

# 酵母发酵条件的优化及其发酵造纸污泥产乙醇\*

彭林才, 陈元彩, 付时雨

(华南理工大学制浆造纸工程国家重点实验室, 广东 广州, 510640)

**摘 要** 优化了酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* GIM-2 发酵工艺条件并对其发酵造纸污泥产乙醇进行了研究。以模拟造纸污泥水解液中糖成分的混合糖为试验原料, 采用响应面分析法优化酵母发酵生产乙醇工艺, 得优化条件: 温度 33.1 °C, pH 值 5.4, 摇床转速 50 r/min, 发酵 24 h 糖醇转化率为 38%。造纸污泥在纤维素酶作用下水解 48 h, 纤维素转化率为 58.2%, 水解液在优化条件下发酵 24 h 糖醇转化率为 28.4%, 产率达 0.14 g 乙醇/g 污泥, 是理论值的 37.3%。

**关键词** 造纸污泥, 酿酒酵母, 发酵, 乙醇, 响应面分析法

乙醇是来自可再生资源的最有发展前景的液态燃料, 具有清洁、安全和支持汽油充分燃烧的特点<sup>[1]</sup>。目前关于生物乙醇的研究大多集中在农业、林业等富含木质纤维素的废物, 而用造纸污泥作为生物质原料制取乙醇国内尚未见报道。造纸污泥是造纸过程中废水里的残余沉淀物, 主要包括不溶性纤维素以及填料、凝聚剂和其他杂质<sup>[2]</sup>。当前造纸工业产生的大量污泥多被废弃或者焚烧, 不仅造成资源的浪费, 也产生严重的环境污染问题, 因此利用生物技术将其中的纤维素水解成可发酵糖, 进一步发酵生产乙醇, 对开发新能源和保护环境等方面具有十分重要的意义<sup>[3]</sup>。与其它生物质原料相比, 造纸污泥中的纤维主要以细小纤维的形态存在, 经过制浆和脱墨过程, 半纤维素和木素含量降低, 不需要经过预处理即可使纤维分散, 有利于酶解反应的进行, 且来源丰富, 廉价易得, 是发酵生产燃料乙醇极具潜力的生物质原料<sup>[4]</sup>。

本文以模拟造纸污泥水解液中糖成分的混合糖为试验原料, 进行戊糖与己糖共发酵生产乙醇, 采用响应面分析法<sup>[5-6]</sup>优化酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* GIM-2 发酵工艺, 然后利用酵母在优化条件下发酵造纸污泥产乙醇进行试验。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

造纸污泥, 取自广东中顺纸业集团有限公司; 酿

酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* GIM-2, 华南理工大学轻工与食品学院实验室筛选菌种; 纤维素酶, 购自丹麦诺维信酶制剂有限公司。

### 1.2 培养基

#### 1.2.1 种子培养基

葡萄糖 10 g/L, 蛋白胨 5 g/L, 酵母粉 3 g/L, 麦芽汁 3 g/L, pH 自然。121 °C 下高压灭菌 20 min。

#### 1.2.2 发酵培养基

混合糖(葡萄糖与木糖质量比为 5:1) 60 g/L, 蛋白胨 5 g/L, 酵母粉 3 g/L, 麦芽汁 3 g/L, 根据实验要求调节 pH 值。121 °C 下高压灭菌 20 min。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 种子培养

保藏菌种接入斜面培养基中恒温 30 °C, 培养 36—48 h。再将菌种接入装 50 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中, 恒温 30 °C, 摇床转速 180 r/min, 扩大培养 24 h, 作为发酵培养基接种物。

#### 1.3.2 发酵方法

250 mL 三角瓶中装入 50 mL 发酵培养基, 按发酵培养基体积 6% 接入培养 24 h 的种子酵母, 根据响应面试验要求将溶液 pH 值调至相应值, 并分别放入对应温度和摇床转速的摇床内发酵 24 h, 重复 2 次, 试验结果取平均值。

#### 1.3.3 污泥水解液的制备

称取 2.0 g 已处理好的造纸污泥, 放入 250 mL 锥形瓶中, 加入一定量的 pH 值为 4.8 的磷酸盐缓冲液使其浓度为 40 g/L, 按 20 U/g 污泥加入纤维素酶, 于 55 °C 水浴振荡器内水解 48 h, 离心, 上层清液即为污泥水解液<sup>[7]</sup>。

### 1.4 分析方法

第一作者: 硕士研究生。

\* 国家自然科学基金项目(20676045), 国家高技术研究发展计划(863 计划) 重点项目(2007A100704), 中山市科技研发项目(20073A146)

收稿日期: 2009-01-08, 改回日期: 2009-03-09

1.4.1 糖浓度的测定

总糖浓度采用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法<sup>[8]</sup>测定,木糖浓度采用地衣酚比色法<sup>[9]</sup>测定,葡萄糖浓度为总糖浓度减去木糖浓度。

1.4.2 酵母浓度

采用比浊法测定,将发酵液混匀后稀释至一定倍数测定其在 600 nm 的吸光度,并根据浓度与吸光度的线性关系曲线求得酵母浓度。

1.4.3 乙醇浓度

采用顶空气相色谱法测定。

2 结果与分析

2.1 酵母发酵条件的优化

2.1.1 Box-Behnken 试验设计

试验设计采用响应面分析方法<sup>[10]</sup>,以乙醇浓度为响应值,温度( $x_1$ ,℃)、pH 值( $x_2$ )、摇床转速( $x_3$ ,r/min)3 个因素为自变量,根据 Box-Behnken 中心组合设计原理,每个因素取 3 个水平,以(-1,0,1)编码。按方程  $X_i=(x_i-x_0)/\Delta x$  对自变量进行编码( $X_i$  为自变量的编码值, $x_i$  为自变量的真实值, $x_0$  为试验中心点处自变量的真实值, $\Delta x$  为自变量的变化步长)。响应面分析试验设计及结果如表 1。共安排了 15 组试验,其中 12 组为析因试验,3 组为 0 点。每组实验重复 2 次,结果取平均值。

表 1 响应面分析试验设计及结果

编号	温度/℃		pH 值		摇床转速/ $r \cdot \min^{-1}$		乙醇浓度 Y / $g \cdot L^{-1}$
	$x_1$	$X_1$	$x_2$	$X_2$	$x_3$	$X_3$	
1	30	-1	4	-1	100	0	11.4
2	30	-1	6	1	100	0	18.5
3	40	1	4	-1	100	0	2.4
4	40	1	6	1	100	0	3.5
5	35	0	4	-1	50	-1	19.8
6	35	0	4	-1	150	1	16.0
7	35	0	6	1	50	-1	20.3
8	35	0	6	1	150	1	16.7
9	30	-1	5	0	50	-1	20.3
10	40	1	5	0	50	-1	8.7
11	30	-1	5	0	150	1	16.6
12	40	1	5	0	150	1	4.0
13	35	0	5	0	100	0	20.5
14	35	0	5	0	100	0	19.6
15	35	0	5	0	100	0	19.3

2.1.2 二次回归拟合及方差分析

利用统计软件 MINITAB 对实验数据进行二次多项回归拟合,分析结果见表 2。由表 2 可知, $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$  的线性项, $X_1$ 、 $X_2$  的平方项, $X_1 X_2$  交互项对发酵都具有显著作用。根据 MINITAB 回归拟合实验数据,可得乙醇浓度对温度、pH 值和摇床转速的三元二次回归方程为: $Y=19.8-6.025X_1+1.175X_2-1.975X_3-8.325X_1^2-2.525X_2^2+0.925X_3^2-1.5X_1X_2-0.25X_1X_3+0.05X_2X_3$ ,其中  $X_1$ 、 $X_2$  和  $X_3$  分别代表温度、pH 值和摇床转速的编码水平。该模型的调整确定系数  $R^2=0.969$ ,说明模型拟合程度良好,预测值和实测值之间具有高度的相关性。

表 2 回归方程系数的显著性检验

模型中 系数项	估计值	标准误差	t 值	P 值
常数	19.800	0.684 8	28.912	0.000
$X_1$	-6.025	0.419 4	-14.367	0.000
$X_2$	1.175	0.419 4	2.802	0.038
$X_3$	-1.975	0.419 4	-4.709	0.005
$X_1 \times X_1$	-8.325	0.617 3	-13.486	0.000
$X_2 \times X_2$	-2.525	0.617 3	-4.090	0.009
$X_3 \times X_3$	0.925	0.617 3	1.498	0.194
$X_1 \times X_2$	-1.50	0.593 1	-2.529	0.053
$X_1 \times X_3$	-0.25	0.593 1	-0.422	0.691
$X_2 \times X_3$	0.05	0.593 1	0.084	0.936

模型的调整确定系数  $R^2=0.969$

### 2.1.3 乙醇浓度的响应曲面分析

根据回归方程利用统计分析软件 MATTAB 绘出响应面及其等高线图,见图1、图2和图3。每个响应面表示其中一个变量保持在最佳水平,另外2个独立变量之间的交互作用对响应值乙醇浓度的影响。由响应曲面和等高线图可以看出,温度、pH值和摇床转速与乙醇浓度都存在显著的相关性,其中温度对乙醇浓度的影响最为显著。温度与pH值之间交互作用显著,而温度与摇床转速、pH值与摇床转速之间的交互作用不明显。

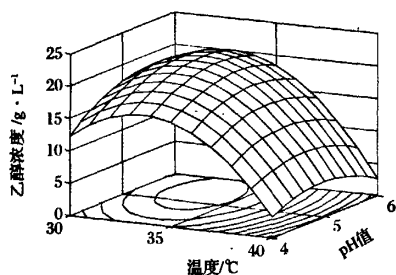


图1 温度和pH值对乙醇浓度影响的响应面图及其等高图

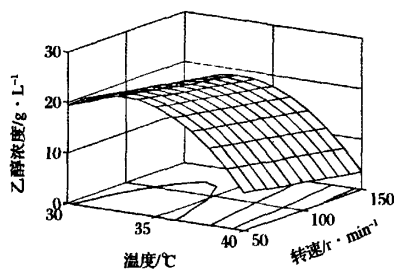


图2 温度和摇床转速对乙醇浓度影响的响应面图及其等高图

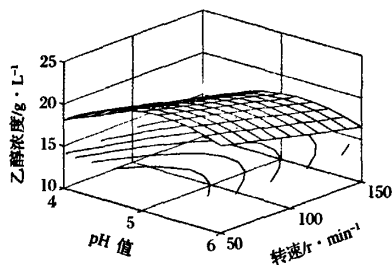


图3 pH值和摇床转速对乙醇浓度影响的响应面图及其等高图

从图1和图2可以看出,发酵过程中温度对乙醇浓度的影响较大,随着温度的升高,乙醇浓度逐渐增

加,但温度达到一定值后,继续升高温度,乙醇浓度明显降低,因此发酵温度一般控制在33—35℃。从图1和图3可以看出,乙醇浓度随pH值增加呈先上升后下降趋势,在较低的摇床转速和温度变化区域内,pH在5.0—5.5乙醇浓度较高。从图2和图3可以看出,随着摇床转速的增加,乙醇浓度逐渐降低,因此选择摇床转速较低时将更有利于乙醇的产生。

在获得回归非线性模型和响应面之后,为了求得乙醇最佳浓度的工艺条件,对所得的回归方程分别对各自的变量求一阶偏导数,并令其为0,得到三元一次方程组,求解此方程组可以得出模型的极值点: $X_1 = -0.39$ ,  $X_2 = 0.35$ ,  $X_3 = -1$ ,  $Y = 23.0$ ,即温度33.1℃、pH值5.4和摇床转速50 r/min时,理论最大乙醇浓度为23.0 g/L。

### 2.1.4 最佳发酵条件的验证及发酵进程

以浓度为60 g/L的混合糖液为发酵底物,采用优化的工艺条件进行发酵试验,以48 h为1个发酵周期,每6 h取样测数据,实验结果如图4。

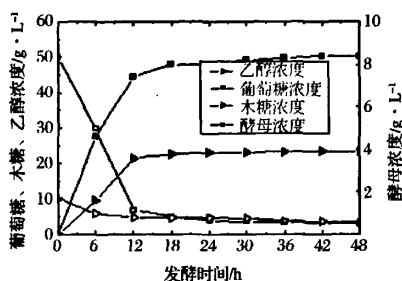


图4 最佳工艺条件下混合糖发酵产乙醇进程

可以看出,随发酵时间增加,葡萄糖和木糖浓度不断降低,并且在发酵0—12 h,葡萄糖和木糖利用速度最快,此后葡萄糖和木糖浓度均下降缓慢至不再下降,发酵至48 h,葡萄糖和木糖的利用率分别达92.8%和67.0%,结果表明,该酵母菌利用葡萄糖的能力大于木糖。酵母浓度和乙醇浓度随发酵时间延长不断增加,至发酵24 h,二者分别为8.0 g/L和22.8 g/L,糖醇转化率为38%。可见乙醇浓度试验值与预测值相一致,说明该模型可以较好的预测实际发酵产乙醇的情况。

## 2.2 发酵造纸污泥产乙醇

### 2.2.1 造纸污泥成分分析

造纸污泥的主要成分及各组分含量如表3所示。该造纸污泥中综纤维素含量较高,木素含量低,因此有利于纤维素酶将其中的纤维素、半纤维素转化为可

被利用的还原糖。

表3 造纸污泥主要成分及含量

污泥成分	水分	综纤维素	木素	灰分	其他
含量/%	4.3	75.0	8.4	10.7	1.6

### 2.2.2 造纸污泥水解与发酵

近年来,国外一些研究人员将造纸污泥作为生物原料制取乙醇已取得了许多研究成果,Marques<sup>[11]</sup>和 Yamashita<sup>[12]</sup>分别以不同公司的造纸污泥采用同时糖化发酵工艺来转化污泥中的纤维素成乙醇,转化率均超过50%。本研究采用分步水解糖化发酵法生产乙醇,以初始浓度为40 g/L造纸污泥为底物,按20 U/g(污泥)加入纤维素酶,于55℃水浴振荡器内酶解48 h,所得水解液中还原糖浓度为19.4 g/L,纤维素转化率为58.2%。水解液在上述优化的发酵工艺条件下发酵24 h,每4 h取样测数据,实验结果如图5。

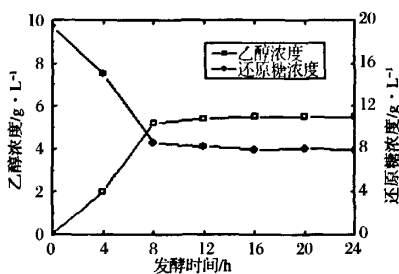


图5 造纸污泥水解液的乙醇发酵

可以看出,随发酵时间增加,还原糖浓度不断降低,并且在发酵4—8 h,还原糖利用速度最快,残糖浓度最后稳定在8 g/L左右。乙醇浓度随发酵时间延长不断增加,至发酵24 h乙醇浓度为5.5 g/L,糖醇转化率为28.4%,相对于污泥乙醇产率为0.14 g乙醇/g污泥,是理论产率值的37.3%。从分析结果可以看出,利用污泥水解液发酵糖醇转化率低于混合糖发酵,污泥发酵液中还存在较高浓度的还原糖,可能原因是造纸污泥中含有的大量金属离子对酵母发酵存在抑制作用<sup>[7]</sup>,使发酵不能充分进行,具体原因还有待进一步研究。

### 3 讨论

研究表明,采用响应面分析法所得酿酒酵母 *S. cerevisiae* GIM-2 共发酵葡萄糖与木糖产乙醇的优化工艺条件为:温度33.1℃,pH值5.4,摇床转速50 r/min,该条件下发酵24 h糖醇转化率为38%。

利用造纸污泥进行水解发酵可获得一定量的乙醇,为造纸污泥资源化利用提供了一条可行的途径。但是发酵造纸污泥产乙醇也存在一些问题,污泥成分复杂多变,碳水化合物含量占20%—70%不等,且含有大量的金属离子和其它杂物,对水解发酵存在一定的抑制作用,不能使污泥中有效成分得到充分利用,同时也缺乏能够同时高效利用戊糖和己糖的发酵菌株。为了使其尽早实现产业化,必须寻找更加合理先进的技术提高造纸污泥中纤维素乙醇的转化效率,降低生产成本,实现造纸污泥资源化利用的最大利益化。

### 参考文献

- [1] 王超,章超桦. 酶解纤维素类物质生产燃料酒精的研究进展[J]. 纤维素科学与技术, 2003(12): 52—57.
- [2] 赵长遂,黄超,陈晓平,等. 造纸污泥热解试验和化学动力学研究[J]. 南京工程学院学报, 2003, 1(2): 1—6.
- [3] 李盛贤,贾树彪,顾立文. 利用纤维素原料生产燃料酒精的研究进展[J]. 酿酒, 2005(3): 13—16.
- [4] Marques S, Alves L, Roseiro J C, et al. Conversion of recycled paper sludge to ethanol by SHF and SSF using *Pichia stipitis* [J]. Biomass and Bioenergy, 2008, 32: 400—406.
- [5] Montgomery D C. Design and Analysis of Experiments (3rd. ed) [M]. New York: John Wiley and Sons, 1991.
- [6] Ambati P, Ayyanna C. Optimizing medium constituents and fermentation conditions for citric acid production from palmyra jaggery using response surface method [J]. World Journal Microbiology and Biotechnology, 2001, 17(4): 331—335.
- [7] Yuya Yamashita, Akihiro Kurosumi, Chizuru Sasaki, et al. Ethanol production from paper sludge by immobilized *Zymomonas mobilis* [J]. Biochemical Engineering Journal, 2008, 42: 314—319.
- [8] Ghose T K. Measurement of cellulase activities [J]. Pure and Applied Chemistry, 1987, 59(2): 257—268.
- [9] 樊梓鸾. 同步糖化发酵纤维素转化乙醇高产菌株选育及工艺研究[D]. 东北林业大学, 2007. 4.
- [10] 金慧,刘荣厚,沈飞,等. 甜高粱茎汁固定化酵母乙醇发酵工艺优化的试验研究[J]. 农业工程学报, 2008, 24(4): 194—198.
- [11] Marques S, Alves L, Roseiro J C, et al. Conversion of recycled paper sludge to ethanol by SHF and SSF using *Pichia stipitis* [J]. Biomass and Bioenergy, 2008, 32: 400—406.
- [12] Yuya Yamashita, Akihiro Kurosumi, Chizuru Sasaki, et

al. Ethanol production from paper sludge by immobi-  
lized *Zymomonas mobilis* [J]. Biochemical Engineering

Journal,2008,42;314-319.

Optimization of Yeast Fermentation Condition and Production of  
Ethanol from Paper Sludge Fermentation

Peng Lincal, Chen Yuancai, Fu Shiyu

(State Key Laboratory of Pulp and Paper Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**ABSTRACT** The conditions of *Saccharomyces cerevisiae* GIM-2 fermentation technique were optimized and production of ethanol from paper sludge fermentation was studied. Mixture of sugar with content of simulate paper sludge hydrolysate was used as experimental material, and optimization of yeast fermentation condition for the production of ethanol was made possible by response surface methodology. The optimized technological parameters were as follows: temperature 33.1℃, pH 5.4, rotational speed 50 r/min and under these conditions, the conversion rate of sugar to ethanol was 38% after 24 h of incubation. Paper sludge was hydrolyzed by commercial cellulose for 48 h and percent conversion of cellulose was 58.2%. Hydrolysate fermentation for 24 h under optimized conditions, the conversion rate of sugar to ethanol was 28.4% and the yield of ethanol produced per gram of paper sludge utilized was 0.14 g, which corresponds to 37.3% of the theoretical yield.

**Key words** paper sludge, *Saccharomyces cerevisiae*, fermentation, ethanol, response surface methodology

国家标准化委员会发布的涉及工业  
发酵与酿酒的最新国标信息

国家标准化委员会以 2009 年第 5 号(总第 145 号)文发布的最新中华人民共和国国家标准批准发布公告中,涉及工业发酵与酿酒的国标如下:

序号	标准号	标准名称	代替标准号	批准日期	修订日期	实施日期
129	GB/T23527-2009	蛋白酶制剂		2009-04-27		2009-11-01
130	GB/T23528-2009	低聚果糖		2009-04-27		2009-11-01
132	GB/T23530-2009	酵母抽提物		2009-04-27		2009-11-01
133	GB/T23531-2009	食品加工用酶制剂企业良好生产规范		2009-04-27		2009-11-01
134	GB/T23532-2009	木糖		2009-04-27		2009-11-01
135	GB/T23533-2009	固定化葡萄糖异构酶制剂		2009-04-27		2009-11-01
136	GB/T23534-2009	曲酸		2009-04-27		2009-11-01
137	GB/T23535-2009	脂肪酶制剂		2009-04-27		2009-11-01
144	GB/T23542-2009	黄酒企业良好生产规范		2009-04-14		2009-12-01
145	GB/T23543-2009	葡萄酒企业良好生产规范		2009-04-14		2009-12-01
146	GB/T23544-2009	白酒企业良好生产规范		2009-04-14		2009-12-01
148	GB/T23546-2009	奶酒		2009-04-14		2009-12-01
149	GB/T23547	浓酱兼香型白酒		2009-04-14		2009-12-01