

黄浆水与木薯粉混合发酵高浓度乙醇的发酵条件*

Techniques for Fermentating High-concentration Ethanol from Mixing Yellow Serofluid and Cassava

秦 艳¹, 申乃坤¹, 莫勇生², 朱 婧¹, 王青艳^{1**}, 廖思明³

QIN Yan¹, SHEN Nai-kun¹, MO Yong-sheng², ZHU Jing¹, WANG Qing-yan¹, LI-
AO Si-ming³

(1. 广西科学院国家非粮生物质能源工程技术研究中心, 广西南宁 530007; 2. 广西科学院生物研究所, 广西南宁 530007; 3. 广西红树林研究中心, 广西北海 536000)

(1. National Engineering Research Center for Non-food Biorefinery, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China; 2. Institute of Biology of Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China; 3. Guangxi Mangrove Research Center, Beihai, Guangxi, 536000, China)

摘要:以黄浆水与木薯粉混合同步糖化发酵高浓度乙醇,应用 Plackett-Burman 设计对底物浓度、尿素、糖化酶、液化酶、MgSO₄、pH 值、CaCl₂、KH₂PO₄ 8 个因素进行 2 水平 12 次试验,研究发酵的最佳条件。结果发现,底物浓度、尿素、糖化酶和 KH₂PO₄ 的添加量是影响发酵的重要因素,最佳发酵条件是底物浓度 38%、尿素 0.15%、糖化酶 1.45AGU/g、KH₂PO₄ 0.07%。在最佳发酵条件下,乙醇浓度达到 17.21% (V/V)。

关键词:黄浆水 木薯粉 同步糖化发酵 Plackett-Burman 设计 乙醇

中图分类号:TQ223.12⁺2,TQ926 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2012)03-0249-04

Abstract: The conditions of simultaneous saccharification and fermentation by mixing yellow serofluid and cassava flour were investigated for producing high-concentration ethanol. The important parameters were screened by Plackett-Burman design, and subsequently the path of steepest ascent was used to approach to the biggest region of ethanol production. Finally, the optimum values of parameters were obtained by orthogonal tests. The experimental results showed the optimum technical conditions as follows: Substrate concentration 38%, CO(NH₂)₂ 0.15%, Dextrozyme 1.45 AGU/g substrate, KH₂PO₄ 0.07%, under which the ethanol reached 17.21% (V/V) after 48 h fermentation at 32°C and 100 r/min.

Key words: yellow serofluid, cassava flour, simultaneous saccharification and fermentation, Plackett-Burman design, ethanol

能源和环境是当今社会发展面临的突出问题。面对石油资源日益枯竭的现状,以发酵法生产燃料乙醇是解决能源及环境问题,实现经济可持续发展的最

有效途径^[1,2]。不同的发酵法,产生的乙醇质量浓度不同。高浓度乙醇发酵是指糖化醪中含有 30% 或更高的可溶性固形物进行的发酵。高浓度发酵终点产物乙醇的浓度高,后续精馏操作能耗低;废糟液量,处理的能耗低;从液化、糖化到发酵的物料流量都少,相关的加热与冷却负荷低,因此,多年来高浓度乙醇发酵一直是各国研究的重点领域^[3~6]。

黄浆水是淀粉生产过程中产生的大量高浓度有机废水。按照目前的生产工艺,每生产 1t 淀粉会排出 15~20t 黄浆水。黄浆水 pH 值 4.2 左右,含可溶性物质 6% 左右, COD_{Cr}10000 ~ 25000mg/L,

收稿日期:2012-01-30

修回日期:2012-03-16

作者简介:秦 艳(1982-),女,工程师,主要从事微生物发酵及酶工程方面的研究。

* 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科重 12118004-3);广西区科学研究与技术开发课题(桂科攻 1099070,桂科攻 11107008-4);广西科学院基金项目(No. 10YJ25SW07)资助。

** 通讯作者。

DOD₅5000 ~ 10000mg/L, 固体悬浮物 1500 ~ 2500mg/L, 是淀粉生产中处理难度最大的废水。黄浆水排入江要消耗大量的溶解氧, 如果不经治理直接排放, 会对环境造成严重污染^[7,8]。韩小龙等^[9]将黄浆水与工厂一般添加的尿素或硫酸铵作为氮源培养酵母并进行酒精发酵实验的对比, 发现用黄浆水培养的酵母进行酒精发酵时原料出酒率比尿素和硫酸铵的都高。本文针对广西特色资源, 结合能源和环保两大主题, 以木薯粉与黄浆水的混合物为原料, 采用同步糖化发酵模式发酵高浓度乙醇, 研究发酵的最佳条件, 为实现木薯黄浆水资源化利用, 解决污水排放问题, 节省自来水用量, 降低木薯乙醇生产成本提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

酿酒酵母 GXASY-49 为本实验选育。木薯粉含淀粉 70.26%, 为广西明阳淀粉化工股份有限公司生产。黄浆水取自广西明阳淀粉化工股份有限公司废水池。液化酶为诺维信公司生产的耐高温淀粉酶 Liquozyme Supra, 标准酶活 135 KNU/g。糖化酶为 Dextrozyme DX 诺维信公司生产, 标准酶活 500 AGU/ml。

种子培养基: 葡萄糖 60g/L, 蛋白胨 20g/L, 酵母粉 10g/L。发酵培养基: 黄浆水与木薯粉以设定比例混合, 加入液化酶, 迅速加热到 90~95℃, 液化 30~60 min, 降温到 32℃, 调整 pH 值, 加入适量糖化酶和所需营养物质, 接种发酵^[3]。

1.2 方法

采用数理统计软件 DX7.0 中的 Plackett-Burman^[12] 和正交试验方法设计实验和分析数据。根据前期单因素实验的结果和文献^[3,13], 选用实验次数为 12 的设计, 对底物浓度、尿素、糖化酶、液化酶、MgSO₄、pH 值、CaCl₂、KH₂PO₄ 等 8 个因素进行考察, 并预留 3 个空白项以估计实验误差。每个因素取 2 个水平, 以发酵醪液乙醇体积浓度(%, V/V) 的平均值为响应值 Y, 每组实验设置 3 个平行, 结果取平均值。Plackett-Burman 实验因素及水平如表 1 所示。

还原糖测定采用 3,5-二硝基水杨酸比色法^[10]。总糖是酸水解后采用还原糖测定。乙醇浓度采用气相色谱法^[11]测定。蛋白质含量采用 NanoDrop 微量分光光度计测定。

2 结果与分析

2.1 黄浆水理化性质及成分

对黄浆水进行理化性质及成分测定, 结果发现黄浆水 pH 值 4.26, 还原糖 0.33g/L, 总糖 4.06g/L, 固体悬浮物 1.8g/L, 淀粉 3.69g/L, 蛋白质 1.29g/L。黄浆水的 pH 值较低, 可以满足乙醇发酵在酸性环境中进行的要求, 虽然碳源含量较低, 但是含有丰富的氮源, 可以用于乙醇发酵。用黄浆水取代自来水与木薯粉混合发酵乙醇, 充分利用了黄浆水中营养成分, 变废为宝。

表 1 Plackett-Burman 实验因素及水平

Table 1 Factors and levels of Plackett-Burman design

编号 Code	因素 Factor	水平 Level	
		-1	+1
X ₁	底物 Substrate(%, m/m)	32	34
X ₂	CO(NH ₂) ₂ (%, m/m)	0.15	0.3
X ₃	液化酶 Liquozyme (KNU/g substance)	0.10	0.20
X ₄	MgSO ₄ (%, m/m)	0.05	0.1
X ₅	糖化酶 Dextrozyme (AGU/g substance)	0.78	1.47
X ₆	pH 值 pH value	4.5	5.0
X ₇	CaCl ₂ (%, m/m)	30	35
X ₈	KH ₂ PO ₄ (%, m/m)	0.05	0.1

2.2 影响发酵的重要因素

通过 Plackett-Burman 实验设计矩阵(表 2), 并对其进行分析(表 3)。“Prob>F”小于 0.05, 表明因素是重要的;“Model Prob>F”等于 0.0038, 表明模型是重要的。根据表 4 的分析结果, 我们选择“Prob>F”小于 0.1 的 4 个因素 X₁、X₂、X₅、X₈, 即底物浓度、尿素、糖化酶和磷酸二氢钾添加量为影响乙醇发酵的重要因素。

2.3 正交实验因素水平的中心点

最陡爬坡试验可以在不考虑各个因素相互影响下逼近最优结果, 因此, 先进行最陡爬坡试验能使后面的正交试验更准确、更有效。从表 5 可知, 最大乙醇浓度在第 5 次附近, 但是原料利用率较低, 综合考虑淀粉增加量与乙醇增加量的比率, 以实验 4 的条件为正交实验因素水平的中心点。

2.4 最佳发酵条件

根据最陡爬坡实验得到的中心点, 取 3 个水平做正交试验(表 6)。

根据正交试验软件设计 4 因素 3 水平共 9 个实验点进行正交分析, 每个试验点做 3 个平行, 结果取平均值。由表 7 的极差分析结果可以看出, 木薯淀粉

与黄浆水浓醪发酵乙醇中,影响最终酒度的因素从大到小依次为:底物浓度>尿素>KH₂PO₄>糖化酶;由此可以确定最佳的发酵条件为:A₂B₂C₃D₃。

表 2 Plackett-Burman 试验结果

Table 2 Plackett-Burman design and fermentation result

序号 Run	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	Y (%, V/m)
1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	14.03
2	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	13.70
3	1	1	1	1	-1	-1	1	-1	14.23
4	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	14.22
5	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	13.99
6	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	13.83
7	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	13.42
8	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	14.97
9	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	13.66
10	1	-1	-1	1	1	1	1	1	14.55
11	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	14.68
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	14.18

表 3 方差分析结果

Table 3 Variance analysis

来源 Source	自由度 Degree of freedom	平方和 Sum of squares	方差 Mean square	F	Prob>F
模型 Model	8	1.93	0.48	11.06	0.0038
误差 Error	3	0.31	0.044		
总误差 Total error	11	2.23			

表 4 参数估计和各影响因素

Table 4 Parameter estimation and effects of different factors

变量 Variables	自由度 Degree of freedom	评估系数 Coefficient estimate	标准差 Standard error	Prob>F	顺序 Order
截距 Intercept	1	14.12	0.06	0.0038	0
X ₁	1	0.26	0.06	0.0033	1
X ₂	1	-0.25	0.06	0.0042	2
X ₃	1	0.098	0.06	0.1035	5
X ₄	1	0.042	0.06	0.22	7
X ₅	1	0.12	0.06	0.0833	3
X ₆	1	-0.052	0.06	0.28	8
X ₇	1	-0.075	0.06	0.1568	6
X ₈	1	-0.12	0.06	0.0981	4

表 5 最陡爬坡试验设计及结果

Table 5 Experimental design of steepest ascent and corresponding results

序号 Run	底物 Substrate (%, m/m)	CO(NH ₂) ₂ (%, m/m)	糖化酶 Dextrozyme (U/g)	KH ₂ PO ₄ (%, m/m)	Y (%, V/m)
1	32	0.30	0.78	0.1	14.18
2	34	0.25	0.95	0.085	14.97
3	36	0.20	1.11	0.07	15.86
4	38	0.15	1.25	0.055	16.80
5	40	0.10	1.38	0.04	16.81
6	42	0.05	1.49	0.025	15.85

2.5 最佳发酵条件验证

利用正交实验确定的最佳发酵条件 A₂B₂C₃D₃进行乙醇发酵验证试验,设 3 个平行,结果取平均值,经过 48h 发酵,醪液乙醇浓度可以达到 17.21% (V/V)。

表 6 正交试验因素与水平

Table 6 Factors and levers for the orthogonal experiments

序号 Run	底物 Substrate (%, m/m)	CO(NH ₂) ₂ (%, m/m)	糖化酶 Dextrozyme (U/g)	KH ₂ PO ₄ (%, m/m)
1	36	0.10	1.11	0.04
2	38	0.15	1.25	0.055
3	40	0.20	1.38	0.07

表 7 正交试验设计及结果

Table 7 Experimental design and result of the orthogonal experiments

序号 Run	A: 底物 Substrate (%, m/m)	B: CO(NH ₂) ₂ (%, m/m)	C: 糖化酶 Dextrozyme (U/g)	D: KH ₂ PO ₄ (%, m/m)	Y (%, V/m)
1	1	1	1	1	15.40
2	1	2	2	2	15.78
3	1	3	3	3	15.77
4	2	1	2	3	16.63
5	2	2	3	1	17.06
6	2	3	1	2	16.22
7	3	1	3	2	16.33
8	3	2	1	3	16.93
9	3	3	2	1	16.54
k ₁	15.65	16.12	16.19	16.33	
k ₂	16.64	16.59	16.32	16.11	
k ₃	16.60	16.18	16.39	16.45	
R	0.99	0.47	0.20	0.34	

3 结束语

本文以黄浆水代替自来水与木薯淀粉混合发酵高浓度乙醇的工艺进行研究,应用 Plackett-Burman 设计对底物浓度、液化酶、糖化酶等 8 个因素进行了 2 水平 12 次试验,确定出底物浓度、糖化酶、尿素、KH₂PO₄为主要影响因素,通过最陡爬坡实验确定中心点,进一步用正交试验对主要因素进行 4 因素 3 水平的 9 次试验,确定主要因素的最佳量为:底物浓度 38%、尿素 0.15%、糖化酶 1.45 AGU/g、KH₂PO₄ 0.07%,发酵获得的乙醇浓度可以达到 17.21% (V/V)。

用木薯粉和黄浆水的混合替代清水和木薯淀粉调浆、应用抗木薯废水黄浆水抑制物的高抗性酵母菌株、采用优化的工艺技术以及废渣废液的综合利用等生产技术来提高木薯淀粉的转化率和木薯酒精的发酵效率,不仅可以达到木薯废水黄浆水资源化利用,

降低污水处理成本,还大大节省了用水量,降低木薯淀粉生产企业的生产成本,达到节本节能增效的目的,推动木薯生物质能源产业的健康发展。

参考文献:

[1] 高寿清. 生物量制燃料酒精的发展和需要解决的问题[J]. 食品与发酵工业, 1991(1):54-60.
[2] 黄宇彤, 伍松陵, 杜连祥. 玉米酒精超高浓度发酵工艺条件的优化[J]. 食品工业科技, 2002, 23(8):66-69.
[3] 申乃坤, 王青艳, 黄日波, 等. 响应面法优化耐高温酵母生产高浓度乙醇[J]. 生物工程学报, 2010, 26(1):42-47.
[4] Rasmus D, Sven P, Lisbeth O. Characterization of very high gravity ethanol fermentation of corn mash. Effect of glucoamylase dosage, pre-saccharification and yeast strain[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2005, 68(5):622-629.
[5] Thomas K C, Ingledew WM. Production of 21% (V/V) ethanol by fermentation of very gravity (VHG) wheat mash[J]. J Ind Microbiol Biot, 1992, 10:61-68.
[6] Thomas K C, Hynes SH, Ingledew WM. Effect of particulate materials and osmoprotectants on very high gravity ethanolic fermentation[J]. Appl Environ Microbiol, 1994,

60(5):1519-1524.

[7] 梁怡, 刘康怀, 魏博, 等. 木薯淀粉企业实施节能减排的经济分析[J]. 中国经济与管理科学, 2009, 4:48-49.
[8] 冯世骥, 刘小兵. 木薯淀粉厂污水处理工艺研究及工程实践[J]. 淀粉与淀粉糖, 2001(1):44-50.
[9] 韩小龙. 提高木薯酒精出酒率的研究[D]. 山东: 山东轻工业大学, 2008.
[10] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999:10-11.
[11] Ohta K, Beall D S, Mejia J P, et al. Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production: Chromosomal integration of *Zymomonas mobilis* genes encoding pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase II [J]. Appl Environ Microbiol, 1991, 57:893-900.
[12] Hacker R L, Burman J P. The design of optimum multifactorial experiments [J]. Biometrika, 1946, 33: 305-325.
[13] 张书祥, 肖亚中, 任杰. 添加营养盐对酒精发酵的影响[J]. 生物学杂志, 1997, 14 (1):23-25.

(责任编辑: 陈小玲)

(上接第 248 页 Continue from page 248)

2.4 扩展不确定度及测量结果的表示

取包含因子 $k=2$, 则扩展不确定度为:

$$U = k \times u_c = 2 \times 0.00073\% = 0.0015\%$$

硫含量的测量结果表示为:

$$w_c = (0.0311 \pm 0.0015)\%, k = 2.$$

3 结论

通过计算各不确定度分量并比较可以看出, 用高频红外碳硫分析仪测定土壤中硫含量, 影响测量不确定度的主要来源是重复性测定、标准物质选用. 而仪

器示值引入的不确定度可忽略不计, 天平称量和由助熔剂及瓷坩埚引入的空白要注意控制.

参考文献:

[1] 中华人民共和国国家计量技术规范. JJF1059-1999. 测量不确定度评定与表示[S]. 北京: 中国计量出版社, 2000.

(责任编辑: 邓大玉)