

高含量己糖玉米芯纤维素酶解液 发酵产酒精的研究

赵 辉^{1,2}, 王海吉^{1,2}, 王 威^{1,2}, 凌宏志^{1,2}, 平文祥^{1,2}

(1. 黑龙江大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150080;

2. 农业微生物技术教育部工程研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150500)

摘 要: 将玉米芯粉碎成 1~2cm³ 的颗粒, 15g/100mL 硫酸喷雾浸润, 萃取脱去其中戊糖后进行三级逆向酶解和萃取工艺, 得到质量浓度为 10.26g/100mL 的己糖水溶液。利用酒精酵母进行此高质量浓度的己糖酶解液进行发酵, 以酒精产率为响应值, 对 MgSO₄、KH₂PO₄、CaCl₂ 的添加量, 以及豆粕水解液、麸皮水解液、酵母泥添加量, 共 6 个影响因素进行 Plackett-Burman 试验设计, 优化其发酵条件。结果表明: Plackett-Burman 试验确定 MgSO₄、KH₂PO₄ 和豆粕水解液为显著影响因素, 经最陡爬坡和中心组合试验得到 MgSO₄ 0.045g/100mL、KH₂PO₄ 0.135g/100mL、豆粕水解液 7.34g/100mL, 在此条件下时发酵结果最佳, 实际酒精产率为 88.64g/L。

关键词: 己糖; 玉米芯; 酶解; 乙醇发酵

Ethanol Production by Fermentation of Corncob Hydrolysate with High Ratio of Hexose Prepared with Cellulase

ZHAO Hui^{1,2}, WANG Hai-ji^{1,2}, WANG Wei^{1,2}, LING Hong-zhi^{1,2}, PING Wen-xiang^{1,2}

(1. College of Life Science, Heilongjiang University, Harbin 150080, China;

2. Engineering Research Center of Agricultural Microbiology Technology, Ministry of Education, Harbin 150500, China)

Abstract: Corncocks were crushed into 1—2 cm³, moistened by spraying 15g/100mL sulfuric acid, extracted for the removal of pentose, and then subjected to three-step countercurrent enzymatic hydrolysis and extraction. Hydrolysate with a hexose content of 10.26 g/100 mL was obtained. The fermentation of the hydrolysate by *Saccharomyces cerevisiae* HF2.0 for ethanol production was investigated. Plackett-Burman (PB) design was used to analyze the effects of MgSO₄, KH₂PO₄, CaCl₂, soybean meal hydrolysate, wheat bran hydrolysate, and yeast mud added to the hydrolysate on ethanol production. MgSO₄, KH₂PO₄ and soybean meal hydrolysate were identified as the main influential factors. As determined by steepest ascent tests and central composite design, the best fermentation results were obtained when the concentrations of MgSO₄, KH₂PO₄ and soybean meal hydrolysate were 0.045, 0.135 g/100 mL and 7.34 g/100 mL, respectively, resulting in an ethanol yield of 88.64 g/L.

Key words: hexose; corn cob; enzymatic hydrolysis; ethanol fermentation

中图分类号: Q815

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)07-0215-04

传统的不可再生能源产量的限制, 能量消耗的急剧增加以及使用过程中对环境不可恢复性破坏, 都使得开发新型能源成为了研究热点。以农产物^[1-4]、农林废弃物^[5-8]等纤维质为原料生产酒精, 将为人类提供取之不尽的新能源^[1-8], 我国纤维原料丰富, 运用生物技术将其降解并发酵生成酒精, 对开发新能源、环境保护及在医药、食品等方面的应用具有重要意义^[9-11]。但纤维质原料酒精发酵存在着粉碎粒度、水解效率和发酵效率等诸多问题^[12-16], 其中原料含 30% 左右的半纤维素, 其

水解后生成的戊糖不能被酒精酵母所利用, 也是影响纤维质酒精发酵的重要因素。

去除玉米芯水解液中的五碳糖, 可有效地解决酒精酵母不能直接利用五碳糖的问题, 减少具有毒性作用和抑制作用的水解产物生成, 还可利用萃取收集的五碳糖水溶液发酵生产乳酸: 木糖醇等产品, 极大提高了原料的利用率和发酵效率, 具有重要的应用价值^[17]。同时利用三级逆向萃取式酶解工艺收集得到菌种发酵所需的高质量浓度己糖酶解液, 可大幅度降低生产成本。并利

收稿日期: 2011-07-08

基金项目: 哈尔滨市科技局科技创新人才专项(2011RFQXN056); 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12511409)

作者简介: 赵辉(1971—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为发酵工程。E-mail: zhaohui9463@sohu.com

用酒精酵母进行此高质量浓度的己糖酶解液进行发酵,以酒精产率为响应值,对 MgSO_4 、 KH_2PO_4 、 CaCl_2 、豆粕水解液、麸皮水解液、酵母泥添加量,共6个影响因素进行 Plackett-Burman(PB)试验设计,优化其发酵条件。以期得到以纤维质为原料的高产率酒精。

1 材料与方法

1.1 材料与菌种

玉米芯来自哈尔滨市呼兰区,风干粉碎至 $1\sim 2\text{cm}^3$ 。

酒精酵母 *Saccharomyces cerevisiae* HF2.0 本实验室保藏。

1.2 试剂与仪器

纤维素酶(酶活力 $30\text{U}/\text{mg}$) 上海蓝季科技发展有限公司;正丙醇、甲醇、乙醛、异丁醇、异戊醇、乙酸丁酯均为色谱纯;其余试剂均为分析纯。

DNP-9082 电热恒温培养箱 上海精宏实验设备有限公司;UV755B 紫外分光光度计 上海精密科学仪器有限公司;HZS-H 水浴振荡器 哈尔滨东联电子技术有限公司;LD24-08 医用离心机 北京医用离心机厂;GC7890 气相色谱仪 上海天美科学仪器有限公司;不锈钢柱式水解反应器($50\text{cm} \times 50\text{cm}$) 本实验室设计加工。

1.3 方法

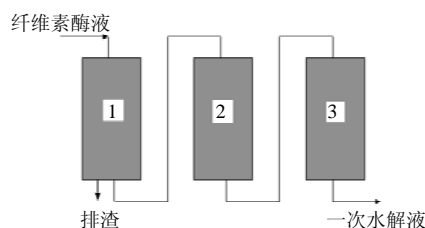
1.3.1 玉米芯脱戊糖预处理

以粉碎度为 $1\sim 2\text{cm}^3$ 的大颗粒玉米芯为底物,按固液比 $15:1(\text{m}/\text{V})$ 的比例,用质量浓度为 $15\text{g}/100\text{mL}$ 的硫酸喷洒浸润过夜,在不锈钢柱式水解反应器内, 100°C 常压蒸汽水解 3h 。用 70°C 的水对常压蒸汽水解的玉米芯进行多次固液萃取,充分脱除其中的戊糖。

采用大颗粒粉碎、喷酸浸润和常压蒸汽水解对玉米芯进行预处理的方法,用水进行固液萃取后,水解液还原糖含量 74.61% 为木糖,而其中戊糖脱除率达到了 86.19% 。

1.3.2 高含量己糖酶解液的制备

在纤维素酶用量 $40\text{U}/\text{g}$ 、酶解温度 50°C 、酶解时间 54h 的单级酶解优化条件基础上,利用三级逆向萃取酶解工艺制备纤维素酶解液,每级酶解时间为 18h ,连续多次收集纤维素酶解液,工艺流程如图1所示。先在反应容器(1、2、3)中依次加入预处理后并酶解萃取过2次、1次和未进行酶解的玉米芯,然后向1号反应容器中加入纤维素酶,依次顺序萃取酶解,3号反应器萃取酶解后收集最终一次酶解液,同时将1号反应器残渣排掉,重新装入预处理后的玉米芯,以此循环收集得到己糖质量浓度稳定的酶解液,最终酶解液己糖质量浓度稳定在 $10.26\text{g}/100\text{mL}$ 左右,与酒精酵母对酶解液的还原糖浓度需求相适应。



1、2、3. 反应容器。

图1 三级逆向萃取酶解示意图

Fig.1 Diagram of three-step countercurrent extraction

1.3.3 酒精发酵条件的优化

1.3.3.1 Plackett-Burman 试验设计

利用脱掉戊糖并经过三级逆向萃取酶解工艺得到的高质量浓度 $10.26\text{g}/100\text{mL}$ 己糖玉米芯纤维素酶解液,在发酵罐中 30°C 条件下发酵 72h 。在预实验基础上,进行 Plackett-Burman 试验,因素水平方案见表1。对纤维素酶解液发酵培养基中6个影响因素进行筛选:即3种无机盐 MgSO_4 、 KH_2PO_4 、 CaCl_2 ,3种工农业副产物豆粕水解液、麸皮水解液、酵母泥,外加3个虚拟变量(x_3 、 x_5 、 x_8),共进行12组试验确定每个因素的影响水平。

表1 Plackett-Burman 试验因素水平设计

Table 1 Factors and levels in Plackett-Burman design

因素	低水平(-)	高水平(+)
x_1 $\text{MgSO}_4/(\text{g}/100\text{mL})$	0.02	0.06
x_2 $\text{KH}_2\text{PO}_4/(\text{g}/100\text{mL})$	0.1	0.14
x_4 $\text{CaCl}_2/(\text{g}/100\text{mL})$	0.2	0.24
x_6 酵母泥 $/(\text{g}/100\text{mL})$	0.5	1.5
x_7 麸皮水解液 $/(\text{g}/100\text{mL})$	5	15
x_9 豆粕水解液 $/(\text{g}/100\text{mL})$	4	8

1.3.3.2 最陡爬坡试验

根据 Plackett-Burman 试验结果,以及各个显著影响因素效应的大小设定步长及变化方向,找出峰值,以快速逼近最佳响应区域。

1.3.3.3 中心组合试验设计

在 Plackett-Burman 试验和爬坡试验结果基础上,应用旋转中心组合设计(CCD)法对纤维素酶解液发酵条件进行研究。以酒精产率为响应值,进行三因素三水平响应面试验设计,具体见表2,确定得到最适酒精发酵条件。

表2 中心组合设计试验因素及水平

Table 2 Factors and levels in central composite rotatable design

编码及水平	X_1 MgSO_4 质量浓度 $/(\text{g}/100\text{mL})$	X_2 KH_2PO_4 质量 $/(\text{g}/100\text{mL})$ 浓度	X_3 豆粕水解液质量浓度 $/(\text{g}/100\text{mL})$
-1	0.04	0.12	6
0	0.06	0.14	8
1	0.08	0.16	10

2 结果与分析

2.1 Plackett-Burman 试验结果

表3 Plackett-Burman 试验结果
Table 3 Plackett-Burman design and results

试验号	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	Y 酒精产率/(g/L)
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	75.74
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	80.48
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	86.00
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	73.59
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	76.28
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	86.00
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	78.90
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	59.43
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	62.33
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	82.85
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	67.32
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	62.06
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	74.32
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	79.70
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	78.90
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	79.00

表4 偏回归系数及影响因素的显著性分析
Table 4 Significance analysis of partial regression coefficients and influential factors

变异来源	回归系数	标准误差	t 值	Prob>t
x ₁	9.816667	1.997293	4.914985	0.002670
x ₂	9.83	1.997293	4.921661	0.002652
x ₃	4.723333	1.997293	2.364867	0.055911
x ₄	-4.82667	1.997293	-2.4166	0.052103
x ₅	2.466667	1.997293	1.235005	0.262994
x ₆	1.833333	1.997293	0.917909	0.394068
x ₇	-1.65667	1.997293	-0.82946	0.438593
x ₈	-4.73	1.997293	-2.36821	0.055657
x ₉	6.936667	1.997293	3.473034	0.013255

对表3中的酒精产率数据进行回归分析,得到各影响因素的偏回归系数及其显著性分析见表4。 $x_1(P=0.00267)$ 、 $x_2(P=0.002652)$ 、 $x_9(P=0.013255)$ 是影响纤维素酶解液酒精发酵的主要因素,3个因素在93%水平上影响显著,其他因素影响不显著。除去不显著影响因素,回归得到一次拟合方程: $Y=75.18125+4.908333x_1+4.915x_2+3.468333x_9$ 。方差分析表明, $P=0.00742$,表明所得回归方程极显著; $R^2=0.9307$,说明相关性较好,即该模型与实际拟合较好; $R^2_{Adj}=0.8267$,表明82%的试验数据的变异性可用此回归模型来解释,因此说明酶解液发酵培养基 Plackett-Burman 试验优化设计数据具有统计学意义。

2.2 最陡爬坡试验

表5 最陡爬坡试验设计及结果

Table 5 Steepest ascent test design and results

试验号	X ₁ MgSO ₄ 质量浓度/(g/100mL)	X ₂ KH ₂ PO ₄ 质量浓度/(g/100mL)	X ₃ 豆粕水解液质量浓度/(g/100mL)	酒精产率/(g/L)
1	0.04	0.12	6	86.00
2	0.05	0.13	7	88.37
3	0.06	0.14	8	89.95
4	0.07	0.15	9	74.17
5	0.08	0.16	10	72.59

以 Plackett-Burman 试验为基础,根据各影响因素的影响效果设计步长进行最陡爬坡试验,MgSO₄、KH₂PO₄和豆粕水解液三因素试验设计及发酵结果如表5所示,确定了爬坡试验中的第3组为中心点,并为进行中心组合设计的步长提供了依据。

2.3 响应面分析法优化培养基

表6 中心组合试验设计及结果

Table 6 Central composite rotatable design and results

试验号	X ₁	X ₂	X ₃	Y/(g/L)
1	-1	-1	0	74.17
2	-1	1	0	82.06
3	1	-1	0	72.59
4	1	1	0	74.17
5	0	-1	-1	75.75
6	0	-1	1	67.85
7	0	1	-1	75.75
8	0	1	1	83.12
9	-1	0	-1	75.75
10	1	0	-1	77.32
11	-1	0	1	83.63
12	1	0	1	67.85
13	0	0	0	89.75
14	0	0	0	87.17
15	0	0	0	83.01

表7 回归方程方差分析

Table 7 Analysis of variance of regression equation

方差来源	自由度	平方和	均方和	F 值	显著性
X ₁	1	70.0928	70.0928	11.57267	0.019212
X ₂	1	76.50845	76.50845	12.63192	0.016316
X ₃	1	0.56181	0.56181	0.092756	0.772971
X ₁ ²	1	99.37654	99.37654	16.40756	0.009819
X ₁ X ₂	1	9.954025	9.954025	1.643459	0.256074
X ₁ X ₃	1	75.25562	75.25562	12.42508	0.016831
X ₂ ²	1	120.2965	120.2965	19.86155	0.006661
X ₂ X ₃	1	58.29323	58.29323	9.624500	0.026782
X ₃ ²	1	104.4193	104.4193	17.24015	0.008892
一次项	3	147.1631	49.05435	8.099116	0.022965
二次项	3	280.9973	93.66576	15.46468	0.005801
交互项	3	143.5029	47.83429	7.897679	0.024158
失拟项	3	7.153900	2.384633	0.206195	0.885185
误差	2	23.12987	11.56493		
总和	14	601.9470			

以 Plackett-Burman 试验和最陡爬坡试验确定中心组合设计的因素和水平。以 $\text{MgSO}_4(X_1)$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4(X_2)$ 、豆粕水解液(X_3)为影响因素,酒精产率为响应值(Y),中心组合试验设计及结果分析见表 6、7。运用 SAS 程序软件对试验数据进行分析并得到回归方程:

$$Y = -1198.78 + 9978.917X_1 + 13266.33X_2 + 46.24583X_3 - 51879.17X_1^2 - 15775X_1X_2 - 433.75X_1X_3 - 57079.17X_2^2 + 381.75X_2X_3 - 5.317917X_3^2.$$

由表 7 可知,方程一次项、二次项和交互项影响是显著的,回归方程的决定系数 $R^2 = 0.9497$,且 F 检验极显著,说明所拟合的方程合适,另外失拟项不显著,说明回归显著,对实验拟合情况良好。

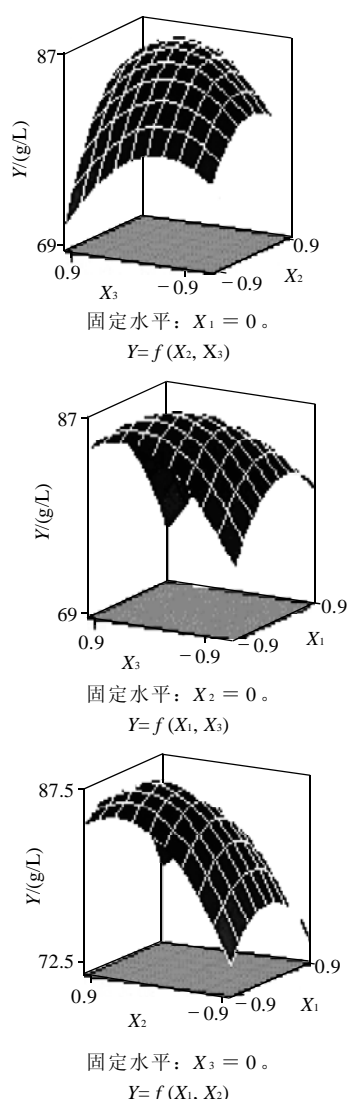


图2 MgSO_4 、 KH_2PO_4 和豆粕水解液对酒精产率影响的响应面图
Fig.2 Response surface plots showing the effects of MgSO_4 , KH_2PO_4 and soybean meal hydrolysate on ethanol yield

根据回归方程可以得到响应面图以及等高线图,响应面如图 2 所示,通过 SAS 软件对回归方程求解,

得到 MgSO_4 质量浓度 $0.045\text{g}/100\text{mL}$ 、 KH_2PO_4 质量浓度 $0.135\text{g}/100\text{mL}$ 、豆粕水解液质量浓度 $7.34\text{g}/100\text{mL}$ 时发酵结果最佳,模型预测理论得到酒精发酵产率为 $88.02\text{g}/\text{L}$,验证理论添加量实验,实际得到酒精产率为 $88.64\text{g}/\text{L}$ 。

3 结 论

采用 $1\sim 2\text{cm}^3$ 大颗粒粉碎、喷酸浸润、常压蒸汽水解和固液萃取对玉米芯进行预处理后,酶解液中还原糖含量 74.61% 为木糖,而戊糖脱除率达 86.19% ,解除了戊糖对酒精酵母的抑制。再经三级逆向萃取酶解后,酶解液中已糖质量浓度达到了 $10.26\text{g}/100\text{mL}$,利用酒精酵母直接对此质量浓度的酶解液进行酒精发酵,同时采用无机盐、工农业副产物优化发酵培养基,结合 Plackett-Burman 设计和中心组合设计确定添加 $0.045\text{g}/100\text{mL}$ 的 MgSO_4 、 $0.135\text{g}/100\text{mL}$ 的 KH_2PO_4 、 $7.34\text{g}/100\text{mL}$ 的豆粕水解液优化发酵培养基,分批发酵 72h ,发酵醪液中酒精产率为 $88.64\text{g}/\text{L}$,虽与淀粉酒精发酵的产率尚有差距,但此工艺是对纤维素酒精发酵的创新性探索,为纤维素酒精发酵工业化提供了新的思路。

参考文献:

- [1] TOLAN J S. Iogen's process for producing ethanol from cellulosic biomass[J]. Clean Techn Environ Policy, 2002, 3(4): 339-345.
- [2] SUN Ye, CHENG Jiayang. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review[J]. Bioresource Technology, 2002, 83(1): 1-11.
- [3] TAHERZADEH M J, KEIKHOSRO K. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review[J]. Bio Resources, 2007, 2(3): 472-499.
- [4] 刘海峰. 乙醇燃料的发展应用现状和前景[J]. 广西节能, 2005(3): 31-33.
- [5] 钱伯章. 世界能源消费现状和可再生能源发展趋势(上)[J]. 节能与环保, 2006(3): 8-11.
- [6] 丁文斌, 王雅鹏, 徐勇. 生物质能源材料: 主要农作物秸秆产量潜力分析[J]. 中国人口·资源与环境, 2007, 17(5): 84-89.
- [7] 孙智谋, 蒋磊, 张俊波, 等. 世界各国木质纤维原料生物转化燃料乙醇的工业化进程[J]. 酿酒科技, 2007(1): 91-94.
- [8] 赵向东. 美国纤维素乙醇产业化发展概况[J]. 全球经济科技瞭望, 2009, 24(9): 34-38.
- [9] 白少成. 浅谈世界能源危机及中国的战略抉择[J]. 试验科学与技术, 2006(12): 168-170.
- [10] 瞿国华. 试论大农业对我国生物质能源产业发展的重要影响[J]. 中外能源, 2009, 14(3): 23-29.
- [11] 钱伯章. 我国纤维素乙醇开发进展[J]. 化工新型材料, 2009, 37(3): 41-43.
- [12] COHEN R, SUZUKI M R, HAMMEL K E, et al. Processive endoglucanase active in crystalline cellulose hydrolysis by the brown rot basidiomycete gloeophyllum trabeum[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(5): 2412-2417.
- [13] ZVEREV V V, SCHANTZ N, SCHWARZ W H. A major new component in the cellulosome of clostridium thermocellum is a processive endo-beta-1,4-glucanase producing cellotetraose[J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 249(2): 353-358.
- [14] 栗微, 吴正舜. 木屑纤维素酶水解条件的试验研究[J]. 可再生能源, 2007, 25(2): 41-43.
- [15] 吕学斌, 张毅民, 杨静, 等. 玉米秸秆酶水解条件的优化研究[J]. 化学工程, 2008, 36(2): 59-62.
- [16] TAHERZADEH M J, KEIKHOSRO K. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review[J]. Bio Resources, 2007, 2(3): 472-499.
- [17] 赵辉, 吴国峰, 章克昌. 玉米芯半纤维素常压酸水解技术的研究[J]. 黑龙江大学自然科学学报, 2003, 20(1): 118-120.