玉米芯残渣中纤维素占主要成分, 纤维素酶水解纤维素为葡萄糖, 在 SSF 中发挥了重要作用。图 1 是在不同纤维素酶用量下(不加纤维二糖酶和木聚糖酶)同步糖化发酵得到 2,3-丁二醇的质量浓度。从图 1 可以看到, 2,3-丁二醇的质量浓度随着纤维素酶用量的增加而升高, 当酶用量大于 25 FPIU/g 时, 2,3-丁二醇的质量浓度增加趋于平缓。综合考虑纤维素酶的成本, 纤维素酶的适宜用量为 25 FPIU/g。

2.1.2 纤维二糖酶的用量 纤维素酶在将纤维素水解成葡萄糖的过程中, 必须依靠不同组分之间的协同作用才能完成。纤维二糖是纤维素大分子在酶解过程中形成的主要中间产物, 在纤维二糖酶的作用下, 一个纤维二糖可水解成两个葡萄糖。目前应用于纤维素酶生产的菌种主要是里氏木霉(*Trichoderma reesei*)的优良突变株, 由于这些菌株产生的纤维二糖酶活力偏低^[7], 限制了纤维素糖化效率的提高, 所以需要补加纤维二糖酶。图 2 是不同纤维二糖酶用量下(不加木聚糖酶)的 SSF 结果。实验结果显示, 补加纤维二糖酶对 SSF 过程有明显的促进作用, 当补加量达到 15 IU/g 时, 发酵液中纤维二糖的积累消除, 2,3-丁二醇的质量浓度与对照相比提高了 31.6%。

2.1.3 木聚糖酶的用量 *Klebsiella oxytoca* ZU-03 可以利用木糖发酵产 2,3-丁二醇^[8]。预处理后的玉米芯残渣中含有一定量的半纤维素, 木聚糖酶可将玉米芯半纤维素水解为木糖。图 3 是不同木聚糖酶用量下的 SSF 结果, 可以看出, 木聚糖酶对 SSF 过程有明显的促进作用, 当木聚糖酶用量达到 300 IU/g

时, 2,3-丁二醇质量浓度达 38.22 g/L;继续增大用量, 2,3-丁二醇的质量浓度不再明显增加。

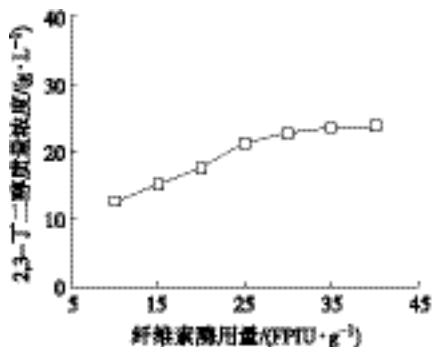


图 1 纤维素酶用量对 SSF 的影响

Fig.1 Effect of cellulase dosage on SSF

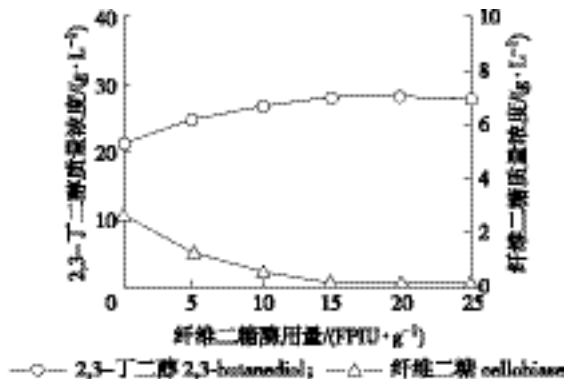


图 2 纤维二糖酶用量对 SSF 的影响

Fig.2 Effect of cellobiase dosage on SSF

2.1.4 初始 pH 值 纤维素酶、纤维二糖酶和木聚糖酶的最佳作用 pH 值为 4.8~5.0, *Klebsiella oxytoca* ZU-03 发酵产 2,3-丁二醇的最佳初始 pH 值为 6.0~6.5^[9], 两者的 pH 值不一致, 研究了 SSF 条件下不同初始 pH 值对 2,3-丁二醇生产的影响(图 4)。结果发现:当初始 pH 值 6.0 时, 2,3-丁二醇的质量浓度最高。在 SSF 过程中, 发酵液中的 pH 值呈逐渐下降趋势, 初始 pH 值对 SSF 进程的影响关系到纤维素糖化与 2,3-丁二醇发酵之间的协同效率。

2.1.5 温度 酶水解的适宜的温度为 50 °C, 而 *Klebsiella oxytoca* ZU-03 发酵生产 2,3-丁二醇的适宜温度范围为 30~35 °C^[10]。图 5 显示了不同温度条件下的 SSF 结果, 在一定范围内, 适当提高温度对酶的催化作用及 SSF 过程有利, 当温度达到 36 °C 时, 2,3-丁二醇达到最高值 39.13 g/L。进一步提高温度, 2,3-丁二醇质量浓度下降, 这主要是由于 *Klebsiella oxytoca* ZU-03 菌体在高温下死亡所致。

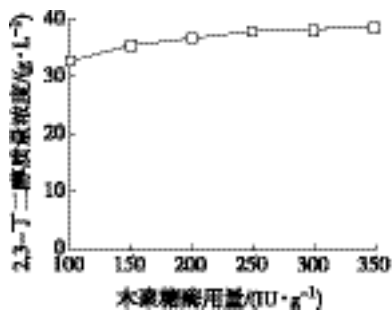


图 3 木聚糖酶用量对 SSF 的影响

Fig.3 Effect of xylanase dosage on SSF

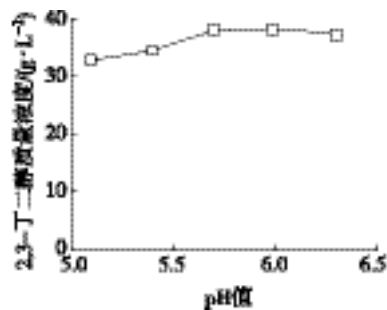


图 4 初始 pH 值对 SSF 的影响

Fig.4 Effect of initial pH on SSF

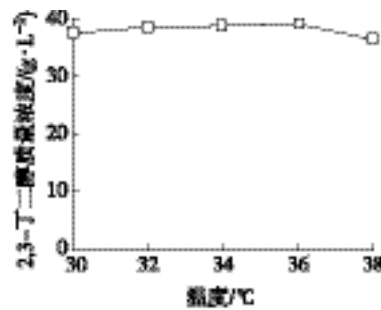


图 5 温度对 SSF 的影响

Fig.5 Effect of temperature on SSF

2.1.6 底物质量浓度 底物中纤维素质量分数为 55.5%, 半纤维素为 34.9%, *Klebsiella oxytoca* ZU-03 可以利用来自纤维素水解的葡萄糖和半纤维素水解的木糖发酵产 2,3-丁二醇, 适当提高底物浓度, 有利于 2,3-丁二醇浓度的提高。但当底物浓度过高时, 反应体系中传质阻力加大, 底物中综纤维素(纤维素及半纤维素)对 2,3-丁二醇的转化率下降。表 1 是不同底物质量浓度下 36 h 的 SSF 结果。可以看出, 2,3-丁二醇的质量浓度随着底物浓度的升高而升高, 但 2,3-丁二醇的转化率却随之下降。综合考虑 2,3-丁二醇的质量浓度和转

表 1 底物质量浓度对 SSF 的影响

Table 1 Effect of substrate concentration on SSF

底物质量浓度/(g·L ⁻¹) substrate concentration	2,3-丁二醇质量浓度/(g·L ⁻¹) 2,3-butanediol concentration	转化率/(g·g ⁻¹) conversion rate
60	24.07	0.444
80	31.72	0.439
100	39.13	0.433
120	46.02	0.424
140	49.31	0.389

化率

化率,SSF适宜的底物质量浓度为100~120 g/L。

2.2 SSF的时间进程

图6是在底物质量浓度为120 g/L条件下SSF的时间进程:反应起始后,pH值逐渐下降,而2,3-丁二醇的质量浓度呈快速上升趋势,在36 h便可达到46.02 g/L,产率为1.28 g/(L·h)。司阳等^[9]采用传统的酶水解、发酵二步法,以玉米秸秆为原料生产2,3-丁二醇,其中纤维素糖化48 h,发酵48 h,共需96 h。本试验将纤维素的酶解糖化与*Klebsiella oxytoca*发酵生产2,3-丁二醇两个过程耦合在同一反应器中进行,周期可缩短为36 h。在SSF工艺中,纤维素、半纤维素酶水解生成的单糖立即被微生物用于发酵,解除了酶解产物对酶制剂的反馈抑制作用,有利于提高酶蛋白的催化效率。

3 结论

3.1 采用同步糖化发酵生产2,3-丁二醇可明显缩短生产周期,提高生产效率。

3.2 来自玉米芯纤维素、半纤维素的己糖和戊糖可被*Klebsiella oxytoca*用于发酵生成2,3-丁二醇,当玉米芯残渣质量浓度为120 g/L,SSF 36 h,2,3-丁二醇可达46.02 g/L。该研究结果在可再生植物纤维废弃物的生物转化与利用方面具有良好的应用前景。

参考文献:

- [1] SYU M J. Biological production of 2,3-butanediol[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, 55(1): 10-18.
- [2] RAGAUSKAS A J, WILLIAMS C K, DAVISON B H, et al. The path forward for biofuels and biomaterials[J]. Science, 2006, 311(5760): 484-494.
- [3] CELINSKA E, GRAJEK W. Biotechnological production of 2,3-butanediol-current state and prospects[J]. Biotechnology Advances, 2009, 27(6): 715-725.
- [4] 刘书钗. 制浆造纸分析与检测[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 17-31.
- [5] GHOSE T K. Measurement of cellulose activities[J]. Pure & Applied Chemistry, 1987, 59(2): 257-268.
- [6] BAILEY M J, BIELY P, POUNTANEN K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity[J]. Journal of Biotechnology, 1992, 23(3): 253-270.
- [7] UUSITALO J M, HELENA N K M, HARKKI A M, et al. Enzyme production by recombinant *Trichoderma reesei* strains[J]. Journal of Biotechnology, 1991, 17(1): 35-50.
- [8] 冯燕青, 夏黎明. *Klebsiella oxytoca* 发酵木糖生产2,3-丁二醇[J]. 林产化学与工业, 2009, 29(1): 103-106.
- [9] 司阳, 夏黎明. 利用玉米秸秆水解液发酵生产2,3-丁二醇[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(2): 26-29.
- [10] PEREGO P, CONVERTI A. Effects of temperature, inoculum size and starch hydrolyzate concentration on butanediol production by *Bacillus licheniformis*[J]. Bioresource Technology, 2003, 89(2): 125-131.

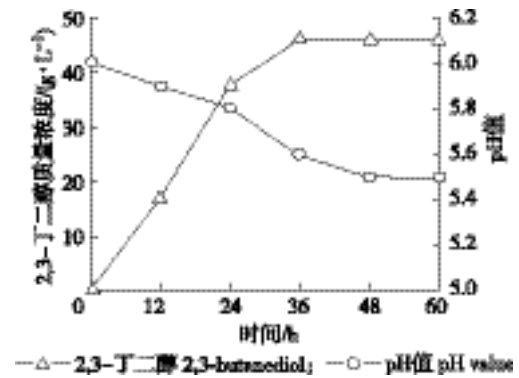


图6 *Klebsiella oxytoca* ZU-03 利用玉米芯原料同步糖化发酵生产2,3-丁二醇的时间进程

Fig. 6 The time course of 2,3-butanediol production from corncob under SSF process by *Klebsiella oxytoca* ZU-03