

高浓度酒精发酵

侯保朝¹ 杜风光² 郭永豪¹ 贾新成¹ 刘代武³

(1.河南农业大学生物技术与食品科学学院,河南 南阳 473000 2.河南天冠企业集团,河南 南阳 473000;
3.安琪酵母股份有限公司,湖北 宜昌 443003)

摘要: 高浓酒精发酵是以提高单位体积内发酵醪液中淀粉含量,在适量的酿酒酵母菌作用下,在一定的时间内获得最大量的酒精。影响高浓酒精发酵的因素有:葡萄糖浓度、酒精含量、溶解氧浓度、酵母菌细胞密度、发酵温度和副营养物匮乏等。提高高浓酒精发酵的方法有:改良筛选优良酵母生产菌株、改进发酵系统、利用复合酶添加工艺和提高营养限制因子利用。(孙悟)

关键词: 高浓度发酵; 酒精; 酵母菌

中图分类号:TS262.2;TQ920;TS261.1 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2005)04-0093-04

Fermentation of High Concentration Alcohol

HOU Bao-chao¹, DU Feng-guang², GUO Yong-hao¹, JIA Xin-cheng¹ and LIU Dai-wu³

(1.Biotech and Food Science College of He'nan Agriculture University, Nanyang, He'nan 473000; 2. He'nan Tianguan Enterprise Group, Nanyang, He'nan 473000 3. Angel Yeast Co. Ltd., Yichang, Hubei 443003, China)

Abstract: The purpose of high concentration alcohol fermentation was to achieve maximum alcohol within certain period by improving starch content in fermented liquor of unit volume and through the action of adequate quantity of yeast. The factors influencing high concentration alcohol fermentation included: glucose concentration, alcohol content, dissolved oxygen concentration, yeast cell density, fermentation temperature and scarcity of assistant nutritive substance etc. The approaches to improve high concentration alcohol fermentation included: seperating and reforming of quality yeast strains, improvement of fermentation system, application of the technique of compound enzyme addition, and utilization of nutrition limiting factor. (Tran. by YUE Yang)

Key words: high concentration alcohol fermentation; alcohol; yeast

酒精作为食品和化工原料,一直是我国发酵行业的主要产品,用微生物发酵生产酒精的历史在我国历史悠久。始于 20 世纪 70 年代中期的石油危机给酒精行业带来了前所未有的良机,随着人们环保意识的不断加强,酒精作为一种清洁的燃料越来越受到人们的重视^[1]。因此,许多科学家和科学工作者开始致力于应用生物技术开发酒精发酵的新菌种、新工艺的开创性研究,而酒精浓醪发酵作为解决当前实际生产的可行方法,具有极其重要的意义,已成为当前酒精行业研究的热门课题。

1 高浓度酒精发酵

所谓的高浓度酒精发酵,是以提高单位体积内发酵醪液中淀粉的含量,在适量的酿酒酵母菌作用下,在一定的时间内力求得到最多的发酵终产物——酒精。现在,一般的酒精生产企业淀粉质原料糖化醪的可溶性固形物含量为 20%~25%(w/v),因此有人将高浓度酒精发酵定义为每 1 L 发酵液中含 300 g(30%(w/v))或者

更高的可溶性固形物的酒精发酵^[2-4]。而在理论上当发酵醪液葡萄糖浓度达到 28%(w/v)左右时(相当于 1 L 发酵醪液中含固形物 300 g),发酵成熟醪中酒精浓度可达 18%(v/v)。

与传统的酒精发酵工艺相比,高浓度酒精发酵具有如下明显的优点:①单位设备的生产率提高:例如若要在发酵成熟醪液中的酒分达到 12.5%(v/v),如果发酵罐体积为 1000 m³,则发酵罐中酒精的量为:1000×12.5%×0.7893 t/m³=99.125 t;如果采用高浓度醪液发酵,发酵成熟醪中酒分达到 18%(v/v),则最终酒精的量可以达到 124.074 t^[5]。在基本相同或接近的发酵时间情况下,高浓度酒精发酵可以明显地提高单位设备的生产率和利用率。②降低能耗:高浓酒精发酵因为增加了单位体积醪液中淀粉的含量,增加了单位体积醪液中酒精的含量和其他固形物的含量,减少了拌料过程中水的投入,可以大大降低蒸煮、发酵、蒸馏和 DDGS 浓缩干燥过程

中的能量消耗^[3-5]。

2 影响高浓度酒精发酵的因素

2.1 酵母菌的产酒机理

在酒精发酵过程中,酵母菌处于主体地位。研究发现,处于对数生长期的酵母细胞产生酒精的能力是稳定期的酵母细胞产酒能力的 30 倍,而处于稳定期的酵母细胞所消耗的糖类主要是维持酵母菌自身的生长代谢所需。资料表明,酵母菌需要能量时才吸收和发酵糖类^[6]。正是由于能量的产生、菌体的生长和乙醇的产生三者是紧密联系在一起的,所以有必要在发酵过程中在发酵培养基里加入相应的酵母生长的必需物质,创造条件使酵母菌维持旺盛的生长繁殖能力,以避免不彻底发酵的发生。对于高浓度酒精发酵而言,其发酵醪液中的酵母所需营养成分显得尤为重要。

2.2 葡萄糖浓度的影响

葡萄糖是酵母菌进行酒精发酵的主要基质。当葡萄糖浓度低于 10 g/L 时,其消耗速度和糖浓度成均匀的直线关系,但是目前的酒精生产中葡萄糖浓度远远高于这一数值。但是当葡萄糖的浓度超过一定浓度值时(许多学者认为是 150 g/L),它对酵母菌的发酵和呼吸作用都产生抑制作用。要实现高浓度酒精发酵,必须解决高浓度葡萄糖的抑制作用。

2.3 酒精的抑制作用

酒精是酵母菌的代谢产物,它会对酵母菌产生毒害作用。随着发酵醪液中酒精浓度的增加,乙醇可以进入到细胞膜的疏水区,降低了疏水相互作用力(这种作用力对维持细胞膜的完整性是非常重要的)。另外乙醇在疏水区的存在还会降低范德华力的相互作用,增加细胞膜的运动性和疏水区的极性,使细胞膜减弱对极性分子自由交换的疏水性障碍作用^[8]。不同的酵母菌株它的耐酒精能力是不同的,但是一般情况下,当发酵醪液中的酒精含量达到 23 %(v/v)时,酵母菌细胞不再生长,也不产生酒精。当酒精含量低于 3.8 %(v/v)时,它对酵母菌的抑制作用才可忽略不计。

2.4 溶解氧浓度的影响

氧气可以破坏酵母菌酒精发酵的厌氧代谢过程,从而使酵母菌采取有氧呼吸,不进行厌氧发酵,不产或者仅产生少量酒精。日本的福井郎指出,即使在充足氧的条件下,如果有葡萄糖存在,酵母菌细胞也可以通过发酵途径增殖,此时酵母菌细胞是受阻抑细胞,具有呼吸能低的特点,他认为高浓度葡萄糖的存在妨碍酵母菌细胞呼吸系的发达,并且减少“功能性”线粒体的个数,从而使无氧呼吸的酒精发酵途径在一定水平上有所提高^[9]。常规的酒精发酵醪液中,溶解氧的数量已经能够保证酵母菌对氧的需要。而在高浓度酒精发酵过程中,有限量氧气的存在,可以为酵母菌提供合成细胞的原生质膜和线粒体中的聚不饱和脂肪酸和类脂质,从而保护细胞

膜的完整性,利于酒精发酵。

2.5 酵母菌细胞密度的限制

酒精是酵母菌生长代谢的产物,一般情况下,发酵醪液中酵母菌细胞的密度越高,单位时间、单位容积产生的酒精就越多,效率就越高。但是在一般的间歇发酵工艺中,受发酵醪液中营养物质的含量、酒精代谢产物浓度及酵母菌自身生理和遗传等因素的影响,醪液中的酵母菌细胞密度会有一个极限值^[7,10]。对于高浓度酒精发酵来说,由于发酵醪液中的葡萄糖的浓度比一般的发酵醪液中高出很多,此时加入酵母菌的数量也应该比一般的间歇发酵醪液中要多,但是考虑到生产成本以及酵母菌个体间的相互影响,酵母菌细胞的密度应该增加到一个合理的范围内,从而防止酵母菌因为过量增殖而消耗多余的原料糖,同时又能保证酵母菌细胞正常生理代谢所需要的糖,实现良性发酵代谢。

2.6 温度条件

在高浓度酒精发酵中,由于葡萄糖浓度很高,溶液的渗透压增加,容易导致细胞膜破裂,而此时如果发酵醪液的温度仍维持在一般发酵的最适温度 32 ℃,则有可能使磷脂分子在膜内作快速的侧向扩散或者侧向运动,频繁的在脂双层的同一层中与邻近的分子进行交换。结果膜内脂的流动性增加,膜的完整性容易遭到破坏。据研究表明,高浓度酒精发酵的最适温度是 27 ℃^[5-7]。此外,温度升高有利于与酵母菌竞争葡萄糖的乳酸菌的生长,从而影响发酵效率,提高生产成本。由此可见,温度是制约高浓度酒精发酵实际生产的一个关键因素。

2.7 副营养物质匮乏的影响

在高浓度发酵中如果各种营养物质供应充足,使酵母菌生长健壮,可以部分起到抵抗高浓度葡萄糖所造成的渗透压的影响,使酵母菌的发酵强度处于较高的水平。但是,随着发酵时间的延续,除了碳源供应充足外,其他的营养物质出现匮乏,从而影响酵母菌的正常新陈代谢,使其发酵能力下降,细胞活力偏低,影响最终发酵的彻底性和达到理想的酒分^[12,11-12]。因此,寻找并及时补充这类副营养物在高浓度酒精发酵过程中也极其重要。

3 高浓度酒精发酵的生产研究进展

3.1 实际生产情况

据有关资料显示,美国有的酒精企业发酵浓醪中酒精浓度可达 18 %(v/v),在实验室条件下可做到 23 %(v/v)^[5-6]。他们从工厂的发酵管理、原料的粉碎粒度、加入酵母所需的营养元素、提高酵母的抗逆性、诱变菌株等方面对影响酒精发酵的因素进行改进,从而达到提高酒精产率的目的^[1,5]。

目前我国的酒精企业成熟发酵醪的酒分大多维持在 12 %(v/v)左右。河南天冠集团试验中心以小麦为原料,在浓醪发酵方面做出了较为成功的尝试,在总糖浓度维持在 26 %~27 %的情况下,成熟醪酒分可维持在

16 % (v/v) 左右,并且发酵终了的各项指标均达到较为理想的数值。

在国内,以生产酵母为主的湖北安琪集团,在实验室中利用其活性干酵母发酵淀粉质原料,已经作到料水比 1:1.8~2,实现发酵醪液中淀粉含量达到 23 %~25 % (w/v),最终的酒分也已达到 16 % (v/v) 左右。

3.2 高浓度酒精发酵的科研动态

3.2.1 改良酵母菌生产菌株

提高酒精酵母的耐酒精程度可以使得发酵醪中的酒精浓度增高,从而降低酒精蒸馏的能耗,为此需筛选耐高酒精浓度的酵母菌,日本在清酒酿造方面所选育的酵母菌具有耐高酒精度的特性。另外,毛志群等采用含有高浓度酒精选择性培养基从自然界中得到 115 株耐高温酵母,经过初筛、复筛,得到 1 株高产酒精酵母 SP-48,在料水比 1:2,发酵时间 72 h 条件下,成熟醪酒分可达 16.2 % (v/v)^[13]。刘建军等对高产酒精酵母的选育也作了卓有成效的工作,它通过从土壤、酒醅等样品中分离筛选并通过热冲击处理、紫外线和 Co60- γ 射线的物理因子照射,获得一株高产酒精酵母 NHY4-36,以玉米淀粉为原料,32 °C 发酵 60~68 h,可产酒精度 17.5 % (v/v),耐酒度达 20 % (v/v) 以上,并且适合边糖化边发酵工艺^[14]。20 世纪 80 年代初,日本九州大学的林田教授等人,从天然样品中选育的一株耐高温酵母菌 W-Y-2,在人工合成培养基中,以蔗糖或淀粉糖化液为底物,在 72 h 内可产生 18.6 % (v/v) 以上的乙醇^[15]。

为了进行高浓度的酒精发酵,对发酵过程中所选择的菌株,进行耐高渗透压的酵母菌细胞所具有的生理特性研究。林秋叶等从两株耐高渗的酵母菌出发,分别以葡萄糖和蔗糖来调节糖度,在糖度为 30 Bx,采用流加氮源,添加无机离子和定期通氧的方法,对这些耐高渗酿酒酵母在发酵过程中的几个重要生理特性指标:细胞形态、降糖能力、pH 变化、生殖曲线以及最终酒分等几个方面进行测定,从而为高浓度酒精发酵选择菌种提供依据^[16]。

3.2.2 改进生产工艺

3.2.2.1 对发酵系统的改进

包括:①透析膜发酵系统:它是指在发酵器的中部装有透析膜,从而将其分为发酵区和进出料区,糖液进入料区,糖分通过渗透膜进入发酵区,发酵区保持有浓度的酵母菌细胞,将糖液迅速发酵,产生的酒精通过渗透膜进入出料区,并随出料排出^[7,10]。②萃取发酵系统:它的实质是将发酵醪液中的酒精用溶剂萃取出来,从而保证发酵醪液中的低酒精浓度,将酒精的抑制作用降低到最低限度。③真空发酵技术:它是指将发酵罐保持在一定的真空度和温度下,糖化醪不断流加,并使液面维持在一定的水平,酒精在负压下处于沸腾状态,蒸发的酒精水蒸汽被抽走、冷凝,而使发酵罐中酒精浓度降低。它可以消除高浓度酒精发酵所带来的高酒分对酵

母菌生长的抑制,另外据此原理设计的连续急闪蒸发发酵系统,也极具发展前景^[7,17]。④连续流加工艺:江南大学的吕欣等对此发酵策略作了初步研究,对一株高浓度酒精酵母从影响流加发酵的关键因素:初糖浓度、流加糖浓度和流加速度几方面,采用均匀实验设计方法,以酒精得率为评价指标,得出了最优流加条件,并对此作出了回归分析^[7,18]。

3.2.2.2 复合酶添加工艺

目前在生产实际中,以及各种淀粉质原料的酒精发酵实验中,采用各种酶顺序添加的工艺,已经成为共识^[7]。但是由于各种原料中淀粉含量及蛋白质含量等存在差异,所以在液化酶、糖化酶以及蛋白酶等各种酶的添加中,对其添加时间、添加量和添加方式上也存在不同的观点,尤其在高温酒精发酵中,料水比接近 1:2 或者更低,这样在实际生产中势必会造成发酵醪液的粘度增大,影响其输送的效率,增加输送的难度。黄宇彤指出,在玉米粉加热过程中它的粘度升高,主要是由于淀粉的糊化和蛋白质的变性引起的,故提出在玉米粉糊化点前(60 °C),加入 10 u/g 的液化酶预处理 20 min,可降低 60 % 的峰值粘度和峰值粘度持续时间,并且可以防止玉米粉的老化现象发生。因为在高温酒精发酵过程中,由于投料比例的加大,势必会造成发酵醪液的粘度增加,因此对于糊化、液化的研究必将对实际生产起到积极的作用^[19]。

在高温酒精发酵过程中,为弄清中温(95~97 °C)蒸煮高浓度发酵中耐高温 α -淀粉酶和糖化酶的合理添加量,池振明等对此作了研究。并最终确定利用耐高温的 α -淀粉酶在 95~97 °C 下同时糊化和液化淀粉,接着在 60 °C 下加高转化率的糖化酶进行糖化,最后在 30 °C 下加酵母悬液进行发酵,结果酵母菌 W4 在 60 h 内可产生 18.3 % (v/v) 的乙醇,残还原糖和残总糖分别为 1.2 % 和 4.1 %^[20]。

但有的学者认为,可以采用边糖化边发酵的生产工艺,由于高浓度的葡萄糖对酵母菌形成的高渗透压,抑制了酵母菌细胞的生长繁殖,所以葡萄糖必须采用“定量供应”的办法。具体的措施就是选择合适的糖化酶种类,并进行量的控制,其目的是为了提供维持酵母菌优良长势的葡萄糖的释放量和最大的酒精生产量之间的理想平衡,同时可以避免高温峰值。对于黑曲霉所产生的糖化酶而言,发酵初始的 pH 是其作用的最适 pH,控制这类糖化酶的用量可以有效控制发酵前期葡萄糖的浓度;对于根霉型糖化酶而言,它的最适 pH 与发酵中后期醪液中的 pH 相近,因此它的添加可有效控制发酵醪液中葡萄糖的定量释放,其综合利用的结果就是一个稳定的、缓慢的释放葡萄糖和一个稳定的被酵母菌利用生成酒精的过程^[6,17]。

在谷物原料的酒精发酵中,因为谷物中的磷 60 %~80 % 以植酸的形式存在,磷元素在酵母菌细胞的生长发

育过程中起着非常重要的作用。植酸可以和大量的二价或者三价阳离子如钙、锌、铜、铁等形成难溶的金属盐,不利于酵母菌对磷元素的吸收和利用,而适量的钙离子在一定程度上可以增加酵母菌发酵酶系的活性。但是在酵母菌体细胞内植酸可以抑制蛋白酶,形成植酸-蛋白复合物,这样一方面降低了酵母菌分解蛋白质的能力,另外一方面又因为组成植酸分子的肌醇是酵母菌生长所必需的营养因子,因此在蒸煮过程中在发酵罐中添加植酸酶,既可以促进植酸盐的分解,并且可以促进淀粉和蛋白质的降解,还可以将植酸盐转化为酵母菌可以利用的两种营养物质:肌醇和磷酸盐,将消极因素转化为积极的因素^[6-21]。

3.2.3 营养限制因子的影响

3.2.3.1 碳源、氮源因子的影响

吕欣等指出在初糖浓度质量分数大于 15% 时,该酵母菌的生长开始受到抑制,在初糖质量分数为 35% 时,可以达到最大发酵酒精体积分数 16.5%;另外,在完全合成培养基条件下,比较了尿素和硫酸铵两种氮源对酒精发酵的影响,发现硫酸铵是较好的氮源,而对 3 种主要的生长与发酵无机盐氯化钙、硫酸镁和磷酸二氢钾的研究中,得到该酵母菌所需无机盐的临界值,从而较为全面地论述了不同营养限制因子对高浓度酒精发酵的影响^[22-23]。

3.2.3.2 改变培养基营养组分,提高酵母菌抗酒精抑制作用

通过改变培养基的营养组分,提高酵母菌的抗酒精抑制作用方面的研究有:①针对高浓度酒精发酵过程中所产生的高酒精度对酵母菌细胞的毒害效应,池振明从脂肪酸、磷脂、麦角固醇、海藻糖以及质膜 ATP 酶等多方面,对酵母菌细胞的耐酒精机制进行了探讨,提出酵母菌细胞的线粒体、海藻糖等与耐酒精能力有一定关系,并指出酵母菌细胞的耐酒精能力有一定的遗传基础,它是受许多基因控制的,但真正的作用机制还未弄清^[8]。②有报道说在酵母菌的合成培养基中添加粗卵磷脂-清蛋白,可以提高酵母菌的生长速度并增强其发酵能力,耐酒精度可达到 20%(v/v)^[7]。③也有报道说,在培养基中添加 Tween80 或麦角固醇和清蛋白,可以使发酵醪中酒精浓度从 17.2%(v/v)提高到 19%(v/v),而且发酵时间也大大缩短,从而证明这些物质可以促进细胞的发酵能力^[7-24-25]。

4 小结

综上所述,影响高浓度酒精发酵的因素是多种多样的,而针对这些限制性因子,人们的对策也是千方百计。在进行新菌种、新设备、新工艺等方面的开创性研究基础上,我们着眼于现有设备及工艺的高效利用,采用完全间歇发酵方式,实现高浓度酒精发酵。可以通过向发酵醪液中添加酵母菌厌氧生长增值所必需的物质,提供增强酵母菌细胞抵抗不良环境因素的物质,从而优化发

酵醪液的组成,最终实现高浓度酒精发酵。

参考文献:

- [1] 章克昌.发展燃料酒精的建议[J].中国工程科学,2002,2(6):89-93.
- [2] Casey.G.P.,Magnus.C.A.,Ingledew.W.M.,High Gravity Brewing: Nutrient Enhanced Production of High Concentrations of Ethanol by Brewing Yeast[J].Biotechnol.Lett.1983,(5):429-434.
- [3] Mccaug.R.mckee,Pfister.E.A.,Ingledew.W.M.,Very High Gravity Brewing-laboratory and Pilot Plant Trials[J].J.of Am.Soc.Brew.Chem,1992,(50):18-26.
- [4] Thomas.K.C.,Ingledew.W.M.,Frel Alcohol Production: Effects of Free Amino Nitrogen on Fermentation If Very-High-Gravity Wheat Mash[J].Appl.Environ.Microbiol,1990,(56):2046-2050.
- [5] 吴国锋,等.酒精浓醪发酵的计算与分析[J].酿酒,2003,30(4):70-72.
- [6] KA Jacques,TP Lyons and DR Kelsall The Alcohol Textbook [M].Nottingham University Press.1999.
- [7] 章克昌.酒精与蒸馏工艺学[M].北京:中国轻工业出版社,1995.
- [8] 池振明,等.酵母菌耐酒精机制的研究进展[J].微生物学通报,1999,26(5):373-376.
- [9] 上原悌次郎,等.酵母菌呼吸与发酵调节[J].发酵工业,1977,(5):6-15.
- [10] 黄亚东.应用膜分离技术提高酒精发酵的研究[J].酿酒,1998,(6):26-28.
- [11] Jones.A.M.,Ingledew.W.M.,Fuel Alcohol Production:Appraisal of Nitrogenous Yeast Foods for Very High Gravity Wheat Mash Fermentation[J].Process Biochem,1994,(29):483-488.
- [12] 郑淑芳.营养因素和环境因素对酵母菌生长的影响[J].山西食品工业,1995,(4):26-29.
- [13] 毛志群,等.燃料乙醇用高产酒精酵母的筛选及鉴定[J].酿酒,2003,30(3):35-37.
- [14] 刘建军,等.高产酒精酵母菌种的选育[J].酿酒,2003,30(1):57-59.
- [15] 池振明,等.高浓度酒精发酵技术的研究进展[J].食品与发酵工业,1995,(4):80-84.
- [16] 林秋叶,等.两株耐高渗酿酒酵母的生理特性比较[J].酿酒,2003,30(2):27-28.
- [17] 李雪雁,等.实现酒精高效率发酵的控制途径[J].酿酒,2002,29(2):66-67.
- [18] 吕欣,等.一株产高浓度酒精酵母的流加发酵策略初步研究[J].酿酒,2003,30(3):25-26.
- [19] 黄宇彤,等.对高浓度玉米原料糊化液化粘度的研究[J].食品与发酵工业,2001,27(6):21-24.
- [20] 池振明,等.利用中温蒸煮工艺进行高浓度酒精发酵[J].生物工程学报,1995,11(3):228-232.
- [21] 王镜岩,等.生物化学[M].北京:高等教育出版社,2002.
- [22] 吕欣,等.不同基质浓度酒精发酵的影响[J].食品与发酵工业,2003,29(7):21-23.
- [23] 吕欣,等.氮源与无机盐对高浓度酒精发酵的影响[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2003,31(4):159-162.
- [24] 陈士怡,等.酵母遗传学[M].北京:科学出版社,1989.
- [25] 陈思礪,等.酵母生物化学[M].济南:山东科技出版社,