

文章编号:1671-6833(2013)01-0044-05

汽爆玉米秸秆糖化及发酵丁醇工艺的优化研究

刘利平, 申利英, 常 春

(郑州大学 化工与能源学院, 河南 郑州 450001)

摘 要: 为了得到较高的丁醇浓度, 以汽爆玉米秸秆为原料, 对 6 种糖化工艺路线进行对比研究. 结果表明: 首先加入纤维素酶量的 1/3, 反应 24 h 后, 再加入 1/3 纤维素酶, 剩下的纤维素酶再隔 12 h 加入, 共糖化 48 h 是一条较佳的糖化工艺路线. 在此基础上, 通过单因素试验和正交试验的考察, 得到较优的丁醇发酵工艺条件. 采用优化的工艺条件进行发酵, 丁醇浓度达到了 9.42 g/L.

关键词: 汽爆玉米秸秆; 糖化; 丁醇; 发酵; 培养基

中图分类号: TQ920.6

文献标志码: A

doi:10.3969/j.issn.1671-6833.2013.01.011

0 引言

能源短缺与环境污染, 使新型生物能源的开发势在必行. 丁醇因其具有能量密度高、易与汽油混合等特点, 而成为替代石油的重要选择^[1]. 秸秆是地球上最丰富廉价的资源, 以秸秆为原料制备生物丁醇在解决粮食、能源、环境污染等问题中具有重要的作用.

微生物无法直接利用秸秆为底物进行丁醇发酵, 需将其水解产生葡萄糖、木糖等单糖后再用于丁醇发酵^[2]. 而水解后还原糖含量直接影响到丁醇的产量. 但目前, 对经蒸汽爆破预处理的玉米秸秆为原料, 进行糖化和丁醇发酵工艺研究的报道较少. 李冬敏等^[3]用汽爆玉米秸秆进行丁醇发酵, 丁醇浓度达到了 6.52 g/L. 其丁醇含量较低, 难以满足规模化应用的条件. 因此, 本研究尝试首先通过对汽爆玉米秸秆的糖化工艺进行考察, 筛选出最佳的糖化工艺, 并在此基础上, 分别对温度、pH 值、底物浓度、纤维素酶用量、菌种种龄及接种量、培养基的组成和发酵时间 8 个方面进行丁醇发酵工艺条件的试验研究, 得出汽爆玉米秸秆发酵丁醇的优化工艺, 为进一步的放大试验研究提供参考依据.

1 材料与方法

1.1 试验材料

丙酮丁醇梭菌 (*Clostridium acetbutylicum* ZZU

-01): 郑州大学生化中心保藏; 种子培养基: 5% 玉米醪; 种子液活化: 取一玉米醪储存的试管菌种, 沸水浴中处理 90 s. 然后在厌氧操作台上 (YQX-Ⅱ厌氧培养箱, 上海跃进医疗器械厂) 接种于 5% 玉米醪培养基, 活化至对数期; 纤维素酶: 滤纸酶活力 110 IU/mL; 汽爆玉米秸秆: 将玉米秸秆切至 3~4 cm 长, 于 1.5 MPa, 205 ℃ 条件下汽爆处理 8 min, 汽爆处理后秸秆经水洗脱毒并于 80 ℃ 干燥恒重后, 保藏待用; 酶解液的制备: 取一定量烘干的秸秆于锥形瓶中, 加自来水, 使底物质量分数为 15%. 然后按照糖化工艺设计的条件加入纤维素酶 (30 IU/g), 木聚糖酶 (200 IU/g), Tween-20 (质量分数为 0.15%), 调 pH 为 4.8, 于 50 ℃, 150 r/min 下反应一定时间后, 离心取上清液.

1.2 糖化工艺设计

以蒸汽爆破预处理的玉米秸秆为原料, 共进行了 6 种不同的秸秆糖化发酵丁醇工艺研究 (称为糖化工艺 I~VI). 分别对比了汽爆玉米秸秆经 6 种糖化工艺后的丁醇发酵结果. 不同糖化方法的具体工艺为

糖化工艺 I: 将纤维素酶一次性加入, 糖化 48 h;

糖化工艺 II: 首先加入纤维素酶量的 1/2, 反应 24 h 后再加入 1/2 纤维素酶, 共糖化 48 h;

糖化工艺 III: 将纤维素酶分成 3 等份, 首先加

收稿日期: 2012-09-13; 修订日期: 2012-11-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21176227)

作者简介: 刘利平 (1965-), 女, 河南郑州人, 郑州大学副教授, 博士, 主要从事化学工程方面的研究, E-mail: liulp@zzu.edu.cn.

入纤维素酶量的 1/3,每隔 6 h 加一次纤维素酶,共糖化 24 h;

糖化工艺Ⅳ:纤维素酶加入法与糖化工艺Ⅲ相同,但糖化时间延至 48 h;

糖化工艺Ⅴ:首先加入纤维素酶量的 1/3,反应 24 h 后,再加入 1/3 纤维素酶,剩下的纤维素酶再隔 12 h 加入,共糖化 48 h;

糖化工艺Ⅵ:初始底物体质量分数为 15%,加入相应量的纤维素酶,反应 24 h,每隔 12 h,补一次原料,并且加入相应量的纤维素酶,共糖化 48 h.

1.3 发酵培养基与培养方法

发酵培养基:秸秆酶解上清液 1 L,酵母抽提物 1 g, KH_2PO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, 尿素 2 g, CaCO_3 5 g^[3-4]. pH7.0, 121 ℃, 灭菌 20 min. 除了考察培养基的影响因素外,其他试验中的发酵培养基均采用以上基础培养基.

发酵方法:将活化 24 h 的种子液,按体积分数为 5% 接种量进行接种,首先采用 35 ℃,厌氧发酵 72 h 的条件,考察不同糖化工艺对丁醇发酵的影响.在此基础上,对丁醇发酵的温度、底物浓度、纤维素酶的用量、接种量和发酵时间进行了单因素试验;对培养基酵母抽提物, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 尿素和 CaCO_3 进行了 $L_{32}(7^4)$ 正交试验.在优化的基础上,对发酵后的丁醇产量进行了考察.

1.4 分析方法

(1) 秸秆成分测定:采用质量减重法^[5].

测得汽爆玉米秸秆主要成分为:纤维素的质量分数为 33.68%;半纤维素的质量分数为 7.29%;木质素的质量分数为 22.31%.

(2) 还原糖的测定:DNS 法^[6].

(3) 溶剂的测定:气相色谱法^[7].

2 试验结果与分析

2.1 糖化工艺对丁醇发酵的影响

根据 1.2 节的试验设计,以还原糖含量和发酵丁醇浓度为考察目标,试验结果如表 1 所示.

表 1 结果表明,糖化工艺Ⅵ的还原糖含量最高,为 48.77 g/L,但丁醇含量仅有 4.01 g/L,这可能是因为分批补料糖化使底物浓度增加的同时,也增加了抑制剂的浓度,严重抑制了丁醇发酵.糖化工艺Ⅰ与Ⅱ相比较,可知分步酶解要比一步酶解得到的还原糖含量高,还原糖含量的增加,也使得后续的丁醇发酵的浓度升高.以上结果表明,多

步糖化和适当的糖化时间能够更充分地酶解纤维素,提高还原糖的含量,从而提高后续的丁醇发酵浓度.糖化工艺Ⅴ的丁醇产量达到了 7.44 g/L,高于其它 5 种糖化发酵的丁醇产量,因此糖化工艺Ⅴ是汽爆玉米秸秆糖化发酵丁醇工艺中较优的工艺路线.下面在糖化工艺Ⅴ的基础上,进一步优化丁醇发酵的工艺条件.

表 1 不同糖化发酵试验结果
Tab.1 Fermentative results of different saccharification

糖化工艺	I	II	III	IV	V	VI
还原糖浓度/ (g · L ⁻¹)	34.66	36.18	31.96	40.58	40.58	48.77
丁醇浓度/ (g · L ⁻¹)	6.32	6.64	6.11	7.41	7.44	4.01

2.2 丁醇发酵工艺条件的优化

2.2.1 温度对发酵的影响

本研究以得到最高的丁醇浓度为考察目标,首先对温度的影响进行考察.试验条件为:底物浓度 15% (质量分数),纤维素酶用量 30 IU/g,接种量 7%,基础培养基,发酵时间 72 h.不同温度对丁醇发酵的影响如图 1 所示.由图可知,本试验中发酵温度为 37 ℃ 时,丁醇产量最高.

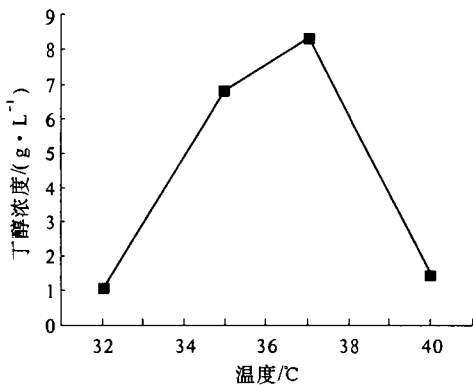


图 1 温度对发酵的影响
Fig.1 Effect of temperature on fermentation

2.2.2 底物浓度对发酵的影响

通常采用增加底物的方法,获得较高的丁醇产量,提高丁醇生产的经济性.但随着底物的增加,会造成有害抑制物的积累等一系列问题^[8].因此寻找适宜的底物浓度显得尤为必要.试验对底物浓度研究条件如下:温度 37 ℃,纤维素酶用量 30 IU/g,接种量 7%,基础培养基,发酵时间 72 h.考察不同底物浓度对发酵的影响,结果如图 2 所示.由图可知,当底物质量分数为 15% 时,丁醇浓度最高.

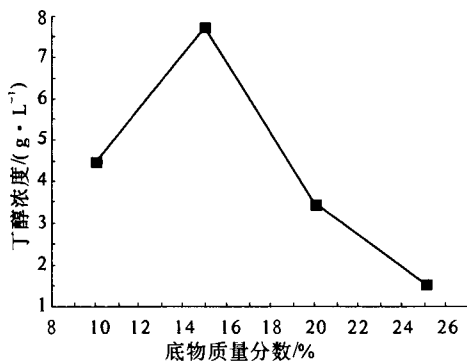


图2 底物浓度对发酵的影响

Fig.2 Effect of substrate concentration on fermentation

2.2.3 纤维素酶用量对发酵的影响

在丁醇发酵过程中,酶的水解对丁醇的生成有决定性的作用.在温度 37 ℃,底物浓度 15%,接种量 7%,基础培养基,发酵时间 72 h 的试验条件下,不同纤维素酶用量对发酵的影响如图 3 所示.图中结果表明,在纤维素酶用量 25 ~ 40 IU/g 的范围内,丁醇浓度随酶用量的增加而增加.较低的纤维素酶用量,不能有效的将秸秆酶解转化为还原糖,不利于后续的发酵;而较高的纤维素酶用量会增加生产成本.因此,选用 30 IU/g 为较优的纤维素酶用量.

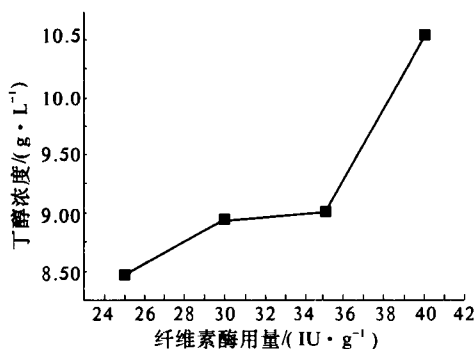


图3 纤维素酶用量对发酵的影响

Fig.3 Effect of loading of cellulase on fermentation

2.2.4 菌种接种量对发酵的影响

在发酵过程中,接种量与菌种的生长速度和丁醇的产量密切相关.因此,在温度 37 ℃、底物浓度 15%、纤维素酶用量 30 IU/g、基础培养基、发酵时间 72 h 的试验条件下,进一步考察接种量对发酵的影响,结果见图 4.接种量为 7% 时,丁醇产量最高.而接种量过高或过低,都会造成丁醇浓度明显下降.所以确定 7% 为最佳接种量.

2.2.5 培养基组成对发酵的影响

发酵培养基的组成对菌体的生长代谢和溶剂的生成有重要的影响.因此笔者重点考察了酵母

抽提物(A), KH_2PO_4 (B), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (C), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (D), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (E), 尿素(F)和 CaCO_3 (G) 7 种营养物组成对丁醇浓度的影响.试验条件为:温度 37 ℃、底物浓度 15%、纤维素酶用量 30 IU/g、接种量 7%、发酵时间 72 h.试验采用 $L_{32}(7^4)$ 正交试验进行培养基的优化,优化试验及结果见表 2.

由表 2 的数据可以得到,优化培养基组成为: KH_2PO_4 0.8 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/L, 尿素 3 g/L, CaCO_3 8 g/L.

进一步和丁醇浓度最高的 28 号试验进行验证试验,结果如表 3 所示.

由表 2 和表 3 的结果,可得到较优的培养基组合为:酵母抽提物 1 g/L, KH_2PO_4 0.8 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g/L, 尿素 2 g/L.在此条件下,发酵的丁醇浓度为 9.37 g/L.

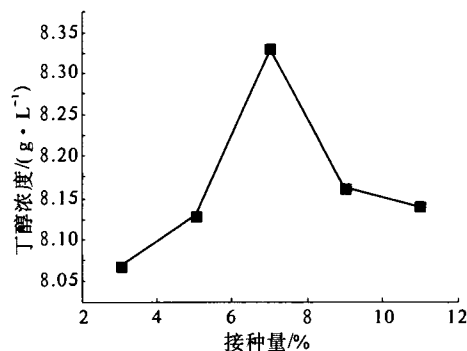


图4 接种量对发酵的影响

Fig.4 Effect of inoculums on fermentation

2.2.6 发酵时间对发酵的影响

发酵时间直接影响丁醇生产的效率.在温度 37 ℃、底物浓度 15%、纤维素酶用量 30 IU/g、接种量 7%,优化的培养基的条件下,不同发酵时间对发酵的影响结果见图 5.

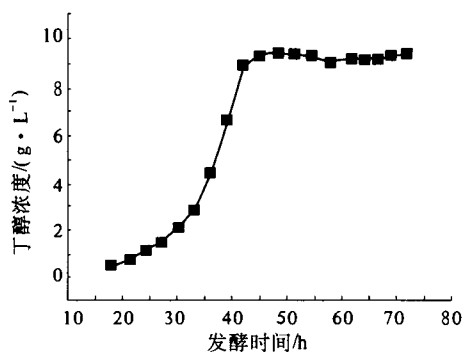


图5 发酵时间对发酵的影响

Fig.5 Effect of fermentation time on fermentation

表 2 培养优化的正交试验表
Tab.2 Results of orthogonal experiment

因素	$A/(g \cdot L^{-1})$	$B/(g \cdot L^{-1})$	$C/(g \cdot L^{-1})$	$D/(g \cdot L^{-1})$	$E/(g \cdot L^{-1})$	$F/(g \cdot L^{-1})$	$G/(g \cdot L^{-1})$	丁醇浓度/ $(g \cdot L^{-1})$
1	0	0	0	0	0	0	0	0.85
2	0	0.2	0.1	2	0.01	1	2	8.77
3	0	0.5	0.3	5	0.02	2	5	8.65
4	0	0.8	0.5	8	0.03	3	8	8.35
5	0.5	0	0	2	0.01	2	5	8.95
6	0.5	0.2	0.1	0	0	3	8	9.15
7	0.5	0.5	0.3	8	0.03	0	0	5.72
8	0.5	0.8	0.5	5	0.02	1	2	8.75
9	1	0	0.1	5	0.03	0	2	7.67
10	1	0.2	0	8	0.02	1	0	5.94
11	1	0.5	0.5	0	0.01	2	8	8.19
12	1	0.8	0.3	2	0	3	5	8.25
13	1.5	0	0.1	8	0.02	2	8	7.14
14	1.5	0.2	0	5	0.03	3	5	7.52
15	1.5	0.5	0.5	2	0	0	2	2.43
16	1.5	0.8	0.3	0	0.01	1	0	8.37
17	0	0	0.5	0	0.03	1	5	8.29
18	0	0.2	0.3	2	0.02	0	8	8.27
19	0	0.5	0.1	5	0.01	3	0	8.64
20	0	0.8	0	8	0	2	2	8.67
21	0.5	0	0.5	2	0.02	3	0	8.53
22	0.5	0.2	0.3	0	0.03	2	2	8.66
23	0.5	0.5	0.1	8	0	1	5	8.78
24	0.5	0.8	0	5	0.01	0	8	8.32
25	1	0	0.3	5	0	1	8	8.2
26	1	0.2	0.5	8	0.01	0	5	7.59
27	1	0.5	0	0	0.02	3	2	9.01
28	1	0.8	0.1	2	0.03	2	0	9.37
29	1.5	0	0.3	8	0.01	3	2	7.76
30	1.5	0.2	0.5	5	0	2	0	2.23
31	1.5	0.5	0	2	0.03	1	8	7.85
32	1.5	0.8	0.1	0	0.02	0	5	6.98
K_1	8.389	8.001	7.966	8.265	6.897	6.806	7.034	
K_2	8.358	7.266	8.313	7.803	8.324	8.119	7.715	
K_3	8.027	7.409	7.985	7.497	7.909	7.732	8.126	
K_4	6.285	8.383	6.795	7.494	7.929	8.401	8.184	
K	2.104	1.117	1.518	0.771	1.427	1.595	1.15	
优化	A_1	B_4	C_2	D_1	E_2	F_4	G_4	

试验结果表明,当发酵时间达到 48 h 时,丁醇浓度已基本趋于平稳. 因此,可以选择 48 h 为较优的发酵时间,此时的丁醇含量为 9.42 g/L.

表 3 两种培养基对发酵的影响
Tab.3 Effects of two kinds of medium on fermentation

培养基组合	丁醇浓度/ $(g \cdot L^{-1})$
28 号试验	9.37
正交试验	9.06

3 结论

(1)笔者通过对不同糖化发酵丁醇试验结果的比较,得到糖化工艺 V,即首先加入纤维素酶量的 1/3,反应 24 h 后,再加入 1/3 纤维素酶,剩下的纤维素酶再隔 12 h 加入,共糖化 48 h 是一条较佳的工艺路线.

(2)在糖化工艺 V 的基础上,通过对丁醇发酵工艺中 8 个影响因素的考察研究,得到了在温度

37 ℃,底物浓度 15%,纤维素酶用量 30 IU/g,接种量 7%,优化的培养基组成:酵母抽提物 1 g/L、 KH_2PO_4 0.8 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/L、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g/L、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g/L,尿素 2 g/L,发酵周期为 48 h 的条件下,丁醇浓度达到 9.42 g/L.

(3)试验表明汽爆玉米秸秆糖化发酵丁醇,取得了较好的发酵效果,为进一步的放大试验提供参考.

参考文献:

- [1] WU M, WANG M, LIU J, et al. Assessment of potential life-cycle energy and greenhouse gas emission effects from using corn-based butanol as a transportation fuel[J]. *Biotechnology Progress*, 2008, 24(6): 1204 - 1214.
- [2] QURESHI N, SAHA B C, DIEN B, et al. Production of butanol (a biofuel) from agricultural residues: Part I-Use of barley straw hydrolysate [J]. *Biomass and Bioenergy*, 2010, 34(4): 559 - 565.
- [3] 李冬敏,陈洪章. 汽爆秸秆膜循环酶解耦合丙酮丁醇发酵[J]. *过程工程学报*, 2007, 7(6): 1212 - 1216.
- [4] 陈守文,马昕,汪履绥,等. 稻草酶法水解液的丙酮丁醇发酵[J]. *工业微生物*, 1998, 28(4): 30 - 34.
- [5] 常春. 生物质制备新型平台化合物乙酰丙酸的研究[D]. 杭州: 浙江大学材料与化学工程学院, 2006.
- [6] 中国食品发酵工业研究院,北京宁馨儿生物科技有限公司,等. QB 2583—2003 附录 A(规范性附录)滤纸酶活力(FPA)的测定方法[S]. 北京:中国轻工业出版社, 2003.
- [7] 刘广慧,朱文众,胡铁功. 毛细管气相色谱法分析丙酮和丁醇发酵产物[J]. *食品与发酵工业*, 2007, 33(11): 115 - 117.
- [8] EZEJI T, QURESHI N, BLASCHEK H P. Butanol production from agricultural residues: Impact of degradation products on *Clostridium beijerinckii* growth and butanol fermentation[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, 97(6): 1460 - 1469.

Study on Saccharification of Steam-exploded Corn Stalk and Butanol Fermentation Process Optimization

LIU Li-ping, SHEN Li-ying, CHANG Chun

(School of Chemical Engineering and Energy, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: Several processes of saccharification based on steam-exploded corn stalk were compared in this paper, and the best process of saccharification is: adding 1/3 cellulase firstly, adding 1/3 cellulase after 24 h, then adding the rest of the cellulase after 12 h, and saccharification 48 h in all. On this basis, the better conditions of fermentative process were investigated by single-factor experiment and orthogonal test. Under the optimum conditions, the concentration of butanol can reach 9.42 g/L.

Key words: steam exploded corn stalk; saccharification; butanol; fermentation; medium