

刘俊红,杨红霞,李子健,等.嗜鞣管囊酵母发酵条件对纤维素制备乙醇的影响[J].江苏农业科学,2015,43(8):384-385,413.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.08.124

嗜鞣管囊酵母发酵条件对纤维素制备乙醇的影响

刘俊红¹,杨红霞²,李子健¹,李 森¹

(1.河南城建学院生命科学与工程学院,河南平顶山 467036; 2.鹤壁职业技术学院,河南鹤壁 458030)

摘要:狗牙根中含有丰富的纤维素,经纤维素酶酶解形成的还原糖通过嗜鞣管囊酵母发酵可以得到生物乙醇。以狗牙根为原料,分析嗜鞣管囊酵母发酵过程中培养时间、接种量、pH 值、温度等因素对乙醇得率的影响,探索最佳的发酵工艺条件。结果表明, pH 值为 5.0、温度 40 ℃、嗜鞣管囊酵母菌液(1 亿个/mL)接种量 0.073 0 mL/g、发酵时间 60 h 为生产乙醇的最佳条件,此时乙醇浓度为 5.146 mg/mL。

关键词:生物乙醇;嗜鞣管囊酵母;发酵;纤维素;狗牙根

中图分类号:TQ352 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)08-0384.02

21 世纪,社会经济飞速发展,对能源的需求也越来越大,以煤炭为主的能源消耗结构是我国空气质量不断恶化的主要原因^[1],寻找新的替代能源是当务之急。生物乙醇是一种新型能源,然而最初生物乙醇的生产主要以玉米、小麦为原料,不仅消耗大量农产品,成本高,而且威胁到国家的粮食安全,影响粮食的正常供应,导致农产品价格上涨等连锁反应^[2-3]。因此,第 2 代利用纤维素生产生物乙醇的技术引起较大关注^[4],这不仅可以大大缓解能源压力,也可以避免人和能源之间的争粮现象。狗牙根含有丰富的纤维素,经稀酸预处理,在纤维素酶和木聚糖酶作用下可降解得到还原糖,接种嗜鞣管囊酵母发酵可制备生物乙醇。本试验通过研究 pH 值、时间、温度、嗜鞣管囊酵母接种量等因素对狗牙根糖化液发酵产生乙醇得率的影响,通过正交试验探索狗牙根糖化液制备乙醇的最佳发酵条件,为狗牙根的开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

从河南城建学院图书馆后的山脚下采集成熟的狗牙根(*Bermuda grass*)植株,洗净烘干,用粉碎机粉碎,过 60 目筛,密封保存,备用。

1.2 主要试剂

葡萄糖、盐酸、氢氧化钠,天津市博迪化工有限公司产品;酵母膏、蛋白胨,北京奥博星生物技术有限责任公司产品;纤维素酶、木聚糖酶,和氏璧生物技术有限公司产品。

1.3 试验仪器

QE-100 屹立高速中药粉碎机,武义县屹立工具有限公司生产;FA1004B 电子天平,上海越平科学仪器有限公司生产;HWS28 型电热恒温水浴锅,上海一恒科学仪器有限公司生产;LDZX-75KBS 立式电热压力蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械厂生产;PHSJ-3F pH 计,上海精密科学仪器有限公司

生产;T6 新世纪紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限公司生产;ZFD-A5250 生化培养箱、HZQ-L 恒温培养摇床,上海智城分析仪器制造有限公司生产。

1.4 试验方法

1.4.1 pH 值测定 称取狗牙根粉末 1 g,加入 1% 稀盐酸,120 ℃ 反应 60 min;调节 pH 值为 4.2,加入木聚糖酶和纤维素酶酶解,测还原糖的量;根据还原糖含量配制液体培养基,分别调 pH 值为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0;灭菌,接种嗜鞣管囊酵母菌液(1 亿个/mL)0.094 9 mL/g,30 ℃ 摇床培养 36 h;蒸馏测定乙醇含量。

1.4.2 温度测定 称取狗牙根粉末 1 g 分装在试管中,加入 1% 稀盐酸,120 ℃ 反应 60 min;调节 pH 值为 4.2,加入木聚糖酶和纤维素酶酶解,根据还原糖含量配制液体培养基,调 pH 值为 5.5;灭菌,接种菌液 0.094 9 mL/g,分别放于 20、25、30、35、40 ℃ 摇床中培养 36 h;蒸馏测定乙醇含量。

1.4.3 接种量测定 称取狗牙根粉末 1 g 分装在试管中,加入 1% 稀盐酸,120 ℃ 反应 60 min;调节 pH 值为 4.2,加入木聚糖酶和纤维素酶酶解,根据还原糖含量配制液体培养基,调 pH 值为 5.5;灭菌,分别接种菌液 0.029 2、0.051 1、0.073 0、0.094 9、0.116 8 mL/g,放于 30 ℃ 摇床中培养 36 h;蒸馏测定乙醇含量。

1.4.4 时间测定 称取 1 g 狗牙根粉末分装在试管中,加入 1% 稀盐酸,120 ℃ 反应 60 min;调节 pH 值为 4.2,加入木聚糖酶和纤维素酶酶解,根据还原糖含量配制液体培养基,调 pH 值为 5.5;灭菌,接种菌液 0.094 9 mL/g,放于 30 ℃ 摇床中分别培养 36、48、60、72、84 h;蒸馏测定乙醇含量。

1.4.5 正交试验 在单因素试验基础上设计 4 因素 3 水平正交试验(表 1),分析狗牙根纤维素发酵制备生物乙醇的最优工艺条件。

表 1 纤维素制备乙醇发酵条件正交试验设计

水平	因素			
	A:pH 值	B:温度(℃)	C:接种量(mL/g)	D:时间(h)
1	4.5	30	0.073 0	48
2	5.0	35	0.094 9	60
3	5.5	40	0.116 8	72

收稿日期:2014-08-21
基金项目:河南省科技厅基础与前沿项目(编号:092300410083)。
作者简介:刘俊红(1972—),女,河南鹤壁人,博士,副教授,从事生物能源技术研究。E-mail:ljhw1@126.com。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 pH 值对嗜鞣管囊酵母发酵产量的影响 由图 1 可见,嗜鞣管囊酵母适于在 pH 值为 4.5~5.0 的酸性环境中生长;pH 值为 5.0 时,生产出的乙醇浓度相对较高,为 2.259 mg/mL。pH 值改变不太剧烈时,酶虽未变性,但会影响酶分子活性部位有关基团的解离,从而进一步影响酶与底物的结合或催化,使酶活性降低,也可能影响中间络合物 ES 的解离状态,不利于催化生成产物^[5]。因此,低于或高于最适 pH 值,都会影响乙醇的产量。

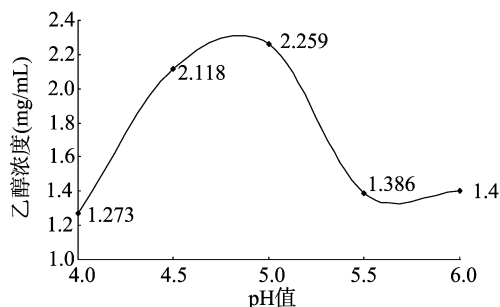


图1 不同 pH 值对嗜鞣管囊酵母发酵效果的影响

2.1.2 温度对嗜鞣管囊酵母发酵产量的影响 温度能够影响蛋白质、核酸等生物大分子的结构功能及细胞结构,而细胞膜的流动性及完整性均可影响微生物的生长、繁殖和代谢^[6]。由图 2 可见,温度过低或过高都会影响细胞生长,进而影响乙醇的得率;35℃时,菌株活力相对最为活跃,细胞膜的流动性达到最佳状态,此时发酵液中乙醇浓度相对较高,为 4.076 mg/mL;20℃时,菌种的发酵能力欠佳,生长速度比较缓慢,生长周期延长,积累的代谢产物乙醇产量相对较低。

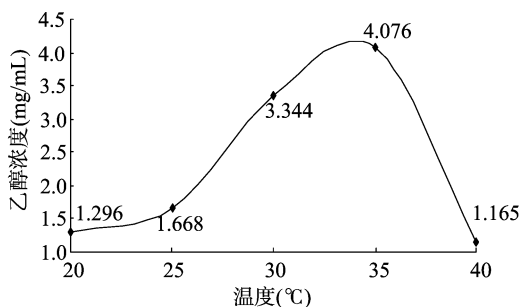


图2 不同温度对嗜鞣管囊酵母发酵效果的影响

2.1.3 接种量对嗜鞣管囊酵母发酵产量的影响 由图 3 可见,随着接种量增加,乙醇得率也逐渐升高,接种量为 0.094 9 mL/g 时,乙醇的得率相对最高,为 1.02 mg/mL;接种量过低,由于没有足够的酵母细胞进行发酵生产,培养基中的营养物质未得到充分利用,从而影响乙醇的得率。由于接种到新鲜培养液的种子细胞,一时缺乏分解或催化有关底物的酶或辅酶,或是缺乏充足的中间代谢物,在实际菌种生长过程中会产生诱导酶或合成有关的中间代谢物^[7-8],这就需要有一段用于适应的时间,出现延滞期。在发酵工业中,为缩短延滞期以缩短生产周期,通常都会采用较大的接种量。但是,如果接种量过高,培养基既要满足菌体生长,又要用于生产乙醇,反而会使乙醇的产量下降。

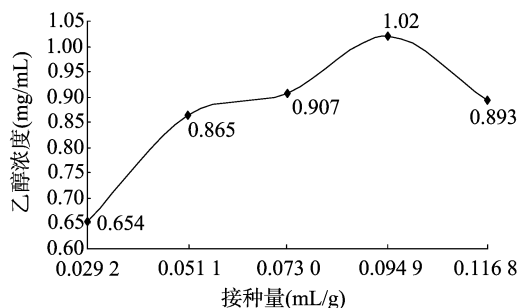


图3 不同接种量含量对嗜鞣管囊酵母发酵效果的影响

2.1.4 发酵时间对嗜鞣管囊酵母发酵产量的影响 菌种发酵生产乙醇需要一个合理的发酵周期,发酵时间直接影响着乙醇的产量。由图 4 可见,嗜鞣管囊酵母发酵培养的最佳时间为 60 h,此时,发酵液中乙醇浓度为相对最高,为 2.442 mg/mL;发酵 72 h 时,发酵液中乙醇浓度有所降低,这是因为嗜鞣管囊酵母发酵初期以发酵液中的葡萄糖为碳源,酵母不断代谢葡萄糖发酵成乙醇,而管囊酵母同化乙醇的能力很强^[9];发酵超过 72 h,发酵液中的葡萄糖含量减少,酵母可能开始利用乙醇为碳源来维持自身的生长和繁殖。

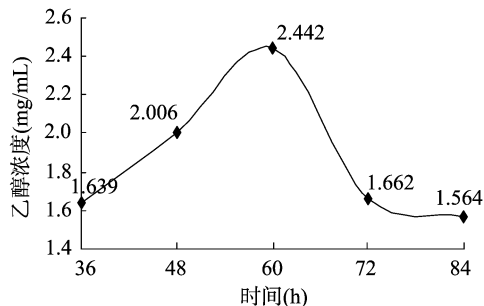


图4 不同发酵时间对嗜鞣管囊酵母发酵效果的影响

2.2 正交试验与工艺优化

由表 2 可见,影响乙醇产物得率的最关键因素是发酵温度;嗜鞣管囊酵母发酵狗牙根生成乙醇的最佳条件为 $A_2B_3C_1D_2$,即 pH 值为 5.0、温度 40℃、接种量 0.073 0 mL/g、时间 60 h,此时,乙醇浓度最高,为 5.146 mg/mL。

表 2 嗜鞣管囊酵母对狗牙根发酵的正交试验结果

试验号	A:pH 值	B:温度 (°C)	C:接种量 (mL/g)	D:时间 (h)	乙醇浓度 (mg/mL)
1	4.5	30	0.073 0	48	1.865
2	4.5	35	0.094 9	60	2.696
3	4.5	40	0.116 8	72	3.372
4	5.0	30	0.094 9	72	1.090
5	5.0	35	0.116 8	48	2.203
6	5.0	40	0.073 0	60	5.146
7	5.5	30	0.116 8	60	1.738
8	5.5	35	0.073 0	72	2.456
9	5.5	40	0.094 9	48	1.513
k_1	2.644	1.564	3.156	1.860	
k_2	2.813	2.452	1.766	3.193	
k_3	1.902	3.344	2.438	2.306	
R	0.911	1.780	1.390	1.333	

- [55] Giles D K, Slaughter D C. Precision band spraying with machine – vision guidance and adjustable yaw nozzles[J]. Transactions of the ASAE, 1997, 40(1): 29 – 36.
- [56] Lee W S, Slaughter D C, Giles D K. Robotic weed control system for tomatoes[J]. Precision Agriculture, 1999, 1(1): 95 – 113.
- [57] Burks T F, Shearer S A, Gates R S, et al. Back propagation neural network design and evaluation for classifying weed species using color image texture[J]. Transactions of the ASAE, 2000, 43(4): 1029 – 1037.
- [58] Burks T F, Shearer S A, Payne F A. Classification of weed species using color texture features and discrimination analysis [J]. Transactions of the ASAE, 2000, 43(2): 441 – 448.
- [59] 陈佳娟, 纪寿文, 李 娟, 等. 采用计算机视觉进行棉花虫害程度的自动测定[J]. 农业工程学报, 2001, 17(2): 157 – 160.
- [60] El – Helly M. El – Belagy S, and rafea a. image analysis based interface for diagnostic expert systems [C]. Proceedings of the Winter international symposium on information and Communication Technologies, 2004: 1 – 6.
- [61] 毛文华. 基于机器视觉的田间杂草识别技术研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2004.
- [62] 田有文, 李成华. 基于图像处理的日光温室黄瓜病害识别的研究[J]. 农机化研究, 2006(2): 151 – 153, 160.
- [63] 李峥嵘, 刘月娥, 何东健, 等. 基于内容的小麦害虫图像检索系统研究与实现[J]. 农业工程学报, 2007, 23(11): 210 – 215.
- [64] Sammany M T. Medhat; dimensionality reduction using rough Set Approach for two neural Networks – Based applications [C]. Rough Sets and Intelligent Systems Paradigms, 2007: 639 – 647.
- [65] 王树文, 张长利. 基于图像处理技术的黄瓜叶片病害识别诊断系统研究[J]. 东北农业大学学报, 2012, 43(5): 69 – 73.
- [66] Arribas J I, Sánchez – Ferrero G V, Ruiz – Ruiz G, et al. Leaf classification in sunflower crops by computer vision and neural networks[J]. Computers and Electronics in Agriculture, 2011, 78(1): 9 – 18.
- [67] Midtby H S, Mathiasen S K, Andersson K J, et al. Performance evaluation of a crop/weed discriminating microsprayer [J]. Computers and Electronics in Agriculture, 2011, 77(1): 35 – 40.
- [68] Slaughter D C, Harrell R C. Discriminating fruit for robotic harvest using color in natural outdoor scenes[J]. Transactions of the ASAE, 1989, 32(2): 757 – 763.
- [69] Sarig Y. Robotics of fruit harvesting: a state – of – the – art review [J]. Journal of Agricultural Engineering Research, 1993, 54(4): 265 – 280.
- [70] 周云山, 李 强, 李红英, 等. 计算机视觉在蘑菇采摘机器人上的应用[J]. 农业工程学报, 1995, 11(4): 27 – 32.
- [71] Kondo N, Nishitauji Y, Ling P P, et al. Visual feed back guided robotic cherry to mat to harvesting[J]. Transactions of the ASAE, 1996, 39(6): 2331 – 2338.
- [72] 应义斌, 章文英, 蒋亦元, 等. 机器视觉技术在农产品收获和加工自动化中的应用[J]. 农业机械学报, 2000(3): 112 – 115.
- [73] 周增产, Bontsema J, Vankollenburg C L. 荷兰黄瓜收获机器人的研究开发[J]. 农业工程学报, 2001, 17(6): 77 – 80.
- [74] 刘成良, 王红永, 曹其新, 等. 秧苗嫁接机器人视觉与识别的研究[J]. 农业机械学报, 2001, 32(4): 38 – 41.
- [75] 陈利兵. 草莓收获机器人采摘系统研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2005.
- [76] 张凯良, 杨 丽, 张铁中. 草莓收获机器人采摘执行机构设计与试验[J]. 农业机械学报, 2011, 42(9): 155 – 161.
- [77] Das K, Evans M D. Detecting fertility of hatching eggs using machine vision II: Neural network classifiers [J]. Transactions of the ASAE, 1992, 35(6): 2035 – 2041.
- [78] Tao Y. Automatic feather sexing of poultry chicks using ultraviolet imaging; US, 6396938 [P]. 2002 – 05 – 28.
- [79] Cockx L, Vanmeirvenne M, Vitharana U A, et al. Extracting topsoil information from EM38DD sensor data using a neural network approach[J]. Soil Science Society of America Journal, 2009, 73(6): 2051 – 2058.
- [80] Rasouli K, Hsieh W W, Cannon A J. Daily streamflow forecasting by machine learning methods with weather and climate inputs [J]. Journal of Hydrology, 2012, 414: 284 – 293.
- [81] Nuthall P L. The intuitive world of farmers—The case of grazing management systems and experts [J]. Agricultural Systems, 2012, 107: 65 – 73.
- [82] 张 梅, 文静华. 浅谈计算机视觉与数字摄影测量[J]. 地理空间信息, 2010, 8(2): 15 – 17, 20.

(上接第 385 页)

3 讨论

目前, 纤维素生产乙醇的研究主要集中于预处理方法的选择、工艺的优化、酶水解成本的降低及乙醇转化率的提高。利用预处理和双酶降解纤维素后的还原糖为原料, 接种单一的嗜鞣管囊酵母发酵制备乙醇, 乙醇的得率往往相对较低, 而多菌种混合发酵可充分利用培养基中的有效成分, 提高乙醇的得率, 这为进一步提高产量提供了依据^[10]。

参考文献:

- [1] 马春红, 李运朝, 刘 旭, 等. 生物质能源研究进展与前景展望[J]. 河北农业科学, 2011, 15(3): 117 – 121.
- [2] 鹿建光, 童莉霞, 李艳君. 我国生物燃料乙醇产业现状及发展政策研究[J]. 经济研究参考, 2008(43): 10 – 18.
- [3] 丁声俊. 我国发展生物燃料乙醇的长久大计[J]. 粮食与食品工业, 2010, 17(3): 1 – 5.
- [4] 林向阳, 阮榕生, 李资玲, 等. 利用纤维素制备燃料酒精的研究[J]. 可再生能源, 2005(6): 51 – 54.
- [5] 武玉学, 靳 挺, 王 强. 嗜鞣管囊酵母发酵柑橘皮水解液生产乙醇的研究[J]. 中国食品学报, 2011, 11(5): 32 – 36.
- [6] 代金龙, 宋昕磊, 张 鹏. 管囊酵母 D – 21 木糖乙醇发酵条件的优化[J]. 北京化工大学学报: 自然科学版, 2010, 37(5): 98 – 102.
- [7] 傅致远. 生物质制取燃料乙醇的研究[J]. 化学工程与装备, 2013(12): 42 – 44.
- [8] 张 越, 聂莉莉, 宋 建, 等. 木质纤维素为原料的燃料乙醇预处理技术研究进展[J]. 天津农业科学, 2011, 17(4): 113 – 116.
- [9] 田毅红, 雷照方, 龚大春. 管囊酵母发酵生产乙醇的试验研究[J]. 酿酒科技, 2008(1): 45 – 47.
- [10] 田 沈, 蔺增曦, 姚滢秋, 等. 嗜鞣管囊酵母 (*Pachysolen tannophilus* 1622) 和重组大肠杆菌 (*E. coli* pGM – PA) 乙醇发酵特性研究[J]. 太阳能学报, 2008, 29(1): 95 – 99.