

# 管囊酵母 D-21 木糖乙醇发酵条件的优化

代金龙 宋昕磊 张 鹏\*

(北京化工大学 生命科学与技术学院, 北京 100029)

**摘 要:** 对一株能利用木糖产乙醇的管囊酵母 D-21 进行了发酵条件的优化,研究了接种量、氮源、碳源和维生素对乙醇产量和还原糖利用率的影响。结果表明:接种量过高会影响乙醇产量,以 6% (体积分数)为宜;当木糖质量浓度为 50 g/L,碳氮质量比为 20:1,使用酵母膏和尿素组成的复合氮源时(质量比为 2:1),发酵 72 h 后所得乙醇质量浓度为 12.5 g/L,达到理论产量的 55%;当木糖与葡萄糖的质量比为 3:1 时,乙醇质量浓度为 15.72 g/L,为理论产量的 69%;在发酵培养基中添加质量分数为  $2 \times 10^{-5}$  维生素 B<sub>6</sub> 可使乙醇产量提高 18.3%。

**关键词:** 木糖;乙醇;发酵;管囊酵母

**中图分类号:** Q815

## 引 言

木糖是一种五碳糖,是植物纤维素中半纤维素水解物的主要单糖之一,其含量占水解总糖量的 30% 左右,仅次于葡萄糖。充分利用木糖发酵生产乙醇,能使纤维素原料的乙醇发酵的产量在原有的基础上增加 25%<sup>[1]</sup>,因此木糖发酵产乙醇是决定植物纤维资源生产乙醇经济可行的关键因素之一。

良好的木糖发酵菌株是解决木糖乙醇发酵问题的关键。传统乙醇发酵菌酿酒酵母只能利用葡萄糖不能利用木糖,基因工程改造后由于存在辅助因子失衡<sup>[2-4]</sup>、代谢途径关键酶活性低<sup>[5-7]</sup>等问题,木糖利用率和乙醇产量均较低,还处于实验室研究阶段,不能达到工业化要求。因此对可代谢木糖的天然酵母的研究具有可行性和实用性。管囊酵母是代谢木糖的天然酵母菌之一,具备酵母菌的发酵特点,有一定实用价值,但目前研究多停留在单个因素上,缺少系统性和全面性。如 Zhao 等<sup>[8]</sup>通过改变培养基中木糖和葡萄糖的比例,得到了管囊酵母 1771 发酵木糖产乙醇的最佳碳源组合,提高了木糖发酵能力。Sánchez 等<sup>[9]</sup>研究了发酵温度对两株管囊酵母 K238 和 K313 的影响,找到了两株菌株各自的最适发酵

温度,乙醇产量达 0.39 g/g(乙醇/还原糖)。

本文使用管囊酵母 D-21,通过对接种量、碳氮源和维生素等因素的研究,得出了最适发酵条件,提高了管囊酵母 D-21 发酵木糖产乙醇的能力。

## 1 实验部分

### 1.1 菌种

嗜单宁管囊酵母 D-21,中国食品发酵工业研究院菌种保藏中心提供。

### 1.2 培养基

种子保藏斜面培养基:木糖 20 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 g/L, 酵母粉 5 g/L, 蛋白胨 5 g/L, 尿素 2.5 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g/L, MgSO<sub>4</sub> 1 g/L, 琼脂 12 g/L;

种子培养用培养基:木糖 20 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 酵母粉 10 g/L;

酵母发酵用培养基:木糖 50 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 g/L, 酵母粉 2 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g/L, MgSO<sub>4</sub> 1 g/L;

### 1.3 培养方法

斜面培养:30℃培养 48 h, -20℃保存;种子培养:30℃培养 24 h, 摇床转速为 160 r/min;发酵培养:30℃, 摇床转速为 100 r/min。

### 1.4 测定方法

#### 1.4.1 乙醇质量浓度的测定

取 4 mL 发酵液,置于密封的离心管中,3000 r/min 离心 20 min,取上清液,气相色谱法测定乙醇质量浓度。

#### 1.4.2 还原糖利用率的测定

发酵液离心后的上清液用 DNS 法<sup>[10]</sup>测定还原

收稿日期:2010-01-07

第一作者:男,1984 年生,硕士生

\* 通讯联系人

E-mail: zhangpeng@mail.buct.edu.cn

糖质量浓度。还原糖利用率  $\eta$  为被利用的糖的质量浓度占初始还原糖质量浓度的分数。

## 2 结果与讨论

### 2.1 接种量对管囊酵母木糖乙醇发酵的影响

挑取管囊酵母 D-21 接入种子培养基培养后,以 3%、6%、9%、12% (体积分数) 的接种量接入发酵培养基中,发酵结果如表 1 所示。

表 1 不同接种量对管囊酵母木糖发酵产乙醇的影响  
Table 1 Effect of varying inoculum size on the ethanol fermentation of xylose by *Pachysolen tannophilus* D-21

接种量	$\rho_{\text{乙醇}} / \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$		
	60 h	72 h	84 h
3%	12.38	11.38	11.51
6%	12.47	11.28	11.40
9%	12.75	11.21	11.44
12%	11.12	10.56	11.03

在所取时间范围内,发酵 60 h 时乙醇产量最高,以 60 h 为发酵周期时 9% 的接种量最优,但接种量在 3% ~ 9% 之间变化时对发酵影响不大,当达到 12% 时,乙醇产量下降,说明接种量过高会影响菌体的生长,进而影响乙醇产量。但随着发酵时间的延长,接种量对发酵的影响越小,到 84 h 时几乎看不出不同接种量的差别。因此,综合以上分析,接种量应取 6% 为宜,以下发酵实验均按此接种量接种。

### 2.2 氮源对管囊酵母木糖乙醇发酵的影响

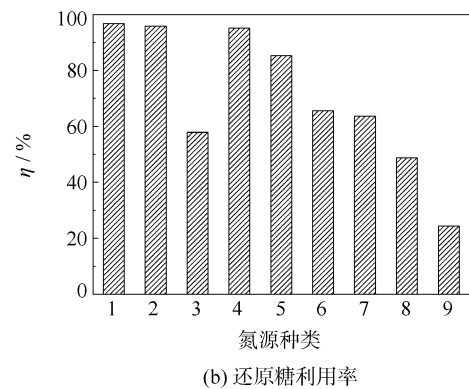
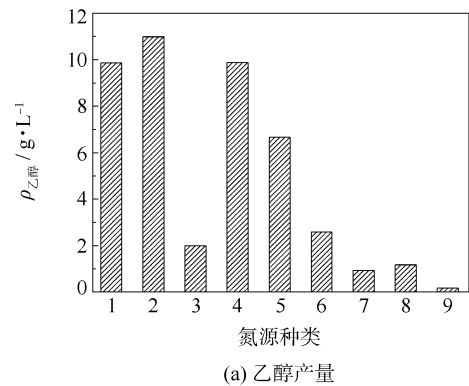
#### 2.2.1 氮源种类

取实验室常用的 9 种氮源为研究对象,以 10 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  中的氮元素含量为标准,其他氮源折合成相应质量加入各自发酵培养基中,在同等条件下发酵 48 h,结果如图 1 所示。

酵母膏、牛肉粉和玉米浆乙醇产量较高,都在 10 g/L 左右,还原糖利用率在 95% 以上,基本达到了现有的水平,是较为理想的氮源。蛋白胨、尿素、硫酸铵作为氮源时,乙醇产量不高,但也有实用价值,根据氮源的速效性和迟效性可以组合成复合氮。

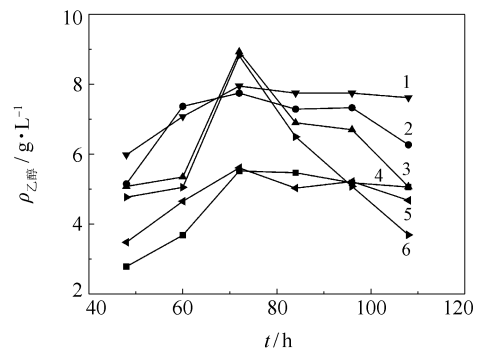
#### 2.2.2 发酵时间

考察了每种氮源的最佳发酵时间,结果如图 2 所示。从图 2 可以看出,此菌株发酵木糖的最佳时间为 72 h,但工业上希望是发酵周期越短越好,还有待改进。玉米浆、牛肉粉、酵母膏、蛋白胨在发酵 72 h 后的乙醇含量达到最高,而后开始下降,可能是由



1—酵母膏; 2—牛肉粉; 3—豆饼粉; 4—玉米浆; 5—蛋白胨;  
6—尿素; 7—硝酸钠; 8—硫酸铵; 9—氯化铵

图 1 不同氮源对管囊酵母木糖发酵产乙醇的影响  
Fig. 1 Effect of different nitrogen sources on the ethanol fermentation of xylose by *Pachysolen tannophilus* D-21  
于菌体开始消耗乙醇。虽然尿素、硫酸铵这种无机氮源作为单一氮源时乙醇产量不如玉米浆、酵母膏好,但在发酵 72 h 前乙醇产量的变化率较快,这就为下一步的复合氮源实验提供了参考。

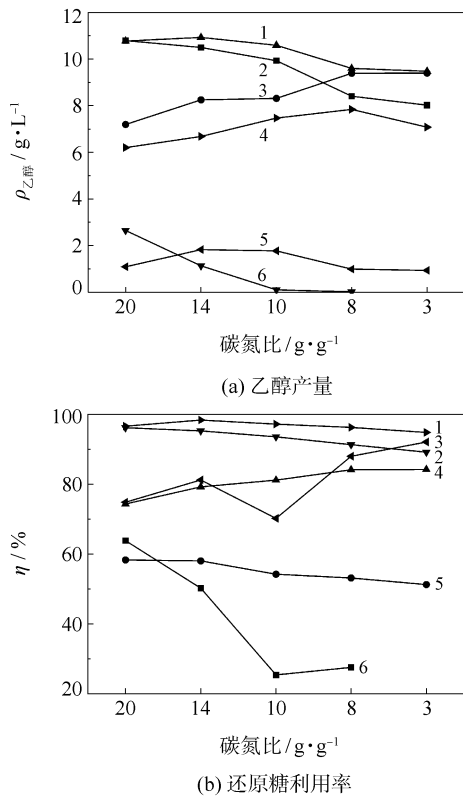


1—蛋白胨; 2—酵母膏; 3—牛肉粉; 4—硫酸铵; 5—尿素; 6—玉米浆  
图 2 不同发酵时间对管囊酵母木糖发酵产乙醇的影响  
Fig. 2 Effect of varying fermentation time on the ethanol fermentation of xylose by *Pachysolen tannophilus* D-21

#### 2.2.3 氮源浓度

选择酵母膏、牛肉粉、玉米浆、蛋白胨、尿素、硫

酸铵为氮源,考察氮源浓度对发酵的影响(由于碳源均为 50 g/L,氮源浓度用碳氮(质量)比来表示),72 h 取样得出结果如图 3 所示。



1—玉米浆; 2—酵母膏; 3—牛肉粉; 4—蛋白胨; 5—硫酸铵; 6—尿素

图 3 不同碳氮比管囊酵母木糖发酵产乙醇的影响

Fig. 3 Effects of different C:N ratios on the ethanol fermentation of xylose by *Pachysolen tannophilus* D-21

由图 3 可以看出,大多数氮源在 10:1 时乙醇含量达到最大,或是增长速度明显放慢,氮源浓度过高时抑制乙醇的生成。

单独考察酵母膏为氮源,不同时间不同碳氮比发酵结果,结果如图 4 所示。由图 4(a)可见,碳氮比在 15:1 和 25:1 时乙醇产量较高。氮源含量过高时发酵效果很差,这是因为菌体生长过于旺盛,本身供氧量低,造成局部或阶段性供氧不足,部分微生物的衰亡期提前,不利于目的产物的积累。氮源含量低时,乙醇产量最高值出现的时间推后,这是因为菌种的生长变慢,发酵周期相应延长。图 4(b)为取碳氮比的中间范围时乙醇产量的比较,结果表明在碳氮比为 15:1 时乙醇产量最大,还原糖消耗最多,乙醇得率达到 55%,但从总体看来,在所取范围内碳氮比对发酵的影响不是很大,考虑到培养成本问题,取碳氮比为 20:1 进行复合氮源的研究。

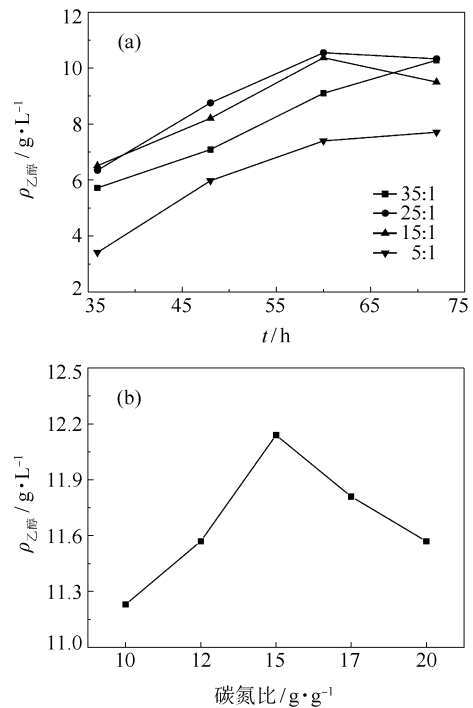


图 4 酵母膏浓度对管囊酵母木糖发酵产乙醇的影响

Fig. 4 Effects of concentration of yeast extract on the ethanol fermentation of xylose by *Pachysolen tannophilus* D-21

### 2.2.4 复合氮源

根据以上单一氮源实验结果,考察酵母膏 + 玉米浆、酵母膏 + 硫酸铵和酵母膏 + 尿素 3 种复合氮源,并以单一氮源酵母膏作对照,结果如图 5 所示。

再取两种复合氮源中最优的配比作横向比较,结果如表 2 所示。

表 2 两种复合氮源管囊酵母 D-21 木糖发酵产乙醇的结果  
Table 2 Results for two different compound nitrogen sources in the ethanol fermentation of xylose by *Pachysolen tannophilus* D-21

复合氮源	$\rho_{乙醇} / g \cdot L^{-1}$		增长率/%
	对照组	复合氮源	
$m_{酵母膏} : m_{硫酸铵} = 1 : 2$	10.57	11.6	109.74
$m_{酵母膏} : m_{尿素} = 2 : 1$	10.88	12.5	114.89

可见,适当配比的复合氮源发酵效果要优于单一氮源,这是因为速效氮源和迟效氮源以及生理酸碱性物质的搭配使用不但有利于微生物的生长,而且有助于维持一个最适于酶合成的环境;随着发酵时间的延长,一些配比的发酵效果反而不及单一的酵母膏,推测是由于随着速效氮源的减少,复合氮源优势下降所致。

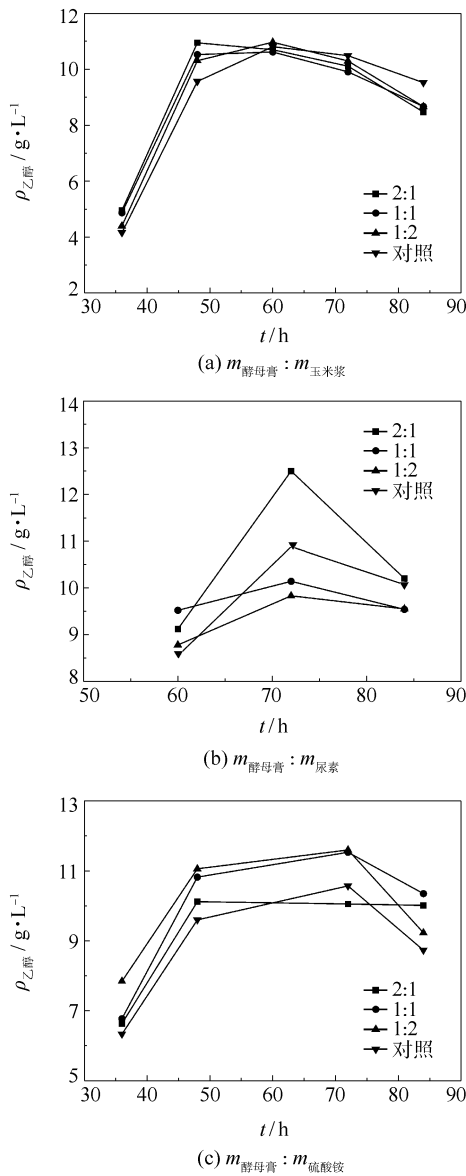


图 5 复合氮源对管囊酵母 D-21 木糖发酵产乙醇的影响

Fig. 5 Effects of different compound nitrogen sources on the ethanol fermentation of xylose by *Pachysolen tannophilus* D-21

### 2.3 碳源对管囊酵母木糖乙醇发酵的影响

保持总糖含量 50 g/L 不变, 纯木糖发酵培养基中以 1:1、1:2、1:3 (葡萄糖与木糖质量比) 的比例添加葡萄糖, 其他条件不变, 发酵结果如图 6 所示。

在纯木糖的发酵培养基中添加一定量的葡萄糖会使乙醇产量增加。60 h 时单独使用木糖的乙醇产量为 12.77 g/L, 当木糖与葡萄糖的比为 3:1 时乙醇产量为 15.27 g/L, 提高了近 20%。从趋势上看, 在少量的添加葡萄糖对发酵有促进作用, 但是添加量

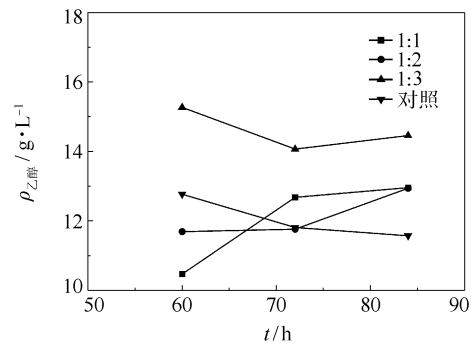


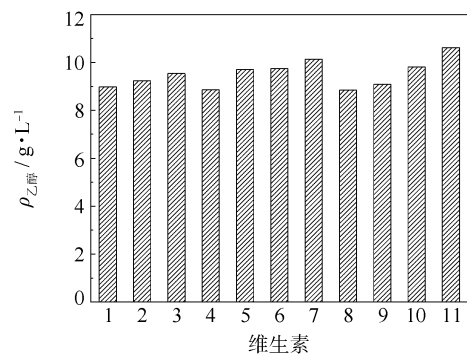
图 6 碳源对管囊酵母 D-21 木糖发酵产乙醇的影响

Fig. 6 Effects of different carbon sources on the ethanol fermentation of xylose by *Pachysolen tannophilus* D-21

过多时葡萄糖的抑制作用就比较明显了, 会阻碍木糖代谢进而影响乙醇产量。

### 2.4 维生素对乙醇发酵的影响

以 5 种维生素为实验对象, 其他发酵条件不变, 结果如图 7 所示。通过和对照组的比较可见, 大多数维生素会使乙醇产量上升, 因为维生素是最为常见的辅酶之一, 会促进某一部分代谢的进行, 但整体效果并不明显。维生素 B<sub>3</sub> 和 B<sub>6</sub> 相比之下效果较明显, 乙醇产量分别提高了 12.8% 和 18.3%, 有一定的实用价值, 当每一种维生素加入量增加时, 乙醇产量也会有增加, 因此, 可以把维生素 B<sub>3</sub> 和 B<sub>6</sub> 作为生长因子添加到发酵培养基中, 根据成本适量添加, 可提高乙醇产量。



1—对照组; 2— $w(B_1) = 10^{-5}$ ; 3— $w(B_1) = 2 \times 10^{-5}$ ; 4— $w(B_2) = 10^{-5}$ ; 5— $w(B_2) = 2 \times 10^{-5}$ ; 6— $w(B_3) = 10^{-5}$ ; 7— $w(B_3) = 2 \times 10^{-5}$ ; 8— $w(B_5) = 10^{-5}$ ; 9— $w(B_5) = 2 \times 10^{-5}$ ; 10— $w(B_6) = 10^{-5}$ ; 11— $w(B_6) = 2 \times 10^{-5}$

图 7 维生素对管囊酵母 D-21 木糖发酵产乙醇的影响

Fig. 7 Effects of added vitamins on the ethanol fermentation of xylose by *Pachysolen tannophilus* D-21

### 3 结论

以管囊酵母 D-21 为发酵菌株,当木糖质量浓度为 50 g/L,碳氮质量比为 20:1,使用酵母膏和尿素组成的复合氮源时(质量比为 2:1),6% 接种量,发酵 72 h 后所得乙醇质量浓度为 12.5 g/L,达到理论产量的 55%;当木糖与葡萄糖以 3:1 的质量比混合时,乙醇质量浓度为 15.72 g/L,为理论产量的 69%。

#### 参考文献:

- [1] 阴春梅,刘忠,齐宏升. 生物质发酵生产乙醇的研究进展[J]. 酿酒科技, 2007(1): 87-90.  
Yin C M, Liu Z, Qi H S. Research Progress in Ethanol Production by Biomass Fermentation[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2007(1): 87-90. (in Chinese)
- [2] Anderlund M, Rådström P, Hahn-Höggerdal B. Expression of Bifunctional Enzymes with Xylose Reductase and Xylitol Dehydrogenase Activity in *Saccharomyces cerevisiae* Alters Product Formation during Xylose Fermentation [J]. Metabolic Engineering, 2001, 3: 226-235.
- [3] Karhumaa K, Fromanger R, Hahn-Höggerdal B, et al. High activity of xylose reductase and xylitol dehydrogenase improves xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 73: 1039-1046.
- [4] Matsushika A, Sawayama S. Efficient Bioethanol Production from Xylose by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Requires High Activity of Xylose Reductase and Moderate Xylulokinase Activity [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2008, 106(3): 306-309.
- [5] Kuyper M, Harhangi H R, Stave A K, et al. High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: The key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. FEMS Yeast Research, 2003, 4: 69-78.
- [6] Hughes S R, Sterner D E, Bischoff K M, et al. Engineered *Saccharomyces cerevisiae* strain for improved xylose utilization with a three-plasmid SUMO yeast expression system [J]. Plasmid, 2009, 61: 22-38.
- [7] Madhavan A, Tamalampudi S, Ushida K, et al. Xylose isomerase from polycentric fungus *Orpinomyces*: gene sequencing, cloning, and expression in *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of xylose to ethanol [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2009, 82: 1067-1078.
- [8] Zhao L, Zhang X, Tan T W. Influence of various glucose/xylose mixtures on ethanol production by *Pachysolen tannophilus* [J]. Biomass and Bioenergy, 2008, 32: 1156-1161.
- [9] Sánchez S, Bravob V, Moya A J, et al. Influence of temperature on the fermentation of d-xylose by *Pachysolen tannophilus* to produce ethanol and xylitol [J]. Process Biochemistry, 2004, 39: 673-679.
- [10] 董林青,牛国文,刘志毅,等. 应用不同方法测定发酵液中的糖含量[J]. 广东化工, 2009, 36(9): 177-178.  
Dong L Q, Niu G W, Liu Z Y, et al. Determination of the Sugar Content in Fermentation Broth via Applications of Different Methods [J]. Guangdong Chemical Industry, 2009, 36(9): 177-178. (in Chinese)

## Optimization of the ethanol fermentation of xylose by *Pachysolen tannophilus* D-21

DAI JinLong SONG XinLei ZHANG Peng

(College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

**Abstract:** The effects of varying the inoculum size, nitrogen and carbon sources and added vitamins on the ethanol production and utilization ratio of xylose in the ethanol fermentation of xylose by *Pachysolen tannophilus* D-21 have been studied. Large inoculum sizes resulted in low yields of ethanol, and the optimum value was found to be 6%. When the xylose concentration was 50 g/L, the mass ratio of carbon to nitrogen was 15:1 and yeast extract and urea (with a mass ratio of 2:1) was used as the compound nitrogen source, after 72 h the mass concentration of ethanol obtained was 12.5 g/L, which is 55% of the theoretical yield. When the mass ratio of xylose and glucose was 3:1, the mass concentration of ethanol obtained was 15.72 g/L, which is 69% of the theoretical yield. The ethanol yield is promoted by addition of vitamins and ethanol production was enhanced by 18.3% by adding vitamin B<sub>6</sub>.

**Key words:** xylose; ethanol; fermentation; *Pachysolen tannophilus*