

碱预处理后的玉米秸秆发酵生产燃料乙醇

余传波，邓建梅

(攀枝花学院生物与化学工程学院，四川攀枝花617000)

摘要：采用玉米秸秆为原料，先氢氧化钠进行预处理后，再加入纤维素酶与酵母进行乙醇发酵。首先通过单因素试验，确定了酵母菌接种量、发酵时间、发酵温度、发酵pH四因素对乙醇的最佳影响程度。再采用四因素三水平的正交实验确定发酵的最佳组合条件。结果表明，乙醇发酵最佳工艺条件为酵母接种量6环、发酵时间36h、温度38℃、pH=4.8，此时乙醇浓度值为12.5432mg/mL。

煤、石油等化石燃料是人类重要的不可再生资源，随着人类的不断挖掘，这些不可再生能源将越来越少，有研究表明，40年后的原油产量将只有现在的五分之一[1]。那时，人类将面临能源的挑战，因此，寻找新型的可再生能源是人类的一大主题。乙醇是一种新型的干净能源，可以作为汽油的最好替代燃料之一[2]。乙醇的生产和开发也不断受到社会关注，大力生产燃料乙醇燃料也成为人类未来的发展方向。

中国是一个农业大国，如若把小麦、玉米等农作物进行燃料乙醇的生产，成本相对较高，约占总成本的80%[3]。所以，如果直接把粮食进行生产乙醇，必将导致人粮相争的情况。然而，一般的农作物中含有大量的木质纤维素，而木质纤维素可以用于生产可再生资源[4]，比如木质纤维素通过降解后转化为葡萄糖，再通过微生物菌种发酵葡萄糖生成燃料乙醇[5]，这样使玉米秸秆、小麦秸秆等农作物变废为宝，在开发新能源方面起着巨大的作用[6]。

在中国，大部分的玉米秸秆都是被焚烧、当作垃圾填埋或直接埋藏入土等方式进行处理，但这样直接排入环境，这不仅浪费了资源，而且还造成了严重的大气污染。如能充分利用玉米秸秆中的木质纤维素进行生产燃料乙醇，那样可以生产新型能源，代替现在的一次能源。本实验正是将废弃的玉米秸秆收集，用于生产燃料乙醇，为开发清洁、无污染、可再生替代能源提供一定的基础。

1 实验部分

1.1 试验材料

玉米秸秆，采自四川省攀枝花市新九乡。

旋转浓缩蒸发仪 (PE-52AA) 由上海青浦沪西仪器厂制造，循环水式真空泵 (SHB-) 由天津华鑫仪器厂制造，722可见分光光度计来源于上海菁华科技仪器厂，超声波清洗器 (KH2200DB) 昆山禾创超声波仪器厂，气浴振荡恒温培养箱 (HZQ-Q) 天津华鑫仪器厂。其他试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 材料预处理

将采摘的玉米秸秆洗净后晾干水分后剪成小段于40度烘箱中，干燥至恒重并粉碎40目筛网，用1.5%氢氧化钠预处理后，备用。

1.2.2 最适波长的确定

在10mL比色管中加3mL乙醇标液，再加入2mL的5%酸性重铬酸钾溶液，然后用蒸馏水定容至刻度线，于沸水浴中加热10min，冷却5min，倒入适量于比色皿中，在分光光度计上测量吸光值，分别测540nm、560nm、580nm、600nm、620nm、640nm、660nm、680nm波长时的吸光值，并作图，以确定最佳测定波长。

1.2.3 乙醇标的制

采用重铬酸钾定乙醇含量[7]。分别在10mL比色管中用移液枪依次加入乙醇标液0，1.00，2.00，3.00，4.00，6.00，7.00，8.00mL，测定方法同1.2.2，并做出标准曲线。

1.2.4 发酵液乙醇含量测定

取样品0.5mL于10mL比色管中，方法同1.2.2。测定发酵液的吸光值，每组测定3次。

设乙醇标线函数为 $V=F(A)$ ，则乙醇浓度的计算公式为： $C=V \times b \times q$

其中C为乙醇浓度（mg/mL），V为每10mL溶液中乙醇标液体积（mL/10mL），q为乙醇标液浓度（mg/mL），A为吸光值，b为稀释倍数。

1.2.5 单因素试验

（1）最佳发酵温度的确定：纤维素糖化液灭菌后，接种纯化培养后的酵母，控制酵母接种量、发酵pH、发酵时间不变，设定发酵温度26、29、32℃、35℃、38℃，发酵液离心后，用重铬酸钾分光光度法测定乙醇浓度。

（2）最佳发酵时间的确定：将采用控制变量法，控制其他可能影响的因素，设定乙醇发酵时间12h、24h、36h、48h、60h，用分光光度计测定发酵液的乙醇吸光值，根据乙醇标线算出其浓度。

（3）最佳发酵pH的确定，控制其它变量因素，分别设定pH值为3.6、4.2、4.8、5.4、6.0，测定其中的发酵液中乙醇浓度。

（4）同样采用控制变量法，在净化的无菌工作台上进行接种操作。设定接种量为3环、4环、5环、6环、7环，发酵后的乙醇浓度仍用重铬酸钾分光光度法测定。

1.2.6 正交试验

为确定最佳发酵条件，设置四因素三水平正交实验，正交试验设计表1所示。

表 1 正交试验

水平	因素			
	(A) pH	(B) 时间/(h)	(C) 温度/(℃)	(D) 接种量/(环)
1	4.8	12	32	4
2	5.4	24	35	5
3	6.0	36	38	6

2 结果与讨论

2.1 最佳波长的确定

最佳吸收波长如图1所示。由图1可知，乙醇浓度一定时，吸光值随吸收波长增加而增大，在波长600nm时，吸光值为最大值，为此选取600nm最佳吸收波长。

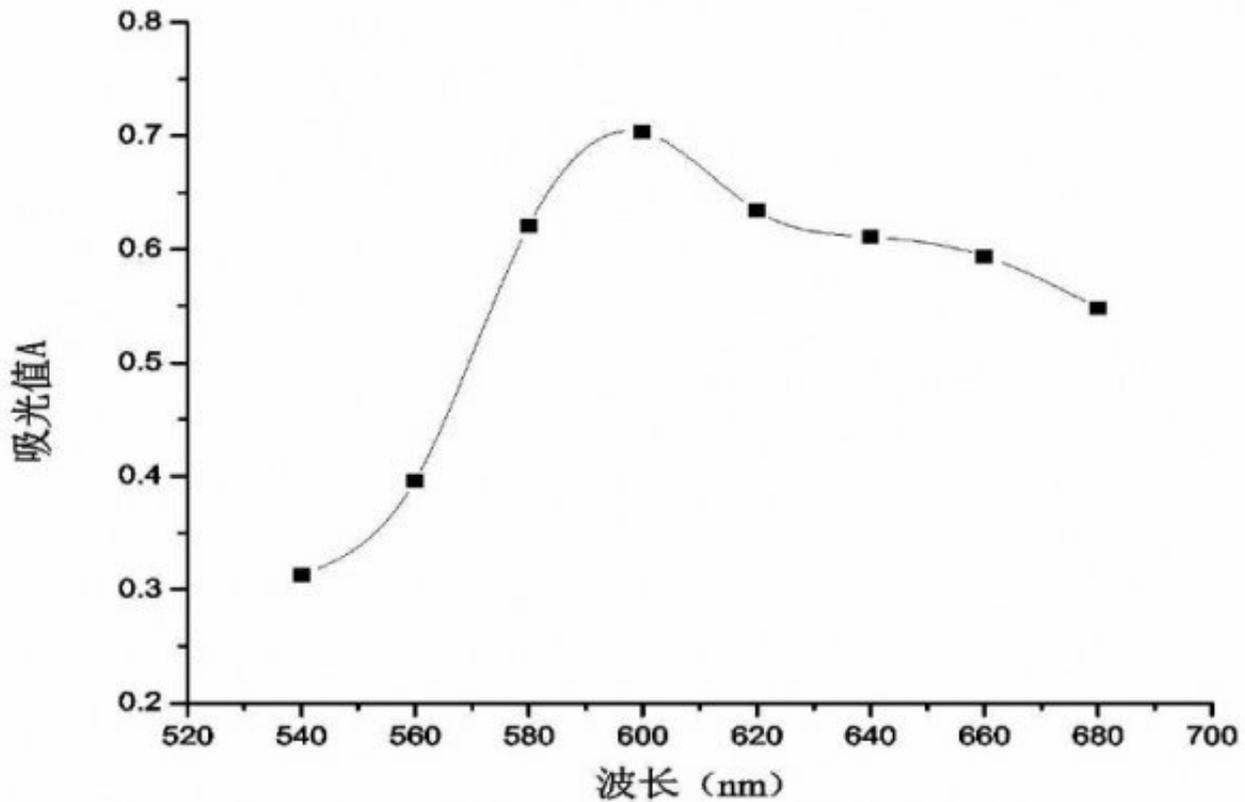


图1 乙醇吸光值与波长的关系

2.2乙醇的标准曲线

乙醇的标准曲线绘制见图2。用重铬酸钾分光光度法测出对应不同体积标液的吸光值，拟合函数曲线方程 $y=0.0833x-0.0237$ ，线性相关度 $R^2=0.995$ 。

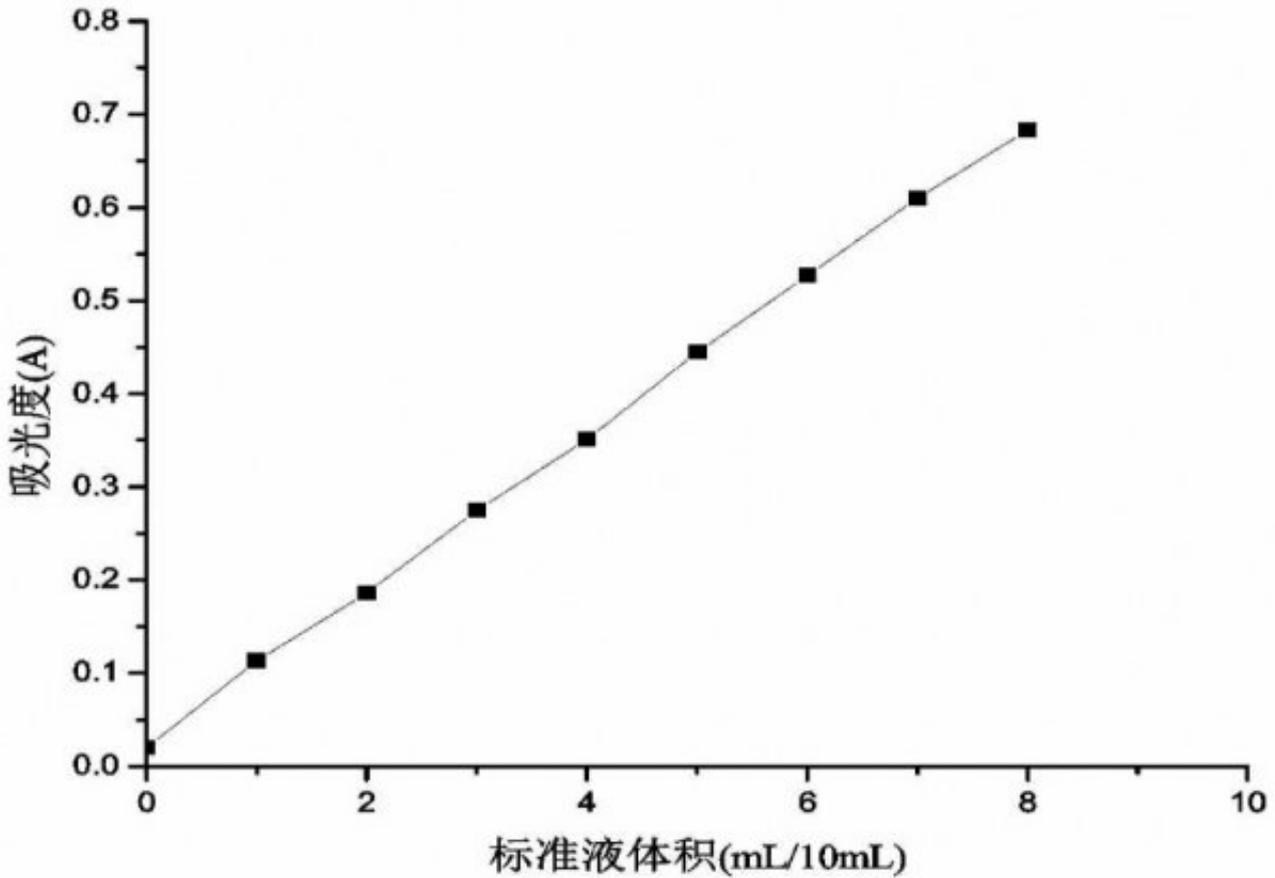


图2 乙醇的标准曲线

2.3 酵母发酵纤维素单因素实验

(1) pH对乙醇浓度的影响

由图3可以看出，随着pH的上升，发酵后的乙醇浓度先上升后下降，在pH为5.4时达到最高，此时乙醇浓度为18.11 m/mL。出现这种结果的原因可能是pH为5.4时更接近酵母菌生长的条件，自然界中酵母多在酸性环境下生长，比如成熟的葡萄表面，酸败的谷物中，这些地方都能发现大量的酵母菌。

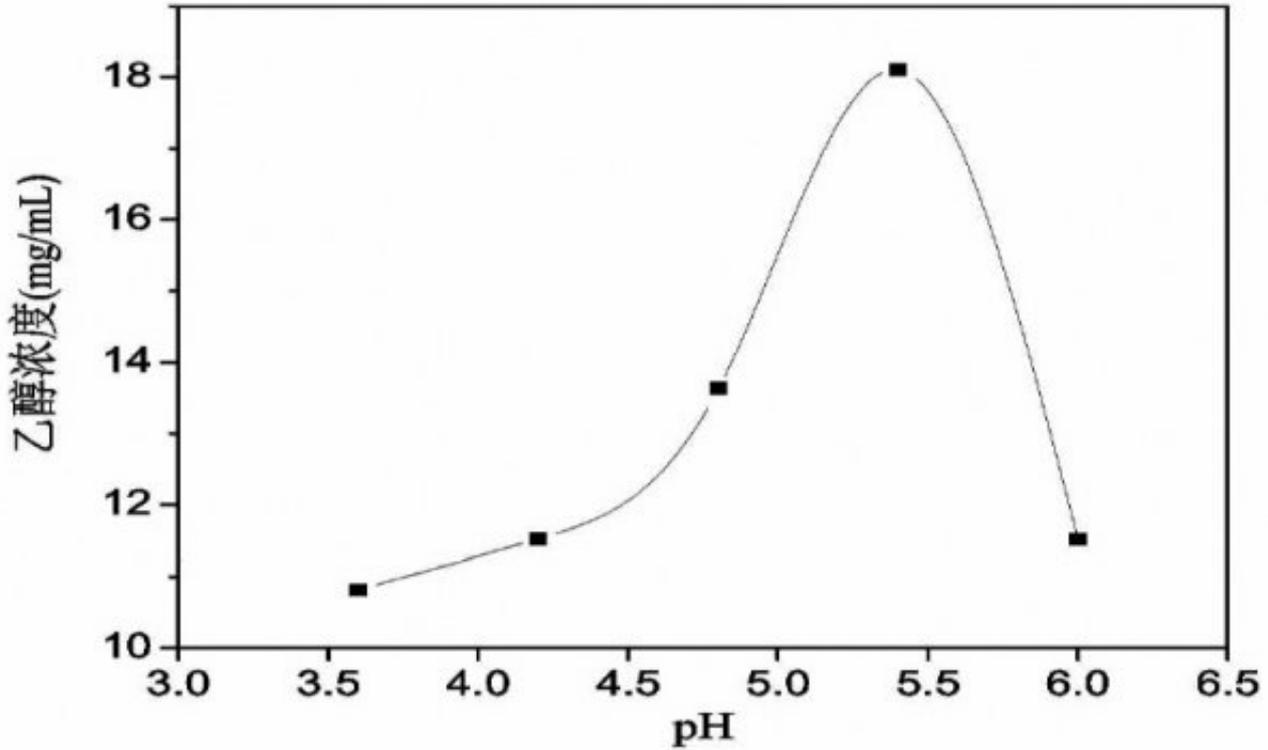


图3 pH对乙醇浓度的影响

(2) 发酵时间对乙醇浓度的影响

由图4可以看出，随着发酵时间的增加，乙醇浓度先升高后降低，最后基本持平。发酵24h后，乙醇浓度达到最高，最高值乙醇浓度为11.39mg/mL。这种结果可能的原因是接种酵母后，菌体有一个适应期，这个时间段主要是适应新的环境，还有就是菌体的繁殖，发酵乙醇的活动还未大量进行。在24h发酵达到高峰，大量的糖被转化为乙醇，随后，糖浓度减小到一定值后，酵母开始利用乙醇作为能源物质，不断消耗乙醇，导致乙醇浓度下降。发酵开始40h后，乙醇的浓度基本不变，可能是糖和乙醇等能源物质都被消耗殆尽。这也符合微生物菌群的生长曲线，说明结果是可靠的。

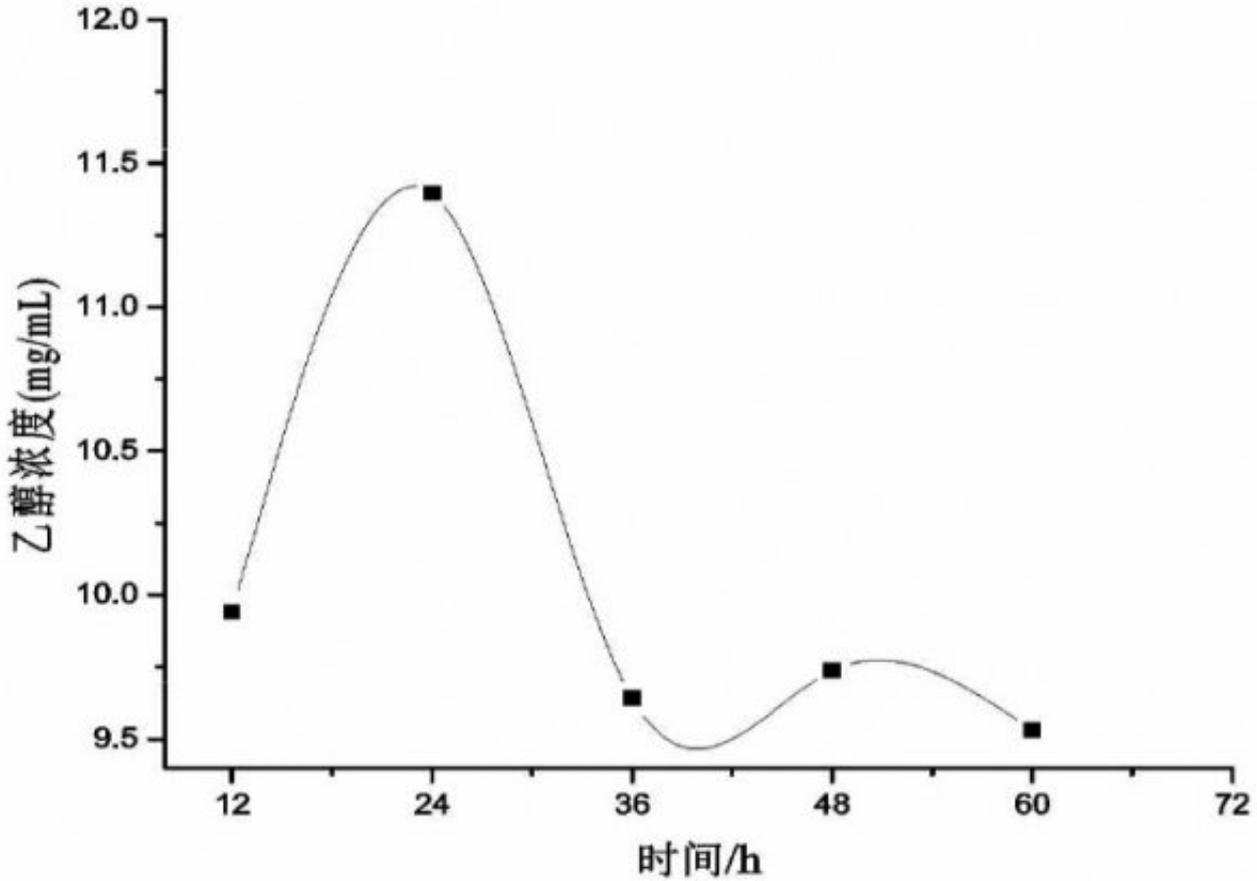


图 4 发酵时间对乙醇浓度的影响

(3) 发酵温度对乙醇浓度的影响。

由图5可以看出，随着发酵时间的增加，在发酵温度为35 时最高，为11.40mg/mL。由生物学知识知道，温度过低会影响酶的活性，使细胞的生理活动减弱，温度过高也会影响细胞的生理活动，甚至造成细胞死亡。每种微生物的最适宜生长温度不尽相同，试验结果表明，温度达到39 后酵母菌的生理活性开始受到抑制。

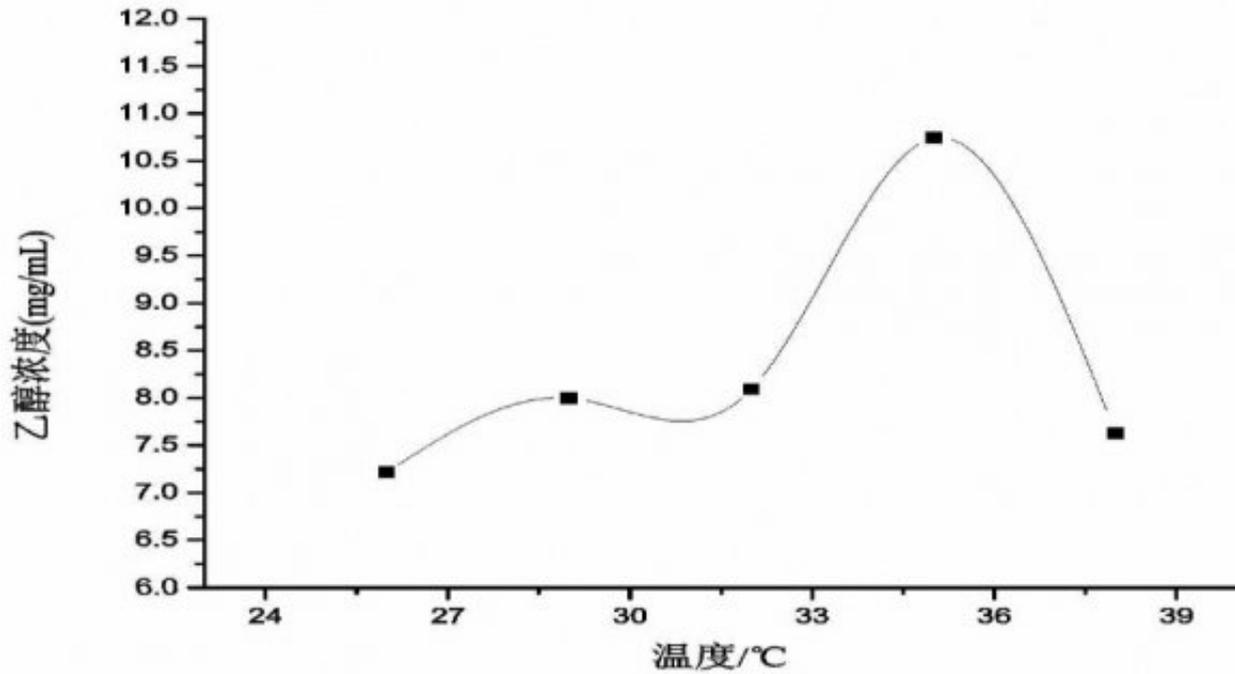


图5 发酵温度对乙醇浓度的影响

(4) 酵母接种量对乙醇浓度的影响。

由图6可以看出随着酵母接种量的增加，在接种量为5环时最高，此时，乙醇浓度达到13.10mg/mL。在固定的发酵时间内，酵母接种过多会大量消耗糖用于菌体其他生理活动，转化为乙醇的量就会减少，接种量过低，发酵速率就低，糖不能完全转化为乙醇，产率就低。

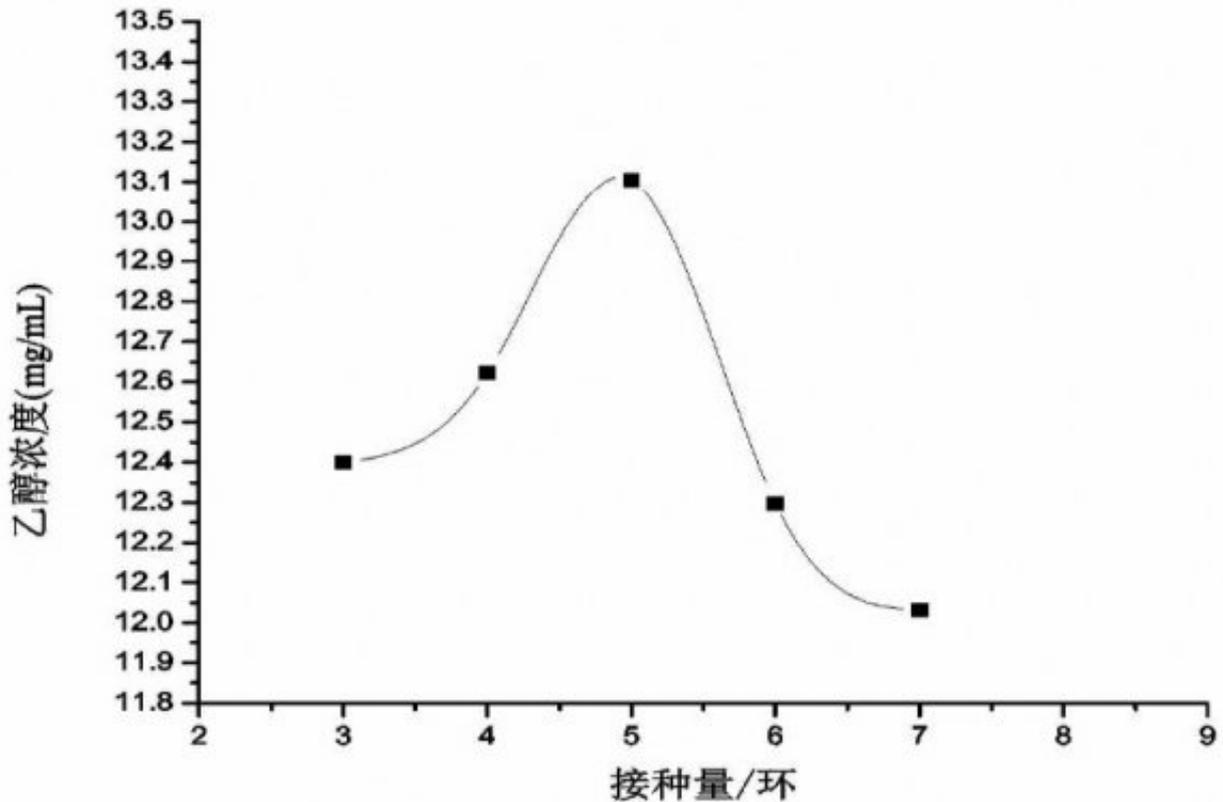


图6 酵母接种量对乙醇浓度的影响

2.4正交试验结果及分析

发酵过程中pH对乙醇产率的影响，由计算出3个水平的离散程度，即极差来衡量， $RA=11.423-10.891=0.532$ 。

发酵过程中时间对乙醇产率的极差 $RA=11.47104-11.031=0.476$

发酵过程中温度对乙醇产率的极差 $RB=11.319-10.987=0.332$

发酵过程中接种量对乙醇产率的极差 $RC=11.395-10.907=0.488$ ， $RA>RD>RB>RC$ ，表示发酵过程中四个因素影响程度的大小顺序为：发酵pH>酵母接种量>发酵时间>发酵温度。从四个因素的影响程度来看，特别要控制好发酵pH，才能有效地提高乙醇产率。并由表2得出发酵的最佳组合为A13C3D3，在对此最优组合进行验证实验，得到乙醇浓度为12.5432mg/mL。具体实验结果如表2所示。

表2 正交实验结果

	pH	发酵时间 /(h)	温度 /(℃)	接种量 /(环)	乙醇浓度 /(mg/ml)
1	4.8	12	32	4	11.3830
2	4.8	24	35	5	10.7947
3	4.8	36	38	6	12.0912
4	5.4	12	35	6	10.8067
5	5.4	24	38	4	10.9028
6	5.4	36	32	5	10.9628
7	6.0	12	38	5	10.9028
8	6.0	24	32	6	11.2869
9	6.0	36	35	4	11.3589
\bar{K}_1	11.423	11.051	11.211	11.215	
\bar{K}_2	10.891	10.995	10.987	10.907	
\bar{K}_3	11.203	11.471	11.319	11.395	
极差	0.532	0.476	0.332	0.488	

3结论

(1) 玉米秸秆糖化液乙醇发酵单因素实验结果为：发酵pH=5.4，发酵时间24h为最优，发酵最优酵母接种量为5环，发酵最适温度35。

(2) 纤维素糖化液乙醇发酵时，四个因素对乙醇浓度的影响程度为：发酵PH>酵母接种量>发酵时间>发酵温度。最佳组合条件为：纤维素酶糖化法发酵乙醇发酵时间为36h，发酵pH为4.8，发酵温度为38，接种量为6环。所得乙醇浓度为12.5432mg/mL。这与邵丽杰[8]等研究酸水解预处理后发酵乙醇含量21.5g/L还有一定的距离，这可能是在前期预处理过程中，未加入超低浓度的硫酸水解，未能获得更多还原性的糖，导致乙醇产量偏低。

本实验只是对碱预处理后的玉米秸秆发酵生产燃料乙醇的条件进行了探索，但对于在木质纤维素转化为葡萄糖过程中是否有其他菌种或者催化剂可以加快反应速度，在后续的实验中可以进行这方面的探索。从而使玉米秸秆变废为宝，对实现燃料乙醇的综合利用具有重要的现实意义。

参考文献

- [1] P, A, M. Classen, J. B. van Lier. Utilization of biomass for the supply of energy carriers [J]. Appl Microbiol, 1999, 52: 741 – 755.
- [2] 李东,袁振宏,王忠铭,等. 生物质合成气发酵生产乙醇技术的研究进展[J]. 可再生能源,2006,24(2):57 – 61.
- [3] 付畅,吴方卫. 我国燃料乙醇的生产潜力与发展对策研究[J]. 自然资源学报,2014,29(08):1430 – 1440.
- [4] 刘海军,李琳,白殿国,等. 我国燃料乙醇生产技术现状与发展前景分析[J]. 化工科技,2012,20(05):68 – 72.
- [5] 吴长青,何国庆,董爱茶. 纤维素酶的液态深层发酵研究进展[J]. 食品与发酵工业,2001,27(8):60 – 64.
- [6] 张杰,张晓东,孟祥梅,等. 纤维素酶的研究进展[J]. 可再生能源,2007,25(5):57 – 60.
- [7] 何川,章登郑,张俊. 等. 重铬酸钾 – DNS 比色法测定发酵液中乙醇含量[J]. 生命科学研究,2013,17(01):1 – 10.
- [8] 邵丽杰,董晓莹,王晓明,等. 玉米秸秆产乙醇两种工艺路径的对比研究[J]. 可再生能源,2017,35(2):179 – 183.

原文地址：<http://www.china-nengyuan.com/tech/197865.html>