

甜高粱秆固态发酵失重与温度的相互关系

王二强¹, 李十中¹, 耿欣^{1,2}, 李天成¹

(1.清华大学核能与新能源技术研究院新能源所,北京 100084;2.中国农业大学资源与环境学院,北京 100094)

摘要: 利用实验室自行筛选的高效酵母菌株 TSH-SC-1,以甜高粱秆为原料进行固态发酵制燃料乙醇,在 24 h 内总糖转化率为 95.6%,发酵料中残糖浓度为 0.45 g/100 g 湿料,乙醇得率为理论值的 84.9%。通过计算机实时采集和记录发酵过程中固态物料的温度和重量的数据,并且通过数值求导得到发酵过程中两者变化的速率。结果表明,两者均能够比较一致地反映固态发酵过程的内在变化,因而温度变化的实时数据可以作为过程监控和诊断的依据。另外,由发酵过程温度变化、散热数据和乙醇得率,估算了固态发酵生成每摩尔乙醇的放热量为 56 kJ,该数据可以用于固态发酵反应器的工程设计和优化放大。

关键词: 燃料乙醇;甜高粱秆;固态发酵;失重;热效应

中图分类号:TS261.2;TS261.4;TS262.2;TQ920.62 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2010)06-0024-04

Relationships between Temperature and Weight Loss during Solid Fermentation of Sweet Sorghum Stalks

WANG Er-qiang¹, LI Shi-zhong¹, GENG Xin^{1,2} and LI Tian-cheng¹

(1. Institute of Nuclear and New Energy Technology, Tsinghua University, Beijing 100084; 2. Resource and Environmental Engineering College, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: Sweet sorghum stalks was used as raw materials by solid fermentation by lab-screened high-efficiency yeast strain TSH-SC-1 to produce fuel ethanol. Within 24 h after the fermentation, the conversion rate of total sugar was 95.6%, the residual total sugar was 0.45 g·(100 g substrate (wet basis))⁻¹ and ethanol yield was 84.9% of theoretical yield. Weight data and temperature data of substrate were recorded automatically by computer at a constant time interval during the fermentation, and the relationships between them were studied. The results showed that they could coherently reflect the internal change in solid fermentation process. Accordingly, the real-time data of temperature could be used effectively to monitor and control the fermentation process online. In addition, based on temperature change in the fermentation, heat emission and ethanol yield, the heat of fermentation was calculated approximately to be 56 kJ·(mol ethanol)⁻¹, which could be used in the design, the simulation and the optimization of bioreactors for solid fermentation of sweet sorghum stalk to produce fuel ethanol.

Key words: fuel ethanol; sweet sorghum stalks; solid fermentation; weight loss; thermal effects

甜高粱作为一种 C4 高能作物^[1-3],具有很高的光合效率,而且具有抗旱、抗涝、耐盐碱和耐瘠薄等多重抗逆特性而成为理想的乙醇生产原料,无论从能源安全、粮食保障和经济发展方面,用非粮作物甜高粱秆生产燃料乙醇都具有广阔的前景^[4-5]。

甜高粱秆制取燃料乙醇可以采用液态或固态发酵技术。液态发酵技术相对成熟^[6-7],但存在能耗高、废液治理难、环境污染严重等问题^[8]。而固态发酵因工艺流程简单、投资少、能耗低、废物排放少等优点而受到越来越多的重视^[9-11],但也存在固态物料和微生物菌种不易混合均匀,传质传热限制,过程监控参数和手段少,难以实现大

规模机械化生产等不利因素^[12-13]。

固态物料床层温度和尾气排放量(等于固态物料失重)是发酵过程中容易监测到的宏观参数,并且与发酵体系内在变化有密切的联系,能够间接反映发酵过程中菌体生长、底物消耗和产物生成等不易检测到的发酵过程参数。Okazaki & Tanaka^[14]根据发酵过程中 CO₂ 尾气排放量来预测菌体生物量的生长,Terebiznik M.R. 和 Pilosof A.M.R.^[15]在 Okazaki & Tanaka 模型基础上增加一个关联式,通过干物质失重来预测生物量的生长,与实验数据吻合良好。

本文利用自行筛选的高效酵母菌株 TSH-SC-1,进

基金项目:天津市科技发展计划项目(No.06YFGZSH02700),国家科技支撑项目(No.2007BAD42B00)。

收稿日期:2010-04-26

作者简介:王二强(1976-),男,河南省焦作市人,清华大学博士后。

通讯作者:李十中,Email: szli@tsinghua.edu.cn。

行甜高粱秆粉碎料固态发酵制取燃料乙醇研究,实时记录发酵过程中的重量和温度变化,对重量与温度变化速率的相互关系进行分析,据其可以准确地把握发酵进程的状态。此外,根据发酵过程温度变化、散热数据和乙醇得率,估算得到生成每摩尔乙醇的发酵热,并将其用于固态发酵反应器的放大设计和优化。

1 材料与方法

1.1 材料

菌种:酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae* Hansen), TSH-SC-1(本实验室保藏号)。

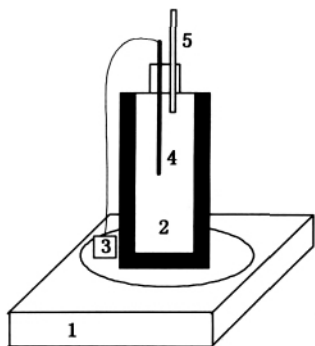
斜面培养:称量固体试剂 YPD(酵母粉、蛋白胨和葡萄糖琼脂培养基),将其直接溶于去离子水中配制浓度为 50 g/L 的 YPD 液体培养基,添加 1.5% 琼脂,分装若干试管后 121 °C 灭菌 20 min,取出斜放并且自然冷却凝固为固体培养基。接种菌体,28 °C 培养 3 d,然后置于 4 °C 冰箱保存备用。

一级种子培养:同上所述,配制浓度为 50 g/L 的 YPD 液体培养基,分装若干三角瓶后,于 121 °C 灭菌 20 min。接种 3 环斜面培养菌体,28 °C 条件下,150 r/min 摇床培养 24 h。

二级种子培养:将(50 Brix)100%的麦芽汁用 10% NaOH 溶液调 pH 值至 pH5.5,115 °C 灭菌 30 min。按照 10% 的接种量接种已培养好的一级种子培养液,28 °C 条件下,150 r/min 摇床培养 18 h。

甜高粱秆:采自河北某地,剥叶后粉碎,粒度约为 1 mm。

1.2 实验装置与方法



注:1:电子天平;2:发酵反应器;3:温度自动记录仪;
4:热电阻温度传感器;5:尾气排放管

图1 甜高粱秆固态发酵装置示意图

摇床:SKY-2102(上海苏坤实业有限公司);超净台:CJ-1S(天津市泰斯特仪器有限公司),电子天平:PL-4002(梅特勒-托利多);2套温度自动记录仪:ZDR-11j(杭州泽大仪器有限公司);真空保温瓶:FG-1220-160(安徽合肥市富光塑胶有限公司)。

如图1所示,将真空保温瓶作为发酵反应器,甜高粱

秆经过粉碎、灭菌后,冷却至 28~30 °C,在无菌条件下按 15% 接种量和菌种混合均匀,然后装入保温瓶中开始静置发酵。一套温度自动记录仪(精度 0.1 °C)用于每 5 min 记录 1 次发酵料的温度,另一套用于记录发酵装置所在室内环境的温度。将整套发酵装置放在梅特勒电子天平秤盘上(最小刻度 0.01 g),通过数据线将天平连接至台式计算机 COM1 串口,利用梅特勒采集软件每 5 s 采集 1 次重量数据。发酵过程中尾气由排气管连续排出。

1.3 分析方法

1.3.1 乙醇含量分析

称取 100 g 固态发酵料,加入 200 mL 去离子水,装入 500 mL 蒸馏烧瓶中,简单蒸馏法蒸馏^[16],准确量取 100 mL 的馏出液,采用酒精度计进行快速测定,然后取出少许馏出液进行气相色谱测定(仪器型号 SHIMADZU GC-14C)。

气相色谱条件:柱温 80 °C,进样口温度 220 °C,检测器温度 220 °C,进样量:2 μL。

乙醇含量:100 g 发酵料(湿基)中含有的乙醇质量,单位为 g/100g 湿料。

1.3.2 糖含量分析

本文中的糖含量和糖浓度系包括还原糖和非还原糖在内的总糖。甜高粱秆中还原糖主要为葡萄糖和果糖,非还原糖主要为蔗糖。取 50 g 固态样品(发酵料或粉碎料,湿基)经 3 次浸提(60 °C,3 次浸提加入去离子水量分别为 250 mL、150 mL、150 mL),取浸提液稀释并与 1:1 盐酸溶液作用(在 68~70 °C 水浴中加热 15 min,冷却后用 20% 氢氧化钠调至中性,定容摇匀),然后采用斐林试剂法^[16]测定浸出液的糖浓度,经换算后得到发酵料的糖含量。

糖含量:100 g 固态样品(发酵料/粉碎料,湿基)中含有的糖分质量,单位为 %。

1.3.3 水含量分析

分别称取质量不等的若干样品,放在常压烘箱中,在 105 °C 温度下烘干至恒重,然后称量得到其含水量。

水分含量:100 g 发酵料(湿基)中含有的水分质量,单位 %。

2 结果与讨论

2.1 发酵物料参数

甜高粱秆粉碎料和发酵料的水分、糖分和乙醇含量等参数见表 1。

由表 1 可知,粉碎料加上菌液(75 mL)的重量,与发酵后物料重量以及尾气排放量之和基本上能够吻合。根据乙醇含量分析结果,计算出乙醇总产量为 24.6 g,其对应的 CO₂ 理论总产量为 23.5 g,与失重量基本吻合。经过计算,得到固态发酵过程中总糖转化率为 95.6%,乙醇

表1 甜高粱秆粉碎料和发酵物料参数

甜高粱秆	甜高粱秆粉碎料	发酵料
总物料(g)	500	534.49
水分(g/100g 湿物)	75	84
糖分(g/100g 湿物)	11.13	0.45
乙醇(g/100g 湿物)	0	4.62

收率为理论值的 84.9%。

2.2 发酵热效应

固态发酵过程发酵物料温度的变化结果见图 2。

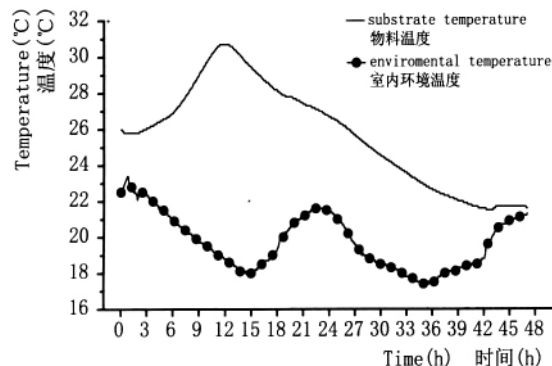


图2 固态发酵过程发酵物料温度变化

图2中2条曲线分别表示发酵物料和室内环境温度随时间的变化,可看出产热和散热同时存在于发酵过程中,不能忽略该装置的散热量。发酵初期存在一个诱导期,温度上升缓慢,进入对数生长期则产热量远大于散热量,温度较快上升。其峰值出现在第12小时左右,最大温升约4.7℃。

对图2中发酵物料温度变化曲线 $T \sim t$ 进行数值求导,得到温度变化速率依时变化曲线 $dT/dt \sim t$,见图3。数值求导之前利用 Origin 软件中的数据平滑功能,对实时采集的 $T \sim t$ 温度数据进行平滑去噪处理。由图3可看出,温度变化速率的最大值出现在第9小时左右,其值约为 $0.8 \text{ } ^\circ\text{C/h}$ 。

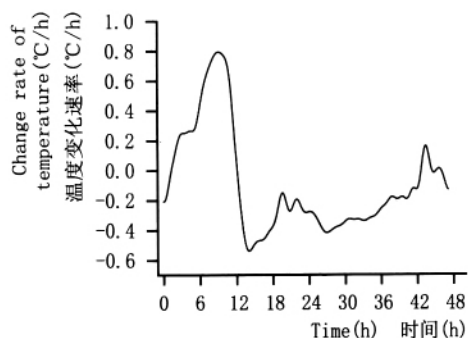


图3 发酵物料温度变化速率的依时变化

图4表示甜高粱秆粉碎料单纯散热过程的温度变化,没有加入酵母菌。图4结果表明,该装置的散热量不可忽视。另外,为抑制微生物活动产热对结果有不利影响,选用某种酸性抑制剂并配成一定浓度溶液,然后和

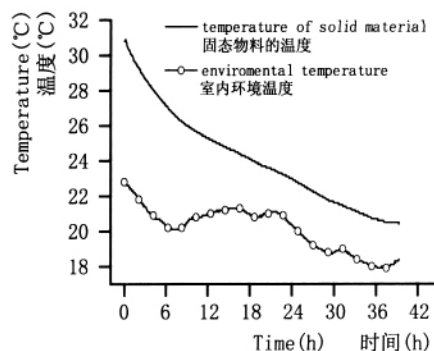


图4 固态物料散热时温度变化

粉碎料混合均匀。由散热前后粉碎料质量基本不变断定抑制剂可以较好地抑制微生物活动的影响。

由图2和图4,以及发酵生成的乙醇摩尔数,可以近似地求出绝热条件下生成每摩尔乙醇放出的发酵热。具体计算如下:

$$Q = \frac{Q_1 + Q_2}{n} \quad (1)$$

式中: Q_1 ——发酵过程实际热量变化;

Q_2 ——发酵过程散热量;

n ——生成乙醇摩尔数。

$Q_1 = MCP\Delta T$, C_p 为发酵料比热。 Q_2 基于散热数据可以得到。

最终得到该固态发酵体系发酵热约为 56 kJ/mol 乙醇,略低于文献^[17]中报道的液态发酵过程中对应的数据 64.5 kJ/mol 乙醇。初步分析可能是固态发酵所使用甜高粱秆粉碎料具有很少的自由水和巨大的气-液-固相界面面积等特性所致,具体原因有待于进一步研究。该发酵热数据已经用来指导固态发酵反应器的放大设计和操作优化等,精度能够满足要求。

2.3 发酵物料重量变化

发酵物料重量变化结果曲线见图5。

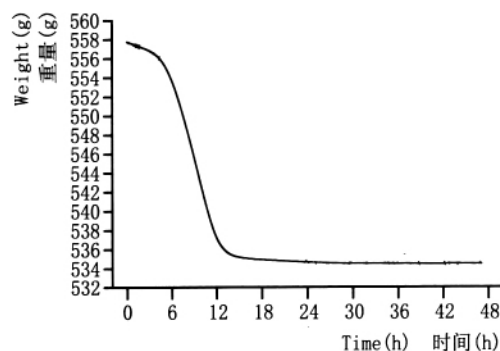


图5 发酵物料重量变化曲线

由图5可看出,发酵过程中物料的重量变化主要集中在前24h内,说明24h以后尾气排放已经基本结束,可认为发酵近于完成。这一点与采用三角瓶所得到的甜高粱秆固态发酵动力学数据也基本吻合^[18]。发酵过程中

物料重量减少约 23.3 g,也即尾气排放总质量,约占发酵前物料总重量的 4.7%。

对图 5 所示的重量-时间曲线 $G \sim t$ 进行数值求导,得到发酵过程中物料重量变化速率的依时变化曲线 $dG/dt \sim t$ 。由于原始数据波动较大(采样时间短及 PL4002 天平容易受环境风速、震动等因素影响),导数值对重量数据又非常敏感,直接对 $G \sim t$ 曲线求导将无法得到合理的结果。为此,首先采用 Origin 软件中的数据平滑功能,对采集到的重量数据进行平滑去噪,再数值求导得到图 7 所示的重量变化速率曲线。在发酵过程中,CO₂ 的逸出速率可以反映发酵过程的快慢。因而图 6 事实上也反映了尾气排放速率,其最大值也出现在第 9 小时左右。

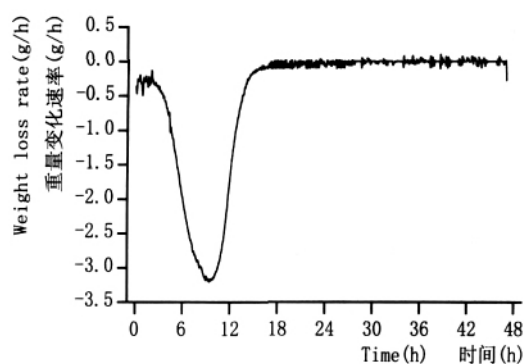


图 6 发酵物料重量变化速率依时变化曲线

2.4 重量与温度变化的相互关系

发酵过程中温度和物料重量变化都是微生物菌种繁殖、生长、死亡等内在生理活动的外在表现形式,它们的变化应该都能够反映出同一个生物化学进程内在的、本质的规律,这对于固态发酵过程同样适用。酵母菌作为兼性厌氧菌,发酵初期发酵罐内存在少量氧气,可以使得酵母菌进行有氧呼吸,大量繁殖,放出热量和 CO₂。随着发酵过程的进行,氧气逐渐耗尽,酵母菌转向无氧呼吸,将底物糖分转变为乙醇和 CO₂。温度和重量的变化与发酵体系状态有密切的关系,图 2 和图 5 的曲线都能够反映出,发酵前期、主发酵期和发酵后期 3 个阶段,而且可以看出,接种后菌体生长的诱导期比较短,接种后 3~4 h 内已经转入对数生长期,这可能与菌种已经培养至对数生长期具有较强活性有关。

由温度和重量变化速率对时间的变化曲线可以看出,尽管到达温度最高峰的时间在第 12 小时左右,但是温度变化速率最大值出现在第 9 小时左右,与重量变化速率最大值出现时间基本相同,这也说明,单位时间内产热量和产气量的最大值基本出现在同一时刻,这也是酵母厌氧发酵最强烈的时刻。由于发酵初期存在的氧气量有限,酵母菌的繁殖主要在厌氧呼吸阶段完成,这也是酵母菌繁殖速率最大的时刻。另外,乙醇属于葡萄糖代谢的初级发酵代谢产物,乙醇形成与菌体生长属于偶联

型,酵母菌繁殖速率最大的时刻也对应于产物乙醇生成速率最大的时刻,而且发酵热和尾气排放量的变化与乙醇产物的生成也直接相关。

3 结论

3.1 从重量和温度变化两方面对甜高粱秆固态发酵制燃料乙醇过程进行了研究。结果表明,最终总糖转化率为 95.6%,乙醇得率为理论值的 84.9%,而且发酵过程在 24 h 内基本完成。

3.2 对发酵物料重量和温度变化之间的相互关系进行了对照分析,认为温度和重量变化可以比较准确地描述发酵过程内在的生理活动,因而可以利用温度的实时测定数据对于固态发酵工业过程进行实时在线监控、优化与故障诊断。

3.3 基于发酵过程温度变化、散热数据和乙醇得率,估算得到该固态发酵体系发酵热的近似值为 56 kJ/mol 乙醇,精度满足固态发酵反应器的工业放大设计和优化的需要。该值略低于文献值的原因有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] ZHANG Fu-yao, ZHAO Wei-jun, PING Jun-ai. Macroergic crop-sweet sorghum [J]. Rev China Agr Sci Tech, 2006, 8 (1): 14-17.
- [2] GU Wei-bin, LI Da-jue. Sweet sorghum: high efficiency solar energy convertor [J]. Solar Energy, 2004,(4): 12-14
- [3] Lorenzo Barbanti, Silvia Grandi, Angela Vecchi et al. Sweet and fibre sorghum (Sorghum bicolor (L.) Moench), energy crops in the frame of environmental protection from excessive nitrogen loads[J]. Europ. J. Agronomy, 2006, 25: 30-39.
- [4] E. Gnansounou, A. Dauriat, C.E. Wyman. Refining sweet sorghum sorghum to ethanol and sugar: economic trade-offs in the context of North China[J]. Bioresource Technology, 2005, 96: 885-1002.
- [5] WANG Meng-jie. Prospect of industrial production of fuel ethanol from sweet sorghum stalks [J]. China Construction(Solar & Renewable Energy Sources), 2007, (2): 56-58.
- [6] XIAO Ming-song, FENG Jun. Technology of producing ethanol through liquid fermentation of sweet sorghum stalks [J]. Transactions of the CSAE, 2006(S1): 65-68.
- [7] WANG Ying, ZHANG Feng-long, JIA Ru-zen, et al. Progress of research and development on alcohol fermentation of sweet sorghum stem juice [J]. Renewable Energy Resources, 2007, 25(1): 51-55.
- [8] LIU Li, SUN Jun-she, KANG Li-ping, et al. The fuel ethanol production from sweet sorghum stalk [J]. Progress in Chemistry, 2007, 19(7/8): 1109-1115.
- [9] XIAO Ming-song, YANG Jia-xiang. Showcase project: ethanol production through solid fermentation of sweet sorghum stalks

(下转第 31 页)

3 讨论

实际的酿酒葡萄发酵液是非常复杂的发酵体系,为了实现 Cu^{2+} 胁迫的单一影响因素,选用模拟葡萄汁进行试验研究。模拟葡萄汁是化学合成的葡萄汁,可以方便地进行成分调整以满足试验需要。

试验发现,铜胁迫能够延缓酿酒酵母的生长,降低酿酒酵母的存活率,导致细胞呼吸缺陷型形成频率增加。吕焯等^[11]研究发现,酿酒酵母经高浓度酒精处理 4 h 后存活率下降,呼吸缺陷型形成增加。由此说明,酿酒酵母在不良环境下的反应存在相似性。0.05 mM Cu^{2+} 对酿酒酵母的生长活性基本没有影响。但是 1.00 mM Cu^{2+} 对 A、B 和 F 酵母的生长活性均产生了明显的抑制。综合来看,铜对 F 酵母的生长活性影响小于对 A 和 B 酵母生长活性的影响。但是 A 和 B 酵母对 Cu^{2+} 的吸收吸附作用高于 F 酵母,原因可能是 F 酵母的抗铜性能比较好,对培养基中的 Cu^{2+} 的吸附作用比较小或者是能够及时排出多余的 Cu^{2+} 。

试验初步研究了不同浓度铜离子对酿酒酵母生长活性的影响,这为以后研究抗铜酵母的筛选、研究酵母的抗铜机制等奠定了理论基础,进一步对发酵工业的深入研究以及弄清微生物抵抗不良环境的生命机制具有重要意义。

参考文献:

- [1] Li H, Guo A, Wang H. Mechanisms of oxidative browning of wine[J]. Food Chemistry, 2008, 108: 1-13.
- [2] Freitas J D, Wintz H, Kim J H, et al. Yeast, a model organism for iron and copper metabolism studies[J]. Biometals, 2003, 16: 185-197.
- [3] Krumova E Z, Pashova S B, Dolashka-Angelova P A, et al. Biomarkers of oxidative stress in the fungal strain *Humicola* [J]. Transactions of the CSAE, 2006, 22(S1): 207-210.
- [4] Marullo P, Bely M, Masneuf-Pomarede I, et al. Inheritable nature of enological quantitative traits is demonstrated by meiotic segregation of industrial wine yeast strains[J]. FEMS Yeast Research, 2004, 7(4): 711-719.
- [5] Masneuf-Pomarede I, Mansour C, Murat M L, et al. Influence of fermentation temperature on volatile thiols concentrations in *Sauvignon blanc* wines[J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 108(3): 385-390.
- [6] Manuel A, Maria T V, Peoro M. The influence of Cu concentration on enantholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2000, 90(2): 163-167.
- [7] Chi Z, Kohlwein S D, Paltauf F. Role of phosphatidylinositol(PI) in ethanol production and ethanol tolerance by a high ethanol producing yeast[J]. Journal of industrial Microbiology and Biotechnology, 1999, 22: 58-63.
- [8] Avery S V, Howlett N G, Radice S. Copper toxicity towards *Saccharomyces cerevisiae*: dependence on plasma membrane fatty acid composition[J]. Application in Environmental Microbiology, 1996, 62(11): 3960-3966.
- [9] Benaroudj N, Lee D H, Goldberg A L. Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2001, 276: 24261-24267.
- [10] Brandolini V, Tedeschi P, Capece A, et al. *Saccharomyces cerevisiae* wine strains differing in copper resistance exhibit different capability to reduce copper content in wine[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2002, 18: 499-503.
- [11] 吕焯,肖冬光,和东芹,等.海藻糖含量与酿酒酵母酒精耐性的关系[J].酿酒科技,2008, (7): 17-19.
- [12] Pandey, Ashok; Soccol, Carlos Ricardo; Larroche, Christian. Current Developments in Solid-state Fermentation[M]. Berlin: Springer, 2008.
- [13] David A. Mitchell, Nadia Krieger, Marin Berovic. Solid-State Fermentation Bioreactors. Fundamentals of Design and Operation[M]. Berlin: Springer, 2006.
- [14] Okazaki N, Sugama S, Tanaka T. Mathematical model for surface culture of Koji mold[J]. Journal of Fermentation and Technology, 1980, 58: 471-476.
- [15] TEREbiznik M. R., PILOsof A. M. R. Biomass estimation in solid state fermentation by modeling dry matter weight loss[J]. Biotechnology Techniques, 1999, 13: 3, 215-219.
- [16] WU Guo-feng, LI Quan-guo, MA Yong-qiang, et al. Industrial Fermentation Analysis [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2006.
- [17] JIA Shu-biao, LI Sheng-xian, WU Guo-feng. The New Alcohol Production Technology [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2004.
- [18] 王二强,耿欣,李十中,李天成.甜高粱秆分批固态发酵制乙醇动力学研究[J].食品与发酵工业,2009,35(10): 28-31.

(上接第 27 页)