

DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2012.04.018

酿酒酵母和嗜鞣管囊酵母对稀酸水解抑制物的耐受性^{*}

杨培周 郑志 罗水忠 姜绍通 陈森林 高书蕊

(合肥工业大学生物与食品工程学院, 合肥 230009)

【摘要】 研究了酿酒酵母和嗜鞣管囊酵母对油菜秸秆稀酸水解抑制物糠醛、5-羟甲基糠醛和乙酰丙酸的耐受性。酿酒酵母能够耐受分别含有2 g/L 糠醛、2 g/L 5-羟甲基糠醛和8 g/L 乙酰丙酸的葡萄糖发酵液;分别含有2 g/L 糠醛、2 g/L 5-羟甲基糠醛和8 g/L 乙酰丙酸的木糖发酵液严重抑制嗜鞣管囊酵母发酵木糖产乙醇。在含有2 g/L 糠醛的葡萄糖发酵液中,酿酒酵母和嗜鞣管囊酵母的乙醇质量浓度分别为对照的85.05%和46.70%,而在以木糖为底物的发酵液中,嗜鞣管囊酵母的乙醇质量浓度为对照的12.40%。油菜秸秆水解液能够有效缓解2 g/L 糠醛对酿酒酵母和嗜鞣管囊酵母产乙醇的抑制,乙醇质量浓度分别为对照的98.40%和91.00%。研究结果表明,酿酒酵母对抑制物糠醛、5-羟甲基糠醛和乙酰丙酸的耐受性高于嗜鞣管囊酵母。

关键词: 秸秆 水解 酿酒酵母 嗜鞣管囊酵母 耐受性 乙醇

中图分类号: TK6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2012)04-0088-05

Tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pachysolen tannophilus* to Diluted Acid Hydrolysis Inhibitor

Yang Peizhou Zheng Zhi Luo Shuizhong Jiang Shaotong Chen Miaolin Gao Shurui

(School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract

The tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pachysolen tannophilus* to inhibitors including furfural, 5-hydroxymethyl furfural and levulinic acid in diluted acid hydrolysis from rape straw was investigated. *S. cerevisiae* was capable of tolerating 2 g/L furfural, 2 g/L 5-hydroxymethyl furfural and 8 g/L levulinic acid in glucose broth. However, ethanol production by *P. tannophilus* was strongly inhibited in xylose broth added with 2 g/L furfural, 2 g/L 5-hydroxymethyl furfural and 8 g/L levulinic acid, respectively. In glucose broth containing 2 g/L furfural, the ethanol yields of *S. cerevisiae* and *P. tannophilus* were respectively 85.05% and 46.70% compared with those of the control, while in xylose broth added with 2 g/L furfural, the ethanol yield of *P. tannophilus* was 12.40% compared with that of the control. Enzymatic hydrolysis of rape straw could effectively relieve the inhibition of 2 g/L furfural on both the *S. cerevisiae* and *P. tannophilus*, whose ethanol yields were respectively 98.40% and 91.00% compared with those of the control. The results showed that the tolerance capacity of *S. cerevisiae* on fermentation inhibitors including furfural, 5-hydroxymethyl furfural and levulinic acid was stronger than that of *P. tannophilus*.

Key words Straw, Hydrolysis, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pachysolen tannophilus*, Tolerance, Ethanol

收稿日期: 2011-06-20 修回日期: 2011-08-14

^{*} 国家自然科学基金资助项目(31071636)和中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(2011HGQC.109)

作者简介: 杨培周, 讲师, 博士后, 主要从事农产品生物化工研究, E-mail: yangpeizhou@163.com

引言

生物质燃料乙醇的开发有助于缓解世界日益严重的能源危机,减少对石油、天然气等不可再生资源的过度依赖,减轻地球温室效应。木质纤维素的高效糖化是秸秆生物能源和生物基材料大规模经济化应用的前提^[1-2]。酸解是一种高效的糖化方法^[3],稀酸预处理目前被认为是较为成熟的高效预处理方法^[4]。木质纤维素在较高温度酸解催化下,生成葡萄糖、木糖、半乳糖和甘露糖等多种糖类^[5],而过度催化将产生大量发酵抑制物,包括糠醛、5-羟甲基糠醛和乙酰丙酸等^[6]。油菜秸秆经质量分数 1.76% 硫酸 152.6℃ 处理 21 min 后,水解液中分别含有 0.98 g/L(本文均为质量浓度)糠醛、0.04 g/L 5-羟甲基糠醛和 0.04 g/L 乙酰丙酸^[7]。

酿酒酵母^[8]和嗜鞣管囊酵母^[9-10]是常用的发酵单糖生成乙醇的酵母菌,能够分别利用水解糖中的葡萄糖和木糖生产乙醇^[11-12]。本文以油菜秸秆稀酸水解过程中产生的主要抑制物糠醛、5-羟甲基糠醛和乙酰丙酸为对象,研究各抑制物对酿酒酵母和嗜鞣管囊酵母产乙醇的影响,以期选育优良的微生物菌株发酵秸秆水解液产乙醇提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株和试剂

酿酒酵母(*S. cerevisiae*)为合肥工业大学生物与食品工程学院保藏菌株;嗜鞣管囊酵母(*P. tannophilus*)购自中国工业微生物菌种保藏管理中心;糠醛、5-羟甲基糠醛和乙酰丙酸均为本实验室从油菜秸秆稀酸水解液中分离获得。

1.2 种子培养基

40 g/L 木糖,2 g/L 葡萄糖,8 g/L 酵母浸粉,1 g/L (NH₄)₂SO₄,1 g/L KH₂PO₄,1 g/L MgSO₄·7H₂O。

1.3 木糖(葡萄糖)发酵培养基

50 g/L 木糖(葡萄糖),10 g/L 酵母浸粉,1 g/L (NH₄)₂SO₄,1 g/L KH₂PO₄,1 g/L MgSO₄·7H₂O^[13]。

1.4 检测方法

采用 DNS 法测定还原糖含量^[14];采用气相色谱法测定乙醇含量,参数:色谱柱 MXT-20,30 m×0.25 mm,液膜厚度 0.25 μm,载气为 N₂,检测器 FID,流速为 30 mL/min,进样器温度 180℃,柱温 150℃,检测温度 220℃,进样量 1 μL,分流比 1:70;采用干重法测定生物量:取 10 mL 发酵液于 5 000 r/min 下离心 10 min,去上清,70℃,真空干燥至恒质量,称量。

1.5 油菜秸秆水解液制备

将油菜秸秆粉碎后,过 40 目筛网得到油菜秸秆粉末,质量分数 2% 氢氧化钠以固液质量比 1:15 浸泡秸秆粉末 24 h,过滤,自来水冲洗至 pH 值呈中性,收集残渣,以纤维素酶和木聚糖酶(南宁东恒华道生物科技有限责任公司生产)混合酶解 48 h,获得水解液,通过高效液相色谱测得葡萄糖、D-木糖,阿拉伯糖等其他成分,质量分数分别为 30.2%、54.6% 和 15.2%。以 D-木糖计算,浓缩后水解液的糖为 40 g/L。

2 结果与分析

2.1 抑制物对酿酒酵母和嗜鞣管囊酵母发酵产乙醇的影响

2.1.1 糠醛

以葡萄糖为发酵底物,以发酵液中含 0 g/L 糠醛为对照,考察不同质量浓度糠醛对酿酒酵母发酵产乙醇的影响(图 1)。随糠醛质量浓度增大,乙醇质量浓度逐渐减小。发酵液中糠醛质量浓度分别为 0.5、1.0、2.0、4.0 g/L 时,乙醇最高质量浓度分别为 15.89、14.72、13.93、12.84 g/L,为对照(16.38 g/L)的 97.00%、89.86%、85.04% 和 78.40%。糠醛质量浓度不高于 2 g/L 时,发酵 24 h 后乙醇质量浓度最高。糠醛质量浓度高于 2 g/L,乙醇质量浓度最高值的时间向后延迟。

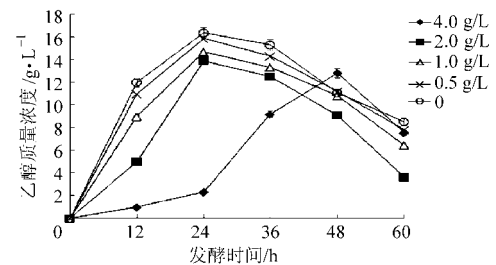


图 1 糠醛含量对酿酒酵母发酵产乙醇的影响
Fig.1 Effect of furfural on ethanol production of *S. cerevisiae*

以木糖为发酵底物,考察不同质量浓度糠醛对嗜鞣管囊酵母发酵产乙醇的影响(图 2),随糠醛质量浓度的升高,乙醇质量浓度逐渐减小。发酵液中糠醛分别为 0.5、1.0、2.0 g/L 时,发酵 48、60 和 60 h 后乙醇质量浓度最高,分别为 5.24、2.98、0.63 g/L,为对照最高(8.03 g/L)的 65.30%、37.10% 和 7.80%。糠醛强烈抑制嗜鞣管囊酵母发酵木糖产乙醇。

2.1.2 5-羟甲基糠醛

以葡萄糖为发酵底物,考察不同质量浓度 5-羟甲基糠醛对酿酒酵母产乙醇的影响(图 3),随着 5-羟甲基糠醛质量浓度的增大,乙醇质量浓度逐渐减小。5-羟甲基糠醛质量浓度分别为 1、2、4、8 g/L

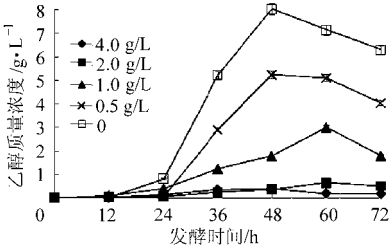


图2 糠醛含量对嗜鞣管囊酵母发酵产乙醇的影响

Fig.2 Effect of furfural on ethanol production of *P. tannophilus*

时,乙醇质量浓度最高峰分别位于24、24、36和48 h,乙醇质量浓度分别为15.10、15.00、12.63、11.10 g/L,为对照(16.38 g/L)的92.19%、91.58%、77.11%和67.77%。结果表明,质量浓度低于2 g/L的5-羟甲基糠醛对酿酒酵母发酵葡萄糖产乙醇的影响较小。

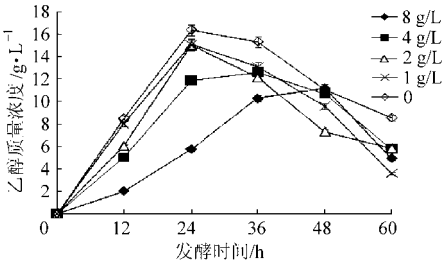


图3 5-羟甲基糠醛含量对酿酒酵母发酵产乙醇的影响

Fig.3 Effect of 5-hydroxymethyl furfural on ethanol production of *S. cerevisiae*

以木糖为发酵底物,考察不同质量浓度5-羟甲基糠醛对嗜鞣管囊酵母发酵产乙醇的影响(图4),随着5-羟甲基糠醛质量浓度的增大,乙醇质量浓度呈减小的趋势。5-羟甲基糠醛质量浓度分别为1、2、4、8 g/L时,乙醇质量浓度的最高值分别为7.32、7.29、1.68、1.50 g/L,分别为对照(8.03 g/L)的91.15%、90.80%、20.90%和18.70%。研究表明,质量浓度高于2 g/L的5-羟甲基糠醛严重抑制嗜鞣管囊酵母发酵木糖产乙醇。

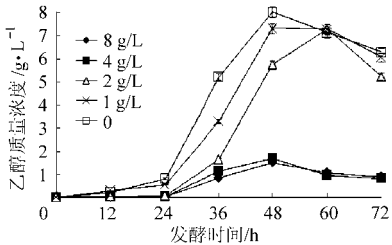


图4 5-羟甲基糠醛含量对嗜鞣管囊酵母发酵产乙醇的影响

Fig.4 Effect of 5-hydroxymethyl furfural on ethanol production of *P. tannophilus*

2.1.3 乙酰丙酸

以葡萄糖为底物,考察不同质量浓度乙酰丙酸对酿酒酵母发酵产乙醇的影响(图5),发酵液中乙

酰丙酸质量浓度分别为1、2、4、8 g/L时,发酵24 h后乙醇质量浓度都达到最高点,分别为14.82、14.79、14.67、14.48 g/L,分别为对照(16.38 g/L)的90.47%、90.29%、89.56%和88.40%。研究结果表明,乙酰丙酸的质量浓度对酿酒酵母发酵葡萄糖产乙醇的抑制不显著。

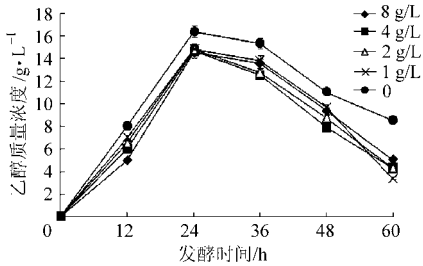


图5 乙酰丙酸含量对酿酒酵母发酵产乙醇的影响

Fig.5 Effect of levulinic acid on ethanol production of *S. cerevisiae*

以木糖为发酵底物,考察不同质量浓度乙酰丙酸对嗜鞣管囊酵母发酵产乙醇的影响(图6),随着乙酰丙酸质量浓度的增加,抑制呈逐渐增加的趋势。当乙酰丙酸质量浓度分别为1、2、4、8 g/L时,发酵后获得乙醇的最高质量浓度分别为7.18、7.02、5.32、1.55 g/L,分别为对照(8.03 g/L)的89.50%、87.50%、66.30%和19.32%。研究结果表明,质量浓度高过4 g/L的乙酰丙酸严重抑制嗜鞣管囊酵母发酵木糖产乙醇。

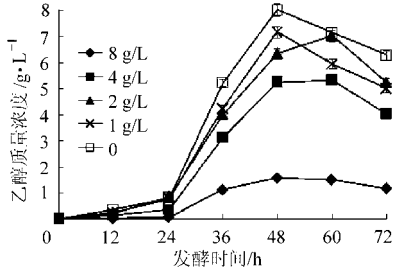


图6 乙酰丙酸含量对嗜鞣管囊酵母发酵产乙醇的影响

Fig.6 Effect of levulinic acid on ethanol production of *P. tannophilus*

2.2 不同碳源下添加糠醛对嗜鞣管囊酵母发酵产乙醇的影响

上述研究结果表明,相对于5-羟甲基糠醛和乙酰丙酸,糠醛质量浓度对嗜鞣管囊酵母发酵产乙醇的影响最大。为深入研究糠醛对嗜鞣管囊酵母产乙醇的影响,分别以葡萄糖和油菜秸秆水解糖为底物,研究2 g/L糠醛对嗜鞣管囊酵母发酵产乙醇的影响。

2.2.1 葡萄糖发酵液

以葡萄糖为发酵底物,考察2 g/L糠醛对嗜鞣管囊酵母发酵产乙醇的影响(图7),结果表明,发酵前48 h,乙醇质量浓度受到严重抑制,48 h后,乙醇

质量浓度逐渐增高,发酵 84 h,乙醇质量浓度最高为 9.43 g/L,是对照最高 (20.18 g/L) 的 46.73%。糠醛推迟乙醇质量浓度最高峰的生成时间。

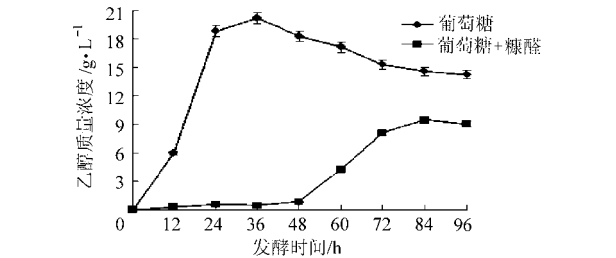


图 7 葡萄糖发酵液中糠醛对嗜鞣管囊酵母发酵产乙醇的影响

Fig. 7 Effect of furfural in glucose broth on ethanol production of *P. tannophilus*

2.2.2 油菜秸秆水解液

以油菜秸秆水解液为发酵底物,研究 2 g/L 糠醛对嗜鞣管囊酵母产乙醇的影响 (图 8),添加 2 g/L 糠醛,发酵 72 h 后,乙醇质量浓度最高;对照达到高峰的时间为 36 h。添加 2 g/L 糠醛后的乙醇最高质量浓度为 6.15 g/L,是对照最高 (6.76 g/L) 的 91.00%。相对于葡萄糖和木糖,油菜秸秆水解液能够有效减轻糠醛对嗜鞣管囊酵母的抑制。

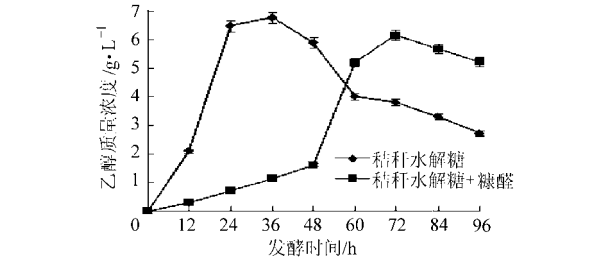


图 8 油菜秸秆水解液中糠醛对嗜鞣管囊酵母发酵产乙醇的影响

Fig. 8 Effect of furfural in hydrolysis of rape straw on ethanol production of *P. tannophilus*

2.3 油菜秸秆水解液中添加糠醛对酿酒酵母发酵产乙醇的影响

由于酿酒酵母不能利用木糖发酵生产乙醇,考察油菜秸秆水解液中添加糠醛对酿酒酵母发酵产乙醇的影响 (图 9),添加 2.0 g/L 糠醛后,乙醇的最高质量浓度为 6.1 g/L,为对照 (6.2 g/L) 的 98.40%。油菜秸秆水解液能够有效缓解糠醛对酿酒酵母发酵产乙醇的抑制。

3 讨论

稀酸水解抑制物对不同微生物的影响效果存在一定的差异,大肠杆菌 K011 最大耐受糠醛的质量浓度为 3 g/L^[15],本研究发现酿酒酵母能够耐受 2 g/L 糠醛,4 g/L 糠醛导致产乙醇高峰延迟至 48 h,

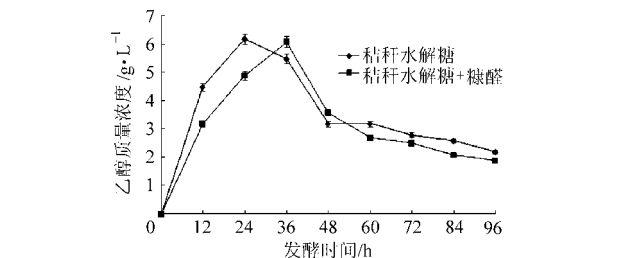


图 9 油菜秸秆水解液中添加糠醛对酿酒酵母发酵产乙醇的影响

Fig. 9 Effect of hydrolysis of rape straw furfural on ethanol production of *S. cerevisiae*

但仍然具有较高的乙醇质量浓度。有报道认为 2 ~ 3 g/L 糠醛几乎能把酿酒酵母产乙醇能力完全抑制,乙醇的质量浓度大幅下降^[16],本研究发现,当糠醛质量浓度达到 4 g/L 时,发酵 24 h,乙醇浓度很低,说明此时酿酒酵母产乙醇被严重抑制,但当乙醇发酵到 48 h,乙醇浓度达到最高峰,比对照乙醇的最高峰推迟 24 h,本研究并不完全认同 Palmqvist 等的报道,不能简单地认为在发酵 24 h 后,乙醇质量浓度低就认为乙醇被完全抑制,研究发现酿酒酵母具有很强的解毒功能,在发酵前 24 h,酿酒酵母很可能处于解除抑制物糠醛的毒副作用的过程。

嗜鞣管囊酵母的乙醇耐受性与休哈塔假丝酵母 (*Candida shehatae*) 和树干毕赤酵母菌 (*Pichia stipitis*) 等能够利用木糖发酵产乙醇的菌株相似,对稀酸水解抑制物的耐受性差。糠醛毒性的可能机理在于糠醛产生化学反应破坏了微生物的细胞膜,产生的疏水性作用导致细胞中毒,影响菌物量的增长,降低乙醇质量浓度^[16]。尽管嗜鞣管囊酵母对糠醛的耐受力差,但是研究表明嗜鞣管囊酵母在含有高质量浓度糠醛的秸秆水解液中具有较高的乙醇质量浓度,可能原因是稀酸水解混合物含有木质素、阿拉伯糖、半乳糖等混合组分,混合组分通过与抑制物糠醛发生反应,降低了糠醛的毒性,减轻了抑制物糠醛对嗜鞣管囊酵母的抑制。

4 结论

- (1) 嗜鞣管囊酵母和酿酒酵母对抑制物的耐受性表明,糠醛、5-羟甲基糠醛和乙酰丙酸对酵母的抑制逐渐减小,糠醛的氧化性最强,对酵母的破坏力最大。
- (2) 酿酒酵母具有强的抑制物耐受性,含有糠醛的油菜秸秆水解液推迟了酿酒酵母产乙醇最高质量浓度的时间,但对酿酒酵母产乙醇的产率影响不大,此外,酿酒酵母能有效解除抑制物的毒害,维持较高的乙醇产率。
- (3) 嗜鞣管囊酵母的抑制物耐受性较差,以宿

主菌的形式进行基因改造产乙醇不合适。酿酒酵母能够作为优异的宿主菌进行乙醇基因工程菌改造。

(4) 在工业化利用稀酸水解液发酵乙醇的生产中,可以先用酿酒酵母发酵,通过发酵水解液中葡萄

糖产乙醇,同时解除糠醛等抑制物对下游微生物发酵的影响;然后在残留的发酵液中加入嗜鞣管囊酵母,利用水解液中残留的 D-木糖生成乙醇,以提高水解液的综合效益。

参 考 文 献

1 杨培周,姜绍通,郑志,等. 碱性氧化物预处理玉米秸秆维管柱、皮层和表皮研究[J]. 农业机械学报,2010, 41(增刊): 137 ~ 140.
Yang Peizhou, Jiang Shaotong, Zheng Zhi, et al. Pretreatment of micro-column, cortex and epidermis of corn stover by alkali oxide[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2010, 41(Supp.):137 ~ 140. (in Chinese)

2 杨培周,姜绍通,潘丽军,等. 玉米芯糖化微波与酸/碱联合预处理效果实验分析[J]. 农业机械学报, 2010, 41(7): 101 ~ 104.
Yang Peizhou, Jiang Shaotong, Pan Lijun, et al. Experiment analysis on pretreatment of corn cob saccharification by acid and alkali coordination with microwave[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2010,41(7):101 ~ 104. (in Chinese)

3 杨培周,姜绍通,郑志,等. 草坪草糖化及发酵生产燃料乙醇[J]. 农业工程学报, 2011, 27(增刊1): 143 ~ 146.

4 张斌,阴秀丽,吴创之,等. 木粉水解残渣热解半焦结构及反应性研究[J]. 农业机械学报,2010, 41(2):87 ~ 92.
Zhang Bin,Yin Xiuli, Wu Chuangzhi, et al. Study on structure and CO₂ gasification reactivity of acid hydrolysis residue char [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2010, 41(2):87 ~ 92. (in Chinese)

5 江滔,路鹏,李国学. 玉米秸秆稀酸水解时糠醛形成原因及影响因素[J]. 农业工程学报, 2009, 25(7): 185 ~ 189.
Jiang Tao, Lu Peng, Li Guoxue. Formation cause and influencing factors of furfurals during the dilute acid hydrolysis of corn stalks[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2009, 25(7):185 ~ 189. (in Chinese)

6 Persson P. Effect of different forms of alkali treatment on specific fermentation inhibitors and on the fermentability of lignocellulose hydrolysates for production of fuel ethanol[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(19): 5 318 ~ 5 325.

7 Tae-Su Jeong, Byung-Hwan Um, Jun-Seok Kim, et al. Optimizing dilute-acid pretreatment of rapeseed straw for extraction of hemicellulose[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010, 161(1 ~ 8): 22 ~ 33.

8 Hsu C L. Pretreatment and hydrolysis of cellulosic agricultural wastes with a cellulase producing streptomyces for bioethanol production[J]. Biomass and Bioenergy, 2011, 35(5): 1 878 ~ 1 884.

9 潘丽军,储开庆,杨培周. 嗜鞣管囊酵母木糖发酵乙醇高产突变株选育及其发酵特性[J]. 核农学报,2011, 25(3): 477 ~ 481.
Pan Lijun,Chu Kaiqing,Yang Peizhou. Breeding and fermentation characterization of *Pachysolen tannophilus* mutant with high ethanol productivity from xylose[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences,2011,25(3):477 ~ 481. (in Chinese)

10 Saharan R K, Kanwal S, Sharma S C, et al. Role of glutathione in ethanol stress tolerance in yeast *Pachysolen tannophilus* [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010, 397(2): 307 ~ 310.

11 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 ~ 98.
Tian Shen, Lin Zengxi, Yao Yingqiu, et al. Ethanol production characteristics of *Pachysolen tannophilus* 1622 and *E. coli* (pGM-PA) utilizing xylose and sugar mixture[J]. Acta Energiæ Solaris Sinica, 2008, 29(1): 95 ~ 98. (in Chinese)

12 季冉,袁兴中,曾光明,等. 外加肌醇和氯化钠对嗜鞣管囊酵母生长和产酒精能力及耐酒精能力的影响[J]. 农业环境科学学报, 2008, 27(5): 2 080 ~ 2 085.

13 Fu N, Peiris P. Co-fermentation of a mixture of glucose and xylose to ethanol by *Zymomonas mobilis* and *Pachysolen tannophilus*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24(7): 1 091 ~ 1 097.

14 Plata-Guerrero R, Guerra-Hernandez E, Garcia-Villanova E. Determination of reducing sugar and asparagine in potatoes [J]. Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, 2009, 32(17): 2 556 ~ 2 568.

15 Beall D S, Ohta K, Ingram L O. Parametric studies of ethanol-production from xylose and other sugars by recombinant *Escherichia coli*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1991, 38(3): 296 ~ 303.

16 Eva Palmqvist, Halfdan Gragem, Nina Q Meinander, et al. Main and interaction effects of acetic acid, furfural, and p-hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1999, 63(1): 46 ~ 55.