



玛丽娜, 敖日格乐, 斯木吉德, 等. 酵母菌混合发酵乳清液及其乙醇发酵阶段工艺优化[J]. 轻工学报, 2024, 39(3): 38-45.  
MALINA, AORIGELE, SIMUJIDE, et al. Parameters optimization of ethanol fermentation process in whey liquid fermented by combined yeasts[J]. Journal of Light Industry, 2024, 39(3): 38-45.  
DOI: 10.12187/2024.03.005

# 酵母菌混合发酵乳清液及其乙醇发酵阶段工艺优化

玛丽娜, 敖日格乐, 斯木吉德, 陶羽

内蒙古农业大学 生命科学学院, 内蒙古 呼和浩特 010018

**摘要:** 选择马克斯克鲁维酵母 CGMCC13907(以下简称马氏酵母 CGMCC13907)和酿酒酵母 AS2.119 为混合发酵剂发酵乳清液制备乳清醋, 并采用 Plackett-Burman Design (PBD) 和 Box-Behnken Design (BBD) 试验优化乙醇发酵阶段的工艺。结果表明: 乙醇发酵阶段的最优工艺为马氏酵母 CGMCC13907 接种量  $4.0 \times 10^6$  CFU/mL, 酿酒酵母 AS2.119 接种量  $4.5 \times 10^6$  CFU/mL, 发酵时间 151 h, 发酵温度  $40.0 \text{ }^\circ\text{C}$ , 发酵 pH 值 5.6, 姜粉用量  $0.09 \text{ g}/100 \text{ mL}$ , 在此条件下, 发酵液中乙醇浓度可达  $8.70 \text{ \%vol}$ , 比优化前增加了 56.2%。因此, 选用马氏酵母 CGMCC13907 结合酿酒酵母 AS2.119 混合发酵乳清液, 可有效解决乳清醋制作过程中的乳糖发酵难题, 并获得较理想的乙醇浓度。

**关键词:** 乳清液; 乳清醋; 酵母菌混合发酵; 乙醇发酵; PBD 试验设计; BBD 试验设计

**中图分类号:** TS252.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096-1553(2024)03-0038-08

## 0 引言

乳清液是奶酪制品生产过程中的副产物, 含有乳糖、矿物盐、乳清蛋白等多种营养成分<sup>[1]</sup>。全球乳清液年产量约  $1.6 \times 10^8 \text{ t}$ , 但利用率只有 50%<sup>[2]</sup>, 大量乳清液被当作废水排弃, 这会使环境中的生化需氧量 (Biochemical Oxygen Demand, BOD) 和化学需氧量 (Chemical Oxygen Demand, COD) 增加<sup>[3]</sup>。为了有效利用乳清液, 国外研究者曾采用机械式反渗透处理技术获得低聚糖、干酪素等有经济价值的功能性成分<sup>[4-5]</sup>, 但该技术流程复杂、设备昂贵、投

资回报较低。目前, 越来越多的研究者将注意力转向成本更低、增值效益更明显的微生物发酵乳清液等相关领域, 例如, 利用乳杆菌发酵乳清液生产抗真菌活性肽粉<sup>[6]</sup>, 利用酵母菌发酵乳清液生产甜型乳清酒<sup>[7]</sup>, 利用马克斯克鲁维酵母和巴斯德醋酸杆菌发酵乳清液生产乳清醋<sup>[8]</sup>等。

乳清醋是采用微生物发酵技术发酵乳清液制得的一种动物源食用醋, 具有全价氨基酸等营养成分及增强免疫力等功效<sup>[8]</sup>, 成本较低, 增值效益明显<sup>[9]</sup>。乳清醋的制作过程主要包括乙醇发酵、醋酸发酵和陈熟这 3 个阶段, 其中, 乙醇发酵阶段所产乙

收稿日期: 2024-04-22; 修回日期: 2024-04-30; 出版日期: 2024-06-15

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金项目 (2022YFHH0091)

作者简介: 玛丽娜 (1975—), 女, 内蒙古自治区科尔沁右翼前旗人, 内蒙古农业大学讲师, 博士, 主要研究方向为微生物及生物工程。E-mail: mln6441@163.com

通信作者: 敖日格乐 (1960—), 男, 内蒙古自治区呼伦贝尔市人, 内蒙古农业大学教授, 博士, 主要研究方向为奶牛饲养管理。E-mail: aori6009@163.com

醇的浓度会直接影响后期醋酸发酵阶段及陈熟后的乳清醋产量。乳清液中的乳糖可作为酵母菌发酵产生乙醇的碳源,但目前酿醋行业常用的多数酵母菌不具备发酵乳糖的功能<sup>[10-13]</sup>。因此,筛选和应用能够利用乳糖发酵产乙醇的酵母菌株成为乳清醋生产的关键和难点。

马克斯克鲁维酵母 CGMCC13907 (*Kluyveromyces marxianus* CGMCC13907,以下简称马氏酵母 CGMCC13907)来源于开菲尔粒<sup>[14]</sup>,属于耐酸、耐高温型酵母菌,其分泌的 $\beta$ -半乳糖苷酶可分解乳糖形成半乳糖、葡萄糖等单糖<sup>[15-16]</sup>。酿酒酵母 AS2.119 (*Saccharomyces cerevisiae* AS2.119)属于高温型酵母菌,能激发马氏酵母发酵葡萄糖产乙醇<sup>[17-18]</sup>。根据已有文献<sup>[19]</sup>报道,采用马氏酵母与酿酒酵母混合发酵,能够达到利用乳清液中的乳糖发酵产乙醇的目的,但其工艺仍有待进一步优化。鉴于此,本研究拟根据克勒勃屈利效应原理<sup>[20]</sup>,选择上述两种酵母菌为混合发酵剂,基于 Plackett-Burman Design (PBD)<sup>[21-23]</sup>和 Box-Behnken Design (BBD)<sup>[24-26]</sup>试验设计方法,对乳清醋的乙醇发酵阶段进行优化研究,以为乳清醋的产业化开发,以及微生物发酵技术在乳清液等乳制品加工副产物增值和转化中的应用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与试剂

乳清原液,内蒙古伊利集团呼和浩特金川公司;鲜姜粉,内蒙古呼和浩特华润万家超市;马氏酵母 CGMCC13907、酿酒酵母 AS2.119,中国普通微生物菌种保藏管理中心;麦芽汁,内蒙古塞北星啤酒有限责任公司;酸性蛋白酶(酶活力 200 000 U/g),湖北康宝泰精细化工有限公司;琼脂,福建环海生物科技股份有限公司;无菌磷酸盐缓冲液,生工生物工程(上海)有限公司。以上试剂均为分析纯。

### 1.2 主要仪器与设备

HPS-250 型生化培养箱,哈尔滨东明医疗仪器厂;CH20BIMF200 型显微镜,日本奥林帕司光学仪器有限公司;PHS-3B 型精密 pH 计,上海雷诺仪器厂;HSY 型电热恒温水浴锅,山西省文水医疗器械

厂;YXQ-LS-18SI 型高压蒸汽灭菌器,上海博讯实业有限公司;SW-CJ-2F 型超净工作台,苏州净化设备有限公司;JJ-21 型高精度酒精计,匡建(上海)仪表科技有限公司。

### 1.3 培养基

酵母菌斜面培养基:12 °Brix 麦芽汁 1.0 L,琼脂 15.0 g,pH 值为 7.0,于 121 °C 条件下灭菌 20 min。

酵母菌扩培培养基:在乳清液中加入质量分数为 0.03% 的酸性蛋白酶,于 37 °C 条件下水解 120 min,为了抑制可能残留的乳脂肪发生氧化反应,加入高温杀菌处理后的姜粉(姜粉用量<0.090 g/100 mL);过滤后,于 121 °C 条件下灭菌 15 min。

乙醇发酵培养基:同酵母菌扩培培养基,但其姜粉用量为 0.050~0.105 g/100 mL。

### 1.4 实验方法

**1.4.1 酵母菌混合发酵** 将马氏酵母 CGMCC13907 和酿酒酵母 AS2.119 分别接种于酵母菌斜面培养基上,于(36±1)°C 条件下活化培养(48±2)h 后,分别转接于酵母菌扩培培养基中,于(36±1)°C 条件下增殖培养(48±2)h。选取适当接种量,将两种酵母菌混合接种(接种比 1:1.1)于乙醇发酵培养基中进行乙醇发酵。

**1.4.2 乙醇发酵阶段工艺优化** 通过 PBD 试验方案确定影响乙醇发酵阶段的主要因素,即马氏酵母 CGMCC13907 接种量(A)、酿酒酵母 AS2.119 接种量(B)、发酵时间(C)、发酵温度(F)、发酵 pH 值(H)和姜粉用量(I)6 个因素,并以乙醇浓度(Y)为响应值,制定六因素二水平试验方案。PBD 试验的因素编码及水平见表 1,共进行 20 次试验。通过 PBD 最陡爬坡试验确定适宜的马氏酵母 CGMCC13907 接种量、酿酒酵母 AS2.119 接种量、发酵时间、发酵温度、发酵 pH 值和姜粉含量,以该组因素数值作为 BBD 试验设计的零水平,制定六因素三水平试验方案。通过响应曲面分析得到乙醇发酵阶段的最优工艺条件。每次试验均设置 3 个平行。

**1.4.3 乙醇浓度测定** 参照《食品安全国家标准酒和食用酒精中乙醇浓度的测定》(GB 5009.225—

2023)<sup>[27]</sup>,采用酒精计法测定乙醇浓度。将样液注入洁净、干燥的量筒中,静置数分钟,待气泡消失后插入酒精计和温度计,平衡约5 min后,读取酒精计刻度值并记录温度,再换算成20℃时的酒精度,即乙醇浓度(以%vol表示)。重复实验两次,结果取平均值。

**1.4.4 活菌数测定** 参照《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数的测定》(GB 4789.2—2022)<sup>[28]</sup>,采用平板菌落计数法测定活菌数。吸取25 mL样液,注入225 mL无菌磷酸盐缓冲液中,混匀,依次制成 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 和 $10^{-3}$ 3个稀释梯度样液;各吸取1 mL样液注入无菌培养皿中,倾注琼脂培养基后,于(36±1)℃条件下培养(48±2)h,用菌落数测试片进行活菌数测定。以不加入样液的培养皿为对照。活菌数单位为CFU/mL。

**1.5 数据处理**

使用MINITAB21统计软件创建PBD和BBD试验方案,并进行数据处理和分析。

**2 结果与分析**

**2.1 PBD 试验结果分析**

**2.1.1 方差分析** PBD试验结果及PBD试验方差分析分别见表2和表3。由表2和表3可知,各因素影响乙醇浓度的关系依次为 $X_1 > X_5 > X_2 > X_4 > X_3 > X_6$ 。其中, $X_1$ 、 $X_5$ 、 $X_2$ 、 $X_4$ 、 $X_3$ ( $P < 0.01$ )对乙醇浓度的影响表现为差异性极显著, $X_6$ ( $P < 0.05$ )表现为差异性显著。

**2.1.2 各因素发酵产乙醇效应率分析** PBD试验中各因素的发酵产乙醇效应率见表4。由表4可知,各因素影响发酵产乙醇效应率的关系依次为 $A > B > C > F > H > I$ ,即马氏酵母CGMCC13907接种量对发

表2 PBD 试验结果

Table 2 Result of PBD test

| 试验号 | A  | B  | C  | F  | H  | I  | Y/(%vol) |
|-----|----|----|----|----|----|----|----------|
| 1   | 1  | -1 | 1  | -1 | -1 | 1  | 4.9      |
| 2   | 1  | 1  | -1 | -1 | 1  | -1 | 4.7      |
| 3   | -1 | 1  | 1  | -1 | -1 | 1  | 5.8      |
| 4   | -1 | -1 | 1  | 1  | -1 | -1 | 5.3      |
| 5   | 1  | -1 | -1 | 1  | -1 | -1 | 3.9      |
| 6   | 1  | 1  | -1 | -1 | -1 | -1 | 3.5      |
| 7   | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | -1 | 4.5      |
| 8   | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 4.6      |
| 9   | -1 | 1  | 1  | -1 | -1 | 1  | 5.7      |
| 10  | 1  | -1 | 1  | -1 | 1  | -1 | 6.0      |
| 11  | -1 | 1  | -1 | 1  | 1  | 1  | 5.5      |
| 12  | 1  | -1 | 1  | 1  | -1 | 1  | 4.6      |
| 13  | -1 | 1  | -1 | 1  | -1 | -1 | 3.8      |
| 14  | -1 | -1 | 1  | 1  | 1  | -1 | 6.7      |
| 15  | -1 | -1 | -1 | -1 | 1  | 1  | 7.2      |
| 16  | -1 | -1 | -1 | 1  | 1  | 1  | 6.1      |
| 17  | 1  | -1 | -1 | -1 | 1  | 1  | 5.5      |
| 18  | 1  | 1  | -1 | 1  | -1 | 1  | 3.2      |
| 19  | -1 | 1  | 1  | -1 | 1  | -1 | 6.3      |
| 20  | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 5.7      |

表3 PBD 试验方差分析

Table 3 Analysis of variance in PBD test

| 方差来源  | 自由度 | 平方和   | 均方   | F值     | P值                  |
|-------|-----|-------|------|--------|---------------------|
| 主效应   | 6   | 21.53 | 3.59 | 90.64  | 0.0001 <sup>a</sup> |
| $X_1$ | 1   | 8.07  | 8.07 | 203.77 | 0.0001 <sup>a</sup> |
| $X_2$ | 1   | 3.45  | 3.45 | 87.03  | 0.0001 <sup>a</sup> |
| $X_3$ | 1   | 1.41  | 1.41 | 35.49  | 0.0001 <sup>a</sup> |
| $X_4$ | 1   | 2.52  | 2.51 | 63.69  | 0.0001 <sup>a</sup> |
| $X_5$ | 1   | 5.73  | 5.73 | 144.64 | 0.0001 <sup>a</sup> |
| $X_6$ | 1   | 0.37  | 0.37 | 9.21   | 0.0100 <sup>b</sup> |
| 残差误差  | 13  | 0.52  | 0.04 |        |                     |
| 失拟    | 12  | 0.51  | 0.04 | 8.49   | 0.2630 <sup>c</sup> |
| 纯误差   | 1   | 0.01  | 0.01 |        |                     |

注:a表示极显著( $P < 0.01$ ),b表示显著( $P < 0.05$ ),c表示不显著( $P > 0.05$ )。下同。

表4 PBD 试验中各因素的发酵产乙醇效应率

Table 4 Effect rates of fermentation ethanol production of various factors in PBD test

| 因素 | 发酵产乙醇效应率/% | 显著性 |
|----|------------|-----|
| A  | 37.5       | **  |
| B  | 26.6       | **  |
| C  | 16.0       | **  |
| F  | 11.7       | **  |
| H  | 6.6        | **  |
| I  | 1.6        | *   |

注:\*\*表示极显著( $P < 0.01$ ),\*表示显著( $P < 0.05$ )。

表1 PBD 试验的因素编码及水平

Table 1 Factor codings and levels of PBD test

| 因素                                       | 编码    |       | 水平   |      |
|------------------------------------------|-------|-------|------|------|
|                                          | 观测码   | 预测码   | 1    | -1   |
| A/( $\times 10^6$ CFU·mL <sup>-1</sup> ) | $X_1$ | $x_1$ | 8    | 6    |
| B/( $\times 10^6$ CFU·mL <sup>-1</sup> ) | $X_2$ | $x_2$ | 8    | 6    |
| C/h                                      | $X_3$ | $x_3$ | 144  | 96   |
| F/℃                                      | $X_4$ | $x_4$ | 46.0 | 42.0 |
| H                                        | $X_5$ | $x_5$ | 5    | 4    |
| I/(g·(100 mL) <sup>-1</sup> )            | $X_6$ | $x_6$ | 0.10 | 0.05 |

醇产乙醇效应率的影响最大(37.5%),其次是酿酒酵母 AS2.119 接种量(26.6%),二者的总效应率为 64.1%;发酵时间的发酵产乙醇效应率为 16.0%,也对乳清液发酵产乙醇有重要作用;另外, A、B、C、F 和 H 对发酵产乙醇效应率的影响表现为极显著, I 表现为显著。

**2.1.3 最陡爬坡试验结果分析** 基于表 3 和表 4 数据的最陡爬坡试验结果见表 5。由表 5 可知, 起点+3 ▽对应的乙醇浓度最高, 为 5.9 %vol, 此时马氏酵母 CGMCC13907 和酿酒酵母 AS2.119 的接种量均为  $4 \times 10^6$  CFU/mL, 发酵时间为 150 h, 发酵温度为 41 °C、发酵 pH 值为 5.7, 姜粉用量为 0.090 g/100 mL。

**2.2 BBD 试验结果分析**

选取表 5 中乙醇浓度最高值所对应的各参数作为 BBD 试验设计的零水平, 创建六因素三水平试验方案。BBD 试验的因素编码及水平见表 6, 试验结果见表 7。对表 7 中的数据进行二次回归分析, 结果见表 8。在表 8 的基础上建立的多元二次回归方程如下:

$$Y = 6.38 + 0.13X_1 + 0.73X_2 + 0.488X_3 - 0.15X_4 - 0.27X_5 + 0.74X_6 - 0.75X_1^2 - 1.08X_2^2 - 0.79^2X_3 + 0.29X_4^2 + 0.34X_5^2 + 0.23X_6^2 - 0.39X_1X_2 - 0.14X_1X_4 - 0.15X_2X_3 - 0.56X_2X_4 - 0.16X_2X_5 - 0.29X_3X_4 - 0.50X_3X_5 - 0.26X_4X_5 + 0.43X_5X_6$$

由表 8 可知, 多元二次回归方程的置信度  $R^2 = 99.51$ , 失拟项不显著 ( $P > 0.05$ ), 纯误差项极显著 ( $P < 0.01$ ), 即模型的稳定性和可靠性较高, 可作为预测乙醇浓度变化趋势的数学模型。

**2.3 响应曲面分析**

参考张晗等<sup>[29]</sup>的方法, 利用 Design-Expert 13 软件系统的响应面绘制功能绘制的各因素交互作用的响应曲面和等高线图如图 1 所示。由图 1 可知, 当马氏酵母 CGMCC13907 接种量为  $3.54 \times 10^6 \sim 4.47 \times 10^6$  CFU/mL、酿酒酵母 AS2.119 接种量为  $3.53 \times 10^6 \sim 4.31 \times 10^6$  CFU/mL 时, 乙醇浓度较高 ( $\geq 6.5$  %vol)。当马氏酵母 CGMCC13907 接种量为  $3.54 \times 10^6 \sim 4.47 \times 10^6$  CFU/mL、发酵温度为 40.0~41.0 °C 时, 乙醇浓度增至 7.5 %vol, 超过此范围, 乙醇浓度会下降。当酿酒酵母 AS2.119 接种量为  $3.63 \times 10^6 \sim 4.02 \times 10^6$  CFU/mL、发酵时间为 146~151 h 时, 乙醇浓度较高 ( $\geq 6.5$  %vol); 当酿酒酵母 AS2.119 接种量低于  $4.34 \times 10^6$  CFU/mL、发酵温度为 40.0~41.5 °C 时, 乙醇浓度随着酿酒酵母 AS2.119 接种量的增加而增加, 在酿酒酵母 AS2.119 接种量为  $4.20 \times 10^6$  CFU/mL 时达最大值 (7.5 %vol), 而当发酵温度高于 41.5 °C 时, 乙醇浓度会下降。当发酵时间为 140~151 h、发酵 pH 值为 5.3~6.1 时, 乙醇浓度呈增加趋势, 在 150 h 时达到最大值(7.0 %vol), 超过此范围, 乙醇浓度会下降。当发酵温度为 40.8~42.0 °C、发酵 pH 值为 5.6~6.1 时, 乙醇浓度降低 ( $\leq 5.5$  %vol); 当发酵温度高于 41.0 °C、发酵 pH 值大于 5.6 时, 乙醇浓度反而会下降。

基于响应曲面分析, 得到乙醇发酵阶段的最优工艺为: 马氏酵母 CGMCC13907 接种量  $4.0 \times 10^6$  CFU/mL, 酿酒酵母 AS2.119 接种量  $4.5 \times 10^6$  CFU/mL, 发酵时间 151 h, 发酵温度 40.0 °C, 发酵 pH 值 5.6, 姜粉用量 0.09 g/100 mL。将最优工

表 5 最陡爬坡试验结果  
Table 5 Result of steepest climbing test

| 步长     | A/( $\times 10^6$ CFU·mL <sup>-1</sup> ) | B/( $\times 10^6$ CFU·mL <sup>-1</sup> ) | C/h | F/°C | H   | I/(g·(100 mL) <sup>-1</sup> ) | Y/(%vol) |
|--------|------------------------------------------|------------------------------------------|-----|------|-----|-------------------------------|----------|
| 起点     | 7                                        | 7                                        | 120 | 44   | 4.5 | 0.075                         |          |
| ▽      | -1                                       | -1                                       | 10  | -1   | 0.4 | 0.005                         |          |
| 起点+1 ▽ | 6                                        | 6                                        | 130 | 43   | 4.9 | 0.080                         | 5.5      |
| 起点+2 ▽ | 5                                        | 5                                        | 140 | 42   | 5.3 | 0.085                         | 5.8      |
| 起点+3 ▽ | 4                                        | 4                                        | 150 | 41   | 5.7 | 0.090                         | 5.9      |
| 起点+4 ▽ | 3                                        | 3                                        | 160 | 40   | 6.1 | 0.095                         | 5.6      |
| 起点+5 ▽ | 2                                        | 2                                        | 170 | 39   | 6.5 | 0.100                         | 4.7      |
| 起点+6 ▽ | 1                                        | 1                                        | 180 | 38   | 6.9 | 0.105                         | 4.1      |

表6 BBD 试验的因素编码及水平

Table 6 Factor codings and levels of BBD test

| 因素                                                 | 编码                                                 |       | 水平    |       |       |
|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
|                                                    | 观测码                                                | 预测码   | 1     | 0     | -1    |
|                                                    | $A/(\times 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1})$ | $X_1$ | $x_1$ | 5     | 4     |
| $B/(\times 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1})$ | $X_2$                                              | $x_2$ | 5     | 4     | 3     |
| $C/\text{h}$                                       | $X_3$                                              | $x_3$ | 160   | 150   | 140   |
| $F/^\circ\text{C}$                                 | $X_4$                                              | $x_4$ | 42.0  | 41.0  | 40.0  |
| $H$                                                | $X_5$                                              | $x_5$ | 6.1   | 5.7   | 5.3   |
| $I/(\text{g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1})$         | $X_6$                                              | $x_6$ | 0.095 | 0.090 | 0.085 |

表7 BBD 试验结果

Table 7 Results of BBD test

| 试验号 | A  | B  | C  | F  | H  | I  | Y/(%vol) |
|-----|----|----|----|----|----|----|----------|
| 1   | -1 | -1 | 0  | -1 | 0  | 0  | 3.1      |
| 2   | 1  | -1 | 0  | -1 | 0  | 0  | 4.4      |
| 3   | -1 | 1  | 0  | -1 | 0  | 0  | 6.4      |
| 4   | 1  | 1  | 0  | -1 | 0  | 0  | 6.2      |
| 5   | -1 | -1 | 0  | 1  | 0  | 0  | 4.2      |
| 6   | 1  | -1 | 0  | 1  | 0  | 0  | 4.9      |
| 7   | -1 | 1  | 0  | 1  | 0  | 0  | 5.2      |
| 8   | 1  | 1  | 0  | 1  | 0  | 0  | 4.5      |
| 9   | 0  | -1 | -1 | 0  | -1 | 0  | 3.1      |
| 10  | 0  | 1  | -1 | 0  | -1 | 0  | 5.2      |
| 11  | 0  | -1 | 1  | 0  | -1 | 0  | 5.3      |
| 12  | 0  | 1  | 1  | 0  | -1 | 0  | 7.0      |
| 13  | 0  | -1 | -1 | 0  | 1  | 0  | 3.8      |
| 14  | 0  | -1 | -1 | 0  | 1  | 0  | 5.3      |
| 15  | 0  | 1  | 1  | 0  | 1  | 0  | 4.2      |
| 16  | 0  | 1  | 1  | 0  | 1  | 0  | 5.0      |
| 17  | 0  | -1 | -1 | -1 | 0  | -1 | 4.7      |
| 18  | 0  | 1  | 1  | -1 | 0  | -1 | 6.3      |
| 19  | 0  | 0  | -1 | 1  | 0  | -1 | 4.9      |
| 20  | 0  | 0  | 1  | 1  | 0  | -1 | 5.4      |
| 21  | 0  | 0  | -1 | -1 | 0  | 1  | 6.2      |
| 22  | 0  | 0  | 1  | -1 | 0  | 1  | 7.5      |
| 23  | 0  | 0  | -1 | 1  | 0  | 1  | 6.6      |
| 24  | 0  | 0  | 1  | 1  | 0  | 1  | 7.0      |
| 25  | -1 | 0  | 0  | -1 | -1 | 0  | 6.2      |
| 26  | 1  | 0  | 0  | -1 | -1 | 0  | 6.7      |
| 27  | -1 | 0  | 0  | 1  | -1 | 0  | 6.6      |
| 28  | 1  | 0  | 0  | 1  | -1 | 0  | 6.9      |
| 29  | -1 | 0  | 0  | -1 | 1  | 0  | 6.1      |
| 30  | 1  | 0  | 0  | -1 | 1  | 0  | 6.7      |
| 31  | -1 | 0  | 0  | 1  | 1  | 0  | 5.6      |
| 32  | 1  | 0  | 0  | 1  | 1  | 0  | 5.6      |
| 33  | 0  | -1 | 0  | 0  | -1 | -1 | 5.0      |
| 34  | 0  | 1  | 0  | 0  | -1 | -1 | 6.6      |
| 35  | 0  | -1 | 0  | 0  | 1  | -1 | 3.8      |
| 36  | 0  | 1  | 0  | 0  | 1  | -1 | 5.1      |

表7(续)

| 试验号 | A  | B  | C  | F | H  | I  | Y/(%vol) |
|-----|----|----|----|---|----|----|----------|
| 37  | 0  | -1 | 0  | 0 | -1 | 1  | 5.5      |
| 38  | 0  | 1  | 0  | 0 | -1 | 1  | 7.5      |
| 39  | 0  | -1 | 0  | 0 | 1  | 1  | 6.2      |
| 40  | 0  | 1  | 0  | 0 | 1  | 1  | 7.5      |
| 41  | -1 | 0  | -1 | 0 | 0  | -1 | 3.8      |
| 42  | 1  | 0  | -1 | 0 | 0  | -1 | 4.2      |
| 43  | -1 | 0  | 1  | 0 | 0  | -1 | 4.7      |
| 44  | 1  | 0  | 1  | 0 | 0  | -1 | 4.8      |
| 45  | -1 | 0  | -1 | 0 | 0  | 1  | 5.0      |
| 46  | 1  | 0  | -1 | 0 | 0  | 1  | 5.5      |
| 47  | -1 | 0  | 1  | 0 | 0  | 1  | 6.1      |
| 48  | 1  | 0  | 1  | 0 | 0  | 1  | 6.5      |
| 49  | 0  | 0  | 0  | 0 | 0  | 0  | 6.4      |
| 50  | 0  | 0  | 0  | 0 | 0  | 0  | 6.3      |
| 51  | 0  | 0  | 0  | 0 | 0  | 0  | 6.5      |
| 52  | 0  | 0  | 0  | 0 | 0  | 0  | 6.4      |
| 53  | 0  | 0  | 0  | 0 | 0  | 0  | 6.3      |
| 54  | 0  | 0  | 0  | 0 | 0  | 0  | 6.5      |

表8 BBD 试验回归分析

Table 8 Regression analysis of BBD test

| 方差来源  | 自由度   | 平方和   | 均方   | F 值    | P 值                |
|-------|-------|-------|------|--------|--------------------|
| 回归    | 21    | 65.06 | 3.10 | 312.26 | 0.001 <sup>a</sup> |
| 线性系数  | 6     | 34.51 | 5.75 | 579.73 | 0.001 <sup>a</sup> |
| 平方系数  | 6     | 21.26 | 3.54 | 357.10 | 0.001 <sup>a</sup> |
| 交互系数  | 9     | 9.30  | 1.03 | 104.10 | 0.001 <sup>a</sup> |
| 残差误差  | 32    | 0.32  | 0.01 |        |                    |
| 失拟    | 27    | 0.29  | 0.01 | 1.89   | 0.248 <sup>c</sup> |
| 纯误差   | 5     | 0.03  | 0.01 |        | 0.001 <sup>a</sup> |
| $R^2$ | 99.51 |       |      |        |                    |

艺代入二次回归模型,可得乙醇浓度预测值为 8.86 %vol。对最优条件进行 3 次验证实验,可得乙醇浓度实测值为 8.70 %vol,预测值与实测值间的偏离度为 0.018,即本研究得到的最优条件具有参考意义。工艺优化后的乙醇浓度较工艺优化前的平均乙醇浓度(5.57 %vol)增加了 56.2%,且能满足乳清醋的醋酸发酵阶段需求。

### 3 结论

本研究以马氏酵母 CGMCC13907 和酿酒酵母 AS2119 作为混合发酵剂(接种比 1:1.1)发酵乳清液制备乳清醋,并优化其乙醇发酵阶段的工艺,得到如下结论:乙醇发酵阶段的最优工艺为马氏酵母 CGMCC13907 接种量  $4.0 \times 10^6 \text{ CFU/mL}$ ,酿酒酵母

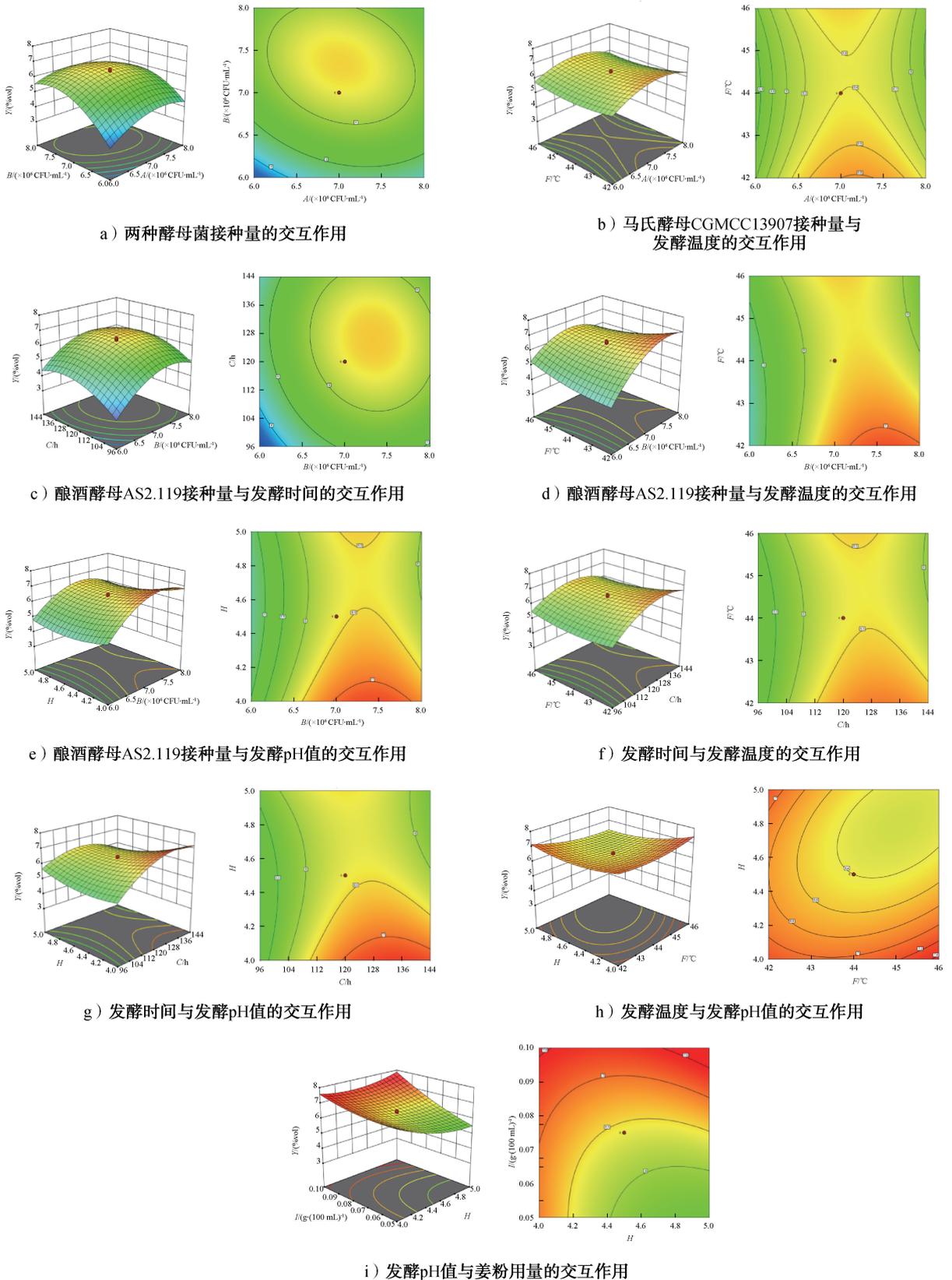


图1 各因素交互作用的响应曲面图和等高线图

Fig. 1 Response surface maps and contour maps for each factor interaction

AS2. 119 接种量  $4.5 \times 10^6$  CFU/mL, 发酵时间 151 h, 发酵温度 40.0 °C, 发酵 pH 值 5.6, 姜粉用量 0.09 g/100 mL, 在该条件下, 可获得较高的乙醇浓度 (8.70 %vol), 且该乙醇浓度能够满足乳清醋后续醋酸发酵阶段的需求。本研究结果可有效解决乳清液中乳糖难以被酵母菌所利用的难题, 为乳制品加工副产物的增值和转化应用提供参考。在下一步研究中, 笔者将对乳清液发酵过程中乳糖、 $\beta$ -半乳糖苷酶、葡萄糖等成分含量的变化规律进行深入研究, 以揭示酵母菌混合发酵乳清液的生化机理。

### 参考文献:

- [1] PIRES A F, MARNOTES N G, RUBIO O D, et al. Dairy by-products: A review on the valorization of whey and second cheese whey [J]. *Foods*, 2021, 10(5): 1067.
- [2] KADAM B, AMBADKAR R, RATHOD K, et al. Health benefits of whey: A brief review [J]. *International Journal of Livestock Research*, 2018, 8(5): 31.
- [3] 王英男, 黄艳玲, 刘琳, 等. 乳清液制备细菌纤维素条件的优化 [J]. *中国乳品工业*, 2019, 47(8): 26-28, 34.
- [4] KRÓLCZYK J, DAWIDZIUŁ T, JANISZEWSKA-TURAK E, et al. Use of whey and whey preparations in the food industry: A review [J]. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 2016, 66(3): 157-165.
- [5] KUMARI A, CHOUDHARY S. Whey proteins as a functional food ingredient [M]. Delhi: Narendra Publishing House, 2019.
- [6] 岳子尧. 乳杆菌抗菌活性肽粉生产工艺的研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2023.
- [7] 秦川. 甜型乳清酒发酵菌株的筛选及其应用 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2021.
- [8] 玛丽娜, 刘扬, 乌兰塔娜, 等. 乳清醋营养成分分析及功能性评价研究 [J]. *中国调味品*, 2023, 48(9): 24-29.
- [9] KOKKILIGADDA A, BENIWAL A, SAINI P, et al. Utilization of cheese whey using synergistic immobilization of  $\beta$ -galactosidase and *Saccharomyces cerevisiae* cells in dual matrices [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2016, 179(8): 1469-1484.
- [10] SALAZAR Y, VALLE P A, RODRÍGUEZ E, et al. Mechanistic modelling of biomass growth, glucose consumption and ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* in batch fermentation [J]. *Entropy*, 2023, 25(3): 497.
- [11] FONSECA G G, HEINZLE E, WITTMANN C, et al. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 79(3): 339-354.
- [12] YADAV J S S, BEZAWADA J, YAN S, et al. Permeabilization of *Kluyveromyces marxianus* with mild detergent for whey lactose hydrolysis and augmentation of mixed culture [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2014, 172(6): 3207-3222.
- [13] KARIM A, AIDER M. Bioconversion of electro-activated lactose, whey and whey permeate to produce single cell protein, ethanol, aroma volatiles, organic acids and fat by *Kluyveromyces marxianus* [J]. *International Dairy Journal*, 2022, 129: 105334.
- [14] CERNAK P, ESTRELA R, PODDAR S, et al. Engineering *Kluyveromyces marxianus* as a robust synthetic biology platform host [J]. *mBio*, 2018, 9(5): e01410-e01418.
- [15] BANSAL S, OBEROI H S, DHILLON G S, et al. Production of  $\beta$ -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* MTCC 1388 using whey and effect of four different methods of enzyme extraction on  $\beta$ -galactosidase activity [J]. *Indian Journal of Microbiology*, 2008, 48(3): 337-341.
- [16] SU M, HU Y, CUI Y, et al. Production of  $\beta$ -glucosidase from okara fermentation using *Kluyveromyces marxianus* [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2021, 58(1): 366-376.
- [17] CHUPAZA M H, PARK Y R, KIM S H, et al. Bioethanol production from *Azolla filiculoides* by *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis*, *Candida lusitanae*, and *Kluyveromyces marxianus* [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2021, 193(2): 502-514.
- [18] RUCHALA J, KURYLENKO O O, DMYTRUK K V, et al. Construction of advanced producers of first- and second-generation ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* and selected species of non-conventional yeasts (*Scheffersomyces stipitis*, *Ogataea polymorpha*) [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2020, 47(1): 109-132.
- [19] 纪铁鹏. 克鲁维酵母和酿酒酵母发酵性能及乳清酒发酵工艺研究 [J]. *内蒙古农业大学学报(自然科学版)*, 2014, 35(1): 125-130.
- [20] YAO Z, GUO Y F, WANG H, et al. A highly efficient transcriptome-based biosynthesis of non-ethanol chemicals in Crabtree negative *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 2023, 16(1): 37.
- [21] PHONG H X, KLANRIT P, DUNG N T P, et al. High-temperature ethanol fermentation from pineapple waste hydrolysate and gene expression analysis of thermotolerant yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Scientific Reports*, 2022, 12(1): 13965.
- [22] YAZICI S O, SAHIN S, BIYIK H H, et al. Optimization of fermentation parameters for high-activity inulinase production and purification from *Rhizopus oryzae* by Plackett-Burman and Box-Behnken [J]. *Journal of Food Science*

- and Technology, 2021, 58(2): 739-751.
- [23] ABONAMA O, MAHROUS H, BAZ A E, et al. Production of citric acid by *Candida lipolytica* under fermentation conditions using a plackett-burman design [J]. American Journal of Food and Nutrition, 2014, 2: 43-48.
- [24] OO K S, THAN S, OO T H. Osmotic dehydration of toddy fruit cubes in sugar solution using response surface methodology [J]. American Journal of Food Science and Technology, 2019, 7: 175-181.
- [25] CHEN F L, ZHANG Q, FEI S M, et al. Optimization of ultrasonic circulating extraction of samara oil from *Acer saccharum* using combination of Plackett-Burman design and Box-Behnken design [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2017, 35(Pt A): 161-175.
- [26] KARMOKER J R, HASAN I, AHMED N, et al. Development and optimization of acyclovir loaded mucoadhesive microspheres by box-behnken design [J]. Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences, 2019, 18(1): 1-12.
- [27] 中华人民共和国国家卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准 酒和食用酒精中乙醇浓度的测定: GB 5009. 225—2023 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2023.
- [28] 中华人民共和国国家卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定: GB 4789. 2—2022 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2022.
- [29] 张晗, 周利琴, 刘志国, 等. 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取富硒百香果籽油的工艺研究 [J]. 轻工学报, 2023, 38(3): 46-54.

## Parameters optimization of ethanol fermentation process in whey liquid fermented by combined yeasts

Malina, Aorigele, Simujide, TAO Yu

College of Life Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China

**Abstract:** *Kluyveromyces markus* CGMCC13907 and *Saccharomyces cerevisiae* AS2. 119 were selected as mixed starter cultures for fermentation of whey liquid to produce whey vinegar. Plackett-Burman Design (PBD) and Box-Behnken Design (BBD) were used to optimize the ethanol fermentation process. The results showed that the optimal ethanol fermentation process was *K. markus* CGMCC13907 inoculum volume  $4.0 \times 10^6$  CFU/mL, *S. cerevisiae* AS2. 119 inoculum volume  $4.5 \times 10^6$  CFU/mL, fermentation time 151 h, fermentation temperature 40.0 °C, fermentation pH value 5.6, ginger powder dosage 0.09 g/100 mL. Under this condition, the concentration of ethanol in fermentation liquid reached 8.70 % vol, which increased by 56.2% compared with that before optimization. *K. markus* CGMCC13907 combined with *S. cerevisiae* AS2. 119 could effectively solve the lactose fermentation problem in the process of making vinegar from whey, and achieve a better ethanol concentration.

**Key words:** whey liquid; whey vinegar; mixed fermentation with yeast; ethanol fermentation; PBD experiment design; BBD experiment design

[责任编辑:杨晓娟]