

Plackett-Burman 实验设计优化餐厨垃圾发酵产燃料酒精的研究

马鸿志¹, 宫利娟², 汪群慧^{1,2*}, 张文毓², 徐文龙³

(1. 哈尔滨工业大学市政环境工程学院, 哈尔滨 150090; 2. 北京科技大学土木与环境工程学院, 北京 100083; 3. 中国城市建设研究院, 北京 100029)

摘要: 针对餐厨垃圾中营养成分含量丰富的特点, 利用运动发酵单胞菌对餐厨垃圾发酵生产燃料酒精, 采用 Plackett-Burman 实验设计分析多种酶制剂和营养物质对发酵过程的影响。结果表明, 糖化酶和蛋白酶对于酒精发酵影响显著, 其他酶和营养物的添加对发酵均无显著影响, 说明餐厨垃圾自身所含的丰富营养即可以满足细菌生长的需要。进一步的单因素试验分析表明糖化酶的最佳添加量为 100 U/g。当同时添加 100 U/g 蛋白酶和 100 U/g 糖化酶时, 酒精产量达到最大值 53 g/L, 比单纯添加糖化酶时产量高 10%, 其酒精转化率为 44%。经酒精发酵后, 餐厨垃圾粗蛋白增加了 1.5 倍且纤维素含量较低, 可作为饲料使用。利用餐厨垃圾产酒精不仅处理了污染严重的废物, 同时也为酒精生产提供了廉价的原料, 具有较高的环境效益和经济效益。

关键词: 餐厨垃圾; 同步糖化发酵; 运动发酵单胞菌; Plackett-Burman 实验设计

中图分类号: X705 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)05-1452-05

Optimization of Fuel Ethanol Production from Kitchen Waste by Plackett-Burman Design

MA Hong-zhi¹, GONG Li-juan², WANG Qun-hui^{1,2}, ZHANG Wen-yu², XU Wen-long³

(1. School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China; 2. School of Civil and Environmental Engineering, University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083, China; 3. China Academy of Urban Construction, Beijing 100029, China)

Abstract: Kitchen garbage was chosen to produce ethanol through simultaneous saccharification and fermentation (SSF) by *Zymomonas mobilis*. Plackett-Burman design was employed to screen affecting parameters during SSF process. The parameters were divided into two parts, enzymes and nutritions. None of the nutritions added showed significant effect during the experiment, which demonstrated that the kitchen garbage could meet the requirement of the microorganism without extra supplementation. Protease and glucoamylase were determined to be affecting factors for ethanol production. Single factor experiment showed that the optimum usage of these two enzymes were both 100 U/g and the corresponding maximum ethanol was determined to be 53 g/L. The ethanol yield could be as high as 44%. The utilization of kitchen garbage to produce ethanol could reduce threaten of waste as well as improve the protein content of the spent. This method could save the ethanol production cost and benefit for the recycle of kitchen garbage.

Key words: kitchen garbage; simultaneous saccharification and fermentation; *Zymomonas mobilis*; Plackett-Burman design

餐厨垃圾俗称泔脚, 是餐馆、饭店、公用食堂等场所人们吃剩下来的饭菜, 具有 3 个特点: 排放量极大, 目前北京市日产约 1 600 t, 上海市日产约 1 300 t^[1]; 极易腐烂变质, 散发恶臭, 传播细菌和病毒^[2]; 营养含量丰富, 可利用潜力高, 目前已有研究表明餐厨垃圾具有生产乳酸、甲烷、氢气等用途。因此如何科学、合理地餐厨垃圾进行处置和资源化利用已经成为亟待解决的问题^[3], 值得人们关注^[4~7]。

随着国际原油价格的不断攀升, 生物质能源的研究越来越受到人们的重视。在众多的生物质能源中, 燃料酒精由于其生产工艺简单, 可生产乙醇汽油, 向环境净排放的温室气体为零等优点, 得到了美国、巴西等国家的青睐^[8~10], 我国也在“十一五”规划

中提出了大力发展燃料酒精的目标。当前我国的酒精生产主要以玉米、稻谷、小麦等粮食作物为原料, 从资源有效利用和降低生产成本方面考虑, 利用含丰富淀粉及纤维素类的废弃物作为原料无疑更具有优势。当前已有利用农业废弃物如玉米渣、土豆渣、麦糠、麸皮、农作物的秸秆以及废弃的甜菜叶茎等进行酒精生产的研究^[11,12], 而利用餐厨垃圾生产燃料酒精尚鲜见报道。此外, 传统酒精发酵的微生物以酵母为主, 而运动发酵单胞菌由于其较高的酒精产率,

收稿日期: 2007-06-05; 修订日期: 2007-09-16

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAJ04A06)

作者简介: 马鸿志(1980~), 男, 博士研究生, 主要研究方向为环境生物技术及固体废物资源化, E-mail: walter_ma2003@yahoo.com.cn

* 通讯联系人, E-mail: Wangqh59@sina.com

耐酸耐酒精,易于进行基因操作等优点,被越来越多地运用到酒精发酵生产中^[13~15]。

本研究利用运动发酵单胞菌对餐厨垃圾进行发酵生产酒精。采用 Plackett-Burman(P-B)法对影响发酵培养基的因素进行筛选,然后对筛选出的因素进行优化,确定最适宜的发酵培养基,以期为下一步的试验研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 原料

餐厨垃圾取自北京科技大学学生二食堂,经过初步分拣、粉碎后待用。其营养成分如表 1 所示。从中可以看出餐厨垃圾中糖类物质含量最大,适合进行酒精发酵。同时,餐厨垃圾中还含有脂肪、纤维素、蛋白质等物质,本实验拟利用添加不同酶制剂以期达到充分利用各种营养物质从而促进酒精发酵的目的。

表 1 餐厨垃圾的组成/%

参数	含量范围	平均值
TS	11.97 ~ 18.10	17.22
DS	1.31 ~ 4.96	2.58
SS	7.01 ~ 15.80	14.64
总糖	56.78 ~ 67.10	62.68
淀粉	41.38 ~ 55.09	46.12
粗蛋白	13.21 ~ 17.13	15.56
粗脂肪	15.12 ~ 19.89	18.06
粗纤维	1.91 ~ 2.87	2.26
pH 值	5.98 ~ 6.12	6.08

1.2 菌种及酶制剂

运动发酵单胞菌: *Zymomonas mobilis* 10225, 中国工业微生物菌种保藏中心提供。酶制剂包括糖化酶(100 000 U/g), 淀粉酶(4 000 U/g), 植酸酶(5 000 U/g), 脂肪酶(2 000 U/g), 纤维素酶(40 000 U/g), 果胶酶(4 000 U/g), 由北京东华强盛生物技术有限公司提供。

1.3 培养基

(1)运动发酵单胞菌种子培养基(葡萄糖培养基) 葡萄糖 10%, 酵母膏 0.5%, 磷酸二氢钾 0.1%, 硫酸镁 0.05%, 硫酸铵 0.1%, pH 7, 水 1 000 mL, 121℃灭菌 15 min。

(2)餐厨垃圾基础培养基 100 g 餐厨垃圾, 加入适当体积的水调节含水率后, 装入 250 mL 三角瓶中, 121℃灭菌 15 min 待用。

1.4 酒精发酵

在基础培养基中,按照 100 U/g加入糖化酶(确定糖化酶单因素的实验除外),以 10%的接种量接入运动发酵单胞菌,厌氧 30℃发酵 48 h。

1.5 分析方法

取一定体积的发酵醪,4 000 r/min离心 20 min,取上清液,进行还原糖和酒精的测定。还原糖测定采用 DNS 法^[16],酒精的测定使用生物传感分析仪 SBA-40C(山东省科学院生物研究所),粗蛋白的测定采用凯氏定氮法^[17]。

酒精转化率 E 定义为:

$$E = \frac{c \times V}{M} \times 100\%$$

式中, c : 发酵液酒精浓度($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), V : 发酵液体积(L), M : 干垃圾质量(g)。

1.6 P-B 实验设计

Plackett-Burman 设计法在一次实验中可以试验多个独立可调变量,通过统计分析筛选出对实验结果有显著影响的因素,因此被广泛应用于微生物培养基的筛选^[18]。本实验加入酶制剂以考察各种酶制剂对酒精发酵的影响,加入运动发酵单胞菌需要的无机盐考察外加营养元素对酒精发酵的影响。表 2 为 $N = 16$ 的 P-B 实验设计选择的因素,其中每个因素为 2 个水平,低水平为原始培养条件,高水平为加入了营养元素的培养条件,试验中一共考察了 13 个因素,其中 N 和 O 为试验空白。

表 2 Plackett-Burman 设计的因素

Table 2 Parameters in the Plackett-Burman design			
编号	因素	低水平(-1)	高水平(+1)
A	淀粉酶/ $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$	0	8
B	糖化酶/ $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$	0	200
C	纤维素酶/ $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$	0	100
D	蛋白酶/ $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$	0	100
E	脂肪酶/ $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$	0	100
F	植酸酶/ $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$	0	100
G	果胶酶/ $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$	0	100
H	磷酸二氢钾/%	0	0.1
I	硫酸镁/%	0	0.05
J	硫酸铵/%	0	0.1
K	酵母膏/%	0	1
L	温度/℃	30	40
M	pH	4	7
N	空白		
O	空白		

2 结果与分析

2.1 不同固液比对酒精发酵的影响

固液比(餐厨垃圾:水)对发酵有较大影响,但为了实验和计算的方便,在显著性因素优化实验之前考察这一因素(即不纳入优化实验设计中). 多次取样分析后,测定本批实验的餐厨垃圾平均含水率为82.8%,为了探讨不同固液比对酒精产量的影响,添加不同量水进行酒精发酵,结果如图1所示.

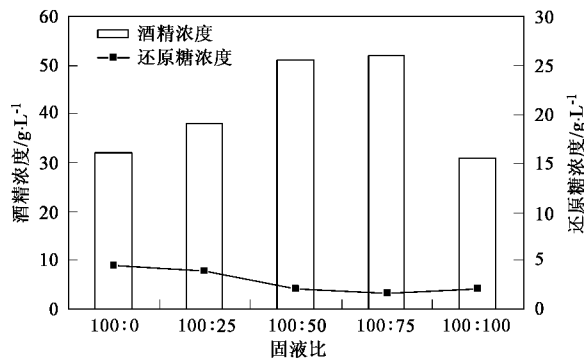


图 1 固液比对酒精发酵的影响

Fig.1 Effect of ratio of solid to liquid on ethanol production

如果外加的水较少,则相应底物的浓度较高,产生酒精的浓度也较大,由于酒精发酵是产物抑制型发酵,酒精浓度达到 4% 就会对发酵产生一定的抑制,从而减弱甚至停止酒精生产速率^[19]. 若增大水的用量,则会使酒精发酵液浓度降低,减弱产物抑制作用,但同时增加了蒸馏的能耗,并产生大量的酒精废液,增加了环境的压力. 因此在酒精发酵过程中选择适当的固液比十分重要. 由图 1 所示,还原糖浓度始终保持较低的水平,说明产生的糖类物质能够被细菌充分利用. 且固液比为 100:50 和 100:75

时,酒精浓度较高为 50 g/L 左右. 考虑到蒸馏时的能耗问题,本实验以 100:50 为最佳固液比,以下实验均保持该值.

2.2 Plackett-Burman 设计法筛选重要影响因素

依照表 2 的因素设计,使用统计软件 Statistica 6.0 (StatSoft Company, USA)设计实验方案,如表 3 所示.向基础培养基中添加营养元素,按照 1.4 方法进行酒精发酵,所产酒精的浓度值见表 3.表 4 为试验分析,利用 p 值来确定显著性的因素,定义 $p < 0.05$ 为特别显著的因素,由表 4 的 $t(a)$ 和 $p(a)$ 中可以看出,糖化酶对应的 p 值最小,为 0.147.为提高模型的显著性,将影响最不显著的因素果胶酶和磷酸二氢钾进行了剔除,利用软件对新的模型进行分析,得到了相应因素新的影响次序如 $t(b)$ 和 $p(b)$ 所示,在所考察的变量中,糖化酶和蛋白酶为影响十分显著的因素,而其他变量的影响不明显,这并不意味着它们对细菌酒精发酵没有作用.淀粉酶一般对酒精发酵具有重要作用,但本实验中因餐厨垃圾经过了加热处理,淀粉类物质相当于已经过了糊化过程,故淀粉酶的作用未能体现.纤维素酶、植酸酶和果胶酶虽对甘薯类和纤维素类物质的酒精发酵有着显著的作用^[20],但本实验餐厨垃圾中纤维素类物质含量较少,使上述酶未能充分发挥其作用.虽然餐厨垃圾中脂肪类物质含量较高,但是其代谢的产物甘油和脂肪酸不影响酒精发酵,故脂肪酶也属非显著因素.其他无机营养盐和酵母膏同样对发酵无明显影响,说明餐厨垃圾营养丰富,不需要外加营养物质即可满足细菌生长的需要.

表3 $N=16$ 的 Plackett-Burman 实验设计及试验相应值Table 3 Experiment design and result for Plackett-Burman design ($N = 16$)[illegible]

表 4 P-B 实验的结果分析

Table 4 Analysis of the result for P-B design					
编号	因素	$t^{(a)}$	$p^{(a)}$	$t^{(b)}$	$p^{(b)}$
A	淀粉酶/ $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$	0.667	0.574	0.940	0.401
B	糖化酶/ $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$	2.314	0.147	3.261	0.031
C	纤维素酶/ $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$	-0.314	0.783	-0.442	0.681
D	蛋白酶/ $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$	2.000	0.183	2.819	0.048
E	脂肪酶/ $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$	0.431	0.708	0.608	0.576
F	植酸酶/ $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$	1.255	0.336	1.769	0.152
G	果胶酶/ $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$	-0.118	0.917		
H	磷酸二氢钾/%	0.000	1.000		
I	硫酸镁/%	-0.824	0.497	-1.161	0.310
J	硫酸铵/%	0.235	0.836	0.332	0.757
K	酵母膏/%	0.314	0.783	0.442	0.681
L	温度/ $^{\circ}\text{C}$	-1.530	0.266	-2.156	0.097
M	pH	-0.157	0.890	-0.221	0.836
N	空白				
O	空白				

2.3 糖化酶和蛋白酶添加量的确定

由上述 P-B 实验可知,糖化酶和蛋白酶为最显著的因素. 为了确定这 2 种酶的最佳用量,进行酒精发酵实验. 依据 1.4 的酒精发酵方法,确定固液比为 100:50,细菌接种量为 10%,分别添加不同量的糖化酶确定其最佳用量,其结果见图 2. 由图 2 可知,糖化酶含量为 100 U/g 时酒精浓度最高,为 48 g/L ,且添加不同量的糖化酶时,由于生成的还原糖不断被接种的运动发酵单胞菌所利用,而保持较低的浓度,有效地缓解了产物(还原糖)对糖化过程的抑制作用.

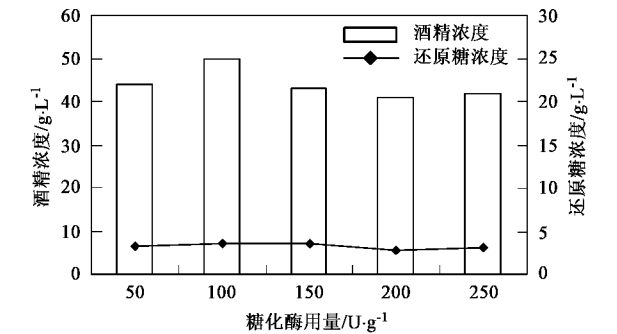


图 2 糖化酶用量对酒精发酵的影响(不添加任何其他酶)
Fig.2 Effect of glucoamylase usage on ethanol production

向 5 瓶餐厨垃圾发酵培养基中分别添加 50 ~ 250 U/g 蛋白酶,并同时添加 100 U/g 的糖化酶,进行酒精发酵的结果见图 3. 从中可知,最佳蛋白酶添加量为 100 U/g ,此时的酒精产量 53 g/L ,比单纯添加 100 U/g 糖化酶时高 10%. 这是因为蛋白酶的加入可促使蛋白质分解为氨基酸,丰富了发酵体系中营养

元素,从而促进微生物的生长,进而提高酒精产量^[21]. 根据 1.5 所述的酒精转化率公式进行计算,此时的酒精的转换率为 44% (根据 1.5 所述的公式: 酒精浓度 53 g/L $\times$ 发酵液体积 142.8 mL / 干垃圾质量 17.2 g = 44%). 根据报道,以葡萄糖为底物进行酒精发酵时的理论转化率为 51%^[22],由此可知,使用餐厨垃圾作为原料可以有效地进行酒精发酵.

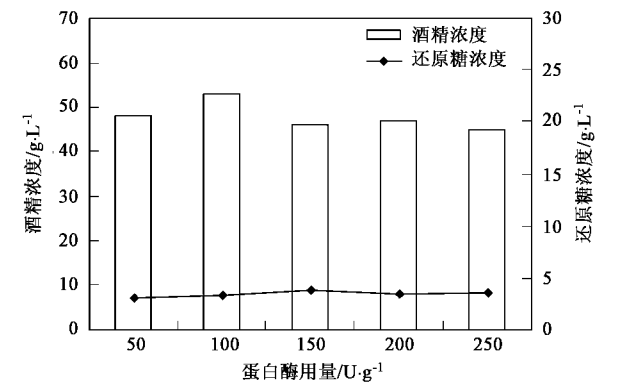


图 3 蛋白酶用量对酒精发酵的影响(同时添加糖化酶 100 U/g)
Fig.3 Effect of protease usage on ethanol production

2.4 餐厨垃圾酒精发酵前后的化学组成分析

将餐厨垃圾酒精发酵的产物蒸馏得到酒精,蒸馏后残液经固液分离后得到的固相物质为固体酒糟,液相物质为酒糟废液. 不同原料酒糟废液的组成如表 5 所示,以餐厨垃圾为原料和以玉米为原料的酒糟废液中 COD 浓度、粗蛋白含量及 pH 值均相近^[23],如果直接排放将严重污染环境,而利用其中含有的营养物质回用于发酵体系以调节发酵前的含水率,则不仅能解决环境污染的问题,还能节约水资源^[24]. 表 6 对比了餐厨垃圾酒精发酵前后的化学组成,可以看出,餐厨垃圾经酒精发酵后,粗蛋白增加了 1.5 倍,粗纤维和粗脂肪的含量变化不显著,因此所得的固体酒糟中蛋白含量高,纤维素含量低,可以作为饲料使用.

Table 5 Characteristic of the distillery waste of different substrates			
原料种类	COD/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	粗蛋白/%	pH
餐厨垃圾	50 000	1 ~ 1.5	3.8 ~ 4.2
玉米	55 800	1.2	3.5

Table 6 Composition of kitchen garbage before and after ethanol production/%			
分类	粗蛋白	粗纤维	粗脂肪
发酵前的餐厨垃圾	15.56	2.26	18.06
发酵后的固体酒糟	38.45	1.32	13.51

3 结 论

餐厨垃圾中营养含量丰富,为了充分利用其中的营养元素,同时考察外加物质对酒精发酵的影响,应用 Plackett-Burman 试验设计和单因素试验的方法,优化了餐厨垃圾发酵产酒精的条件. 实验结果表明,在选取的 13 个因素中,只有糖化酶和蛋白酶对于酒精发酵影响显著,进一步的单因素试验分析表明糖化酶的最佳添加量为 100 U/g. 当同时添加 100 U/g 蛋白酶和 100 U/g 糖化酶时,酒精产量达到最大值 53 g/L,比单纯添加糖化酶时产量高 10%,其酒精转化率为 44%. 经过酒精发酵后,餐厨垃圾粗蛋白增加了 1.5 倍,所得的固体酒糟中蛋白含量高,纤维素含量低,可以作为饲料使用. 利用餐厨垃圾发酵生产酒精,不仅可以解决城市垃圾中排放量越来越大且难以处理的餐厨垃圾环境污染问题,有效地实现其减量化、无害化与资源化,还对扩大酒精生产原料来源,降低酒精生产成本有积极意义.

参考文献:

[1] 赵由才.生活垃圾资源化原理和技术[M]. 北京:化学工业出版社,2002.358-368.

[2] 吴玉萍,董锁成.当代城市生活垃圾处理现状与展望[J].城市环境与城市生态,2001,14(1):33-36.

[3] 王星,王德汉,张玉帅,等.国内外餐厨垃圾的生物处理及资源化技术进展[J].环境卫生工程,2005,13(2):25-29.

[4] Lay J J, Fan K S, Chang J. Influence of chemical nature of organic wastes on their conversion to hydrogen by heat-shock digested sludge [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2003, 28(12):1361-1367.

[5] Noike T, Takabatake H, Mizuno O. Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by lactic acid bacteria[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2002, 27(11-12):1367-1371.

[6] Wang Q H, Narita J, Xie W M, et al. Effects of an anaerobic/aerobic incubation and storage temperature on preservation and deodorization of kitchen garbage[J]. Bioresource Technology, 2002, 84(3):213-220.

[7] 席北斗,刘鸿亮,孟伟,等.厨余垃圾堆肥蓬松剂技术研究[J].安全与环境学报,2003, 3(3):41-45.

[8] Ibsen K. Technology advance in producing biobased fuels and

chemicals [A]. In: Proceedings of Pacific Ethanol and Biodiesel Conf[C]. Bangkok: 2004.

[9] 高寿清.燃料酒精发展的国际情况与分析[J].食品与发酵工业, 2001, 27(12):59-62.

[10] Itoh H, Wada M, Honda Y, et al. Bioorganosolve Pretreatment for Simultaneous Saccharification and Fermentation of Beech Wood by Ethanolysis and White Rot Fungi[J]. Journal of Biotechnology, 2003, 103: 273-280.

[11] Wingren A, Galbe M, Zacchi G. Techno-Economic Evaluation of Producing Ethanol from Softwood: Comparison of SSF and SHF, and Identification of Bottlenecks[J]. Biotechnology Progress, 2003, 19: 1109-1117.

[12] Montesinos T, Navarro J. Production of Alcohol from Raw Wheat Flour by Amyloglucosidase and *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2000, 27:362-370.

[13] Tao F, Miao J Y, Shi G Y, et al. Ethanol fermentation by an acid-tolerant *Zymomonas mobilis* under non-sterilized condition [J]. Process Biochemistry, 2005, 40(1): 183-187.

[14] Veera V R B, Subba R S, Damodara R M, et al. Optimization of fermentation conditions for the production of ethanol from sago starch by co-immobilized amyloglucosidase and cells of *Zymomonas mobilis* using response surface methodology [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 38:209-214.

[15] Davis L, Jeon Y J, Svenson C, et al. Evaluation of wheat stillage for ethanol production by recombinant *Zymomonas mobilis*[J]. Biomass and Bioenergy, 2005, 29(1):49-59.

[16] Miller G L. Use of DNS reagent for determination of reducing sugars [J]. Analytical Chemistry, 1959, 31:426-428.

[17] GB/T 6432-1994, 饲料中粗蛋白测定方法[S].

[18] 陈雄,章莹,王金华.响应面方法优化菊粉酶液体发酵培养基的研究[J].生物技术,2006,16(5):44-47.

[19] 刘振,王金鹏,张立峰,等.木薯干原料同步糖化发酵生产乙醇[J].过程工程学报,2005,5(3):353-356.

[20] 段钢,孙长平.酶在生物质转化为燃料酒精中的应用[J].食品与发酵工业,2005,31(5):73-76.

[21] 李永泉.宇佐美曲霉 1336 酸性蛋白酶发酵过程动力学研究[J].浙江大学学报,2000, 27(2):184-187.

[22] Rogers P L, Lee K J, Skotnicki M L, et al. Ethanol production by *Zymomonas mobilis* [J]. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 1982, 23:37-84.

[23] 冯玉杰,金永新,孙晓君.壳聚糖季铵盐处理玉米酒精清糟液的研究[J].环境污染与防治,2002,24(3):129-131.

[24] 陶飞,石贵阳,章昌昆.酒糟处理方式在细菌酒精全回流发酵中的研究[J].酿酒,2003,30(5):34-36.