



发酵制备乙醇过程中气体成分的监测与调控

杨志岩¹, 闫仲丽¹, 姜玉倩², 苗苗苗²

(1. 天津科技大学现代分析技术研究中心, 天津 300457; 2. 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘要: 为了达到利用腐烂葡萄生产乙醇的目的, 通过气相色谱法对发酵过程中顶空气体成分进行分析. 研究了气体成分变化对乙醇产生量的影响. 实验表明: 为了保证乙醇的增长趋势, 必须在氧气和二氧化碳的相对含量比值小于 2 时, 补加空气使氧气和二氧化碳的相对含量比值达到 3.5 左右. 酿酒酵母 BDX 的生长期为 7 d, 第 5 天补加空气调整顶空气体成分, 第 7 天发酵液中乙醇的含量可以达到 7% 以上.

关键词: 腐烂葡萄; 气相色谱; 六通阀进样; 顶空气体; 乙醇; 发酵液

中图分类号: O658.6⁺1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-6510(2013)04-0005-05

Monitoring and Regulating Gas Components in the Process of Ethanol Preparation through Fermentation

YANG Zhiyan¹, YAN Zhongli¹, JIANG Yuqian², MIAO Miaomiao²

(1. Research Centre of Modern Analysis Technology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;

2. College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Headspace gas in the fermentation process was analyzed with gas chromatography to optimize the methods for ethanol production by fermentating fruit and vegetable waste. Influence of the gas composition on the ethanol production was analyzed. Experiments show that in order to produce as much ethanol as possible, when the relative ratio of oxygen to carbon dioxide is below 2, air should be added to make the relative ratio of oxygen to carbon dioxide up to about 3.5. The growing period of *Saccharomyces cerevisiae* BDX is 7 days. The ethanol content on the 7th day in the fermentation broth could be more than 7% when the air is supplied on the 5th day to adjust the headspace gas composition.

Key words: rotten grapes; gas chromatography; six-way valve injection; headspace gas; ethanol; fermentation broth

燃料乙醇被认为是最有发展前景的可再生能源之一, 开发前景十分广阔^[1]. 以往燃料乙醇的生产是以谷物为原料(例如玉米、小麦和稻米), 通过酶转化为糖, 然后经过发酵而成. 但我国人口众多, 将燃料乙醇的发展建立在以粮食为原料的基础上是不可行的^[2]. 目前, 以废弃物作为原料生产更加安全、环保和高性价比的能源倍受关注, 所以利用废弃物发酵生产乙醇就有着非常重大的实际意义^[3]. 利用果蔬废弃物发酵生产乙醇, 既解决环境污染问题、减少温室气体排放, 又能缓解人口增长带来的粮食压力, 对能源的可持续利用、环境保护和社会稳定都具有重要意

义^[4]. 厌氧微生物发酵机理仍然是一个谜, 有待于进一步深入研究^[5]. 在厌氧微生物发酵过程中, 氧气、氮气、二氧化碳的含量至关重要^[6]. 本文通过气相色谱仪的六通进样阀和蠕动泵实现了发酵过程的顶空气体与气相色谱主机的密闭连接. 在常规分析方法^[7]的基础上, 利用两根色谱柱实现了氧气、二氧化碳、氮气、水蒸气、乙醇蒸汽的分离. 并对腐烂葡萄发酵过程中气体成分进行了在线检测, 研究了发酵过程中顶空气体成分变化与乙醇含量的关系. 发酵过程中气体成分的在线监测系统具有快速、准确、真实的特点, 可为得到高效率的乙醇生产工艺条件提供重要的

收稿日期: 2013-01-16; 修回日期: 2013-03-14

基金项目: 天津科技大学实验室基金(1188A312)

作者简介: 杨志岩(1956—), 男, 天津人, 研究员, yangzy@tust.edu.cn.

参考数据.

1 材料与方 法

1.1 实验材料

碳酸氢钠(AR),天津市塘沽化学试剂厂;硫酸(AR),天津化学试剂一厂;蒸馏水,自制普通蒸馏水;腐烂葡萄,零售市场腐烂葡萄;酿酒酵母 BDx,安琪酵母股份有限公司.

1.2 检测装置与检测方法

气体检测装置如图 1 所示.

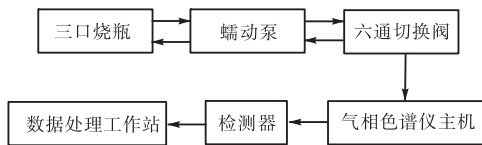


图 1 检测装置

Fig. 1 Detection equipment

用组织粉碎机将腐烂葡萄制成浆状液,经高温蒸汽灭菌后,取 500 mL 按接种量 200 mg/L 加入酿酒酵母 BDx,接种前取 0.100 0 g 酵母 BDx,加浆状液 5 mL、水 15 mL,活化 5 h 后接种并置于 1 000 mL 三口烧瓶中进行发酵,连接至检测系统.测定初始顶空气体成分,并定期每 24 h 检测 1 次,分析发酵过程中顶空气体成分的变化与乙醇产生速率的规律.

1.3 测定方法

1.3.1 顶空气体中氧气、氮气、二氧化碳相对含量的测定

取 500 mL 水加入到 1 000 mL 的三口烧瓶中,用 1%的硫酸水溶液调节 pH 至 3.0~4.0,连接至检测系统,依次加入 10%碳酸氢钠溶液 1、2、3、4、5、6 mL 分别发酵 10 min 后,利用 Carbosieve B(80~100 目)填充色谱柱(2 m × 0.2 mm)和热导池(TCD),在柱温 40 °C、氢气流量 40 mL/min 的色谱条件下,采用色谱归一化法进行测定.通过六通阀在线提取顶空气体 1 mL 进行氧气、氮气、二氧化碳的相对含量分析.

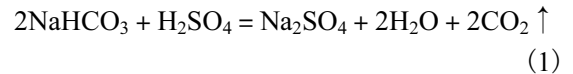
1.3.2 气体中二氧化碳含量的测定

称取 10.000 0 g 碳酸氢钠固体,用水溶解后定容至 100 mL(0.1 g/mL).

取 10 mL 浓硫酸,慢慢加入到 990 mL 蒸馏水中(1%).取此溶液 50 mL 放入 1 000 mL 容量瓶中.开启蠕动泵进行循环搅拌 5 min 后,通过六通阀提取气体 1 mL 注入气相色谱仪进行分析,记录二氧化碳色谱峰的面积.

检测完成后,为了模拟二氧化碳的产生,在上述容量瓶中加入 1 mL 质量浓度为 0.1 g/mL 的碳酸氢钠水溶液,相当于加入 0.1 g 的碳酸氢钠固体产生的二氧化碳质量.

利用化学反应方程式(1)计算得到 0.1 g 的碳酸氢钠能产生 0.052 4 g 的二氧化碳气体,此气体分布在 950 mL 的空间中其含量为 5.516×10^{-7} .以此类推,每次增加 0.1 g/mL 的碳酸氢钠水溶液 1 mL 测定二氧化碳色谱峰的面积和二氧化碳质量的关系.



1.3.3 气体中空气、水、乙醇的相对含量的测定

取 500 mL 水加入到 1 000 mL 的烧瓶中,用 1%的硫酸水溶液调节 pH 至 3.0~4.0,连接至检测系统,取顶空气体进行分析.利用 GDX-401 填充色谱柱(1 m × 0.2 mm)和热导池(TCD)检测器,在柱温 110 °C、氢气流量 40 mL/min 的色谱条件下,利用色谱归一化法,在线测定发酵气中的空气、水、乙醇的相对含量.其中空气中成分包括氧气、氮气、二氧化碳,可通过 1.3.1 方法测定.

1.3.4 液体中乙醇含量的测定

取 500 mL 水加入到 1 000 mL 的烧瓶中,用 1%的硫酸水溶液调节 pH 至 3.0~4.0,再依次加入无水乙醇 5、10、15、20、25、30、50、70、90、110 mL(相当于液体中乙醇的含量为:0.78%、1.55%、2.31%、3.05%、3.79%、4.52%、7.31%、9.94%、12.43%),连接至检测系统,取顶空气体 1 mL,利用 GDX-401 填充色谱柱(1 m × 0.2 mm)和热导池(TCD)检测器,在柱温 110 °C、氢气流量 40 mL/min 的色谱条件下,采用色谱外标法进行液体中乙醇含量的测定.

2 结果与讨论

2.1 二氧化碳含量与色谱峰面积曲线

由 1.3.2 实验测得的数据进行回归处理,得到二氧化碳含量和色谱峰面积的关系如图 2 所示.

2.2 发酵液中乙醇含量与气体中乙醇色谱峰面积工作曲线

由 1.3.4 实验测得的数据进行回归处理,得到液体中乙醇含量和气体中乙醇色谱峰面积的关系,如图 3 所示.

气体中乙醇色谱峰面积和液体中乙醇含量呈良好的线性关系,其回归方程式为 $y = 0.000 3x + 1.239 7$,其中: x 为气体中乙醇色谱峰面积($\mu\text{V}\cdot\text{s}$),

y 为液体中乙醇含量(%)。

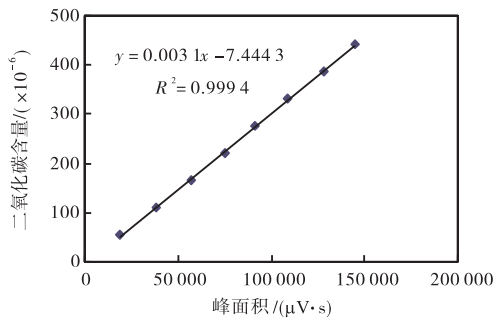


图2 气体中二氧化碳含量与色谱峰面积工作曲线

Fig. 2 Carbon dioxide content in the gas and the chromatographic peak area curve

实验结果表明: 此法能通过对发酵气体中乙醇色谱峰面积的测定, 得到发酵液体中的乙醇含量. 在监控气体成分变化的同时也能了解发酵液体中乙醇

含量的变化.

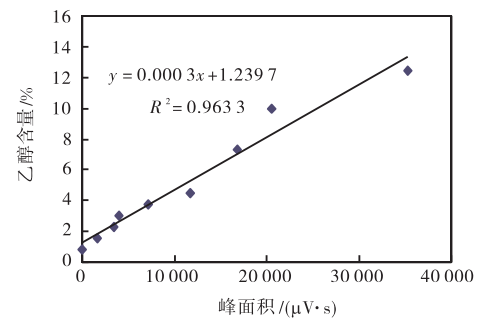


图3 气体中乙醇色谱峰面积与液体中乙醇含量的关系

Fig. 3 Relationship between the chromatographic peak area of ethanol in the gas and the ethanol content in the liquid

2.3 腐烂葡萄乙醇发酵过程中气体成分的变化

由 1.2 实验测得的数据见表 1.

表 1 腐烂葡萄发酵过程中气体成分在线检测结果

Tab. 1 Composition detection results of fruit and vegetable waste gas in the process of fermentation

时间/d	气相组分	保留时间/min	峰面积/($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)	组内相对含量/%	发酵液中乙醇含量/%	二氧化碳产生量/%	相对含量/%
0	空气	0.216	852 007	89.73	—	—	89.73
	水	0.938	97 509	10.27			10.27
	乙醇	—	—	—			—
	O ₂	1.768	6 707	22.29			21.96
	N ₂	2.017	23 646	76.32			75.18
	N ₂ + O ₂	0.790	857 475	98.50			98.50
	CO ₂	—	—	—			—
1	空气	0.237	960 671	90.13	1.532 7	—	90.13
	水	0.973	103 102	9.67			9.67
	乙醇	2.312	2 100	0.20			0.20
	O ₂	1.743	5 335	22.29			21.86
	N ₂	1.990	16 111	76.32			74.84
	N ₂ + O ₂	4.294	787 460	98.06			98.06
	CO ₂	—	—	—			—
2	空气	0.252	962 323	91.12	2.875 1	—	91.12
	水	0.921	78 575	8.52			8.52
	乙醇	2.520	3 702	0.35			0.35
	O ₂	1.821	30 105	18.75			18.24
	N ₂	2.057	130 418	81.25			79.04
	N ₂ + O ₂	4.537	574 158	69.82			97.28
	CO ₂	5.880	22 387	2.72			0.036 3
3	空气	0.264	915 133	90.45	3.796 5	—	90.45
	水	0.964	914 273	9.04			9.04
	乙醇	2.531	5 196	0.51			0.51
	O ₂	1.907	36 078	14.88			14.04
	N ₂	2.135	206 358	85.12			80.31
	N ₂ + O ₂	4.592	506 437	60.15			94.35
	CO ₂	5.556	47 603	5.65			0.063 4
4	空气	0.247	857 260	93.12	4.986 7	—	93.12
	水	0.891	56 689	6.16			6.16
	乙醇	2.407	6 695	0.73			0.73
	O ₂	1.738	48 056	13.04			12.12
	N ₂	1.919	320 450	84.96			78.97

续表

时间/d	气相组分	保留时间/min	峰面积/($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)	组内相对含量/%	发酵液中乙醇含量/%	二氧化碳产生量/%	相对含量/%
4	$\text{N}_2 + \text{O}_2$	4.460	347 459	44.03			92.95
	CO_2	5.835	55 675	7.05		0.072 2	7.05
5 (加空气 后)	空气	0.212	817 811	89.09			89.09
	水	0.911	91 446	9.96			9.96
	乙醇	2.339	8 706	0.95	6.405 6		0.95
	O_2	1.707	97 694	17.21			16.37
	N_2	1.884	469 832	82.79			78.73
	$\text{N}_2 + \text{O}_2$	4.754	166 566	21.17			95.10
	CO_2	6.129	38 582	4.9		0.053 7	4.90
6	空气	0.222	867 750	93.89			93.89
	水	0.908	46 569	5.04			5.04
	乙醇	2.444	9 909	1.07	7.254 5		1.07
	O_2	1.803	94 109	16.12			15.09
	N_2	1.990	489 575	83.88			78.52
	$\text{N}_2 + \text{O}_2$	4.758	141 046	17.57			93.61
	CO_2	5.639	51 304	6.39		0.067 4	6.39
7	空气	0.219	809 121	91.64			91.64
	水	0.913	64 162	7.27			7.27
	乙醇	2.463	9 651	1.09	7.212 7		1.09
	O_2	1.814	93 797	15.69			14.48
	N_2	1.995	503 828	84.31			77.81
	$\text{N}_2 + \text{O}_2$	4.668	171 821	21.42			92.29
	CO_2	5.385	61 818	7.71		0.078 8	7.71

注：“—”表示未检出。

酿酒酵母 BDX 的生长期为 7 d. 在整个发酵过程中乙醇含量与发酵时间的关系如图 4 所示. 初始空气中无乙醇生成; 1 d 后生成 1.53%; 第 3 天生成 1.34%; 第 4 天生成 0.92%; 第 5 天生成 1.19%; 第 6 天生成 1.41%; 第 7 天生成 0.84%; 第 8 天生成 0%, 说明发酵在第 7 天已经结束.

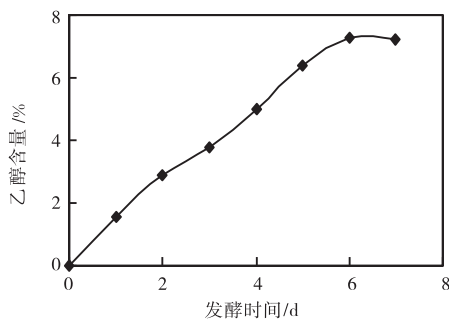


图 4 乙醇的含量与发酵时间的关系

Fig. 4 Relationship between the alcohol content and reaction time

氧气、二氧化碳含量与发酵时间的关系如图 5 所示. 二氧化碳第 3 天生成 2.72%; 第 4 天生成 2.9%; 第 5 天生成 1.43%; 此时补加空气使二氧化碳的含量降至 4.9%. 第 6 天生成 2.49%, 第 7 天生成 1.32%. 从以上数据可知, 在乙醇生成量降低(第 4

天)的同时二氧化碳的生成量也降低, 表明发酵速度下降, 必须补充空气调整发酵环境. 实验证明, 顶空气体成分调整后乙醇 1 d 的生成量提高了 0.26%. 氧气的含量在前 4 d 下降至 12.12%, 进一步说明补充空气的重要性.

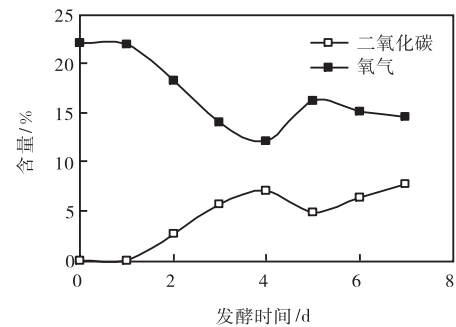


图 5 氧气、二氧化碳含量与发酵时间的关系

Fig. 5 Relationship between reaction time and oxygen, carbon dioxide content

氮气含量与发酵时间的关系如图 6 所示. 由于发酵消耗氧气, 所以氮气的含量在前 4 d 上升至 80.31%. 通入空气后由于氧气占有部分分压, 所以氮气含量降至 78.37%, 后期由于二氧化碳的产生, 氮气含量降至 77.81%.

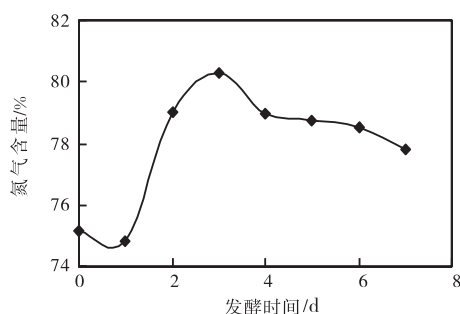


图6 氮气含量与发酵时间的关系

Fig. 6 Relationship between nitrogen and reaction time

乙醇含量与氧气、二氧化碳含量的关系如图7所示. 乙醇的含量在前4 d与氧气含量成反比,与二氧化碳含量成正比. 补充空气后经过1 d的平衡继续维持原来的关系.

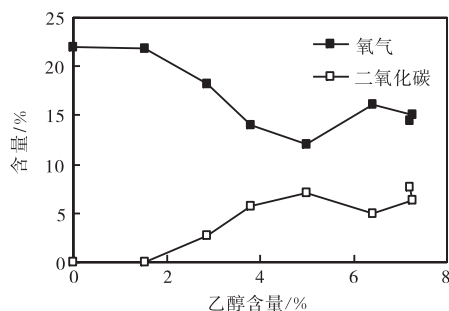


图7 乙醇含量与氧气、二氧化碳含量的关系

Fig. 7 Relationship between ethanol content and oxygen, carbon dioxide content

氧气和二氧化碳含量的比值与乙醇含量的关系如图8所示.

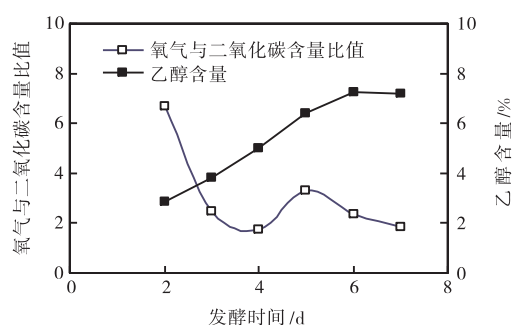


图8 发酵液中氧气和二氧化碳含量比值与乙醇含量的关系

Fig. 8 Relationship between ethanol content and the ratio of oxygen to carbon dioxide in the fermentation broth

在发酵过程中氧气和二氧化碳的变化量成反比,在线检测过程中发现两者的相关性对乙醇的产生有较大的影响. 采用氧气和二氧化碳的相对含量比值来描述两者对乙醇产生的影响,具有相对的稳定性和

可靠性. 为了保证乙醇的增长趋势,必须在氧气和二氧化碳的相对含量比值小于2时,补加空气使氧气和二氧化碳的相对含量比值达到3.5左右. 连续发酵8 d,得到乙醇含量为7.21%的发酵液.

3 结论

根据氧气、氮气、二氧化碳、水、乙醇的色谱峰面积及相对比例,可推算出在发酵过程中顶空气体成分含量与乙醇生成量之间的关系.

从腐烂葡萄发酵过程中顶空气体成分的变化情况可以看出:乙醇和二氧化碳的含量随着发酵时间增加而升高,当发酵至第5天时,通过通入空气对发酵系统的气体成分进行了调整,解除发酵中期二氧化碳对酵母的抑制作用,使发酵顺利进行. 发酵至第7天,由在线监测系统对顶空气体检测得到的乙醇含量为7.21%,采取常用方法直接取液体进样检测得到的乙醇含量为7.56%,二者相差不大. 由于该检测系统和发酵系统实现一体化连接,能直接得到发酵过程中产物和其他成分的变化,直接观测到乙醇的生成量,而且利用六通阀定量管提取气体不存在人为取样和发酵体系压力变化造成的误差,能真实地得到发酵乙醇的生长速率和顶空气体成分组成之间的随机变化,真实、准确地判断补充空气的时机和加入量,对最佳发酵工艺的选择有十分重要的现实指导作用.

参考文献:

- [1] Lin Y, Tanaka S. Ethanol fermentation from biomass resources: Current state and prospects[J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2006, 69(6): 627-642.
- [2] 蓝艳华. 甘蔗渣生产燃料乙醇研究现状与对策[J]. 甘蔗糖业, 2007, 32(6): 34-39.
- [3] Dien B S, Cotta M A, Jeffries T W. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status[J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2003, 63(3): 258-266.
- [4] 张继泉, 王瑞明, 孙玉英. 利用木质纤维素生产燃料酒精的研究进展[J]. 酿酒科技, 2003(1): 39-42.
- [5] 张无敌. 沼气发酵残留物利用基础[M]. 昆明: 云南科技出版社, 2002: 132-133.
- [6] 高天荣, 肖怡玲, 徐锐, 等. 厌氧发酵气的气相色谱测试方法[J]. 云南师范大学学报, 2004, 24(3): 26-27.
- [7] 张英. 食品理化与微生物检测实验[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2004.

责任编辑: 郎婧