

酵母发酵玉米秸秆水解液产麦角甾醇应用研究

宋公明 刘 娇 薛冬桦*

(长春工业大学化学与生命科学学院 长春 130012)

摘要: 生物质是一种可再生资源, 生物质发酵可产生高端化工产品。本文主要探讨蒸汽爆破处理玉米秸秆及水解可发酵单糖, 考察酵母发酵玉米秸秆糖化液产麦角甾醇的应用研究。实验结果表明: 当固液比 10%, 盐酸浓度 1.5%, 90°C 水解反应 3 h, 还原糖含量达到 53.3%, 纤维素转化率 79%。发酵工艺参数为玉米秸秆糖化液 6.0 °Bx, 玉米浆 4%, pH 7.5, 接种量 10%, 28°C 摇床振荡培养 32 h, 细胞生物量达 8.5 g/L, 麦角甾醇含量可达 2.35%。同时对玉米秸秆发酵产麦角甾醇晶体进行结构表征。

关键词: 玉米秸秆, 酵母, 麦角甾醇, 发酵

Application Research on the Production of Ergosterol using Corn Straw Hydrolyzates Fermentation by Yeast

SONG Gong-Ming LIU Jiao XUE Dong-Hua*

(School of Chemistry and Life Science, Changchun University of Technology, Changchun 130012)

Abstract: Biomass is a renewable resource, which can be transformed into useful chemical products. The effects of dilute hydrochloric acid on the hydrolysis of steam explosion pretreatment of corn straw were studied. This article developed the application research of ergosterol using corn straw hydrolyzates as fermentation substrates. The results showed that when corn straw was hydrolyzed with 1.5% hydrochloric acid, temperature at 90°C, hydrolysis for 3 h and the corresponding solid to liquid ratio at 10%, the reducing sugar content can reached up to 53.3% and cellulose conversion efficiency was 79%. The optimal fermental parameters were as follows: 6.0 °Bx of corn straw hydrolyzates, corn concentration steep water at 4%, pH 7.5, 10% of inoculation, 28°C cultivated for 32 h. Under these conditions, the yeast biomass up to 8.5 g/L and the ergosterol content up to 2.35%. The infrared spectrometer and the X-ray diffract meter used to characterize of crystallite structure.

Keywords: Corn straw, Yeast, Ergosterol, Fermentation

生物质的能源化和资源化利用所要解决的关键技术问题就是生物质如玉米秸秆的预处理, 以及利用秸秆作为糖源生产发酵产品。利用成本更低的农作物秸秆作为发酵产品的原料是今后重要的研究方

向^[1,2]。我国玉米秸秆每年产 2.2 亿吨, 资源优势明显。玉米秸秆的主要成分是纤维素、半纤维素、木质素。其中, 纤维素占秸秆总重量 40%左右, 木质素将纤维素与半纤维素连接在一起其结晶结构很难被

降解。因此, 必须采用特殊的方法对秸秆进行预处理, 才能解除木质素对纤维素的包裹, 从而把纤维素暴露出来, 利于酸水解及后续发酵过程^[3]。

麦角甾醇($C_{28}H_{43}OH$)是一种二十八碳甾族化合物, 熔点 $166^{\circ}C\sim 183^{\circ}C$ (无水), 沸点: $250^{\circ}C$, 密度 1040 kg/m^3 的无色晶体, 经紫外线照射, 可转化成维生素D, 是重要的医药、化工和饲料行业原料。麦角甾醇可通过生物发酵法和化学合成法制造, 微生物发酵法是国内外麦角甾醇主要生产方法^[4]。目前, 我国酵母总产量为 64741 吨, 其中麦角甾醇酵母仅几十吨, 麦角甾醇主要依赖进口, 采用玉米秸秆为原料降低麦角甾醇生产成本, 具有一定的参考应用价值^[5]。本文主要探讨玉米秸秆水解可发酵性单糖研究, 考察酵母发酵玉米秸秆产麦角甾醇工艺参数优化, 对玉米秸秆发酵产麦角甾醇晶体进行结构表征。

1 材料与方法

1.1 玉米秸秆

原料为 2007 年收获经自然储存的吉林省玉米秸秆。酵母菌株来自本实验室电融合技术构建麦角甾醇酵母细胞工程菌株(同时利用五碳糖和六碳糖), 实验室编号 YELB。

1.2 酵母发酵玉米秸秆产麦角甾醇工艺流程

玉米秸秆→粉碎→蒸汽爆破→纤维素(半纤维素)→稀酸水解→六碳糖(五碳糖)→发酵→离心→皂化→提取→浓缩→麦角甾醇结晶

1.3 玉米秸秆蒸汽爆破预处理方法

玉米秸秆原料用 $200^{\circ}C\sim 240^{\circ}C$ 的水蒸汽处理 (15 min~20 min), 反应器中急速爆破, 木质素软化, 纤维素晶体与纤维素破裂。因木质素和半纤维素结合层被破坏, 使得纤维素暴露, 易于酸水解, 供后续发酵利用^[6]。

1.4 纤维素水解方法

玉米秸秆蒸汽爆破处理后, 加入适量稀盐酸, 固液比为 10%, 在 $90^{\circ}C$ 恒温水解, 过滤得到水解液, 其中纤维素经水解反应后的转化率计算公式如下^[7]:

$$\text{纤维素转化率}(\%) = \frac{\text{反应前的量}(\text{g}) - \text{反应后的量}(\text{g})}{\text{反应前的总量}(\text{g})}$$

1.5 还原糖测定——费林试剂滴定法

分别配制费林试剂甲液和乙液, 同时配制 1 g/L

葡萄糖标准溶液。费林试剂的标定, 获得消耗葡萄糖标准液的体积平均值(V_1), 进行玉米秸秆糖化液滴定, 得到消耗玉米秸秆糖化液体积的平均值(V_2)。计算公式:

$$DE = \frac{1 \times V_1 \times 10}{V_2 \times m \times G}$$

式中: DE-玉米秸秆糖化液还原糖含量, %;

V_1 - 标定时消耗葡萄糖标准溶液(1 g/L)的体积, mL; V_2 - 测定时消耗玉米秸秆糖化液体积, mL; m- 玉米秸秆糖化液质量, g; G-玉米秸秆糖化液中固形物含量, %。

1.6 麦角甾醇酵母培养

种子培养: $6.5^{\circ}Bx$ 麦芽汁, 0.07 MPa 压力灭菌 15 min, $28^{\circ}C$ 振荡培养 16 h, 要求 $OD_{600} \geq 0.3$ 。

发酵培养: $6.0^{\circ}Bx$ 玉米秸秆糖化液, 10% 种子液, 0.1% 营养盐, 深层好氧发酵, $28^{\circ}C$ 振荡培养 32 h^[8]。

1.7 分析方法

生物量: 比浊法 600 nm 测 OD 值, 获得单位体积内麦角甾醇酵母干重。

麦角甾醇: 20% 氢氧化钾和甲醇进行皂化反应, $95^{\circ}C$ 反应时间 3 h, 加入二倍体积的乙醚萃取, 振荡 15 min, 静置 4 h, 取上层萃取液, 经紫外分光光度法测麦角甾醇含量^[9-12]。

计算公式: 麦角甾醇含量(%) = $CV/W \times 100$

式中 C-麦角甾醇的浓度(mg/mL), V-为萃取剂的体积(mL), W-酵母菌体干重(g)。

2 结果与讨论

2.1 不同酸对玉米秸秆水解的影响

以 7.5% 的固液比, 2% 的酸浓度, $100^{\circ}C$ 水解 3 h, 比较不同酸对玉米秸秆水解影响。应用 1.4 和 1.5 方法获得糖含量及纤维素转化率(见表 1), 盐酸水解玉米秸秆的 DE 值可达 44.93%; 纤维素转化率为 71.2%。

表 1 不同酸对玉米秸秆水解的影响
Table 1 Effect of different acids on the hydrolysis of corn straw

序号 No.	酸种类 Different acids	DE 值 DE value (%)	纤维素转化率 Cellulose conversion efficiency (%)
1	HCl	44.93	71.2
2	H ₂ SO ₄	38.2	66.1
3	HNO ₃	35.7	56.6
4	CH ₃ COOH	28.5	39.2

2.2 盐酸浓度对玉米秸秆水解的影响

在固液比 7.5%、100°C 水解 3 h 条件不变情况下, 考察盐酸浓度变化对玉米秸秆水解的影响 (见图 1)。随着盐酸浓度的增加, DE 值和纤维素转化率也在增加, 当盐酸浓度为 1.5% 时, 玉米秸秆糖化液的 DE 值达到 48.6%; 纤维素转化率为 72.3%。

2.3 固液比对玉米秸秆水解的影响

在盐酸 1.5%、100°C 水解 3 h 条件不变情况下, 考察固液比变化对玉米秸秆水解的影响 (见图 2)。随着固液比的增加, DE 值和纤维素转化率也增加, 当固液比为 10% 时, 玉米秸秆糖化液的 DE 值达到 49.2%; 纤维素转化率为 77.5%。

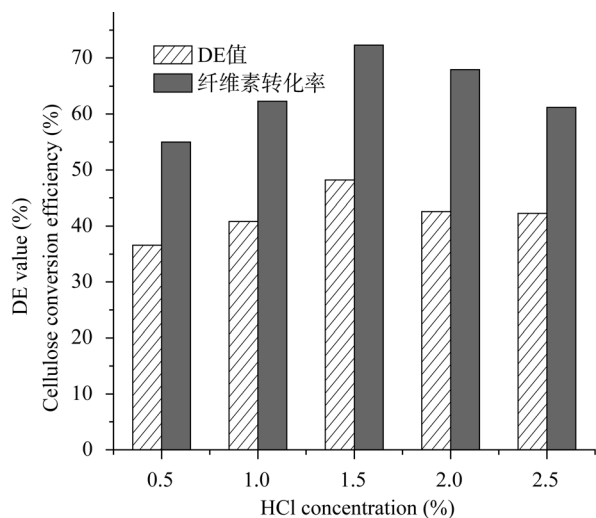


图 1 盐酸浓度变化对玉米秸秆水解的影响
Fig. 1 Effect of HCl concentration the hydrolysis of corn straw

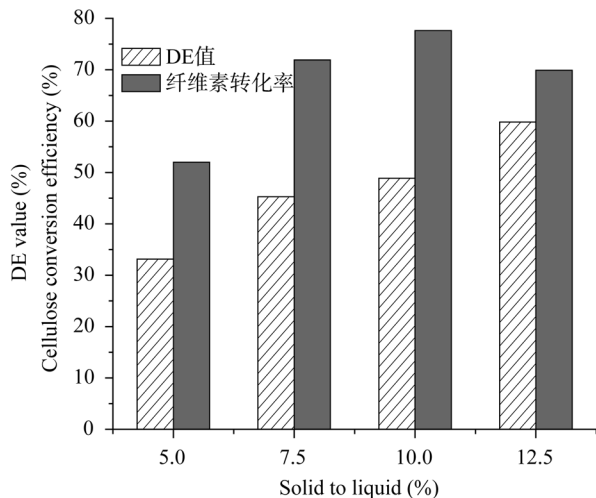


图 2 固液比变化对玉米秸秆水解的影响
Fig. 2 Effect of solid to liquid ratio on the hydrolysis of corn straw

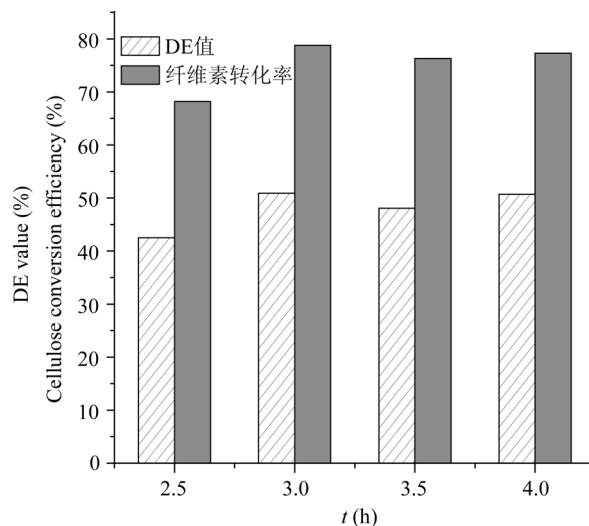


图 3 水解时间变化对玉米秸秆水解的影响
Fig. 3 Effect of time on the hydrolysis of corn straw

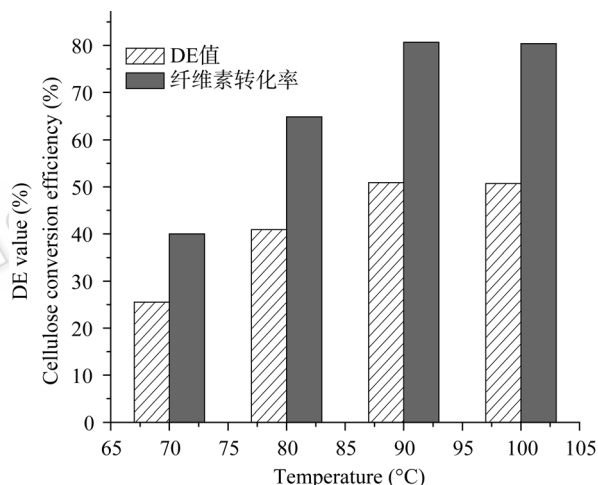


图 4 反应温度变化对玉米秸秆水解的影响
Fig. 4 Effect of temperature on the hydrolysis of corn straw

2.4 反应时间对玉米秸秆水解的影响

在盐酸 1.5%、固液比为 10%、100°C 条件不变情况下, 考察时间变化对玉米秸秆水解的影响 (见图 3)。随着时间的增加, DE 值和纤维素转化率不断增加, 反应时间 3 h, 玉米秸秆糖化液 DE 值可达 51%; 纤维素转化率达到 78%。

2.5 反应温度对玉米秸秆水解的影响

在盐酸 1.5%、固液比为 10%、水解 3 h 条件不变情况下, 考察温度变化对玉米秸秆水解的影响 (见图 4)。随着温度的上升, DE 值和纤维素的转化率都不断增加, 当温度达到 90°C, 玉米秸秆糖化液 DE 值达到 53.3%; 纤维素转化率为 79%。

2.6 玉米秸秆水解液中发酵抑制剂的解除

玉米秸秆稀盐酸水解过程中, 产生微生物发酵抑制因子, 影响麦角甾醇酵母后续发酵^[13]。应用不同方法解除发酵抑制效应(见图 5)。汽化法: 采用旋转蒸发去除易挥发的小分子醛类发酵抑制剂; 过量碱法: 氢氧化钙高调pH值, 再反调菌株需求pH值; 过量碱法与加热结合法; 调pH值法: 用NaOH调菌株适宜pH值。结果表明不同解除方法对麦角甾醇酵母生长促进作用, 过量碱法效果理想, 其生物量由对照组的 1.24 g/L 提高到 5.12 g/L。

2.7 麦角甾醇酵母发酵培养条件优化

考察了玉米秸秆水解液糖度、玉米浆、pH值和发酵周期四因素对酵母细胞代谢合成麦角甾醇的影响(见表 2)。由正交实验方差分析(见表 3)麦角甾醇酵母发酵影响因子依次为玉米浆 > 玉米秸秆水解液糖度 > 发酵周期 > pH。发酵条件优化组合为 A₃B₂C₃D₂。即: 6.0 °Bx玉米秸秆水解液, 4%玉米浆,

pH 值 7.5, 发酵周期 32 h。

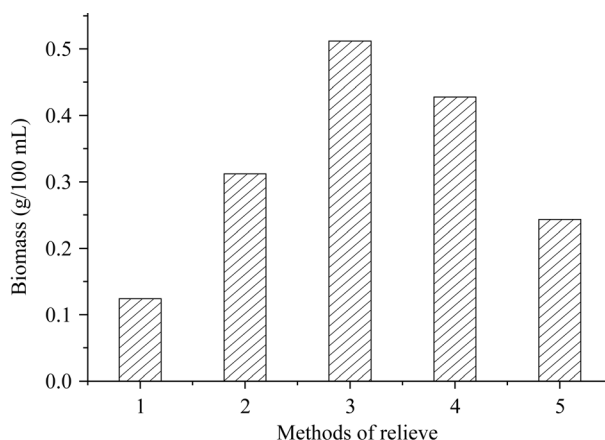


图 5 不同抑制剂解除方法对麦角甾醇酵母发酵影响
Fig. 5 Effect of different inhibitor on the synthesis of ergosterol

注: 1: 对照组; 2: 汽化法; 3: 过量碱法; 4: 加热法; 5: pH 值调节法
Note: 1: Control group; 2: Evaporization; 3: Alkali overdose; 4: Heating method; 5: Up adjust pH

表 2 L₉(3⁴)正交实验表及结果
Table 2 L₉(3⁴) Orthogonal experiment result

序号 No.	初始糖度(A) Initial sugar concentration(°Bx)	玉米浆(B) Corn steep water(%)	pH 值(C) Initial pH	周期(D) Time(h)	生物量 Biomass(g/L)	麦角甾醇含量 Ergosterol content(%)
1	4.0	3	5.5	28	4.54	0.70
2	4.0	4	6.5	32	4.49	2.05
3	4.0	5	7.5	36	5.34	1.54
4	5.0	3	6.5	36	5.29	1.14
5	5.0	4	7.5	28	5.54	2.21
6	5.0	5	5.5	32	6.09	2.01
7	6.0	3	7.5	32	8.52	1.62
8	6.0	4	5.5	36	6.30	2.31
9	6.0	5	6.5	28	6.24	1.52
K ₁	4.29	3.46	5.02	4.43		
K ₂	5.36	6.57	4.71	5.68		
K ₃	5.45	5.07	5.37	4.99		
R	1.16	3.11	0.66	1.25		

表 3 正交实验方差分析
Table 3 Orthogonal experiment analysis of variances

	平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	显著性 Significance
A	0.2776	2	0.13881	12	**
B	1.6127	2	0.60634	18	**
C	0.0727	2	0.03634	6	*
D	0.2614	2	0.13068	10	**
误差 Error	2.22436	18	1.11218		

2.8 玉米秸秆发酵产麦角甾醇稳定实验

在 6.0 °BX 玉米秸秆水解液, 4% 玉米浆, pH 7.5, 28°C 摇床培养 32 h 优化实验条件下, 进行 5 批次稳定实验(见表 4), 麦角甾醇酵母细胞生物量平均达到 8.5 g/L, 麦角甾醇含量达到 2.35%。

序号 No.	OD 值 Optical density	生物量 Biomass(g/L)	麦角甾醇含量 Ergosterol content(%)
1	1.26	8.54	2.39
2	1.31	8.66	2.32
3	1.20	8.51	2.37
4	1.16	8.47	2.35
5	1.21	8.42	2.33
平均值 Mean value	1.23	8.52	2.35

2.9 麦角甾醇红外光谱分析

对玉米秸秆水解液发酵产麦角甾醇酵母进行皂化、萃取、浓缩、结晶得到麦角甾醇晶体。用红外光谱仪测定麦角甾醇($C_{28}H_{43}OH$)的红外光谱特性(图 6)。3421.293 cm^{-1} 处峰, 是羟基(-OH)的伸缩振动吸收峰, 其羟基不随分子的结构发生变化总是在 3750 cm^{-1} ~3000 cm^{-1} 之间出现强而宽的伸缩振动吸收带, 具有强烈的特征性。1715.257 cm^{-1} 和 567.190 cm^{-1} 这两处峰, 是碳碳双键(-C=C-)的伸缩振动和变形振动。在 567.190 cm^{-1} 处出现吸收峰, 说明乙烯基是二取代的顺式结构。此外, 在 1350 cm^{-1} ~400 cm^{-1} 区域内是指纹区, 从图中可以看出 A、B 指纹区大致是一致的, 说明二者具有相同的结构。

2.10 麦角甾醇 X 射线粉末衍射分析

采用 Philips PW1700 型广角 X-射线粉末衍射仪测定玉米秸秆发酵法产麦角甾醇晶体的 X 射线衍射(XRD)图谱(图 7)。谱峰 2θ 分别为(100)(200)(110) ($\bar{1}11$)($\bar{2}11$)(501)($\bar{5}11$)($\bar{4}02$)晶面的衍射角, 与标准衍射卡片(JCPDS 即 Joint Committee on Powder Diffraction Standards)编纂的《粉末衍射卡片集》[(PDF), 070738]相符, 说明是麦角甾醇晶体结构较完整; 可确定它属于单斜晶系, 从图中可以看出 A、B 在同一角度下出峰, 杂峰较少, 说明产物的纯度比较高。

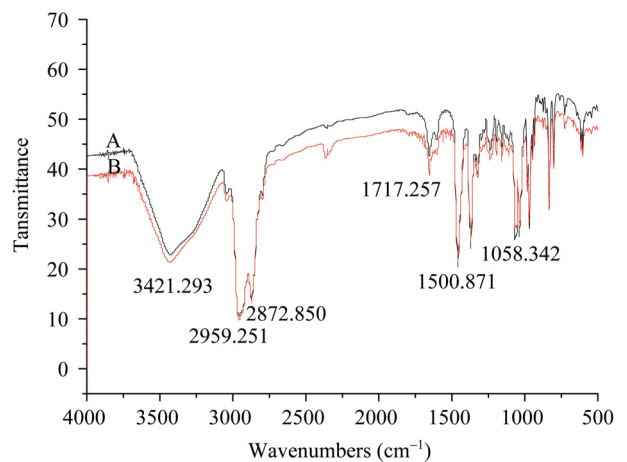


图 6 麦角甾醇晶体的红外光谱图

Fig. 6 Infrared spectvogram of ergosterol crystal

注: A: Sigma 公司麦角甾醇标样; B: 玉米秸秆产麦角甾醇晶体

Note: A: Standard sample of ergosterol; B: The ergosterol produced by corn straw

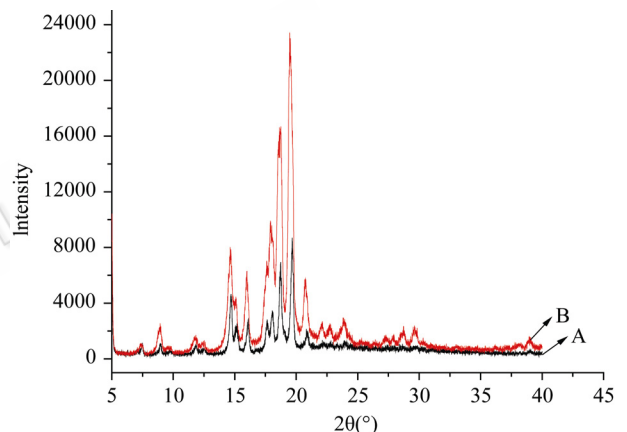


图 7 麦角甾醇的 X 衍射图(XRD)

Fig. 7 X-ray diffractogram of ergosterol crystal

注: A: Sigma 公司麦角甾醇标样; B: 玉米秸秆产麦角甾醇

Note: A: Standard sample of ergosterol; B: The ergosterol produced by corn straw

3 结论

以玉米秸秆为原料, 以本实验室电融合技术构建麦角甾醇酵母细胞工程菌株为实验菌株, 采用深层好氧发酵法产麦角甾醇的工艺路线切实可行。

玉米秸秆水解工艺参数: 盐酸浓度为 1.5%, 固液比为 10%, 在 90°C 下水解 3 h, DE 值达到 53.3%, 纤维素转化率为 79%。

玉米秸秆发酵优化工艺参数: 6°BX 玉米秸秆糖化液、4% 玉米浆为氮源、初始 pH 值 7.5、发酵周期 32 h。在此条件下获得麦角生物量 8.5 g/L; 麦角甾

醇含量达 2.35%, 过量碱法有效减弱玉米秸秆水解液对发酵抑制效应。





对玉米秸秆发酵产麦角甾醇晶体进行结构表征, 红外光谱图表明玉米秸秆发酵产麦角甾醇晶体与标样结构一致, X-射线粉末衍射分析表明玉米秸秆发酵产麦角甾醇晶体属于单斜晶系, 谱图中的杂峰少, 说明麦角甾醇晶体纯度较高。

参 考 文 献

- [1] 张 强, 陆 军, 侯 霖, 等. 玉米秸秆发酵法生产燃料酒精的研究进展. 饲料工业, 2005, 26(9): 20-23.
- [2] 田 沈, 姚莹秋, 蔺增曦, 等. 木质纤维素稀酸水解液乙醇发酵研究进展. 微生物学通报, 2007, 34(2): 355-358.
- [3] 刘 娇, 宋公明, 马立娟, 等. 不同预处理方法对玉米秸秆水解糖化效果的影响. 饲料工业, 2008, 29(1): 31-32.
- [4] 邓玉清, 王 纪, 虞 龙. 微生物麦角甾醇的研究进展. 微生物学杂志, 2001, 21(3): 45-47.
- [5] Fei Shang, Shaohong Wen, Xi Wang, *et al.* High-cell-density fermentation for ergosterol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2006, 101(1): 38-41.
- [6] 徐 勇, 勇 强, 单 谷, 等. 汽喷玉米秸秆纤维素酶水解的研究. 林产化工通讯, 1999, 33(6): 15-18.
- [7] 侯 霖, 薛冬桦, 李 涛, 等. 玉米秸秆预处理及水解生成可发酵性糖. 长春工业大学学报, 2007, 28(1): 26-28.
- [8] 薛冬桦, 李秀萍, 李亚丽, 等. 麦角甾醇酵母培养研究. 东北师大学报(自然科学版), 2006, 38(3): 87-90.
- [9] 姚广印, 张双凤, 谢宗良. 酵母细胞麦角甾醇的提取条件. 河北大学学报, 2007, 27(2): 195-198.
- [10] 张博润, 何秀萍, 铁翠娟, 等. 麦角固醇高产菌株的构建及其培养优化条件的研究. 生物工程学报, 1999, 15(1): 46-51.
- [11] Abramson D, Smith DM. Determination of ergosterol in canolaby liquid chromatography. *Journal of Products Research*, 2003, 39: 185-191.
- [12] Delareauj. Rapid determination of ergosterolby HPLC. *Specta*, 2000, 91(12): 29-31.
- [13] 薛 珺, 蒲 欢, 孙春宝. 纤维素稀酸水解产物中发酵抑制剂的去方法. 纤维素科学与技术, 2004, 12(3): 48-60.

征订启事

2009 年中科院微生物所期刊联合编辑部联合征订全面启动!

	《微生物学报》月刊(每月 4 日出版), 单价 55.00 元, 全年定价 660 元。刊号: ISSN 0001-6209; CODEN WSHPA8。国内邮发代号: 2-504; 国外邮发代号: BM67。
	《生物工程学报》月刊(每月 25 日出版), 单价 65.00 元, 全年定价 780 元。刊号: ISSN 1000-3061; CODEN SGXUED。国内邮发代号: 82-13; 国外邮发代号: BM5608。
	《微生物学通报》月刊(每月 20 日出版), 单价 48.00 元, 年价 576 元。刊号: ISSN 0253-2654; CODEN WSWPDI。国内邮发代号: 2-817; 国外邮发代号: BM413。
	《菌物学报》双月刊(单月 15 日出版), 单价 80 元, 全年定价 480 元。刊号: ISSN 1672-6472; CODEN JXUUAЕ。国内邮发代号: 2-499; 国外邮发代号: Q723。
订阅	欢迎广大读者直接与本刊发行部联系订购, 我们将按期免费为您邮寄。
	汇款地址: (100101)北京市朝阳区大屯路中科院微生物所 B401
	收信人: 《 》编辑部; 电话: (010)64807521; E-mail: bjb@im.ac.cn
	请在附言处注明“订刊费”及所订期刊名称、年代、卷、期和数量