

能源甜菜乙醇发酵的耐高温菌种筛选及工艺优化

史淑芝¹, 代翠红¹, 程大友¹, 马凤鸣², 鲁兆新¹, 罗成飞¹

1. 哈尔滨工业大学食品学院, 哈尔滨 150090

2. 东北农业大学农学院, 哈尔滨 150056

摘要 利用能源甜菜进行乙醇发酵已引起人们重视。由于发酵温度对乙醇发酵效果影响较大, 为了探讨不同菌种对发酵温度高低的适应性, 筛选适应高温发酵的优良菌株, 本研究首先利用温度单因素筛选出耐高温菌种 HADY, 45℃时乙醇转化率仍达 81.68%; 菌种 ADY 在 31℃时乙醇转化率最高。然后利用 Plackett-Burman 设计和响应面分析法 (RMS) 从与发酵相关的 9 个因素: 底物质量浓度、料液比、加菌量、营养盐添加量、加磷量、pH 值、转速、发酵温度和发酵时间中依次筛选出底物质量浓度、发酵温度和加磷量 3 个主要影响因素。优化后的工艺参数为: 底物质量浓度为 12%、料液质量比 1:1、加菌量 15%、营养盐 0.5、加磷量 0.9%、pH 值 5.0、转速 130r/min、发酵温度 37℃和发酵时间 44h。此条件下的乙醇转化率为 89.43%。

关键词 能源甜菜; 乙醇发酵; 乙醇转化率; 响应面法; 工艺优化

中图分类号 TS261.4

文献标识码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2011.03.12

Screening High Temperature Tolerant Yeast Strains and Technological Optimization of Ethanol Fermentation of Energy Beet

SHI Shuzhi¹, DAI Cuihong¹, CHENG Dayou¹, MA Fengming², LU Zhaoxin¹, LUO Chengfei¹

1. Food Science and Engineering School, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China

2. Agricultural College, Northeast Agricultural University, Harbin 150056, China

Abstract It has been an interesting topic using energy beet to ferment ethanol. Because temperature would affect ethanol fermentation of energy beet greatly, in order to explore the adaptability to high temperature of the different strains and to screen better yeast to ferment in the high temperature, in this study, at first, by the single factor, temperature, the yeast HADY was screened to be tolerant to high temperature, such that when the fermentation temperature was 45℃, the translation rate of ethanol was 81.68%. However, the translation rate of ethanol of ADY was the highest at 31℃. Secondly, three main factors were screened out from nine factors related to fermentation by Plackett-Burman design and response surface methodology, including substrate concentration, ratio of solvent to material, added HADY amount, nutrient salts, phosphorus addition amount, pH value, rotational speed, fermentation temperature and fermentation time. The three main factors are substrate concentration, fermentation temperature and phosphorus addition amount. The optimized technological parameters of HADY are as follows: substrate concentration (mass fraction) 12%, mass ratio of solvent to material 1:1, added HADY 15%, nutrient salts 0.5, added phosphorus 0.9%, pH 5.0, rotation speed 130r/min, fermentation temperature 37℃ and fermentation time 44 hours. It is shown that the translation rate of ethanol is 89.43%.

Keywords energy beet; ethanol fermentation; translation rate of ethanol; response surface methodology; technological optimization

0 引言

由于矿物质能源的储量有限和人们环保意识的增强, 利

用可再生的生物质进行能源生产越来越引起人们的重视^[1-3]。

因此, 寻找一种能保证能源正常供应而污染又小的燃料已迫

收稿日期: 2010-09-19; 修回日期: 2010-12-28

基金项目: 农业部寒地作物生理生态重点开放实验室开放基金项目; 国家科技部专项基金项目 (NCSTE-2006-JKZX-022)

作者简介: 史淑芝, 副研究员, 研究方向为作物生理及农产品深加工, 电子信箱: sssz0451@sina.com; 程大友 (通信作者), 教授, 研究方向为作物遗传育种, 电子信箱: hgdcy@sohu.com



在青睐^[4-5]。乙醇是一种可再生能源,也是石化燃料最有希望的替代产品^[6-9]。

甜菜作为糖料作物早已为人类所利用,而随着能源植物研究的不断深入^[10],能源甜菜的研究越来越引起人们的重视,其中重要的一项研究是以能源甜菜为发酵底物进行乙醇发酵^[11]。研究表明,发酵过程中乙醇转化率的高低与许多因素密切相关,尤其是发酵温度的高低对发酵效果影响较大^[12-15]。为了探讨在不同温度条件下,提高乙醇生产的效率,研究者开始研究各种措施以提高发酵过程中的乙醇转化率。本研究旨在探索高温条件下不同菌种发酵乙醇的能力,并进一步研究和优化工艺参数,为下一步工业化生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

生物材料:能源甜菜 NY0503(哈尔滨工业大学自育材料)。

供试菌种:ADY,HADY (*Saccharomyces cerevisiae*)(购自中国工业微生物菌种保藏中心)

仪器:自制锯糊机;甜菜检糖自动线(德国 Venema 公司);恒温培养箱(DH5000,江苏金怡公司);恒温振荡培养箱(HZQ-F160A,上海一恒公司);旋转蒸发仪(EYELAN-1000,上海爱朗公司)。

1.2 试验方法

本试验所用发酵底物为能源甜菜固态糊,具体操作参照文献[16]。

1.3 实验设计

(1) 单因素筛选发酵适宜温度

分别探讨 7 种不同发酵温度条件下乙醇转化率的水平,以初步确定不同菌种对发酵温度的要求,从而筛选出较耐高温的菌种。

(2) Plackett-Burman 试验设计法筛选主要因素

应用 SAS V8.2 统计分析软件进行试验设计和分析^[17-18]。应用 Plackett-Burman 试验设计法从影响发酵过程的 9 因素中筛选出重要因素,试验通过 12 次完成,响应值为乙醇转化率 Y 。具体因素与水平见表 1。

表 1 Plackett-Burman 设计的试验因素和水平

Table 1 Experimental factors and levels of Plackett-Burman design

因素	水平	
	-1	1
X_1 (底物质量浓度)/%	12	15
X_2 (料液质量比)	1:0.5	1:1
X_3 (加菌量)/%	10	15
X_4 (营养盐)	0.5	1
X_5 (加磷量)/%	1	2
X_6 (pH 值)	4.5	5.5
X_7 (转速)/(r·min ⁻¹)	100	130
X_8 (发酵温度)/℃	31	35
X_9 (发酵时间)/h	44	60

(3) 利用 Box-Behnken 设计和响应面分析法确定重要因素的最佳水平。

根据 Plackett-Burman 试验设计法筛选出的重要因素,利用 SAS V8.2 统计分析软件进行 Box-Behnken 设计,并进行响应面分析,从而确定重要因素的最佳水平。

2 结果与分析

2.1 不同温度条件下发酵试验

由图 1 可见,菌种 ADY 在 31℃时乙醇转化率最高,其他温度时转化率都降低,45℃时乙醇转化率降至 73.02%;但 HADY 耐高温能力好,40℃时有最高的转化率,到 45℃时转化率为 81.68%。可见正常温度下利用 ADY 进行发酵可以获得较高的乙醇转化率,但在高温条件下 HADY 应用效果更佳。

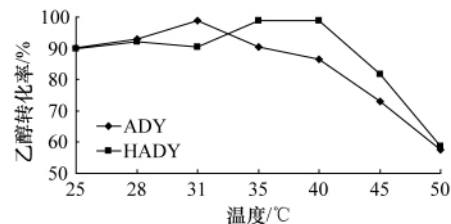


图 1 不同温度条件下乙醇转化率

Fig. 1 Translation rate of ethanol in different temperatures

2.2 HADY 发酵工艺参数优化

2.2.1 应用 Plackett-Burman 试验设计法筛选重要因素

参照表 2 试验设计,通过 12 次试验且每次试验设两次重复得出乙醇转化率的均值,具体结果见表 2。

对表 2 数据进行统计分析,结果见表 3。发酵时起重要作用的 3 个因素分别为底物质量浓度、发酵温度和加磷量。其中发酵过程中所用底物质量浓度的高低对试验结果影响极大,另外发酵温度和加磷量对最终转化率影响也较大。

根据表 3 的统计分析结果,确定这 3 个重要因素的不同水平设计,见表 4。不同水平的设置是根据表 3 中估计效应值的正负和大小决定。

2.2.2 应用响应面分析法确定重要因素的最佳水平

(1) 试验结果的回归分析

对表 5 的结果进行二次回归分析,得到二次回归方程:

$$Y=89.44-2.21375X_5+4.3925X_8-1.46875X_1-6.26625X_5X_8-1.185X_5X_8+0.1525X_5X_1-6.35375X_8X_8-0.625X_8X_1-6.00125X_1X_1$$

(2) 回归方程的方差分析

从方差分析表 6 可以看出,模型在 $\alpha=0.01$ 水平上回归显著,一次项、二次项对响应值有显著性影响,但交互项影响不显著,说明所选因素之间的交互作用不明显;失拟项反映的是试验数据与模型不相符的情况, $P=0.242021>0.1$,说明失拟不显著,因此证明模型选择正确。



表 2 HADY Plackett–Burman 试验设计表和响应值
Table 2 Plackett–Burman design table and response values of HADY

序号	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	$Y/\%$
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	72.46
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	81.26
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	85.79
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	84.77
5	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	72.35
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	72.17
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	87.79
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	76.87
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	77.54
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	72.79
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	76.02
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	88.46

表 3 统计分析结果
Table 3 Results of statistic analysis

因素	因素	估计效应	标准差	t 值	P 值	排序
X_1	底物质量浓度	-6.1117	1.4609	-4.1835	0.0527	1
X_2	料液质量比	0.415	1.4609	0.2841	0.8031	9
X_3	加菌量	1.905	1.4609	1.304	0.3221	6
X_4	营养盐	2.1483	1.4609	1.4706	0.2792	5
X_5	加磷量	-5.5417	1.4609	-3.7934	0.063	3
X_6	pH 值	-1.0183	1.4609	-0.6971	0.5579	8
X_7	转速	-5.285	1.4609	-3.6177	0.0686	4
X_8	发酵温度	5.9383	1.4609	4.0649	0.0555	2
X_9	发酵时间	1.165	1.4609	0.7975	0.5088	7

表 4 响应面分析法试验因素与水平
Table 4 Experimental factors and levels of response surface methodology

因素	因素	水平		
		-1	0	1
X_5	加磷量/%	0.5	1	1.5
X_8	发酵温度/℃	31	35	40
X_1	底物质量浓度/%	8	12	15

(3) 模型可信度分析

从表 7 可见,决定系数为 99.04%,说明此模型可以解释 99.04%试验所得的乙醇转化率的变化,表明方程拟合程度较好。而 Y 的变异系数 CV 则表示试验的精确度, CV 值越高,试验的可靠性越低,本试验中 $CV=1.340616$,数据较低,说明此试验操作可信。综上所述,该回归方程为能源甜菜固态发酵产生乙醇提供了一个合理的模型。

表 5 响应面分析试验设计和结果
Table 5 Design of RSA and fermentation results

试验序号	X_5	X_8	X_1	$Y/\%$
1	-1	-1	0	72.73
2	-1	1	0	84.86
3	1	-1	0	71.15
4	1	1	0	78.54
5	0	-1	-1	73.48
6	0	-1	1	72.88
7	0	1	-1	82.54
8	0	1	1	79.44
9	-1	0	-1	81.79
10	1	0	-1	76.58
11	-1	0	1	77.46
12	1	0	1	72.86
13	0	0	0	90.23
14	0	0	0	88.94
15	0	0	0	89.15

表 6 回归方程的方差分析

Table 6 Analysis of variance for regression equation

变异来源	自由度	平方和	方差	F 值	P 值
X_5	1	39.20551	39.20551	34.50719	0.002029
X_8	1	154.3525	154.3525	135.8551	0.0001
X_1	1	17.25781	17.25781	15.18966	0.011439
X_5X_5	1	144.9817	144.9817	127.6074	0.0001
X_5X_8	1	5.6169	5.6169	4.94378	0.076793
X_5X_1	1	0.093025	0.093025	0.081877	0.786246
X_8X_8	1	149.059	149.059	131.196	0.0001
X_8X_1	1	1.5625	1.5625	1.375252	0.293736
X_1X_1	1	132.9785	132.9785	117.0425	0.000117
模型	9	588.2254	65.35838	57.52593	0.000163
一次项	3	210.8158	70.27193	61.85065	0.000225
二次项	3	370.1372	123.3791	108.5935	0.0001
交互项	3	7.272425	2.424142	2.133636	0.214553
误差项	5	5.680775	1.136155		
失拟项	3	4.722575	1.574192	3.285727	0.242021
纯误差	2	0.9582	0.4791		
所有项	14	593.9062			

表 7 模型可信度分析

Table 7 Confidence level statistics for Y

平均值	决定系数 (R^2)	校正的决 定系数	模型误差 的平方根	Y 的变异 系数(CV)
79.50867	99.04%	97.32%	1.065906	1.340616

(4) 通过回归方程绘制分析图

从图 2 的等高线图中可以看出, 其等高线图近乎为圆

形,说明任意两因素间交互作用不显著;而从线条的疏密程度可以得出,对响应值所起的作用大小依次为 X_1 (底物质量浓度), X_8 (发酵温度), X_5 (加磷量)。

(5) 岭脊分析

通过岭脊分析得到, Y 值的预测极大值为 90.60%, 而该预测值的标准误为 0.9832,表明该试验达到了显著水平;极大值所对应的 3 个主要因素(X_5, X_8, X_1)的编码值及对应量见表 8。

2.2.3 验证试验

根据实际情况分别将加磷量 X_5 , 发酵温度 X_8 , 底物浓度

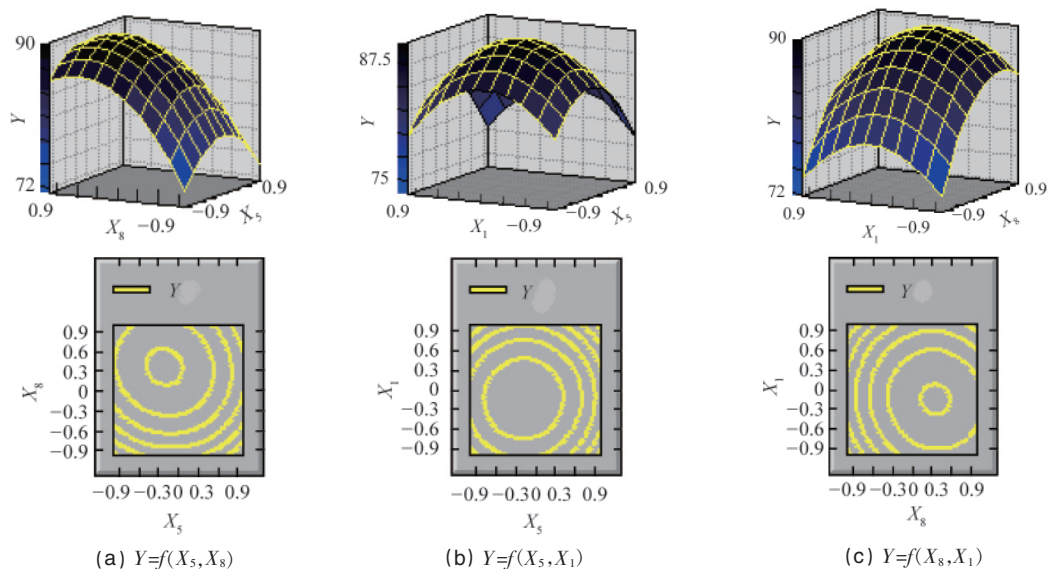


图 2 响应面立体分析图和等高线图

Fig. 2 Response surface and contours

表 8 岭脊分析因素和水平

Table 8 Ridge analysis for factors and levels

因素	编码值	对应量
X_5	-0.21364	0.89
X_8	0.37269	36.86
X_1	-0.14449	11.42

X_1 的水平定为加磷量 0.9%, 发酵温度 37℃, 底物质量浓度 12%。在以上优化条件下进行验证试验, 共进行 5 批次 500mL 摇瓶试验, 乙醇转化率平均结果为 89.43%, 该试验值 (89.43%) 与模型的理论值 (90.60%) 的差值仅占理论值的 1.29%, 可见该模型可以较好地反映出利用 HADY 耐高温菌种将能源甜菜 NY0503 固态糊转化成乙醇的条件。

3 讨论

(1) 通过在不同温度条件下对菌种 ADY 和 HADY 的筛选, 可见在高温条件下, 若发酵温度达 45℃左右时, 菌种 HADY 的发酵效果较好, 但在正常温度条件下即发酵温度达 31℃左右时菌种 ADY 的发酵优势更强, 这之前报道的工艺优化后的温度因素水平也相符^[6]。因此发酵时要针对不同条件来选择适宜菌种, 才能达到较好效果。

(2) 针对耐高温菌种 HADY, 工艺优化其发酵参数, 并最终获得优化后的工艺, 经验证试验证明, 所得出的数学模型是合理的, 能在较高水平上反映出优化后的发酵条件, 因此可作为一种成型工艺进一步进行扩大化生产。

4 结论

(1) HADY 为耐高温菌种, 在 45℃时仍有较高的乙醇转化率。

(2) 从 9 个与发酵相关的因素: 底物质量浓度、料液比、加菌量、营养盐添加量、加磷量、pH 值、转速、发酵温度和发酵时间中依次筛选出底物质量浓度、发酵温度和加磷量 3 个主要影响因素。

(3) 优化后的工艺参数为: 底物质量浓度 12%、料液质量比 1:1、加菌量 15%、营养盐 0.5、加磷量 0.9%、pH 值 5.0、转速 130r/min、发酵温度 37℃和发酵时间 44h。在此条件下的乙醇转化率为 89.43%。

参考文献 (References)

- [1] 孙永明, 袁振宏, 孙振钧. 中国生物质能源与生物质能利用现状与展望[J]. 可再生能源, 2006(2): 78-82.
Sun Yongming, Yuan Zhenhong, Sun Zhenjun. *Renewable Energy*, 2006 (2): 78-82.
- [2] 孙振钧. 中国生物质产业及发展取向 [J]. 农业工程学报, 2004, 20(5): 1-5.
Sun Zhenjun. *Transactions of the CSAE*, 2004, 20(5): 1-5.
- [3] 周中仁, 吴文良. 生物质能研究现状及展望 [J]. 农业工程学报, 2005,

21(12): 12-15.

Zhou Zhongren, Wu Wenliang. *Transactions of the CSAE*, 2005, 21(12): 12-15.

- [4] 严良政, 张琳, 王士强, 等. 中国能源作物生产生物乙醇的潜力及分布特点[J]. 农业工程学报, 2008, 24(5): 213-216.
Yan Liangzheng, Zhang Lin, Wang Shiqiang, et al. *Transactions of the CSAE*, 2008, 24(5): 213-216.
- [5] Lin Y, Tanaka S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 69(6): 627-642.
- [6] Bai F W, Anderson W A, Moo-Young M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks [J]. *Biochemistry Advances*, 2008, 26: 89-105.
- [7] Choi G W, Kang H W, Moon S K. Repeated-batch fermentation using flocculent hybrid, *Saccharomyces cerevisiae* CHFY0321 for efficient production of bioethanol [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 84(2): 261-269.
- [8] Hussy I, Hawkes F R, Dinsdale R, et al. Continuous fermentative hydrogen production from sucrose and sugarbeet [J]. *Hydrogen Energy*, 2005, 30(5): 471-483.
- [9] 岳国君, 武国庆, 郝小明. 我国燃料乙醇生产技术的现状与展望[J]. 化学进展, 2007, 19(7/8): 1084-1090.
Yue Guojun, Wu Guoqing, Hao Xiaoming. *Progress in Chemistry*, 2007, 19(7/8): 1084-1090.
- [10] 宋永芳. 能源植物的开发与利用进展 [J]. 生物质化学工程, 2006, 40(6): 51-53.
Song Yongfang. *Biomass Chemical Engineering*, 2006, 40(6): 51-53.
- [11] 史淑芝, 程大友, 马凤鸣, 等. 生物质能源作物-能源甜菜的开发利用 [J]. 中国农学通报, 2007, 23(11): 416-419.
Shi Shuzhi, Cheng Dayou, Ma Fengming, et al. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2007, 23(11): 416-419.
- [12] 宋昕磊, 张鹏. 不同条件对木糖酒精发酵菌种发酵性能的影响[J]. 酿酒, 2007, 34(1): 40-43.
Song Xinlei, Zhang Peng. *Liquor Making*, 2007, 34(1): 40-43.
- [13] 金慧, 刘荣厚. 不同温度条件对甜高粱茎秆汁液酒精发酵的影响[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(19): 5684-5685.
Jin Hui, Liu Ronghou. *Journal of Anhui Agriculture Science*, 2007, 35(19): 5684-5685.
- [14] 刘畅, 王涛, 石翠芳. 耐高温酵母菌的筛选及特性研究[J]. 酿酒, 2007, 34(2): 52-54.
Liu Chang, Wang Tao, Shi Cuifang. *Liquor Making*, 2007, 34(2): 52-54.
- [15] Wu W, Min H, Kamdem D G C. Biological and fermentative properties of a thermotolerant yeast strain in alcohol production from cassava flour [J]. *Journal of Zhejiang University: Agriculture & Life Science*, 2001, 27(3): 277-281.
- [16] 史淑芝, 程大友, 徐德昌, 等. 能源甜菜酒精发酵的工艺优化及数学模型[J]. 农业工程学报, 2009, 25(6): 214-218.
Shi Shuzhi, Cheng Dayou, Xu Dechang, et al. *Transactions of the CSAE*, 2009, 25(6): 214-218.
- [17] De León-Rodríguez A, Escalante-Minakata P, Barba de la Rosa A P, et al. Optimization of fermentation conditions for the production of the mescal from *Agave salmiana* using response surface methodology [J]. *Chemical Engineering and Processing*, 2008, 47(1): 76-82.
- [18] Guo N, Gong F, Chi Z, et al. Enhanced inulinase production in solid state fermentation by a mutant of the marine yeast *Pichia guilliermondii* using surface response methodology and inulin hydrolysis [J]. *Microbiol Biotechnol*, 2009, 36(4): 499-507.

(责任编辑 吴晓丽)