

# 响应面法优化耐高温酵母生产高浓度乙醇

申乃坤, 王青艳, 陆雁, 秦燕, 黄日波

广西科学院国家非粮生物质能源工程技术研究中心, 南宁 530007

**摘要:** 利用耐高温酵母 GXASY-10 菌株对木薯粉同步糖化 (SSF) 法生产高浓度乙醇的发酵条件进行了优化。在单因素实验的基础上, 首先应用 Plackett-Burman 试验设计筛选影响酒精高温高浓度发酵的重要参数, 采用最陡爬坡实验逼近最大酒精生产区域后, 利用 Box-Behnken 设计确定重要参数的最佳水平。筛选结果表明, 影响酒精产量的重要参数是液化时间、糖化酶用量和初始木薯粉 (底物) 浓度。最佳工艺条件为: 液化时间为 35 min, 糖化酶添加量为 1.21 AGU/g 底物, 底物浓度为 37.62%。20 L 发酵罐在此条件下 (发酵温度 37°C, 转速 100 r/min) 经过 48 h 发酵, 酒精浓度可达 16.07% ( $V/W$ )。优化条件与初始条件相比较, 酒精浓度提高了 33%。

**关键词:** 燃料乙醇, 木薯, 同步糖化发酵, Plackett-Burman 设计, Box-Behnken 设计

## Enhancing ethanol production using thermophilic yeast by response surface methodology

Naikun Shen, Qingyan Wang, Yan Lu, Yan Qin, and Ribo Huang

National Engineering Research Center for Non-food Biorefinery, Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530007, China

**Abstract:** We optimized the conditions of simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from cassava flour into high-concentration ethanol by thermophilic yeast GXASY-10. Based on the single factor experiment, we screened the important parameters by Plackett-Burman design. We used the path of steepest ascent to approach to the biggest region of ethanol production subsequently. Then, we obtained the optimum values of the parameters by Box-Behnken design. The results showed that the important parameters were the liquefaction time, glucosidase dosages and initial concentration of cassava flour (substrate). The optimum technical conditions were as follows: liquefaction time 35 min, glucosidase dosages 1.21 AGU/g substrate and initial substrate concentration 37.62%. Under such optimum conditions, the ethanol yield of 20 L fermentor reached 16.07% ( $V/W$ ) after 48 h fermentation at 37°C and 100 r/min. The ethanol content increased 33% than that under the original condition.

**Keywords:** fuel ethanol, cassava, simultaneous saccharification and fermentation (SSF), Plackett-Burman design, Box-Behnken design

随着社会和经济的高速发展, 能源短缺成为各国面临的重大课题。实施燃料乙醇计划, 对于发展国民经济、保障能源安全和改善环境等具有十分重要的意义<sup>[1]</sup>。目前在燃料乙醇的发展上我国政府提

**Received:** September 15, 2009; **Accepted:** November 16, 2009

**Supported by:** National Science and Technology Ministry (No. BAD75B05), International Scientific and Technological Cooperation (No. 2008DFA30710), Science and Research Foundation of Guangxi Academy (No. 0701).

**Corresponding author:** Ribo Huang. E-mail: rbhuang@gxas.cn

国家科技支撑计划 (No. BAD75B05), 国际科技合作项目 (No. 2008DFA30710), 桂科院研 (No. 0701) 资助。

出“因地制宜, 非粮为主”的原则。木薯 (Cassava) 是一种极具潜力的非粮能源作物, 木薯干片淀粉含量可达 70% 以上, 被称为“淀粉之王”<sup>[2]</sup>。以木薯为原料生产燃料乙醇, 不仅能够满足原料长期稳定经济的供应, 而且不影响我国的粮食安全, 同时可减少环境污染, 提高农民收入。

在我国南方地区及盛夏的北方, 气温常达到 35℃ 以上, 而一般酿酒酵母最适发酵温度在 30℃ 左右, 这势必增加生产中的冷却成本。因此, 选育合适的耐高温酵母菌种, 采用高温发酵可大大降低酒精生产的成本<sup>[3]</sup>。所谓“高浓度发酵”是指糖化醪中含有 30% 或更高的可溶性固形物进行的发酵。与传统的酒精发酵工艺相比, 高浓度酒精发酵的优点是: 发酵终点产物乙醇浓度高, 不仅节省后续精馏操作的能耗, 而且减少废糟液量, 废糟液处理的能耗也降低; 同时 VHG 发酵从液化、糖化到发酵的物料流量都减少, 因此这些环节的加热与冷却负荷都相应降低, 节省了操作能耗和设备投资。因此, 多年来一直是各国研究者研究的重点领域<sup>[4]</sup>。

目前, 国内外关于高浓度乙醇发酵的报道多集中于葡萄糖培养基及玉米、小麦等粮食原料。Rasmus 等<sup>[5]</sup>以小麦粉为原料采用同步糖化发酵工艺, 32℃ 条件下经过 70 h 发酵, 酒精浓度可达 12.60% (W/W)。Thomas 等<sup>[6]</sup>以小麦粉为原料在不添加其他营养条件下仅通过增大接种量, 20℃ 条件下经过 170 h 发酵, 酒精浓度可达 21% (V/V), 同时还证明死亡的酵母菌细胞可以为发酵提供营养成分。Thomas 等<sup>[7]</sup>发现, 在高浓度发酵条件下, 加入渗透压保护剂, 有助于增加酒精产量, 提高糖利用率。张书祥等<sup>[8]</sup>以瓜干为原料, 通过添加氮源及其复合物能改善酵母生长环境, 缩短发酵周期, 提高酒精产量。黄宇彤等<sup>[9]</sup>研究发现添加 Tween80 和麦角甾醇的高浓度酒精发酵, 最终酒精浓度可以达到 15.32% (V/V)。以上研究重在提高酒精浓度, 很少兼顾到高温高浓度发酵。而对高温发酵的研究主要集中在耐温酵母的筛选和改造方面。

本研究针对高浓度乙醇发酵过程中发酵底物抑制发酵的缺点, 以木薯粉为原料在高温发酵条件下 (37℃) 采用同步糖化发酵 (SSF) 模式进行发酵, 在

省略糖化工段的同时, 可部分地解决底物抑制问题。在前期单因素研究的基础上, 采用 Plackett-Burman 实验方法, 对影响乙醇发酵的条件及培养基主要因子进行了优化和筛选, 通过对实验进行统计学设计和数据分析, 筛选出对目标值影响最大的关键因素; 进一步通过响应面理论 (RSM) 对木薯酒精发酵工艺条件进行优化研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种及原料

耐温菌种: 酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* GXASY-10 为本实验室突变选育后得到的耐高温高产菌株。

木薯粉: 淀粉含量 70% 左右, 广西明阳淀粉化工股份有限公司生产。

#### 1.1.2 所用酶类

耐高温淀粉酶: Liquozyme Supra, 购自诺维信公司, 标准酶活为 90 KNU/g。

糖化酶: Dextrozyme DX, 购自诺维信公司, 标准酶活 500 AGU/mL。

纤维素酶: 宁夏和氏璧有限公司生产。

#### 1.1.3 发酵醪液的制备

木薯与自来水以设定料水比混合, 加入液化酶, 迅速加热到 90℃~95℃, 液化 30~60 min, 冷却调 pH, 降温到 37℃, 加入适量糖化酶, 接种发酵。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 测定方法

还原糖的测定: 3, 5-二硝基水杨酸比色法<sup>[10]</sup>。

乙醇浓度的测定: 气相色谱法<sup>[11]</sup>。

#### 1.2.2 数理统计方法

Plackett-Burman<sup>[12]</sup>设计是一种有效的两水平实验设计方法, 它适用于从众多的考察因素中快速有效地筛选出最为重要的因素。酒精发酵工艺中涉及的参数较多, Plackett-Burman 适合于本实验的设计。

最陡爬坡试验设计: 响应面拟合方程只有在考察的紧接邻域里才充分近似真实结果, 故只有在最先逼近最大目标产物产量区域后才能建立有效的响应面拟合方程。根据 Plackett-Burman 设计的结果,

来确定是否进行最陡爬坡试验。

响应面 (RSM) 实验设计: 采用Box-Behnken<sup>[13]</sup>法, 对Plackett-Burman设计筛选出的关键因子和最陡爬坡设计确定的浓度进一步研究, 以获得最优培养基。响应面法是通过近似构造一个具有明确表达形式的多项式来表达隐式功能函数。在响应曲面的最优点附近, 曲面效应是主导项, 用二阶模型来逼近响应曲面:

$$y = b_0 + \sum b_i x_i + \sum b_{ij} x_i x_j + \sum b_{ii} x_i^2$$

式中:  $y$  为预测响应值, 即酒精浓度;  $b_0$  为回归系数;  $b_i$  表示  $x_i$  的线性效应;  $b_{ii}$  表示  $x_i$  的二次效益;  $b_{ij}$  表示  $x_i$  与  $x_j$  间的线性交互效益。用 Design-espt7.1 软件对试验数据进行回归拟合, 并对拟合方程作显著性检验和方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 重要因素的筛选

根据单因素试验结果和有关高浓度发酵的参考文献, 试验选用实验次数 N-12 的设计, 对 9 个因素进行考察, 并余留 2 个空白项以估计实验误差。每个因素取 2 个水平, 以发酵醪液酒精体积浓度 (% ,  $V/W$ ) 的平均值为响应值  $Y$ , 每组实验设置平行 3 个。Plackett-Burman 实验设计因素及水平见表 1, 实验设计矩阵见表 2, 对表 2 进行统计分析, 结果见表 3。“Prob> $F$ ” 小于 0.05, 表明因素是重要的。

“Model Prob> $F$ ” 等于 0.0093, 表明模型是重要的。通过表 4 的分析, 本实验选择了“Prob> $F$ ” 小于 0.05 的 3 个因素  $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_8$ , 即液化时间、糖化酶用量和底物浓度影响酒精发酵的重要因素。

### 2.2 最陡爬坡实验设计

实验设计及结果如表5所示, 最大酒精浓度区在第3次附近, 故以实验3的条件为响应面实验因素水平的中心点。

### 2.3 应用响应面分析法确定重要因素的最佳水平

#### 2.3.1 试验因素水平设计

运用Box-Behnken的中心组合设计原理, 以最陡爬坡实验得到的中心点对Plackett-Burman实验确定的3个显著性影响因子各取3个水平。本项实验安排响应面试验各个因素水平如表6所示。

#### 2.3.2 实验设计及结果

根据响应面分析试验软件设计了3因素3水平共15个实验点进行响应面分析, 试验安排及结果见表7。15个试验点分为两类: 一类是析因点, 共12个; 一类是零点 (试验点1, 4, 8) 为区域的中心点。零点重复3次, 用于估计试验的误差。

表1 Plackett-Burman设计实验参数和水平

Table 1 Factors levels of Plackett-Burman design

Code	Variables	Level (-1)	Level (+1)
$X_1$	CO(NH) <sub>2</sub> (% , $W/W$ )	0.05	0.10
$X_2$	Liquefaction time (min)	60	40
$X_3$	Glucoamylase (AGU/g substrate)	0.80	1.00
$X_4$	The pH value of fermentation	5.0	5.5
$X_5$	Cellulase (u/g substrate)	11	22
$X_6$	Trehalose (% , $W/W$ )	0.05	0.10
$X_7$	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (% , $W/W$ )	0.05	0.10
$X_8$	Substrate concentration (% , $W/W$ )	30	32
$X_9$	MgSO <sub>4</sub> (% , $W/W$ )	0.05	0.10

表2 Plackett-Burman试验设计表和结果

Table 2 Experimental design of Plackett-Burman and corresponding results

Run	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$X_5$	$X_6$	$X_7$	$X_8$	$X_9$	$Y$ (% , $V/W$ )
1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	11.32
2	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	13.64
3	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	1	14.67
4	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	13.56
5	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	14.09
6	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	9.18
7	-1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	13.95
8	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	14.66
9	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	14.55
10	1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	12.65
11	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	14.08
12	1	1	1	-1	-1	1	1	1	-1	14.62

表3 方差分析

Table 3 Univariate analysis of variance

Source	Degree of freedom (DF)	Sum of squares (SS)	Mean square (MS)	$F$ value	Prob> $F$
Model	9	22.37	7.46	7.79	0.0093
Error	2	7.66	0.96		
Total error	11	30.03			

“Prob> $F$ ” less than 0.05 indicate model terms are significant.

表 4 参数估计和各因素影响

Table 4 Parameter estimation and effects of different factors

Variables	Degree of freedom	Coefficient estimate	Standard error	Prob>F	Order
Intercept	1	13.41	0.28	0.0093	0
$X_1$	1	-0.42	0.28	0.1490	4
$X_2$	1	6.95	0.28	0.0274	2
$X_3$	1	4.73	0.28	0.0471	3
$X_4$	1	-0.41	0.28	0.8831	5
$X_5$	1	0.27	0.28	0.9461	6
$X_6$	1	-0.14	0.28	0.9966	8
$X_7$	1	0.029	0.28	1.000	9
$X_8$	1	10.70	0.28	0.0102	1
$X_9$	1	-0.23	0.28	0.9161	7

表 5 最陡爬坡试验设计及结果

Table 5 Experimental design of steepest ascent and corresponding results

Run	Liquefaction time (min)	Glucoamylase (AGU/g substrate)	Substrate concentration (% <i>W/W</i> )	<i>Y</i> (% <i>V/W</i> )
1	40	1.00	32.00	14.44
2	35	1.10	34.00	15.60
3	30	1.20	36.00	15.89
4	25	1.30	38.00	15.81
5	20	1.40	40.00	14.87
6	15	1.50	42.00	12.78

表 6 响应面分析实验参数水平

Table 6 Factors and levers of response surface central composite design

Variables		Level		
Code	Factors	Low (-1)	Center (0)	High (+1)
$X_1$	Liquefaction time (min)	25.00	30.00	35.00
$X_2$	Glucoamylase (AGU/g substrate)	1.10	1.20	1.30
$X_3$	Substrate concentration (% <i>W/W</i> )	34.00	36.00	38.00

根据表7的试验结果,以酒精产率 *Y* 值为响应值,对数据进行回归分析,试验因子对响应值的影响可得到如下方程:

$$Y=15.97+0.37X_1+0.082X_2+0.37X_3-0.59X_1^2-0.94X_2^2-0.44X_3^2+0.054X_1X_2+0.35X_1X_3+0.089X_2X_3。$$

决定系数  $R^2=0.9687$ ,说明方程的拟合度很好,可以用该回归方程代替真实试验点结果进行分析。回归方程的方差分析还表明,一次项和二次项对响应值的影响是十分显著的,交互项的影响不明显,试验因子与响应值之间不是线性关系。

对响应面实验进行方差分析,结果见表 8。

表 8 的方差分析结果表明,“Model Prob>*F*”等于 0.003 远小于 0.05,说明模型是重要的。一般认为,相关系数  $R^2$  大于 0.9,表明预测值能与试验值具有高度相关度<sup>[14]</sup>。在这个试验中, $R^2=0.9687$ ,表明仅有不到 4%的酒精产量变异不能由该模型解释。

图形能够提供一种形象的观测响应值和试验参数水平关系的方法。通过上面多元回归方程做响应曲面及其等高线图,结果见图 1~3。

由响应面的规范分析可知,回归模型存在最大

稳定点。 $Y$ 的最大估计值为 16.05,最佳点为  $X_1=1.00$ 、 $X_2=0.12$ 、 $X_3=0.81$ , 即液化时间为 35 min, 糖化酶添加量为 1.21 AGU/g 底物, 底物浓度为 37.62%, 此点醪液的酒精浓度为 16.05%。对最佳点进行 5 次 20 L 发酵罐验证试验, 发酵过程中残糖和酒精浓度的变化的平均值见图 4。发酵结果平均值为 16.07%, 表明预测值与验证试验很接近, 说明回归方程能够比较真实地反映各筛选因素对酒精发酵的影响。

表 7 Box-Bohnkon 试验设计表和结果

Table 7 Experimental design of Box-Bohnkon and corresponding results

Run	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$Y$ (% , $V/W$ )
1	0	0	0	15.95
2	-1	0	-1	14.50
3	1	-1	0	14.81
4	0	0	0	15.97
5	-1	-1	0	14.32
6	0	1	-1	14.40
7	0	-1	1	14.62
8	0	0	0	15.98
9	-1	1	0	13.98
10	1	0	-1	14.60
11	0	-1	-1	14.10
12	0	1	1	15.27
13	1	0	1	16.08
14	-1	0	1	14.59
15	1	1	0	14.77

表 8 Box-Bohnkon 试验方差分析结果

Table 8 Analysis of variance of Box-Bohnkon experiment

Term	$DF$	$SS$	$MS$	$F$	$Pr>F$
Model	9	7.23	0.800	17.18	0.0030
$X_1$	1	1.030	1.030	22.01	0.0054
$X_2$	1	0.039	0.039	0.83	0.4029
$X_3$	1	1.090	1.090	23.40	0.0047
$X_1*X_1$	1	1.230	1.230	26.28	0.0037
$X_1*X_2$	1	0.025	0.025	0.53	0.4978
$X_1*X_3$	1	0.490	0.490	10.38	0.0234
$X_2*X_2$	1	3.140	3.140	67.40	0.0004
$X_2*X_3$	1	0.032	0.032	0.68	0.4475
$X_3*X_3$	1	0.740	0.740	15.85	0.0105
Lack of fit	3	0.200	0.078	285.75	0.0035

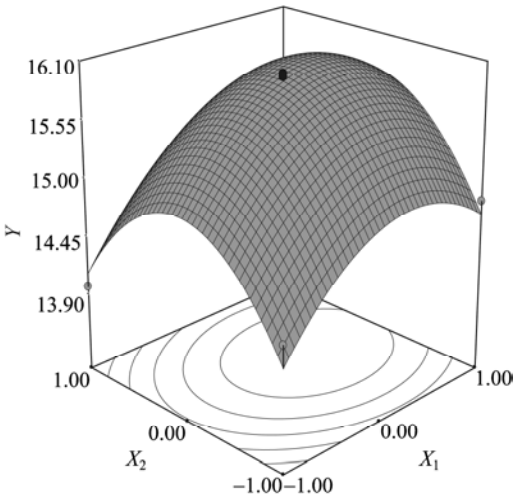


图 1 液化时间和糖化酶用量对酒精产量影响的响应面图  
Fig. 1 Surface layer of the mutual-affection of liquefaction time and glucoamylase dosage on ethanol yield.

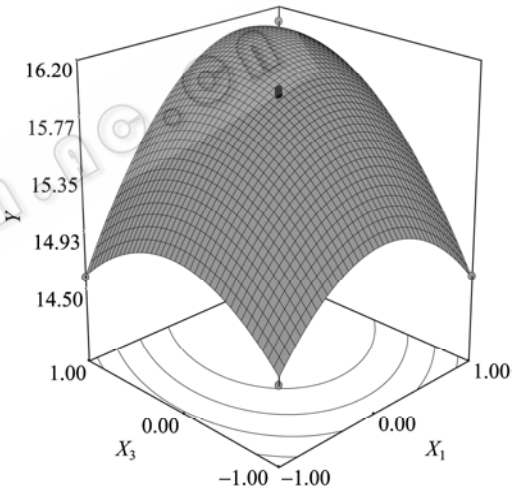


图 2 液化时间和底物浓度对酒精产量影响的响应面图  
Fig. 2 Surface layer of the mutual-affection of liquefaction time and substrate concentration on ethanol yield.

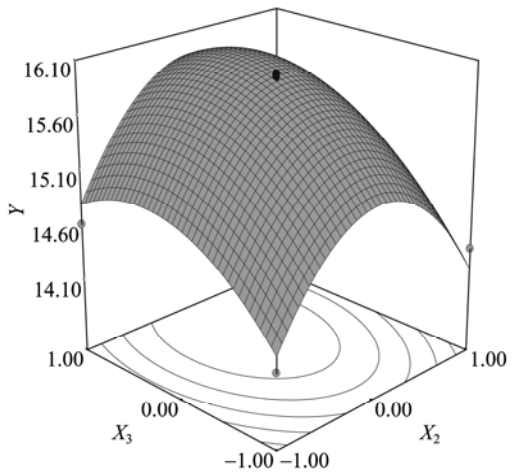


图 3 糖化酶用量和底物浓度对酒精产量影响的响应面图  
Fig. 3 Surface layer of the mutual-affection of glucoamylase dosage and substrate concentration on ethanol yield.

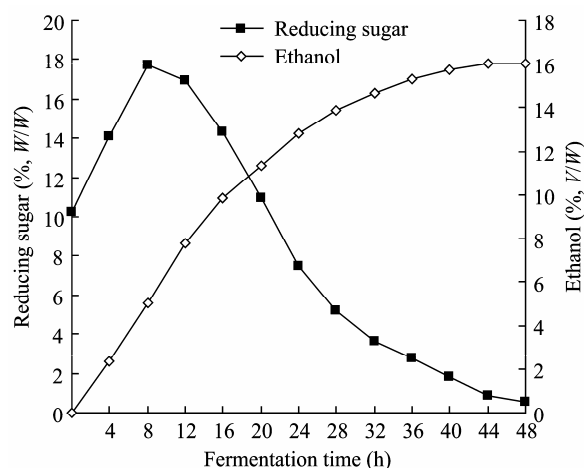


图4 20 L 发酵罐验证试验发酵结果

Fig. 4 Demonstration test results of 20 L fermentor.

### 3 结论

应用Plackett-Burman设计对尿素、硫酸镁、海藻糖、糖化酶、纤维素酶、磷酸二氢钾添加量以及液化时间、底物浓度和pH值9个因素进行了两水平12次试验,并从中筛选出液化时间、糖化酶添加量和底物初始浓度为主要影响因素;通过最陡爬坡实验确定中心点,进一步用响应面分析法对主要因素进行3因素3水平的15次试验,确定主要因素的最佳量。得到最优点醪液酒精浓度为16.05%。利用得到的最优条件进行5次20 L发酵罐验证试验,酒精的平均浓度为16.07% (V/W),较初始条件(指未进行优化前Plackett-Burman实验采用的较低水平的条件,此时酒精浓度为12%)提高33%以上。表明采用响应面法优化发酵工艺是提高酒精发酵浓度的有效途径之一。该菌株在高温(37℃)发酵条件下仍有很高的产酒精能力,是一株很有应用开发潜力的耐高温酒精发酵菌种。

### REFERENCES

- [1] Liu Z, Wang JP, Zhang LF, *et al.* Study on production of fuel ethanol by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from cassava. *Chin J Proc Eng*, 2005, **5**(3): 254–256.  
刘振, 王金鹏, 张立峰, 等. 木薯干原料同步糖化发酵生产乙醇. *过程工程学报*, 2005, **5**(3): 254–256.
- [2] Dai D, Hu ZY, Pu GQ, *et al.* Energy efficiency and potentials of cassava fuel ethanol in Guangxi region of China. *Energy Conv Manag*, 2006, **47**: 1686–1699.
- [3] Song Y, Mao LH, Gao SQ, *et al.* Screening of thermotolerant alcohol-producing yeast and comparison of fermentation activity. *Chin Brew*, 2009, **9**: 38–42.  
宋瑶, 缪礼鸿, 高素芹, 等. 耐高温酒精酵母菌株的筛选及发酵能力比较. *中国酿造*, 2009, **9**: 38–42.
- [4] Xue YM, Jiang N. Study on ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* X330 under very high gravity medium. *Chin J Biotech*, 2006, **22**(3): 508–513.  
薛颖敏, 江宁. 酿酒酵母X330高浓度发酵时耐酒精性能的初步研究. *生物工程学报*, 2006, **22**(3): 508–513.
- [5] Rasmus D, Sven P, Lisbeth O. Characterization of very high gravity ethanol fermentation of corn mash. Effect of glucoamylase dosage, pre-saccharification and yeast strain. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, **68**: 622–629.
- [6] Thomas KC, Ingledew WM. Production of 21% (V/V) ethanol by fermentation of very gravity (VHG) wheat mashes. *J Ind Microbiol Biot*, 1992, **10**: 61–68.
- [7] Thomas KC, Hynes SH, Ingledew WM. Effect of particulate materials and osmoprotectants on very high gravity ethanolic fermentation. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**(5): 1519–1524.
- [8] Zhang SX, Xiao YZ, Ren J. The influence on alcohol fermentation by adding the inorganic salts. *Chin J Biol*, 1997, **14**(1): 23–25.  
张书祥, 肖亚中, 任杰. 添加营养盐对酒精发酵的影响. *生物学杂志*, 1997, **14**(1): 23–25.
- [9] Huang YT, Wu SL, Du LX. The optimization for alcohol very gravity fermentation from corn meshing. *Sci Technol Food Ind*, 2002, **23**(8): 66–69.  
黄宇彤, 伍松陵, 杜连祥. 玉米酒精超高浓度发酵工艺条件的优化. *食品工业科技*, 2002, **23**(8): 66–69.
- [10] Zhang WJ. The Biochemical Technology of Polysaccharides Compound. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1987: 13.  
张惟杰. 复合多糖生化研究技术. 上海: 上海科学技术出版社, 1987: 13.
- [11] Tao F, Miao JY, Shi GY, *et al.* Ethanol fermentation by an acid-tolerant *Zymomonas mobilis* under non-sterilized condition. *Process Biochem*, 2005, **40**: 183–187.
- [12] Hacker RL, Burman JP. The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, 1946, **33**: 305–325.
- [13] Box GEP, Behnken DW. Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*, 1960, **2**: 455–475.
- [14] Wood JM, Bremer E, Laszlo N. Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria comparative. *Biochem Physiol*, 2001, **130**: 437–460.