

## 蔗渣水解液发酵乙醇的研究

杨 斌<sup>1,2</sup> 吕燕萍<sup>2</sup> 高孔荣<sup>2</sup> 邓子新<sup>1</sup>

(华中农业大学生命科技学院 武汉 430070)<sup>1</sup>

(华南理工大学食品工程系 广州 510641)<sup>2</sup>

**摘 要** 研究了酵母(*Pichia stipitis*) Y-7124 在限制供氧条件下尽管反应初期葡萄糖消耗速率大于木糖,但在一定时间后,葡萄糖的消耗速率变慢,而木糖消耗速率变快直至耗尽的现象。建立了气升柱以 *P. stipitis* 转化木糖为目的和以溢流柱 *Saccharomyces cerevisiae* 转化残留葡萄糖为目的的串联发酵乙醇工艺,即流加 5 倍浓缩的蔗渣水解液,  $D = 0.1\text{h}^{-1}$ ,还原糖总利用率为 97.2%,酒精浓度为 46.5g/L,生产率为 4.1g/L·h。

**关键词** 甘蔗渣,葡萄糖,木糖,串联发酵,乙醇

蔗渣纤维的水解液主要包括葡萄糖、木糖、阿拉伯糖等多种单糖和寡糖的混合物。以往的研究多集中于葡萄糖或木糖发酵乙醇的工艺过程<sup>[1~14]</sup>。而对多碳源发酵乙醇方面的研究尚不多见<sup>[15~17]</sup>。究其主要原因:一是多碳源发酵乙醇的菌株不多,主要是葡萄糖和木糖,也有阿拉伯糖和半乳糖转化乙醇的研究工作;二是多碳源发酵乙醇的工艺及设备在满足其代谢特点上有一定困难,例如,使用单菌株发酵混合糖会出现二次培养现象,使发酵时间延长,第二碳源利用率低,酒精产率亦不尽人意。而双菌株串联发酵混合糖,存在串联工艺上的问题,诸如前发酵乙醇对次发酵菌的影响以及菌株发酵工艺条件的同步性等等。本研究将采用气升柱发酵木糖和溢流柱发酵葡萄糖的串联工艺,选用相应的强发酵五碳糖菌株 *P. stipitis* Y-7124 和强发酵六碳糖菌株 *S. cerevisiae*。对蔗渣水解液进行了连续发酵,稳态操作动力学的研究。内环流反应器 (IALR),控制溶氧方便<sup>[17]</sup>,较适用于限氧发酵的毕赤氏酵母采用。用 *S. cerevisiae* 溢流柱发酵残留葡萄糖,具有投资省、操作方便、生产效率高等优点,当然也必须解决游离细胞的流失问题。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 菌种:** 毕赤氏酵母 (*Pichia stipitis*) Y-7124 由山东大学微生物所曲音波教授转赠。酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) AS.2.1190 为华中工学院食品系保藏。

**1.1.2 培养基:** *P. stipitis* Y-1724 的斜面培养基 (YM); 液体发酵培养基 (CCY)<sup>[1]</sup>; *S. cerevisiae*<sup>[2]</sup> 的斜面培养基; 麦芽汁培养基, 广东微生物所制备; 液体培养基: 葡萄糖适量, 酵母抽提物 6g, 麦芽抽提物 6g, 蛋白胨 10g, 脱离子水 1.0L, 调整 pH6.2。以上药品均为

广东省科学基金资助项目。

本文于 1996 年 11 月 25 日收到。

分析纯或化学纯。

**1.1.3 发酵培养基的碳源:**葡萄糖、木糖溶液,按实验要求配制成一定浓度备用。蔗渣水解液;总还原糖为 19.6g/L,其中葡萄糖:木糖为 3:1,并按实验要求浓缩至一定倍数以便串联发酵。在连续发酵时要在其中加入 5%的酵母抽提物。

## 1.2 方法

**1.2.1 培养方法:**①酵母的转接与增殖:将酿酒酵母分别从相应斜面培养基接入含液体培养基的三角瓶,在 30℃,150r/min 培养 48h,然后接入反应器中。②间歇发酵:1)将增殖好的酿酒酵母接入含 200ml 发酵培养基的 500ml 三角瓶中,pH 调节控制在 5.5~6.5 之间,30℃,150r/min 摇床进行厌氧发酵。其间,每次采取 3ml 样品进行 pH、乙醇浓度和糖浓度的分析。2)将增殖好的毕赤氏酵母接入 200ml CCY 培养基的 500ml 三角瓶中,30℃摇床(150r/min)发酵,定时取样 3ml 测定 pH、乙醇浓度和糖浓度。③连续发酵:设备简图如图 1 所示:

将增殖好的赤毕氏酵母接入气升柱(1)(内管  $\Phi 43\text{mm} \times 350\text{mm}$ ,外管  $\Phi 57\text{mm} \times 550\text{mm}$ )中。同时将增殖好的酿酒酵母接入柱(2)( $\Phi 51\text{mm} \times 550\text{mm}$ )中,在 30℃下,柱(1)从底部进入压缩空气以维持溶氧需要,将发酵培养基用泵从柱(1)底侧部输入,改变其操作条件,就可得到不同条件下的结果。然后将发酵液澄清,再用泵将其输入柱(2)底部,用酿酒酵母进行厌氧发酵,最后产物乙醇从柱(2)的沉降器出口流出。其间,定时取样 3ml 测定细胞数,还原糖及葡萄糖和木糖、酒精浓度等。

**1.2.2 分析方法:**①酒精:气相色谱法测定<sup>[3]</sup>;②还原糖含量:DNS 法<sup>[18]</sup>。③葡萄糖、木糖醇和木糖含量:高压液相色谱法<sup>[4]</sup>;④细胞数量:显微镜直接计数法<sup>[5]</sup>。⑤酵母浓度:发酵液试样经离心分离,沉淀菌体经二次洗后加入分散剂(NaCl 0.9%,吐温 80 0.5%,EDTA 钠盐 20mmol/L),充分摇匀,用 721 型分光光度计在波长 660nm 处测 OD 值,且测得了菌体干重与 OD<sub>660</sub>的关系为:1.0OD<sub>660</sub>相当于 0.921g/L(菌体干重)。⑥蔗渣水解液的浓缩:采用减压浓缩法<sup>[8]</sup>,主要以葡萄糖和木糖为指标。⑦气体流量:用气体流量计来测量。

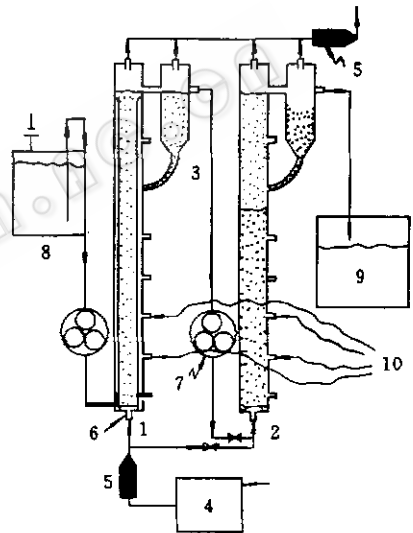


图 1 多碳源串联发酵器

Fig. 1 Schematic diagram of the multicarbon series connection fermentor

(1) Air-lift tower, (2) Overflow tower, (3) Settler

## 2 结果与分析

### 2.1 气升柱(1)的 *P. stipitis* 乙醇连续发酵

**2.1.1 供氧量与木糖的发酵:**一般认为,在多碳源存在时,微生物较易利用的碳源对较难利用的碳源有抑制作用<sup>[9]</sup>。然而,在一定条件下,己糖对戊糖的代谢抑制作用可以减

轻或消除。Slininger 等<sup>[10]</sup>在研究葡萄糖-木糖的二元系统中用管囊酵母发酵时发现,只要接种物是在木糖中培养而得,且酵母细胞浓度高于 5g/L,葡萄糖对木糖的抑制作用可以避免。

另外,已糖的乙醇发酵是在厌氧条件下进行的。虽然发酵初期也需要少量氧供细胞生长并维持细胞活力,但所需量极少。戊糖发酵则必须在“限制供氧”条件下进行<sup>[11]</sup>。实验条件:气升柱调节进气量,温度 30℃, pH5.5, *P. stipitis* 酵母增殖用从木糖为唯一碳源的 CCY 培养基培养,间歇发酵接种量为 5.2g/L。初糖浓度为 100g/L,其结果如图 2 所示。厌氧发酵 24h,木糖有近 1/3 转化为木糖醇,乙醇浓度较低,酵母的生长受严重抑制,显然木糖醇需进一步转化为木酮糖后才能进入磷酸戊糖循环并最终生成乙醇<sup>[12]</sup>。厌氧条件显然阻碍了木糖醇的进一步代谢,从而影响了乙醇的生成。反之,通气充分条件下,木糖利用速率很快,木糖醇也不积累,但乙醇的产量也不高。除了相当一部分木糖消耗于酵母细胞的增殖以外,通气量过大还可能导致乙醇作为

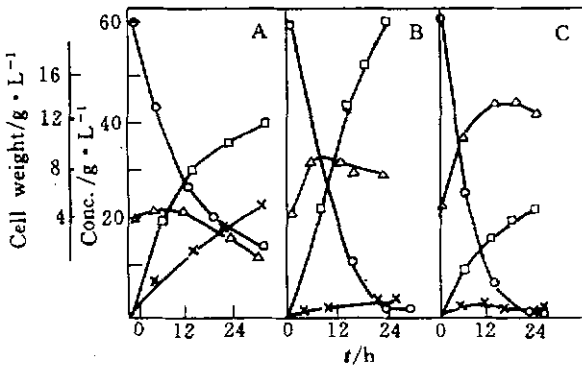


图 2 供氧量对木糖发酵的影响

Fig. 2 Effect of oxygen availability on xylose fermentation by *P. stipitis* Y-7124

A. No air supplied, B. Air 0.03vvm, C. Air 0.12vvm

Ethanol(□), Xylose(O), Xylitol(×), Cell(△)

一种碳源被酵母细胞利用<sup>[13]</sup>。只有在通气量适度的条件下,(如图 5B),发酵才能正常,木糖利用率为 96%,乙醇得率为 0.45g/g。消耗的糖,副产物木糖醇低于 1.5g/L。所以说“限制供氧”条件,实际上就是既考虑到木糖的利用率,又考虑到乙醇得率的一种平衡。

**2.1.2 蔗渣水解液的气升柱(1)发酵:**将蔗渣水解液和浓缩 2、5、10 倍的水解液作为底物分别流加,在对其气升柱(1)单元进行连续 15d 发酵过程中,调节通气量、糖浓度和稀释率,得到了较好的实验结果。在整个发酵过程中酵母活性良好,卸柱时细胞浓度高达 7.94g/L。

(a)通气量:通气量对发酵中酒精浓度,木糖和葡萄糖的利用率和生产能力的关系进行研究,其结果如图 3 所示。当通气量为 0.03vvm 时,乙醇浓度最高,且木糖残留浓度低于 2g/L,葡萄糖残留浓度为 32.4g/L。此结果与以往通气量实验一致<sup>[14]</sup>。

(b)蔗糖水解液浓缩倍数的确定:过高的底物浓度将会对发酵过程产生明显的抑制作用,而低浓度发酵又十分不经济。由于柱(1)发酵的目的主要是消耗木糖产乙醇,且酒精浓度高,产率高。从实验结果(表 1)可知:随着残木糖浓度的升高,残葡萄糖浓度也逐渐升高。木糖的利用率不仅与自身初始浓度有关,而且与混合糖的比例有关。在发酵过程中尽管采用了限制供氧等有利于木糖利用的方法,但由于 *P. stipitis* 本身的特性和葡萄糖效应的作用,还是有相当一部分葡萄糖用于发酵了。

在蔗渣水解液中葡萄糖与木糖等单糖共存。*P. stipitis* 酵母通常先利用葡萄糖,当葡萄糖在较短时间内降低一定浓度时,便出现了木糖发酵速率高于葡萄糖的现象。我们同时对5倍浓缩蔗渣水解液总还原糖,葡萄糖和木糖随时间的变化规律进行了研究(见图4)。从图4中可知:葡萄糖在4h内的消耗速率很快,高于总还原糖和木糖,而4h以后,葡萄糖浓度变化不大,木糖的速率成了最高,并保持至消耗尽为止。总之,从糖的利用率和乙醇产率两个方面来看,尤其是木糖的利用水平,便会选择浓缩5倍的蔗渣水解液来流加。(c)稀释率:稀释率大至某一临界值时会导致细胞流失的现象。所以只

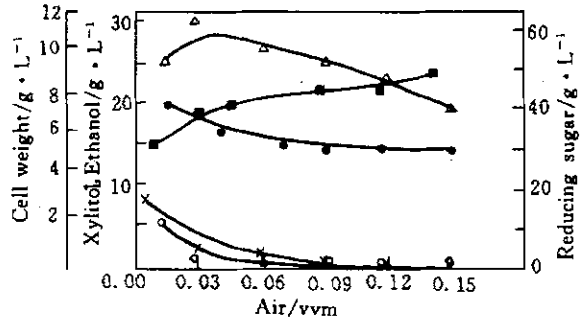


图3 通气量的影响

Fig. 3 The effect of aeration rate

△—△ Ethanol, ○—○ Xylose, ●—● Glucose, ■—■ Cell, ×—× Xylitol

Initial sugar concentration ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) was five time concentrated hydrolyzate of bagasse (glucose  $71.4 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , xylose  $23.1 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )

Fermentation conditions:  $30^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}5.0$ ,  $D = 0.1 \text{h}^{-1}$

可能在一定范围内通过加大稀释率来增加生产能力,同时还应考虑到稀释率高也会降低糖利用率。为此,采用不同稀释率来发酵5倍浓缩的蔗渣水解液。其结果如表2所示:

表1 柱(1)的发酵情况

Table 1 Fermentation of column(1)

Concentration times	Residual xylose / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	Residual glucose / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	Ethanol / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	Productive rate / $\text{g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$
0	0.10	0.09	9.26	0.95
2	0.24	0.48	16.77	1.34
5	1.93	32.4	30.5	2.63
10	21.2	81.9	37.5	3.11

Condition:  $D = 0.1 \text{h}^{-1}$ ,  $30^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}5.0$ , Air  $0.03 \text{vvm}$

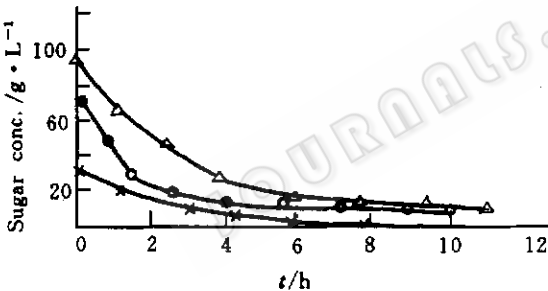


图4 毕赤氏酵母对各种糖的利用

Fig. 4 Sugars utilized by *P. stipitis*

Conditions:  $30^\circ\text{C}$   $\text{pH}5.0$  Air:  $0.03 \text{vvm}$

△—△ - Total reducing sugar, ○—○ - Glucose, ×—× - Xylose

从表2可知:稀释率为  $0.1 \text{h}^{-1}$  时,生产能力没达到最大,但糖利用率(尤其是木糖)和酒精得率均属高水平。因此,最适稀释率应为  $D = 0.1 \text{h}^{-1}$ 。

### 2.2 柱(2)酿酒酵母的匹配参数

由于串联发酵的要求,寄希望于柱(2)能够将柱(1)中残留的葡萄糖发酵成乙醇,将溢流方式进行低浓度流加葡萄糖的实验,以确定柱(2)中的初始细胞浓度与酒精得率之间的关系。条件为:  $30^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}4.5$ ,  $D = 0.1 \text{h}^{-1}$ , 初始葡萄糖浓度为  $35 \text{g/L}$ , 结果如表3所示:

表2 稀释率对发酵柱(1)的影响

Table 2 Effect of  $D$  on the fermentation of column (1)

$D$ /h <sup>-1</sup>	Residual glucose /g·L <sup>-1</sup>	Residual xylose /g·L <sup>-1</sup>	Ethanol /g·L <sup>-1</sup>	Ethanol yield /g·g <sup>-1</sup>	Productive rate /g·(L·h) <sup>-1</sup>
0.05	11.7	0.22	38.2	0.44	1.63
0.08	24.9	0.38	31.7	0.44	1.89
0.1	32.4	1.93	30.5	0.48	2.63
0.12	37.3	5.41	25.4	0.46	3.14
0.15	42.1	10.6	19.9	0.43	3.37
0.20	48.3	16.9	14.2	0.43	3.99

Condition: Air 0.03vvm, 30°C, pH5.0.

表3 酿酒酵母初细胞浓度的发酵状况

Table 3 Difference initial concentration of cells effect on fermentation by *S. cerevisiae*

Initial cell /g·L <sup>-1</sup>	Residual glucose /g·L <sup>-1</sup>	Yield /g·g <sup>-1</sup>	Ethanol /g·L <sup>-1</sup>
0.05	3.2	0.49	15.9
0.5	1.01	0.50	17.4
1.0	0	0.47	16.6

从表3中知:初始细胞浓度为0.5g/L时,柱(2)发酵的酒精得率最高。要在稳态时与柱(1)匹配发酵必须要维持细胞浓度与乙醇浓度的相对平衡使得葡萄糖尽量地转化为乙醇,即要控制轴出比来控制发酵状况<sup>[3]</sup>。因此,在初始葡萄糖浓度为35g/L,  $D = 0.1\text{h}^{-1}$ ,酒精产率为1.91g/L·h,轴出比需控制在  $B = 0.42$ 。

### 2.3 蔗渣水解液的串联发酵

串联发酵是首先经 *P. stipitis* 酵母的限氧发酵后,再经 *S. cerevisiae* 的厌氧过程而结束<sup>[15]</sup>。建立这个程序的基础为:

由于 *P. stipitis* 酵母是不耐酒精的,如果以 *S. cerevisiae* 发酵葡萄糖为前序步骤,将必然产生高浓度的酒精,而影响木糖的发酵<sup>[15]</sup>;

尽管葡萄糖效应较严重,但在一定通气条件下,短时间后会产生木糖为主的乙醇发酵过程,且葡萄糖和木糖均转化为乙醇;

柱(1)以木糖的最大量消耗为目的,并和一部分葡萄糖一同转化为乙醇;而柱(2)的流式操作为了将剩余的残葡萄糖最大量地转化为乙醇。柱(1)的气升式操作控制便得很重要,柱(2)R发酵为协同匹配为主。

其条件为:初始糖浓度为5倍的蔗渣水解浓缩液(总糖为98g/L,葡萄糖:木糖=3:1),柱(1)中接种量为5.2g/L,通气量为0.03vvm。柱(2)中接种量为0.5g/L系统的稀释率控制在  $D = 0.1\text{h}^{-1}$ , 30°C, 初始 pH5.0, 其结果如图5示:

从图5中可知:当间歇发酵结束而进行连续发酵时,经过约10h便进入了稳态操作。操作参数为:初始流加5倍浓缩的蔗渣水解液,  $D = 0.1\text{h}^{-1}$ , 柱(1)细胞浓度为7.24g/L。柱(2)细胞浓度为0.67g/L,还原糖利用率近97.2%。酒精浓度为46.6g/L,生产率为4.1g/L·h。

### 3 结 论

研究了气升柱(1)*P. stipitis*的连续发酵乙醇的操作条件:通气量为0.03vvm。初始蔗渣水解液浓度为98g/L还原糖(其中葡萄糖71.4g/L,木糖23.1g/L)。木糖残留浓度低2g/L。葡萄糖残留浓度32.4%,酒精浓度为30.5g/L,生产率为2.63g/L·h。

在研究气升柱连续发酵的同时,也对木糖消耗的机理进行了初步探讨,发现*P. stipitis*:30℃,pH5.0,通气量0.03vvm。 $D = 0.1\text{h}^{-1}$ ,加入5倍浓缩的蔗渣水解液(葡萄糖71.4g/L,木糖23.4g/L)时,发酵前4h葡萄糖消耗速率大于木糖,后4h木糖的消耗速率大于葡萄糖,且葡萄糖的浓度在8h内变化不大。这个原因十分复杂,需要从代谢调控的机理去深入地研究,从宏观的角度分析可能是:其一是葡萄糖利用几乎同时对木糖进行利用,不过由于木糖含量少且代谢途径复杂而造成消耗速率偏低的现象,但当4小时,葡萄糖浓度下降到一定程度,其消耗速率与木糖一致并继续下降,而木糖代谢也渡过了代谢迟滞期,消耗速率增大,并一直维持至发酵终了。其二氧的协同作用在代谢上对木糖的消耗速率的变化起着一定作用。这方面的问题有待今后详细研究。

在研究溢流柱匹配气升柱发酵的细胞浓度可通过轴出化 $B = 0.42$ 来控制,当*S. cerevisiae*的初始细胞浓度为0.5g/L时, $D = 0.1\text{h}^{-1}$ ,初始葡萄糖浓度为35g/L。酒精产率为1.91g/L时,酒精浓度为1.74g/L。

柱(1)和溢流柱(2)串联发酵,其条件为:5倍浓缩的蔗渣水解液30℃,pH5.0,柱(1)接种量为5.0g/L,通气量0.03vvm,柱(2)接种量为0.5g/L,系统稀释率 $D = 0.1\text{h}^{-1}$ ,进行稳态发酵,还原糖的利用率为97.2%,酒精浓度为46.6g/L,生产率为4.1g/L·h。

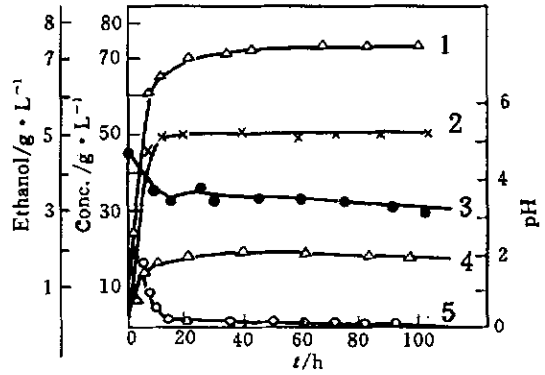


图5 串联发酵的稳态动力学曲线

Fig.5 Steady-state kinetics at  $D = 0.1\text{h}^{-1}$

1. Cell concentration column(1), 2. Ethanol concentration, 3. pH, 4. column(2), 5. Reducing sugar(O)  
\* pH controlled by adding 0.2mol/L NaOH and 0.2mol/L HCl.

### 参 考 文 献

- [1]Slininger P J, Branstrator L E, Bothast R J. *Biotechnol Bioeng*, 1990, 35: 727~731.
- [2]Stephen T J. *Biotechnol Bioeng*, 1984, 26: 742~747.
- [3]杨 斌,李宝璋,高孔荣. 华南理工大学学报,1995,10:8~15.
- [4]天津轻工业学院等. 工业发酵分析,北京:轻工业出版社,1987,29:144~150.
- [5]马清和. 中国调味品酿造技术,西安:世界图书出版公司,1994, p. 263.
- [6]梁世中,许 维,高孔荣. 华南理工大学学报,1993,11:27~31.
- [7]Chisti M Y. *Airlift Bioreactor*, Elsevier Applied Science, 1989.
- [8]梁树权. 定量分析,北京:高等教育出版社 1964.

- [9] Skoog K, Hohn-Hagerdal B. *Enzyme Microb Technol*, 1988, **10**(2):66~80.
- [10] Slininger P J, Bothart R J. *Biotechnol Bioeng*, 1988, **32**:1104~1112.
- [11] Jeng R S, Yu S, Wayman M. *Can J Microbiol*, 1988, **33**:1017~1023.
- [12] Brueneberg P M. *Gen Microbiol*, 1983, **129**:956~971.
- [13] Delgenes J P, Moletta R, Navarro J M. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1988, **29**:155~161.
- [14] Schreider H. *Biotechnol Lett*, 1981, **2**:89~92.
- [15] 邓 旭, 郑重鸣, 岑沛霖. *食品与发酵工业*, 1995, **6**:39~44.
- [16] Kompala D S, Ramkrishna D, Tsao T G. *Biotechnol Bioeng*, 1984, **26**:1272~1281.
- [17] Tynee R W, Moser A. *Biotechnol Lett*, 1990, **12**(11):51~56.
- [18] Ghose P. *Enzyme Microb Technol*, 1982, **4**:425~431.

## Research on Fermentation Hydrolyzate of Sugarcane Bagasse to Ethanol

Yang Bin<sup>1,2</sup> Lü Yanping<sup>2</sup> Gao Kongrong<sup>2</sup> Deng Zixin<sup>1</sup>

(Huazhong Agriculture University, Wuhan 430071)<sup>1</sup>

(Department of Food Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641)<sup>2</sup>

**Abstract** During the research of glucose and xylose utilization by *P. stipitis* in limited oxygen supply condition. The rate that glucose was utilized by *P. stipitis* decreased rapidly while xylose decreased slowly until that time that glucose was shown to level out, then the rate of utilization by *P. stipitis* of xylose increased rapidly. Based on the results, ethanol fermentation technology in continuous connective tower fermentors was advanced, namely fermentation by *P. stipitis* in air-lift loop tower focusing on xylose utilization and then residue glucose utilization by *S. cerevisiae* in overflow tower. When the fed hydrolyzate of bagasse was concentrated five folds and the dilution rate was  $0.1\text{h}^{-1}$ , the total utilization ratio of reducing sugar was 97.2%; the concentration of ethanol was 46.5g/L the ethanol productivity was 4.1g/L·h.

**Key words** Sugarcane bagasse, glucose, xylose, ethanol, fermentation in connective fermentors