

响应面法优化荔枝渣发酵生产酒精的工艺条件

何珺珺^{1,2}, 周如金^{1,*}, 唐玉斌², 黄敏¹

(1. 广东石油化工学院化学与生命科学学院, 广东 茂名 525000;

2. 江苏科技大学生物与化学工程学院, 江苏 镇江 212003)

摘 要: 对荔枝渣酒精发酵工艺进行研究, 探讨发酵 pH 值、发酵温度、发酵时间对酒精产量的影响, 并在单因素试验的基础上, 应用 Design Expert 7.1.1 软件技术, 以酒精产量为指标利用响应面法对荔枝渣酒精发酵的条件进行优化。结果表明, 最佳工艺条件为发酵时间 70h、发酵 pH4.6、发酵温度 33℃, 在此条件下进行发酵验证实验, 酒精产量达到 8.99mL/100g。

关键词: 燃料酒精; 荔枝渣; 发酵; 响应面法

Employing Response Surface Methodology to Optimize Ethanol Fermentation from Litch Residue

HE Jun-jun^{1,2}, ZHOU Ru-jin^{1,*}, TANG Yu-bin², HUNAG Min¹

(1. School of Chemistry and Life Science, Guangdong University of Petrochemical Technology, Maoming 525000, China;

2. School of Biology and Chemical Engineering, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang 212003, China)

Abstract: In this work, litch residues left after manufacturing of litchi wine were fermented to produce ethanol and the fermentation process was optimized using response surface methodology. Ethanol production was explored with respect to pH, temperature and time. The optimal fermentation conditions were pH of 4.6 and temperature of 33 °C for a fermentation period of 70 h. Under these conditions, the ethanol production was up to 8.99 mL/100 g.

Key words: fuel ethanol; litch residue; fermentation; response surface methodology

中图分类号: S377

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)13-0254-05

燃料乙醇属可再生资源, 用它取代部分石油意义重大。利用工业废弃物制备燃料酒精, 既能发展替代能源, 又能有效地解决环境污染问题, 促进工业生产的良性循环^[1-2]。因此, 研究燃料酒精的生产是一项重要课题。发酵法生产的燃料酒精, 具有和矿物燃料相似的燃烧性能, 但其生产原料为生物质, 是一种可再生的能源^[3]。此外, 酒精燃烧过程中所排放的一氧化碳和含硫气体均低于汽油燃烧, 可有效减少大气的污染及抑制温室效应^[4-5]。

生产燃料酒精的原料呈现多元化和非粮化发展趋势^[6]。葛向阳等^[7]利用同步糖化法发酵菊芋生产酒精, 发酵液中酒精体积分数可达到 19.6%, 转化率达到理论值的 90%。沈艳丽^[8]利用柑橘皮渣制备糖蜜, 发酵生产燃料酒精。彭林才等^[9]以造纸污泥为原料同步糖化发酵生产燃料乙醇。康利平等^[10]研究了甜高粱品种 M-81E 茎秆汁液乙醇发酵条件, 结果显示在自然 pH 值、32℃条件下

发酵 32h, 乙醇得率达到 90.5%。

鲜果荔枝不易保藏, 荔枝深加工是发展荔枝产业的重要途径; 但是荔枝加工过程中会产生大量荔枝渣, 含大量糖分, 对环境造成污染^[11]。本实验应用响应面优化方法对荔枝渣酒精发酵工艺条件进行优化研究, 以考察荔枝渣酒精生产的最佳工艺参数, 提高荔枝渣酒精产量, 旨在为探讨荔枝渣生产酒精的可行性提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鲜荔枝渣由东方红荔枝酒厂提供。

耐高温高活性酿酒酵母 安琪酵母股份有限公司; 乙醇(色谱纯)、正丙醇(色谱纯) 天津市百世化工有限公司; 果胶酶(酶活力 50000U/g) 上海源聚生物科技有限公司; 纤维素酶(酶活力 15000U/g) 上海绿岛科技有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

收稿日期: 2010-10-25

基金项目: 广东省科技厅产学研项目(2009B090300134)

作者简介: 何珺珺(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为发酵工程。E-mail: hjjplmm0405@163.com

* 通信作者: 周如金(1965—), 男, 教授, 研究方向为生化工程。E-mail: rujinzhou@126.com

1.2 培养基

斜面培养基: 麦芽汁固体培养基^[12]; 种子培养基: 荔枝汁液体培养基^[13], 鲜荔枝去皮去核, 榨汁机压榨后, 纱布过滤, 115℃灭菌 30min 备用; 发酵培养基: 荔枝渣培养基, 荔枝渣经干燥、粉碎、过筛等处理后, 在 pH5.0 的缓冲液中, 加 65U/g 纤维素酶和 80U/g 果胶酶, 50℃水解 1.5h。

1.3 发酵液酒精含量的测定^[14]

色谱条件: 国产 GC7890F 气相色谱仪, 配备 FID 氢火焰检测器和 N2010 色谱工作站; OV-17 型石英毛细管柱(0.25mm × 0.5 μm, 30m); 柱温: 180℃; 气化室和检测器温度: 220℃; 载气流量: 40mL/min; 氢气流量: 40mL/min; 空气流量: 500mL/min, 进样量: 1 μL。

标准溶液的制备: 精密量取 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0mL 的无水乙醇和 0.5mL 的内标物正丙醇, 加甲醇稀释至 50mL, 混匀。

样品溶液的测定: 取适量待测发酵液, 在 5000r/min、室温条件下离心 10min, 得上清液, 经 25 μm 微孔滤膜过滤, 所得滤液即为发酵液样品溶液。精密量取恒温至 20℃ 的样品溶液 1.0mL, 加正丙醇 0.5mL, 加甲醇稀释至 50mL, 混匀, 放置 15min, 取上层溶液进样分析, 测定发酵液中酒精含量。酒精产量用每 100g 干荔枝渣发酵产酒精体积量表示。

1.4 培养方法

将酿酒酵母接入荔枝汁种子培养基中, 180r/min 振荡培养过夜获得种子培养液。在 150mL 发酵瓶装入 100mL 发酵培养基, 灭菌后按 5% 的接种量接种种子培养液, 装上发酵栓, 静置发酵。

2 结果与分析

2.1 发酵温度对酒精产量的影响

150mL 锥形瓶中装发酵培养基 100mL, 灭菌按 5% 的接种量接种种子培养液, 分别在 27~39℃ 不同温度条件下静置发酵 84h, 测定发酵液中酒精含量, 结果如图 1 所示。

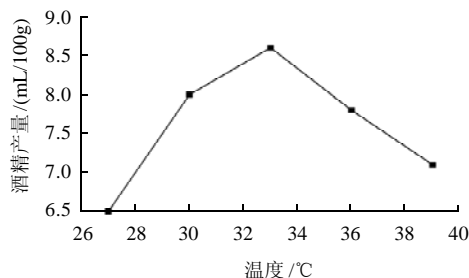


图 1 不同发酵温度对酒精产量的影响

Fig.1 Effect of temperature on ethanol production

如图 1 所示, 发酵温度对酒精发酵的影响非常显著。当发酵温度为 27~33℃ 时, 酒精产量呈增加趋势, 在 33℃ 时酒精产量达到最高。当发酵温度高于 33℃ 时, 酒精产量降低, 发酵不完全, 酒精产量低。这是由于高温抑制酵母菌的生长和繁殖, 影响代谢途径中酶系活力, 代谢活力明显降低, 发酵速度减慢。结果表明, 安琪耐高温高活性酿酒酵母最适发酵温度为 33℃。在此温度条件下酒精产量最高。

2.2 发酵培养基初始 pH 值对酒精产量的影响

将发酵培养基调至 pH3.0~5.5 等不同的 pH 值, 按 1.4 节培养方法在 33℃ 静置发酵 84h, 测定发酵液中酒精含量, 结果如图 2 所示。

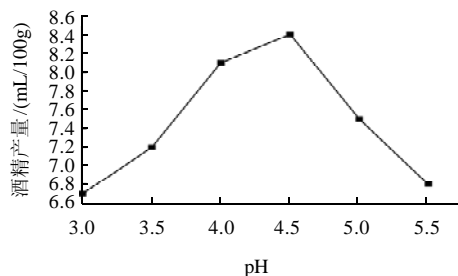


图 2 发酵培养基初始 pH 值对酒精产量的影响

Fig.2 Effect of initial medium pH on ethanol production

pH 值对酵母细胞中酶的活性影响显著, 从而影响酒精产量。由图 2 可以看出, 在不同的初始 pH 值条件下, 发酵后的酒精产量不同。在 pH 值为 3.0~4.5, 酒精产量逐渐升高, 酵母菌产酒精酶的活性增加, 在 pH 值为 4.5 时酒精产量最高, 此时酵母菌产酒精代谢途径最旺盛, 酒精的发酵作用最强, 在 pH 值为 4.5~5.5, 酿酒酵母生长和代谢酶系活性被抑制, 酒精产量降低, 因此确定最适发酵培养基初始 pH 值为 4.5。

2.3 发酵时间对酒精产量的影响

150mL 锥形瓶中装入 100mL 发酵培养基, 高压蒸汽灭菌后按 5% 的接种量接入种子培养液, 30℃ 静置培养, 在不同的发酵培养时间后测定发酵液中酒精含量, 结果如图 3 所示。

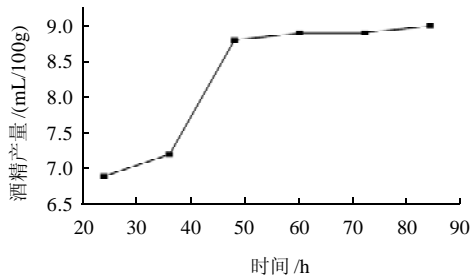


图 3 发酵时间对酒精产量的影响

Fig.3 Effect of fermentation time on ethanol production

如图3所示,酒精产量随着发酵时间的延长不断上升,尤其是24~48h之间几乎呈直线上升趋势,48h达到最大。酒精发酵主要集中在24~48h,至48h发酵基本结束,48h以后酒精产量的变化不明显,所以选取48h为最终培养时间。

综上,单因素试验得出荔枝渣酒精发酵的优化条件为:发酵温度33℃,发酵pH值为4.5,发酵时间48h。

2.4 响应面法优化荔枝渣发酵产酒精条件

在单因素试验的基础上,利用响应面法优化荔枝渣酒精发酵工艺,根据Box-Behnken中心组合设计原理,以酒精产量为响应值,利用Design Expert7.1.1软件对发酵温度、发酵时间和发酵pH值3个因素设计三因素三水平的响应面试验法,共有17个试验点,其中12个为析因点,5个为零点以估计误差。因素水平见表1,试验设计和结果见表2。

表1 Box-Behnken 中心组合设计

Table 1 Factors and their coded levels in Box-Behnken experimental design

水平	因素		
	A 温度/℃	B pH	C 发酵时间/h
-1	30	4.0	36
0	33	4.5	54
1	36	5.0	72

表2 Box-Behnken 设计方案及响应值结果

Table 2 Box-Behnken experimental design and corresponding results

试验号	因素			酒精产量/(mL/100g)
	A 温度	B pH	C 时间	
1	0	0	0	9.10
2	1	0	1	8.95
3	0	0	0	9.13
4	1	-1	0	8.37
5	0	-1	1	8.37
6	0	1	1	8.53
7	1	1	0	8.45
8	0	0	0	9.06
9	-1	-1	0	8.13
10	-1	1	0	8.49
11	0	0	0	9.16
12	0	1	-1	8.41
13	0	0	0	9.06
14	-1	0	1	8.80
15	1	0	-1	8.86
16	0	-1	-1	8.24
17	-1	0	-1	8.63

利用Design Expert7.1.1软件对响应面试验结果进行多元回归拟合,对表2的数据进行回归分析后得到模型为二次多项回归方程,酒精产量(Y)对荔枝渣发酵温度、

发酵pH值、发酵时间的方程为:

$$Y = -68.09275 + 1.42567A + 22.7085B + 0.061097C - 0.046667AB - 3.7037 \times 10^{-4}AC - 2.77778 \times 10^{-4}BC - 0.01775A^2 - 2.32900B^2 - 4.08179 \times 10^{-4}C^2$$

为检验方程的可靠性,对方程进行方差分析,结果见表3。

表3 二次回归模型的方差分析结果

Table 3 Analysis of variance for the fitted regression equation

变异来源	自由度	平方和	均方	F值	P	显著性
模型	9	1.88	0.21	110.19	<0.0001	**
A	1	0.042	0.042	22.21	0.0022	**
B	1	0.074	0.074	39.14	0.0004	**
C	1	0.033	0.033	17.17	0.0043	**
AB	1	0.020	0.020	10.35	0.0147	*
AC	1	1.6×10^{-3}	1.6×10^{-3}	0.84	0.3886	
BC	1	2.5×10^{-5}	2.5×10^{-5}	0.013	0.9117	
A ²	1	0.11	0.11	56.75	0.0001	**
B ²	1	1.43	1.43	753.83	<0.0001	**
C ²	1	0.074	0.074	38.89	0.0004	**
残差	7	0.013	1.89×10^{-3}			
失拟项	3	5.575×10^{-3}	1.858×10^{-3}	0.97	0.4902	
纯误差	4	7.680×10^{-3}	1.920×10^{-3}			
总变异	16	1.89				

注: * $P < 0.05$, 模型或考察因素有显著影响; ** $P < 0.01$, 模型或考察因素有极显著影响; $R^2=0.9930$, $R^2_{Adj}=0.9840$ 。

由表3可知,失拟项 $P=0.4902 > 0.05$,表明失拟项不显著,模型预测值与实际值拟和较好。而模型的 P 值 < 0.0001 ,表明该模型有显著意义,不同发酵条件下的差异高度显著,该试验方法准确可行,可使用该方程模拟荔枝渣产酒精的三因素三水平的分析。由 P 值可知,在所选的各因素水平范围内,对结果的影响排序为:发酵pH值>发酵温度>发酵时间。且模型的复相关系数 R^2 为0.99,大于90%,说明酒精产量和发酵温度、pH值及发酵时间存在线性相关,模型拟合程度良好,试验误差小,该模型是合适的。因此可以用该模型分析和预测不同发酵条件下酒精产量的变化。方程中A、B、C、A²、B²、C²对酒精产量的影响极显著,AB对酒精产量的影响显著,表明发酵温度、pH值及发酵时间对酒精产量的影响不是简单的线性关系,二次项和交互项对酒精产量也有影响。

2.5 发酵条件的响应面分析与优化

在回归模型方差分析结果的基础上,利用软件作发酵温度、pH值及发酵时间对酒精产量影响的响应面和等高线图,结果如图4~6所示。响应面三维图反应各发酵因素的交互作用,等高线图的形状表示交互作用的强弱,形状为圆形交互作用弱,椭圆形则交互作用强^[15]。比较两组图响应面最高点和等高线可知,在所选范围内存在极值,即

响应面最高点,同时也是等高线最小椭圆的中心点。

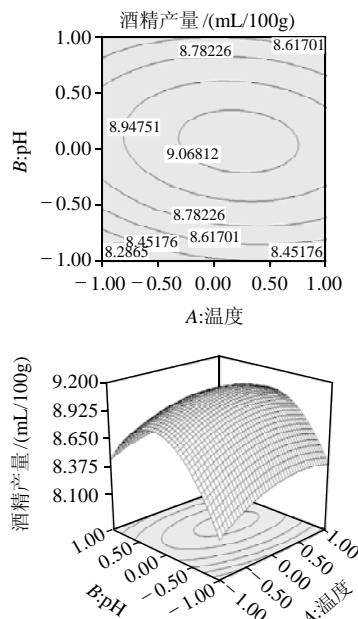


图4 温度和pH值交互作用对酒精产量的影响

Fig.4 Contour and response surface plots showing the effect of temperature and initial medium pH on ethanol production

当发酵时间70h时,发酵温度和发酵pH值对酒精产量的交互作用见图4。固定发酵温度,随着发酵pH值的增加,酒精产量逐渐增加,在4.55左右出现极值,之后随着pH值的增加,酒精产量下降。发酵温度在30~36℃的范围内酒精产量变化不太明显。沿着发酵pH值方向的等高线密度变化较高,说明发酵pH值对酒精产量的影响大于发酵温度。

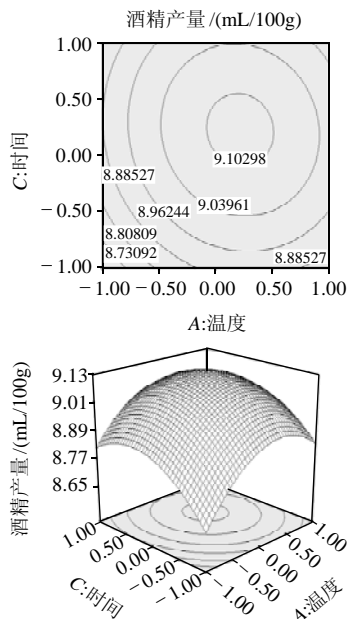


图5 发酵时间和温度交互作用对酒精产量的影响

Fig.5 Contour and response surface plots showing the effect of fermentation temperature and time on ethanol production

当发酵pH为4.5时,发酵温度和发酵时间对酒精产量的交互作用见图5。固定发酵时间,当发酵温度在30~36℃的范围内时,随着发酵温度的升高,酒精产量逐渐增加,在34.5℃左右达到极值,之后发酵温度继续升高,酒精产量降低。固定发酵温度,随着发酵时间的延长酒精产量呈增加的趋势。

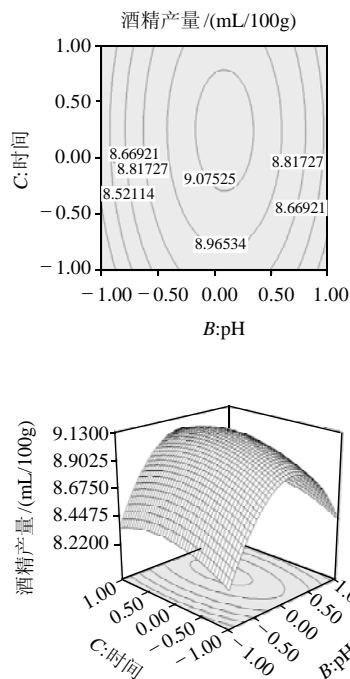


图6 发酵时间和发酵pH值交互作用对酒精产量的影响

Fig.6 Contour and response surface plots showing the effect of fermentation time and initial medium pH on ethanol production

当发酵温度为33℃时,发酵时间和发酵pH值的交互作用对酒精产量影响见图6。固定发酵pH值,当发酵时间在36~72h的范围内变化时,酒精产量没有明显变化。固定发酵时间,发酵pH值在4~5.5的范围内时,随着发酵pH值的增加,酒精产量不断增加,在4.65左右出现最大值,之后随着pH值的增大,酒精产量有下降的趋势。沿着发酵pH值方向的等高线密度变化较高,说明发酵pH值对酒精产量的影响大于发酵时间。

通过软件分析,得到荔枝渣发酵的最佳条件为:发酵时间70.150h、发酵pH4.64、发酵温度33.830℃,在此条件下酒精产量的理论最大值为9.028mL/100g。为检验响应曲面法所得结果的可靠性,采用上述条件进行荔枝渣酒精发酵,考虑到实际操作的便利,将发酵工艺参数修正为发酵时间70h、发酵pH4.6、发酵温度33℃,3次平行实验得到的实际平均酒精产量为8.99mL/100g,其相对误差小于1%。因此,基于响应曲面法所得的优化发酵参数准确可靠,具有实际应用价值。

3 结 论

在单因素试验的基础上, 利用响应面法对酿酒酵母利用荔枝渣发酵代谢产酒精的条件进行了优化, 建立了酒精产量与发酵 pH 值、发酵温度、发酵时间 3 个因素的二次多项式回归模型, 经验证实验证明该模型合理可靠。由该模型得到的优化发酵工艺参数为: 发酵时间 70h、发酵 pH4.6、发酵温度 33℃。酒精的实际平均产量可达到 8.99mL/100g。

参考文献:

- [1] 宋安东, 裴广庆, 王风芹, 等. 中国燃料乙醇生产用原料的多元化探索[J]. 农业工程学报, 2008, 24(3): 302-307.
- [2] LAOPAIBOON L, THANONKEO P, JAISIL P, et al. Ethanol production from sweet sorghum juice in batch and fed-batch fermentations by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007, 23(10): 1497-1501.
- [3] YAMASHITA Y, KUROSUMI A, SASAKI C, et al. Ethanol production from paper sludge by immobilized *Zymomonas mobilis*[J]. Biochemical Engineering Journal, 2008, 42(3): 314-319.
- [4] OLESKOWICZ-POPIEL P, LISIECKI P, HOLM-NIELSEN J B, et al. Ethanol production from maize silage as lignocellulosic biomass in anaerobically digested and wet-oxidized manure[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(13): 5327-5334.
- [5] 陈万里, 赵明星. 燃料乙醇产业发展综述[J]. 河南化工, 2010, 27(7): 24-26.
- [6] 谭天伟, 王芳, 邓利. 生物能源的研究现状及展望[J]. 现代化工, 2003, 23(9): 8-11.
- [7] 葛向阳, 张伟国. 同步糖化发酵菊芋生产酒精中黑曲霉菌株的选育[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(2): 83-87.
- [8] 沈艳丽. 柑橘皮渣糖蜜及其燃料酒精制备的研究[D]. 重庆: 西南大学, 2008: 18-20.
- [9] 彭林才, 陈元彩, 付时雨, 等. 造纸污泥同步糖化发酵生产燃料乙醇[J]. 华南理工大学学报, 2010, 38(8): 34-38.
- [10] 康利平, 孙君社, 张京生, 等. 甜高粱茎秆汁液发酵生产燃料乙醇的研究[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(2): 48-50.
- [11] 蔡长河, 曾庆孝, 段东洋, 等. 荔枝的营养价值功能、加工研究现状及开发利用前景[J]. 食品科学, 2005, 26(8): 48-50.
- [12] 黄文芳, 张松. 微生物学实验指导[M]. 广州: 暨南大学出版社, 2003.
- [13] 周德庆. 微生物学教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 1996.
- [14] 谢文, 丁慧瑛, 章晓氢. 葡萄酒、果酒中乙醇含量的测定方法[J]. 色谱, 2004, 22(5): 561-563.
- [15] 陈燕, 王文平, 邱树毅, 等. 响应面法优化超声波强化提取薏苡仁酯[J]. 食品科学, 2010, 31(8): 46-50.