

文章编号: 1674-5566(2011)01-0131-06

酸法水解绿潮藻生物质及发酵制乙醇的效果

张维特¹, 时旭¹, 欧杰², 李柏林², 杨建强³, 胡翔³, 房建孟³, 何培民¹

(1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 3. 国家海洋局 北海分局, 山东 青岛 266033)

摘要: 以2008年我国沿海暴发的绿潮藻浒苔生物质为原材料, 分析了海藻中的营养成分, 探讨了温度、时间、酸度、料水比等因子对浒苔生物质硫酸水解的影响, 通过4因素5水平正交实验, 结果显示温度影响极为显著, 其次为酸度、时间、料水比, 最终确定水解优化组合条件为: 温度90℃、时间70 min、硫酸浓度5.0%、料水比4.5%。通过液相色谱法检测水解液中的单糖成分, 结果表明浒苔水解液中含有葡萄糖、木糖和鼠李糖, 其摩尔比为1.71:1.00:1.29。同时确定了5种酵母菌(酵母菌1770、1766、啤酒酵母S1、酿酒酵母S2、酵母菌IwSc1)的生长曲线, 在其进入稳定期时进行厌氧发酵, 发酵完成后用气相色谱法检测最终产物中的乙醇含量, 结果显示酿酒酵母S2效果最好, 其乙醇含量为2.1 g/L, 乙醇得率为26%, 发酵液中葡萄糖浓度由18.26 g/L降至2.38 g/L, 利用率达87%。S1、S2、IwSc1主要利用葡萄糖, 1770、1766可以利用葡萄糖和木糖。

研究亮点: 系统对绿潮藻浒苔生物质酸解条件进行了探讨, 获得了绿潮藻浒苔生物质酸解最佳条件, 并测定了酸解液中主要单糖成分; 利用绿潮藻浒苔生物质酸解液进行发酵, 制备出了生物乙醇, 其乙醇得率达26%

关键词: 浒苔; 乙醇; 水解; 发酵

中图分类号: TK 6

文献标识码: A

生物质是可再生的绿色新型能源, 它将光能以化学能的形式固定在其中。我国对生物质能源的开发利用主要集中在秸秆、玉米芯、稻草, 废弃木材等, 而对海藻生物质能源的研究相对较少, 相关研究集中在微藻油脂生产生物柴油^[1]。2008年以来, 我国南黄海连续2年爆发绿潮藻, 且规模和生物量一年比一年大^[2]。如何处置和利用如此巨大的海藻, 已成为我国海藻灾害防灾减灾重大项目研究内容之一。绿潮藻主要藻种属于绿藻门石莼目石莼科, 在外部环境适宜的条件下能迅速生长繁殖, 生物量十分惊人, 并且能随海流漂浮, 影响面积大、难以防控。据报道, 2008年仅青岛当地就打捞近一百万吨。绿潮藻的粗纤维含量为10%左右^[3], 虽低于陆生植物, 但因其总量巨大, 所以应用前景非常广阔。

本实验主要应用酸法降解绿潮藻纤维素, 将

水解液经处理后发酵制出酒精, 为我国绿潮藻生物质乙醇能源产品的开发和利用奠定一定基础。

1 材料与方法

1.1 藻种

2008年8月采自青岛胶南海区大规模漂浮的绿潮藻, 主要种类为浒苔(*Ulva prolifera*)^[4]。用干净海水冲洗3~4遍, 除去杂物, 平铺于广场上晒7~8 h, 装入带塑料薄膜内衬的编织袋, 放于干燥避光通风处储存备用。

1.2 菌株

酵母菌1770(嗜单宁管囊酵母 *Pachysolen tannophilus* CICC 1770)、1766(休哈塔假丝酵母 *Candida shehatae* CICC 1766)由中国工业微生物种保藏管理中心提供, 啤酒酵母S1(*Saccharomyces cerevisiae* AS 2.112)、酿酒酵母S2

收稿日期: 2010-03-28 修回日期: 2010-05-16

基金项目: 国家海洋局绿潮专项(CL-01-04)

作者简介: 张维特(1984-), 男, 硕士研究生, 专业方向为海藻生物能源利用。E-mail: wtzhangm@stmail.shou.edu.cn

通讯作者: 何培民, E-mail: pmhe@shou.edu.cn

(*Saccharomyces cerevisiae* AS 2.516)由上海海洋大学提供,酵母菌 IwSc1 (*Saccharomyces cerevisiae* AS 2.109)由哈尔滨工业大学提供。

1.3 酵母培养基

YPD 斜面培养基:酵母浸膏 10 g、蛋白胨 20 g、葡萄糖 20 g、琼脂 15 g、水 1 000 mL,121 °C 灭菌 30 min。

麦芽斜面培养基:麦芽浸膏 3 g、葡萄糖 10 g、酵母浸膏 3 g、蛋白胨 5 g、琼脂 15 g、水 1 000 mL,121 °C 灭菌 30 min。

1.4 实验方法

1.4.1 浒苔中营养成分测定

水分测定:取 0.5 g 藻粉摊平于锡箔托盘中,用 MA100 水分测定仪(德国 Sartorius)105 °C 迅速烘干至恒重,前后质量差为水分含量。

蛋白质测定:采用紫外分光光度法^[5]。

脂肪测定:采用索氏抽提法^[5]。

灰分测定:用高温灼烧法,称取烘干藻粉 3 g,在 550 °C 高温炉内灼烧至恒重,质量差为灰分重量。

粗纤维测定:针对各种成分分别计算各部分含量,最后计算总和^[5]。

1.4.2 浒苔水解条件正交实验

将备用浒苔放入粉碎机粉碎半分钟,用 80 目网筛筛出细粉装袋备用。按温度(°C)、时间(min)、酸度(硫酸含量)、料水比(1 mL 水中投入浒苔的克数),设计 $L_{25}(5^4)$ 正交表^[6-8](表 1),每个水平设 3 个平行,用 DNS 法测定水解液中总还原糖含量^[9]。

表 1 $L_{25}(5^4)$ 正交设计表

Tab. 1 Levels of different conditions in orthogonal test

	A	B	C	D
	温度(°C)	时间(min)	酸度(%)	料水比(%)
1	30	10	1.0	2.0
2	50	40	3.0	4.5
3	70	70	5.0	7.0
4	90	100	7.0	9.5
5	110	130	9.0	12.0

1.4.3 浒苔水解液糖组分测定

用 Waters2695 液相色谱仪(美国 Waters)测水解液中糖组分^[10]。并按 20 mg/mL 配制鼠李糖、果糖、葡萄糖、木糖、半乳糖、甘露糖的标准溶液。

1.4.4 酵母菌生长曲线测定

酵母菌生长测定见参考方法[11]。用 YPD 斜面培养基培养 S1、S2、IwSc1 菌株,麦芽斜面培养基培养 1766、1770 菌株。待斜面长好后各加入 3 mL 生理盐水,轻微震荡,分别取 0.5 mL 悬浊液加入到浒苔水解液中振荡培养(THZ-051 恒温摇床,上海申能博彩公司),培养条件为:温度 28 °C,转速 170 r/min。每隔 2 h 取样测 OD 值(590 nm 波长),绘制出酵母菌在水解液中的生长曲线。

1.4.5 浒苔水解液发酵

浒苔水解液制作:按照 1.4.1 中最佳水解条件水解浒苔,用石灰调 pH 至 6.0 左右,过滤并浓缩至有少量糖的结晶物析出。

发酵菌株种子液制作:YPD 液体培养基接种 S1、S2、IwSc1 菌株,麦芽液体培养基接种 1766、1770 菌株。接种后置入摇床进行振荡培养,培养条件:温度 28 °C,转速 170 r/min,在各酵母菌对数期时取出。

发酵:用 250 mL 三角瓶装入 50 mL 水解液,按照 10% 的接种量,加入酵母菌种子液,在 28 °C 摇床中 170 r/min 震荡 6 h,连上无菌 U 型杆,杆内用无菌水液封,保持密封环境,放入 28 °C 培养箱静置厌氧发酵 3 d。

1.4.6 乙醇含量测定

采用 6890N 气相色谱仪(美国 Agilent)测定酒精含量^[12]。乙醇标准液配制:取 0.05 g 无水乙醇溶于 100 mL 水中,40 °C 水浴平衡 1 h,用采样针取上层气体进气相色谱。

2 结果与分析

2.1 浒苔中的各种成分

实际检测浒苔样品中含水分 12.4%,蛋白质 12%,脂肪 0.54%,粗纤维 15%,灰分 29%。

2.2 多种因子对浒苔生物质水解的影响

表 2 为温度、时间、酸度、料水比等 4 因子 5 水平对浒苔生物质硫酸水解效果的正交实验结果。由表 2 可以看出,4 因素对水解效果影响由高到低依次为温度、酸度、料水比和时间。其中,温度组中 90 °C、110 °C 所获得的总还原糖含量高于其他 3 组温度所在平行,两者最后转化率前者最高为 31.421%,后者最高为 28.875%,相差仅为 2.546%,但 110 °C 需要用高压灭菌锅,操作繁

琐且耗电量大,因此选取 90 °C 为水解温度;时间组中加热 130 min 的效果好于其它时间段,但由于美拉德反应的存在,时间过长可能导致还原糖变质,且水解液变成褐色对后期吸光度的测量也有影响,100 min 也存在同样问题,所以选取 70 min 为最佳时间;极值计算结果表明,5.0% 硫酸浓度最佳;料水比组中 2.0%、4.5%、7.0% 的料水比好于其它两组,由于后期需要对水解液浓

缩,2.0% 投料量虽然转化率高但糖含量低,浓缩时间长,7.0% 投料量虽然糖含量较高但投料量大且转化率偏低,综合考虑选取 4.5% 的料水比。

综上所述,最终确定水解条件为 90 °C,70 min,5% 硫酸,4.5% 料水比。

方差分析结果见表 3,通过对各因素的 *MS* 进行 *F* 检验,在 $\alpha=0.01$ 和 $\alpha=0.05$ 的置信度范围内,温度为极显著差异。

表 2 浒苔水解正交实验结果

Tab. 2 Results of the orthogonal test for *Ulva prolifera* biomass hydrlysis

组	A	B	C	D	转化率(%)
1	1	1	1	1	0
2	1	2	2	2	0.094
3	1	3	3	3	0.103
4	1	4	4	4	0.919
5	1	5	5	5	0.736
6	2	1	2	3	1.269
7	2	2	3	4	1.012
8	2	3	4	5	0.875
9	2	4	5	1	1.526
10	2	5	1	2	1.917
11	3	1	3	5	1.453
12	3	2	4	1	5.564
13	3	3	5	2	6.123
14	3	4	1	3	1.590
15	3	5	2	4	3.570
16	4	1	4	2	13.366
17	4	2	5	3	20.482
18	4	3	1	4	6.029
19	4	4	2	5	15.220
20	4	5	3	1	28.875
21	5	1	5	4	17.156
22	5	2	1	5	11.713
23	5	3	2	1	30.465
24	5	4	3	2	31.421
25	5	5	4	3	25.958
R ₁	0.370	6.649	4.250	13.286	
R ₂	1.320	7.773	10.124	10.584	
R ₃	3.660	8.719	12.573	9.880	
R ₄	16.794	10.135	9.336	5.737	
R ₅	23.343	12.211	9.205	5.99	
R	22.973	5.562	8.323	7.549	

表 3 浒苔水解正交实验方差分析

Tab. 3 Variance analysis for *Ulva prolifera* biomass hydrlysis

因素	SS	df	F	F _{0.01}	显著性
A	2141.932	4	28.949	7.010	*
B	93.328	4	1.261	7.010	
C	183.497	4	2.480	7.010	
D	206.283	4	2.788	7.010	
误差	147.98	8			

注: * 具有极显著差异($P < 0.01$)。

2.3 浒苔水解液糖组分测定

液相色谱分析结果显示,浒苔经硫酸水解后,其水解液中主要含有葡萄糖、鼠李糖和木糖(图1),并且还含有少量甘露糖和半乳糖。其中葡萄糖、鼠李糖和木糖的摩尔比分别为 1.71 : 1.29 : 1.00。

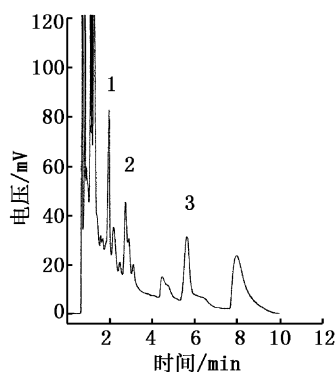


图1 浒苔硫酸水解液单糖液相色谱分析结果

Fig. 1 Chromatography analysis of monosaccharides *Ulva prolifera* in hydrolysate with sulphuric acid

1. 鼠李糖; 2. 木糖; 3. 葡萄糖

2.4 酵母菌在发酵液中生长曲线与厌氧发酵时间的确定

各酵母菌在浒苔水解液中生长曲线见图2。从图2可以看出,在温度 28 °C、转速 170 r/min 条件下,S1、S2、IwSc1 在 0 ~ 8 h 处于生长调整期,8 ~ 18 h 处于对数生长期,18 h 以后处于稳定期,因此选择第 18 h 为厌氧发酵时间;1766 菌种在

0 ~ 12 h 处于生长调整期,12 ~ 22 h 处于对数生长期,22 h 以后处于稳定期,选第 22 h 为厌氧发酵时间;1770 菌种在 0 ~ 14 h 处于生长调整期,14 ~ 24 h 处于对数生长期,24 h 以后处于稳定期,选第 24 h 为厌氧发酵时间。

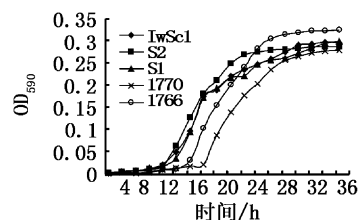


图2 酵母菌在水解液中生长曲线

Fig. 2 Growth curves of different yeasts in hydrolysates

2.5 不同发酵菌对水解液发酵的影响

浒苔水解液发酵前总还原糖含量为 39.73 g/L,其中葡萄糖浓度为 18.26 g/L,木糖浓度为 8.90 g/L,鼠李糖浓度为 12.55 g/L 发酵结束后,各组上清液乙醇、总还原糖、葡萄糖、木糖、鼠李糖浓度检测结果见表4,其中酒精含量大约在 1.4 ~ 2.1 g/L。可见 S2 产乙醇量最高,达到 2.1 g/L,剩余葡萄糖最低为 2.38 g/L,葡萄糖利用率最高,达 87%,酒精产率达到 26%。S1、S2 和 IwSc1 主要利用葡萄糖,而不利用木糖。1770 和 1766 既可利用葡萄糖也可利用木糖,且使水解液木糖降低了 52%。

表4 发酵完成后发酵液中总糖、单糖(葡萄糖、木糖、鼠李糖)及乙醇含量

Tab. 4 Concentration of total reducing sugar, monosaccharide (cglucose, xylose and rhamnose) and ethanol in fermentation broth

菌种	总还原糖(g/L)	葡萄糖(g/L)	木糖(g/L)	鼠李糖(g/L)	乙醇(g/L)	葡萄糖利用率(%)
1770	23.25	7.32	4.57	12.55	1.4	60
1766	22.77	7.28	4.31	12.54	1.5	60
S1	21.75	3.74	9.93	12.55	1.4	80
S2	20.19	2.38	9.92	12.55	2.1	87
IwSc1	21.53	3.41	9.92	12.55	1.5	81

3 讨论

3.1 浒苔水解与传统木质纤维素水解比较

浒苔是一种大型海洋绿藻,其叶片为单层管状细胞^[13],根据浒苔中营养成分分析,青岛海域浒苔中粗纤维含量 15%,主要为纤维素及半纤维

素,相对于含有木质素的高等植物更容易酸化水解,反应条件更温和。一般水解木质纤维素的糖转化率为 50%,使用酸浓度范围 3% ~ 9%,温度在 120 °C ~ 220 °C 之间,时间长达数小时^[14-15],而水解浒苔的糖转化率为 30%,使用 5% 硫酸,在 90 °C 条件下水解 70 min 即可,简便易行。并且

浒苔中含有蛋白质 12%,较高的蛋白质含量使后期发酵时不需要向发酵液中添加氮源。

3.2 浒苔发酵酒精得率

从最终发酵结果来看,S1、S2、IwSc1 主要利用葡萄糖,S2 的乙醇产量高出其它 4 株酵母 30%,可见它对浒苔的水解液有更强的适应性和耐受性。1770、1766 葡萄糖和木糖均能利用,并且在木糖水平低于葡萄糖的条件下,仍然能生产出和啤酒酵母、IwSc1 同等量的酒精,说明它们对木糖的转化效率非常高,正好可以弥补其它菌种的不足。产量最高的 S2 所消耗的葡萄糖为 15.88 g/L,理论上能产酒精 8.12 g/L,实际产量为 2.1 g/L,酒精得率为 26%。影响得率的原因可能有以下几个方面:首先,浒苔中的半纤维素会脱乙酰生成乙酸,导致酵母细胞内环境酸化,乙酸还可抑制部分糖酵解酶的活性。其次,浒苔酸水解液的单糖组分中含有葡萄糖和木糖,它们在酸性环境下可以脱水形成糠醛和 5-羟甲基糠醛,从而抑制乙醇脱氢酶、乙醛脱氢酶和丙酮酸脱氢酶等,降低细胞活力,延长停滞期,由糠醛降解产生的甲酸具有比乙酸更强的细胞抑制作用^[16]。尽管前期对浒苔进行水洗浸泡处理及硫酸水解后用 Ca(OH)₂ 中和^[17-18],多少降低了一些负面因子,但残留物会在浓缩过程中得到加强,原来低浓度的有害物质也会进一步富集,从而影响发酵结果。最后,浒苔粗纤维的含量本身就比陆生植物低,而且水解生成的单糖种类多,鼠李糖就不能为菌种所用,丰富的蛋白质还能与还原糖发生美拉德反应。不过从结果中也可以看出,如果在以后的实验中能对酿酒酵母 S2 进行筛选,得到最合适的突变菌株,再辅以一定比例的 1766 菌株,提高木糖的利用率,相信还会再度提高乙醇的产量。

3.3 浒苔发酵制备乙醇的潜力

浒苔是中国海洋野生植物中极为丰富的大型经济藻类,在海水、淡水中均可生长。据新闻报道,2009 年在江苏省盐城以东约 100 km 海域处发现漂浮绿潮,分布面积约为 6 550 km²,覆盖面积约 42 km²,并且烟台、威海等地也出现绿潮,浒苔总量估计有几百万吨。按现有的酒精产率计算,能产酒精十几万吨。在以后的实验中,对浒苔生物质利用将继续加以研究。

参考文献:

- [1] 郑言. 微藻制生物柴油前景可期[J]. 中国石化,2009(8): 28-29.
- [2] 梁宗英,林祥志,马牧,等. 浒苔漂流聚集绿潮现象的初步分析[J]. 中国海洋大学学报:自然科学版,2008,38(4): 601-604.
- [3] 何清,胡晓波,周峙苗,等. 东海绿藻缘管浒苔营养成分分析及评价[J]. 海洋科学,2006,30(1):34-38.
- [4] 叶乃好,张晓雯,毛玉泽,等. 黄海绿潮浒苔(*Enteromorpha prolifera*)生活史的初步研究[J]. 中国水产科学,2008,15(5):853-856.
- [5] 穆华荣,于淑萍. 食品分析[M]. 北京:化学工业出版社,2004:44-75.
- [6] NGUYEN M T, SEUNG P C, LEE S H, et al. Hydrothermal acid pre-treatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production[J]. Microbiol Biotechnol, 2009, 19(2): 161-166.
- [7] YOSHIKUNI T, NORIKO T, LEE S H, et al. Pre-treatment of eucalyptus wood chips for enzymatic saccharification using combined sulfuric acid-free ethanol cook and ball milling[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2008, 99(1):75-85.
- [8] MUSSATTO S I, ROBERTO I C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes[J]. Bioresour Technol, 2004, 93(1):1-10.
- [9] 杨贵明,蒋爱华,薛秋生. 用 DNS 光度法测定还原糖的条件研究[J]. 安徽农业科学,2006,34(14):3258-3264.
- [10] 杨俊,刘江生,蔡继宝,等. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定烟草中的水溶性糖[J]. 分析化学,2005,33(11):1596-1598.
- [11] 王秋菊,许丽,崔一喆,等. 酵母菌生长曲线的测定及不同生长时间麦芽汁糖度的变化[J]. 兽药与饲料添加剂, 2006,11(1):8-9.
- [12] 李竹鹭,王莉,骆雨龙. 气相色谱法测定酒醅中的乙醇[J]. 酿酒科技,2004(3):85-86.
- [13] 忻丁豪,任松,何培民,等. 黄海海域浒苔属(*Enteromorpha*)生态特征初探[J]. 海洋环境科学,2009,28(2):190-192.
- [14] 杨洋,张玉苍,何连芳,等. 纤维素类生物质废弃物水解方法的研究进展[J]. 酿酒科技,2009(10):82-86.
- [15] 张宇,许敬亮,王琼,等. 纤维素酶水解棕榈壳制取乙醇研究[J]. 农业工程学报,2008,24(10):186-189.
- [16] 李洪兴,张笑然,沈煜,等. 纤维素乙醇生物加工过程中的抑制物对酿酒酵母的影响及应对措施[J]. 生物工程学报,2009,25(9):1321-1328.
- [17] ALMEIDA J R M, BERTILSSON M, GORWA-GRAUSLUND M F, et al. Metabolic effects of furaldehydes and impacts on biotechnological processes[J]. Appl Microbiol Biotechnol,

2009,82(4):625-638.
[18] PALMQUIST E, HAHN-HAGERDAL B. Fermentation of

ligno-cellulosic hydrolysates[J]. *Bioresour Technol*,2000,74
(1):17-24.

Effect of preparing alcohol with green tide algae biomass by acid hydrolysis

ZHANG Wei-te¹, SHI Xu¹, OU Jie², LI Bai-lin², YANG Jian-qiang³, HU Xiang³, FANG Jian-meng³, HE Pei-min¹

(1. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. North China Sea Branch of the State Oceanic Administration, Qingdao 266033, China)

Abstract: In summer of 2008, green tides broke out in south Yellow Sea. First, the nutrition of floating algae was analyzed and then the algae were treated by sulphuric acid for getting reducing sugar. The effects of temperature(°C), treating time(min), sulphuric acid concentration(%), ratio of mass weight(%) on the biomass hydrolyzation were studied and the hydrolysis conditions were optimized by orthogonal analysis. The results showed that optimum conditions for floating *Ulva prolifera* biomass hydrolysis by sulphuric acid were 90 °C of treating temperature, 70 min of treating time, 5% of sulphuric acid concentration, 4.5% of ratio of the mass weight. Liquid chromatography analysis showed that the molar ratio of monosaccharides in hydrolyzate were glucose 1.71:xylose 1.00:rhamnose 1.29. Growth curves of five yeasts(IwSc1, S1, S2, 1770, 1766) were drawn in order to ferment the liquid at stationary phase. The results showed that S2 was the best for getting highest ethanol concentration with GC analysis. The ethanol concentration was 2.1 g/L and the ethanol conversion rate was 26%. Glucose concentration dropped from 18.26 g/L to 2.38 g/L and the utilization rate of it was 87%. S1, S2 and IwSc1 mainly use glucose compared with 1770, 1766 which can use both glucose and xylose.

Key words: *Ulva prolifera*; ethanol; hydrolyzation; fermentation