

固定化酵母连续发酵乳清粉生产燃料乙醇的研究

郭学武 周 珺 刘 淼 肖冬光

(工业微生物教育部重点实验室,天津市工业微生物重点实验室,天津科技大学生物工程学院,天津 300222)

摘要: 对混合固定化克鲁维酵母和固定化酿酒酵母连续发酵乳清粉生产燃料乙醇进行了研究。结果表明,对比双柱式连续发酵,混合菌株单柱式连续发酵工艺较好,发酵周期缩短为36 h,酒精度达到了4.7 %vol。

关键词: 燃料乙醇; 固定化; 酵母; 乳清粉

中图分类号: Q814; TS261.1; TS262.2; TS261.4 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2010)02-0020-03

Research on Continuous Fermentation of Whey Powder by Immobilized *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* to Produce Fuel Ethanol

GUO Xue-wu, ZHOU Jun, LIU Miao and XIAO Dong-guang

(Key Lab of Industrial Microbiology of Ministry of Education, Tianjin Industrial Microbiology Key Lab,

College of Biotechnology of Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300222, China)

Abstract: Continuous fermentation of cheese whey powder (CWP) by immobilized *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* to produce fuel ethanol was studied. The results showed that single-column continuous fermentation by mixed strains was better than double-column continuous fermentation (it could shorten fermentation period to 36 h and alcolicity could reach up to 4.7 %vol).

Key words: fuel ethanol; immobilized; yeast; whey powder

乳清是乳制品企业利用牛奶生产干酪时所得的一种天然副产品,其主要成分有乳糖、乳清蛋白、矿物质等,具有很高的营养价值。近年来,关于如何利用乳清的问题一直是研究的重点。目前已经有一些关于利用乳清生产乙醇、单细胞蛋白、沼气等的研究报道^[1]。

但是,利用乳清生产乙醇存在乙醇得率低(2 %vol~3 %vol)、分离成本高等问题^[2]。乳清粉是乳清浓缩干燥的产物,其相比乳清来说具有营养物质浓度高、可长期稳定放置等优点,是一种较好的替代乳清生产乙醇的原料^[3-5]。笔者已经报道过关于固定化酵母发酵乳清的研究^[6-7],本文进一步对固定化酵母连续发酵乳清粉生产乙醇进行研究,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

马克思克鲁维酵母 (*Kluyveromyces marxianus*)TY-13;酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)AY-5 均为本室保存。

基金项目:天津市应用基础及前沿技术研究计划重点项目(09JCZDJ17900),天津科技大学科学研究基金资助(20080203),2009-2010 学年天津科技大学实验室开放基金项目资助。

收稿日期:2009-12-15

作者简介:郭学武(1980-),男,湖南人,助理研究员,研究方向:现代酿造技术。

通讯作者:肖冬光(1956-),教授、博士生导师,xdg@tust.edu.cn。

1.1.2 试剂

乳清粉:地球牌甜乳清粉,天津奥凯化工贸易有限公司;海藻酸钠:上海化学试剂厂;氯化钙:天津市凯通化学试剂有限公司。

1.2 种子培养基

YEPD; 发酵培养基:乳清粉水溶液:乳清粉 12 % (w/v), pH6.0, 于 110 °C, 20 min 灭菌。初始糖浓度为 100 g/L。

1.3 酵母细胞的固定化方法

参考文献[6],并根据各试验需要,选择各自所需细胞浓度。

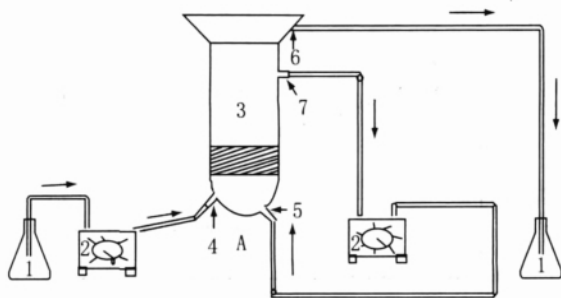
1.4 酵母细胞的增殖培养

将制备好的固定化酵母凝胶颗粒接入到 YEPD 中, 30 °C 活化 24 h。

1.5 实验方法

固定化细胞发酵:将获得的固定化酵母菌液体种子接入发酵培养基中,30 °C、120 r/min,进行固定化细胞发酵,并根据各试验需要,选择各自所需固定化细胞的浓度。

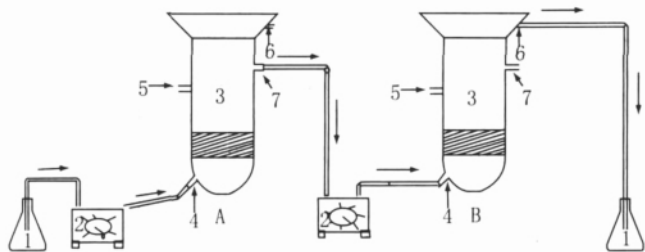
单柱连续发酵:见图1。首先将发酵液填满发酵柱,并按10%接种量接入增殖好的固定化酵母颗粒,并且通过恒流泵使柱体内的发酵液按22 mL/min的速度进行循环,以提高发酵速度。发酵一定时间后,当残糖含量降低至2 g/100mL后,开始以15 mL/h的流量(即稀释率为 0.025 h^{-1})向柱式反应器注入新鲜发酵液,通过固定化酵母细胞层进行连续发酵。并且每隔4~12 h不等的时间段对流出的发酵醪液中的残糖含量、酒精度、pH值和细胞泄漏数进行测定。



注:1.发酵液,2.恒流泵,3.反应柱,4.进料口,5.循环液进料口,6.出料口,7.循环液出料口

图1 单柱式连续发酵示意图

双柱串联连续发酵:如图2所示,首先将发酵液填满A发酵柱,并按10%接种量接入TY-13酵母颗粒,并且通过恒流泵使柱体内的发酵液进行循环,发酵3 h后,也由恒流泵作用使A发酵柱内的发酵液流入已按10%接种量装填好AY-5酵母颗粒的B发酵柱。当流出液的残糖含量降低至2 g/100 mL后,开始以15 mL/h的流量向A柱式反应器注入新鲜发酵液,通过固定化酵母细胞层进行连续发酵。并每隔4~12 h不等的时间段对流出发酵醪液中的残糖含量、酒精度、pH值和细胞泄漏数进行测定。



注:1.发酵液,2.恒流泵,3.反应柱,4.进料口,5.取样口,6.最终发酵液出料口,7.出料口

图2 双柱式连续发酵示意图

1.6 检测方法

总糖的测定采用菲林滴定法^[8],乙醇采用快速氧化法^[9]测定。

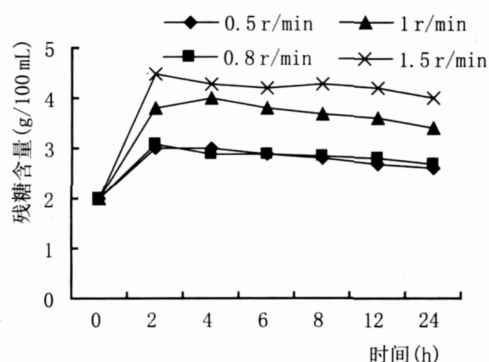
2 结果与分析

2.1 连续发酵稀释率的确定

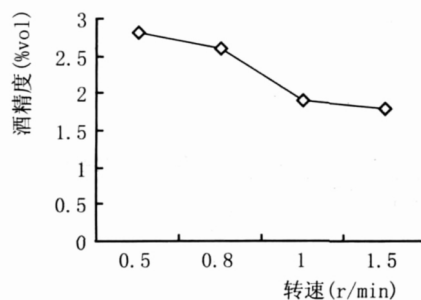
通过改变恒流泵的转速改变向柱式反应器内加入发酵液的流量,最终改变发酵稀释速率,进行固定化酵母细胞发酵实验,确定最佳稀释率。首先,先将发酵液填满柱式反应器,并接入酵母凝胶颗粒,先反应一定时间,当流出的反应液的残糖含量由初始的10 g/100 mL降低至2 g/100 mL时,开始将发酵液以不同的流量流入柱式反应器,待反应稳定后测定其酒精度及残糖值。恒流泵转速与稀释率换算见表1,不同稀释率对残糖含量和酒精度的影响见图3。

表1 转速与稀释率对照结果

恒流泵转速 (r/min)	进料速度 (mL/h)	稀释率 (h^{-1})	平均停留时间 (h)
0.5	9	0.015	67
0.8	15	0.025	40
1.0	20	0.033	30
1.5	50	0.080	12



a.不同稀释率对残糖含量的影响



b.不同稀释率对酒精度的影响

图3 不同稀释率对残糖含量和酒精度的影响

由图3a、图3b可知,稀释速率为 0.025 h^{-1} 为佳,此时生成的酒精度较高,且发酵醪液中残糖含量较低,反应器的生产能力也达到一定水平。若将稀释率降低为 0.015 h^{-1} ,酒精度与残糖含量均比稀释率为 0.025 h^{-1} 时较优,但优势并不明显,且平均停留时间明显延长,故最终选择稀释率为 0.025 h^{-1} 为宜。

2.2 混菌单柱式连续发酵

2.2.1 单柱式连续发酵循环速度的确定

在单柱式连续发酵的过程中,由于发酵液体积仅为600 mL,且固定化颗粒密度较高,易于沉入发酵液的下层,使得发酵液与固定化细胞接触面积较小,因此,为防

表2 不同循环速度对残糖含量和酒精度的影响

转速 (r/min)	发酵时间(h)										酒精含量 (%vol)
	4	8	12	24	36	48	60	72	96	120	
20	7.8	6.4	4.6	3.2	2.2	2	1.8	1.8	1.9	1.8	2.8
40	7	5.1	3.1	1.2	0.88	0.52	0.47	0.46	0.46	0.46	4.4
60	6.8	4.8	2.9	0.9	0.69	0.48	0.44	0.44	0.44	0.44	4.7
80	6.6	4.7	2.7	0.85	0.65	0.46	0.41	0.4	0.4	0.4	4.8
100	6.5	4.8	2.6	0.82	0.66	0.47	0.4	0.39	0.38	0.39	4.8

止发酵液发酵不完全,故通过恒流泵的蠕动使发酵液可以循环流动,以提高发酵效率。恒流泵分别通过20 r/min、40 r/min、60 r/min、80 r/min和100 r/min 5个不同的转速提供发酵液的循环流动。乳清还原液按上述实验内容确定以15 mL/h的速度向柱式反应器中流加,实验结果见表2。恒流泵转速与发酵液循环速度对照结果见表3。

表3 转速与循环速度对照结果

恒流泵转速(r/min)	循环速度(mL/min)
20	8
40	15
60	22
80	30
100	39

由表3所知,恒流泵转速在60~100 r/min时对酒精生成量和残糖值影响均不大。因此,综合考虑残糖含量、酒精度以及节约能源方面的因素,最终确定恒流泵的转速以60 r/min为最佳。

2.2.2 混菌固定化酵母单柱式连续发酵

通过2.1.1和2.1.2.1确定的稀释率和循环速度,用1.5的实验方法,对混菌固定化酵母单柱式连续发酵实验进行了研究,结果见表4。

表4 混菌单柱式连续发酵结果

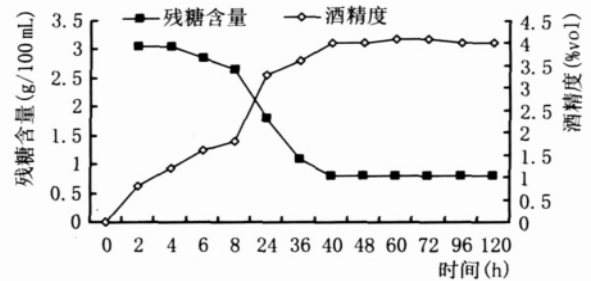
时间 (h)	残糖含量 (g/100mL)	酒精度 (%vol)	pH	细胞泄漏数 (个/mL)
0	2.00	0.0	5.0	2.1×10^5
2	5.34	0.5	5.0	2.7×10^5
4	4.76	1.2	4.8	3.5×10^5
6	3.25	1.4	4.7	3.9×10^5
8	2.86	1.8	4.6	4.0×10^5
24	1.57	3.4	4.5	4.5×10^5
36	0.68	4.7	4.3	6.8×10^5
40	0.58	4.8	4.3	8.8×10^5
48	0.48	4.8	4.3	3.1×10^6
60	0.44	4.7	4.3	3.4×10^6
72	0.44	4.7	4.3	3.7×10^6

由表4中所列出的各项实验指标数值可看出,混菌单柱式连续发酵实验提高了发酵速度,平均停留时间为36 h。pH值变化幅度不大,且从36 h开始一直比较稳定,说明发酵进入稳态后,发酵液的酸碱环境没有太大变化,且对发酵效果影响不大。发酵液中的残糖含量也相

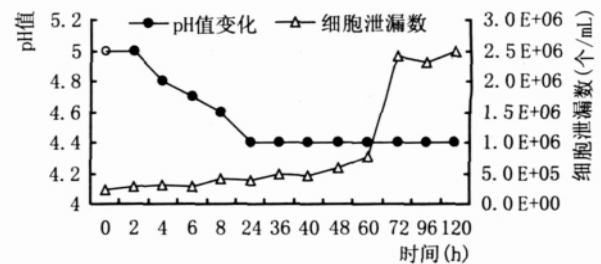
对较低,酒精度也达到相应水平。

2.3 固定化双柱串联连续发酵

一般酿酒酵母不能直接利用乳糖,需要由克鲁维酵母先将乳糖分解为葡萄糖和半乳糖后才能利用。由于混菌固定化酵母单柱式发酵,虽然能提供发酵液的循环流动,但还不能保证两种酵母的接种时间间隔,因此,还需要再对连续发酵的模式进行探讨,以确定最佳的连续发酵的模式。参照1.5的实验方法,对固定化双柱串联连续发酵进行了研究,实验结果见图4a、图4b。



a. 固定化双柱串联连续发酵对残糖含量和酒精度的影响



b. 固定化双柱串联连续发酵对pH值和细胞泄漏的影响

图4 分别固定化双柱串联连续发酵结果

由图4的结果分析可知,分别固定化双柱串联连续发酵实验的平均停留时间为40 h,pH值的变化幅度不大且从24 h开始一直比较稳定,说明发酵进入稳态后发酵液的酸碱环境没有太大变化,且对发酵效果影响不大。最终发酵液中的残糖含量为0.88 g/100 mL,而酒精生成量为4.0%vol。这种连续发酵模式虽然可以保证两种酵母接种的时间间隔,但不能提供发酵液的循环流动,导致还有部分糖发酵不完全,使最终的实验结果明显不如混菌固定化酵母单柱式连续发酵效果好,因此可以说明,增加发酵液的循环流动对混菌固定化酵母连续发酵来说比较重要,既能使发酵液多次重复接触固定化酵母层,还可以增加一定的氧气供给,对提高发酵速度以及发酵液中的酒精度有一定帮助。

3 结论

通过对稀释率的研究,确定了 0.025 h^{-1} 为最适稀释率。对比混合固定化菌株单柱式连续发酵和双柱式连续发酵工艺,确定了单柱式连续发酵工艺较好,其发酵周期

(下转第26页)

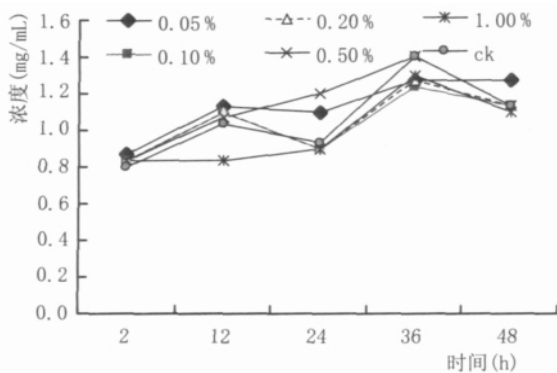


图5 Tween-80对水稻秸秆同步糖化发酵的影响

优化组合试验。对发酵条件中的时间、温度、pH值和接种量等4个因素进行了正交试验,试验设计及试验结果见表1。

表1 $L_9(3^4)$ 正交实验结果及分析

实验号	因素				乙醇浓度 (mg/mL)
	A(时间, h)	B(温度, °C)	C(pH)	D(接种量, %)	
1	1(12)	1(32)	1(3.5)	1(8)	1.1
2	1(12)	2(37)	2(4.0)	2(10)	1.3
3	1(12)	3(40)	3(4.5)	3(12)	1.3
4	2(24)	1(32)	2(4.0)	3(12)	1.4
5	2(24)	2(37)	3(4.5)	1(8)	1.1
6	2(24)	3(40)	1(3.5)	2(10)	1.2
7	3(36)	1(32)	3(4.5)	2(10)	1.3
8	3(36)	2(37)	1(3.5)	3(12)	1.3
9	3(36)	3(40)	2(4.0)	1(8)	1.0
K1	12.333	12.667	12.000	10.667	
K2	12.333	12.333	12.333	12.667	
K3	12.000	11.667	12.333	13.333	
R	0.333	1.000	0.333	2.666	

由表1结果可以看出:

①在9个处理的直观分析中,第4个组合条件下燃料乙醇浓度最高,为1.4 mg/mL。从而可以确定第4个组合 $A_2B_1C_2D_3$ 为最佳条件组合。

②从各个因子不同水平条件对燃料乙醇浓度的影

响来看,各个因子影响燃料乙醇浓度的顺序分别是 $A_1=A_2 > A_3, B_1 > B_2 > B_3, C_2=C_3 > C_1, D_3 > D_2 > D_1$, 因此可以确定最佳条件组合为 $A_1B_1C_2D_3, A_1B_1C_3D_3, A_2B_1C_2D_3, A_2B_1C_3D_3$, 即时间为12 h或24 h、温度32 °C、pH4.0或4.5、接种量12%。

③从各因子的极差大小 $RD > RB > RA = RC$ 可知,在发酵条件中,对乙醇浓度影响最大的是酵母用量,其次是温度,而时间和pH的影响是最小的。

3 结论

水稻秸秆同步糖化发酵生产燃料乙醇的适宜的发酵工艺条件为:起始pH值为4.0~4.5,培养温度为32 °C,接种量为12%,发酵时间12~24 h。在此条件下,生成乙醇的浓度为1.4 mg/mL,水稻秸秆原料的乙醇转化率为7.02%。

参考文献:

- [1] 徐昶,龙敏南,邬小兵,等.高产纤维素酶菌株的筛选及产酶条件研究[J].厦门大学学报(自然科学版),2005,44(1):107.
- [2] Ghose T K.Measurement of cellulase activities[J].Pure Appl Chem,1987,59(2):257-268.
- [3] 李华,高丽.β-葡萄糖苷酶活性测定方法的研究进展[J].食品与生物技术学报,2007,26(2):107-114.
- [4] 高培基,曲音波,王祖农.纤维素酶解过程的分析和测定[J].生物工程学报,1988,4(4):321-325.
- [5] 沈加成.酶解工业纤维废渣生成乙醇技术的研究[D].济南:山东大学微生物技术国家重点实验室,2008.
- [6] Helle SS,Duss SJB,Cooper DG.Effect of surfactants on cellulose hydrolysis[J].Biotechnol Bioeng 1993;42(5):611-7.
- [7] Castanon M,Wilke CR.Effects of the surfactant Tween-80 on enzymatic hydrolysis of newspaper[J].Biotechnol Bioeng,1981, XXIII:1365-72.
- [8] Kurakake M,Ooshima H,Kato J,Harano Y.Pretreatment of becase by nonionic surfactant for the enzymatic hydrolysis[J]. Bioresour Technol 1994,49:247-51.
- [9] Kaar WE,Holtzapple M.Benefits from Tween during enzymic hydrolysis of corn stover[J].Biotechnol Bioeng 1998,59:419-27.
- [10] eters[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 38 (5): 711-718.
- [11] Ozmihci, S., Kargi, F., Comparison of yeast strains for batch ethanol fermentation of cheese-whey powder (CWP) solution[J]. Letters in Applied Microbiology, 2007, 44(6):602-606.
- [12] 周琨,肖冬光,郭学武,王艳.混菌固定化发酵乳清生产燃料乙醇的研究[J].酿酒科技,2008,1(163):42-44.
- [13] 周琨,郭学武,王瑞生,肖冬光,岳瑞雪.固定化酵母发酵乳清生产燃料酒精的研究,酿酒,2007,34(5):35-37.
- [14] 蔡定域.酿酒工业分析手册[M].北京:中国轻工业出版社,1988.
- [15] 王亚楠,等.快速测定啤酒酒精度和真正发酵度的方法[J].酿酒,2002,29(6):84-86.

(上接第22页)

缩短为36 h,酒精度达到了4.7 %vol。

参考文献:

- [1] Siso, M. I. Gonzá lez. The biotechnological utilization of cheese whey: A review[J]. Bioresource Technology, 1996, 57(1): 1-11.
- [2] P. Gunasekaran, N. R. Kamini, High ethanol productivity from lactose by immobilized cells of *Kluyveromyces fragilis* and *Zymomonas mobilis*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 1991,7(5):551-556.
- [3] Ozmihci, S., Kargi, F., Effects of feed sugar concentration on continuous ethanol fermentation of cheese whey powder solution (CWP)[J].Enzyme and Microbial Technology, 2007,41: 876-880.
- [4] Kargi, F., Ozmihci, S., Utilization of cheese whey powder (CWP) for ethanol fermentations: Effects of operating param-