

固定化酵母的选育及在木薯浓醪发酵生产燃料乙醇中的性能对比

伍彦华¹,覃红梅¹,崔师泰²,盘柳萍¹,凌成金²

(1.广西轻工工业科学技术研究院,广西 南宁 530031;2.广西北海中粮生物质能源有限公司,广西 北海 536100)

摘要:对固定化酵母进行选育,得到3株酿酒酵母编号分别为SLS、SYA、SJY和1株自絮凝酵母FJY。以木薯为原料,对固定化酵母浓醪发酵生产燃料乙醇的性能进行对比,结果表明,自絮凝酵母菌株FJY的乙醇生产能力最高,在发酵86 h后,最终酒精分达到15.7%vol,残总糖1.35%,甘油产量比其他3株酵母菌株低20%。

关键词:微生物;固定化酵母;选育;燃料乙醇;浓醪发酵

中图分类号:TS262.2;TS261.4;Q814

文献标识码:A

文章编号:1001-9286(2010)07-0031-03

Breeding of Immobilized Yeasts & Comparison of Their Performance in High-gravity Fermentation of Cassava to Produce Fuel Ethanol

WU Yan-hua¹, QIN Hong-mei¹, CUI Shi-tai², PAN Liu-ping¹ and LING Cheng-jin²

(1.Guangxi Light Industrial Research Academy of Science and Technology, Nanning, Guangxi 530031;

2. Guangxi COFCO Bio-Energy Co. Ltd, Beihai, Guangxi 536100, China)

Abstract: Three *S.cerevisiae* strains including SLS, SYA and SJY and one self-flocculating yeast strain FJY were obtained through the breeding of immobilized yeasts. Their performance in high-gravity fermentation of cassava to produce fuel ethanol were compared. The results showed that self-flocculating strain FJY had the strongest ethanol-producing capacity among all the four strains. After 86 h fermentation, its final alcohol content could reach up to 15.7 %vol and its residual total sugar content to 1.35 % and its glycerol content was 20 % lower than that of the other three strains.

Key words: microbe; immobilized yeast; breeding; fuel ethanol; high-gravity fermentation

生物质能因其清洁、可循环再生等优点被认为是最有希望的替代能源之一,作为生物质能源的一种,燃料乙醇已成为减轻石油需求的可替代燃料。固定化酵母发酵生产酒精技术是采用生物技术将活酵母包埋于载体中,由于活酵母高度密集,可以成倍提高反应速度,减少原料损失。浓醪发酵生产酒精工艺则可节能,提高设备利用率,但浓醪发酵要求酵母菌株有极强的耐渗透压、耐高酒精浓度的能力,还要求酵母菌株能减少酵母的次要代谢产物(如甘油等),尽可能多的将可发酵糖转化为酒精,因此,酵母菌株的选育在浓醪发酵酒精生产中尤为重要。

1 材料与方法

1.1 菌株筛选

1.1.1 酵母菌种

选取酒精连续生产线上,发酵良好的糖蜜或淀粉质醪液。

1.1.2 初筛

采用 TTC 平板法。

TTC 上层培养基:TTC(三苯基四氮唑盐酸盐)0.5 g/L,营养琼脂 33 g/L,121℃灭菌 15 min。

下层培养基:10° Bx 麦芽汁,营养琼脂(广东环凯微生物科技有限公司)33 g/L,pH6.0,121℃灭菌 15 min。

将酵母液接入含 TTC 下层培养基的平皿中培养,优质酵母菌落生长快,大而饱满,死亡率低,细胞壁薄,细胞核显著,形态均匀,大小整齐,呈圆形或椭圆形,无异状细胞。

下层培养基长出菌落后,倒入 TTC 上层培养基中,30℃避光保存 2~3 h。产酒精能力强的酵母菌落呈深红色,次之为粉红色,比较各菌株之间的产酒精能力,初筛性状优良的酵母菌株。

1.1.3 复筛

发酵实验法。

收稿日期:2010-03-30

作者简介:伍彦华(1972-),女,工程师,主要从事食品、发酵工艺及发酵微生物的应用研究。

浓醪发酵实验培养基参见 1.2.2, 制备方法参见 1.2.4。

分别以淀粉为原料,以各菌株发酵周期、乙醇生产能力、残糖等为指标,进行浓醪发酵实验,确定发酵周期短、产酒高、残糖低的菌株用于驯化。

1.1.4 酵母菌的驯化

浓醪连续发酵培养驯化。将固定化酵母细胞置于反应器中,用浓醪连续发酵培养,连续时间约 90 d,将发酵醪进行二次分离复筛,复筛同时与亲本酵母细胞相比,最终得到耐高浓度和高酒度的酿酒酵母(*S.cerevisiae*)(编号 SLS、SYA、SJY)和 1 株自絮凝酵母(编号 FJY)。

1.2 固定化酵母木薯浓醪发酵生产燃料乙醇的性能对比

1.2.1 材料

酵母:SLS、SYA、SJY、FJY。

木薯淀粉:带皮木薯干片粉碎而成的木薯淀粉(取自广西北海中粮生物质能源有限公司粉碎工段),淀粉含量 68%。

液化酶、糖化酶:诺维信公司生产。

1.2.2 培养基

1.2.2.1 麦芽汁液体试管培养基

10.5°Bx 麦芽汁,pH4.0。121℃灭菌 15 min。

1.2.2.2 扩培培养基

液化醪:取自广西北海中粮生物质能源有限公司液化车间。

1.2.2.3 浓醪酒精发酵培养基

料水比 1:2,尿素 1.0%、 KH_2PO_4 0.5%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、 CaCl_2 0.2%。

1.2.3 酵母的扩培

斜面试管酵母→麦芽汁液体试管→三角瓶扩培。

将斜面试管中的酵母菌接种于麦芽汁液体试管培养基中,28~30℃培养 20 h。将培养好的麦芽汁试管酵母接种到扩培培养基中,扩培比 1:10,28~30℃培养 24 h。

1.2.4 木薯淀粉浓醪发酵实验

木薯淀粉与水混合后调整 pH5.0~5.5;添加液化酶,液化温度 90℃,保温 1.0 h 后冷却至 35℃;调整 pH3.5~4.0,添加糖化酶及营养盐;接入扩培的酵母菌种,发酵温度 28~30℃,发酵周期 86 h。

1.2.5 木薯淀粉浓醪发酵成熟醪的检测

酒精分的测定^[1];残还原糖测定^[2];残总糖测定^[2];酵母数及酵母死亡率的测定^[1]。

HPLC 检测^[2]:发酵成熟醪调节 pH 值到 1~1.5,抑制酶活,取 40 mL 发酵醪离心,过滤,用 HPLC 法检测乙醇、麦芽糖、麦芽三糖、葡萄糖、果糖、醋酸、乳酸、甘油的

含量。

2 结果与分析

2.1 固定化酵母在麦芽汁中生长的形态(图 1~图 4)

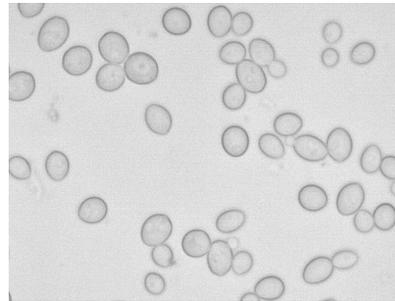


图 1 SLS 形态图

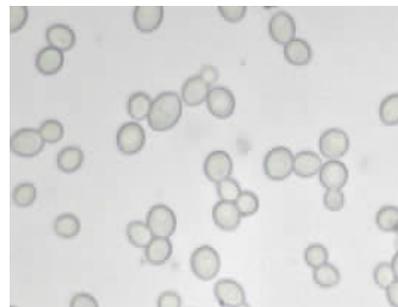


图 2 SYA 形态图

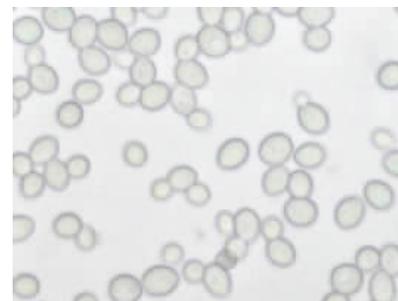


图 3 SJY 形态图



图 4 FJY 形态图

2.2 不同固定化酵母菌株的乙醇生产能力(见图 5)

对不同固定化酵母菌株产乙醇能力进行比较,结果见图 5。

由图 5 可见,不同酵母菌株在发酵成熟醪中的乙醇产量和酒精分从高到低排列的菌株为 FJY >

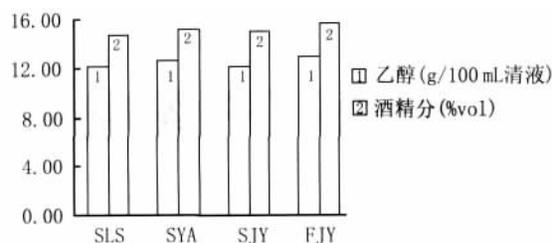


图5 发酵成熟醪的出酒率

SYA > SJY > SLS。FJY 的乙醇产量和酒精分最高分别是 12.9 g/100 mL 清液和 15.7 %vol。

2.3 不同固定化酵母菌株耗糖的能力

对不同固定化酵母菌株耗糖能力进行比较, 结果见图 6、图 7。

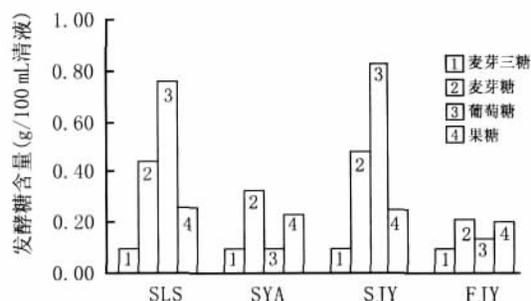


图6 发酵成熟醪中可发酵糖的含量

由图 6 可见, 4 株酵母菌对麦芽三糖的发酵能力相同, 而对麦芽糖、葡萄糖和果糖的发酵能力, 酵母菌株 SYA 和 FJY 的能力明显优于 SLS 和 SJY, 其中 SYA 对葡萄糖的发酵能力最强, 自絮凝酵母 FJY 对麦芽糖的发酵能力最强。

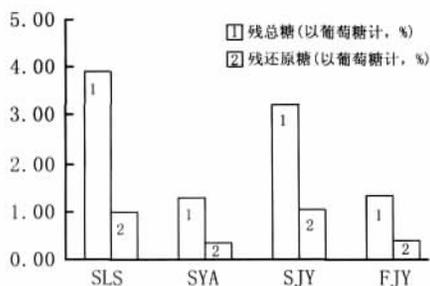


图7 发酵成熟醪中的残还原糖、残总糖

由图 7 可见, 发酵成熟醪中残总糖、残还原糖值从低到高排列的菌株为 SYA < FJY < SJY < SLS。酵母菌株 SYA 和 FJY 的耗糖能力比 SLS 和 SJY 强。

2.4 发酵过程中甘油的生成

甘油是酒精生产中的主要副产物, 酵母菌利用发酵醪中的葡萄糖产生甘油的反应, 可用下列化学方程式来表示: $C_6H_{12}O_6$ (葡萄糖) + $H_2O \rightarrow C_2H_5OH$ (酒精) + $CO_2 + C_3H_5(OH)_3$ (甘油)。

由此可知, 产生甘油要消耗发酵醪中的葡萄糖, 从

而减少酒精的生成量。正常的酒精发酵过程, 发酵醪中只有少量的甘油生成, 浓醪发酵中其量约为发酵成熟醪的 0.4%~0.8%。发酵成熟醪中甘油的含量见图 8。

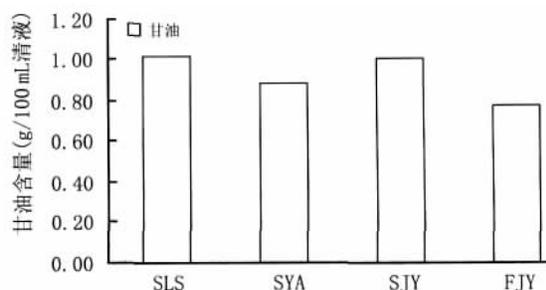


图8 发酵成熟醪中甘油的含量

由图 8 可见, 发酵成熟醪中甘油的含量由低到高排列的菌株为 FJY < SYA < SJY < SLS, 酵母菌株 FJY 产生的甘油含量为 0.78 g/100 mL 清液, 比其他菌株低 20%, 说明 FJY 代谢过程中产生的甘油较少, 能利用更多的糖发酵生成酒精。

2.5 发酵过程醋酸、乳酸的生成

醋酸、乳酸是酒精发酵过程中的副产物, 酵母酒精发酵过程醋酸、乳酸的生成有以下因素: 酵母菌株产酸能力的差异以及发酵过程中细菌污染所致, 酒精发酵过程中, 某些乳酸菌具有乳酸脱氢酶, 能以丙酮酸作为受氢体而生成乳酸, 而发酵醪被醋酸菌污染, 醪液中的酒精会被醋酸菌氧化生成醋酸。发酵成熟醪中醋酸、乳酸含量见图 9。

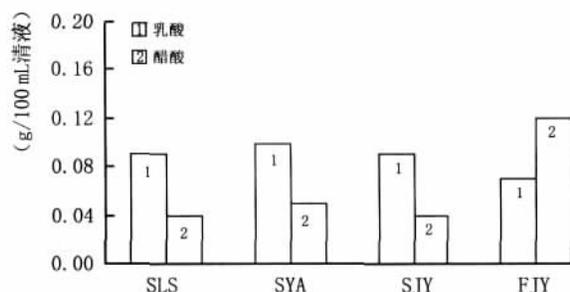


图9 成熟醪中乳酸、醋酸的含量

由图 9 可见, 发酵成熟醪中乳酸含量由低到高的菌株为 FJY < SJY < SLS < SYA, 醋酸含量由低到高的菌株为 SJY < SLS < SYA < FJY。自絮凝酵母 FJY 的发酵成熟醪中, 醋酸含量明显高于其他菌株, 这有可能是菌株本身产醋酸能力较强引起的, 也可能是由于菌株本身的自絮凝性, 发酵过程中醪液固液相容易分离, 固相絮凝浮于上层, 加上二氧化碳生成形成的孔隙, 有利于醋酸菌繁殖, 具体原因有待进一步研究。

2.6 酵母数及酵母死亡率

酒精发酵效率决定于酵母繁殖速度和酵母数量, 酵母数量过多, 则发酵醪的糖分供给酵母细胞生长消耗较多, 相应地糖转化为酒精的转化率降低。酵母数量过少,

(下转第 38 页)

株组合发酵即能生产出优良的葡萄酒,本次实验选用的菌株组合 RC212+D254+ZYFJQ 生产的葡萄酒异味较重,口感不协调。

产地酵母是生产原产地葡萄酒的决定因素之一。酵母 ZYFJQ 分离自烟台葡萄酒厂,它与商品酵母 D254 组合发酵产香 27 种,香型丰富,苯乙醇(玫瑰香)和乳酸乙酯(果香)构成了酒体主要香气,辅以辛酸乙酯(茴香味)、己酸乙酯(菠萝香),保留有蛇龙珠浆果的典型青草味,香味协调,酒度、酸度与糖度适中,口感品评极佳。

实验结果显示,D254+ZYFJQ 是生产烟台产地葡萄酒的优良组合,其发酵的蛇龙珠葡萄酒在理化指标和香气的协调性上较为突出,对于地方特色葡萄酒生产具有重要意义。目前,由于葡萄酒厂大量引进国外活性干酵母生产葡萄酒,有可能导致产地典型性特征被弱化。因此,加强产地酵母菌开发对生产优质葡萄酒有重要价值,尤其分离并添加优良产地酵母菌株,可以放大天然酵母菌株在葡萄酒发酵过程中的优良特性,生产具有地域特色的葡萄酒将是未来中国葡萄酒产业发展的新趋势^[11,12]。

参考文献:

- [1] 王慧,张立强,刘天明,等.产地葡萄酒优良酵母菌株的筛选及鉴定[J].酿酒科技,2007,(9):29-31.
- [2] Ciani M, Mannazzu I, Marinangeli P, et al. Contribution of win-

ery- resident *Saccharomyces cerevisiae* strains to spontaneous grape must fermentation [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2004, 85 (2):159-164.

- [3] Evelyn S O, Helena M A, Bolini C, et al. The influence of different yeasts on the fermentation composition and sensory quality of Cachaca[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology 2005, 21: 707-715.
- [4] Romano P, Fiore C, Paraggio M. Function of yeast species and strains in wine flavour[J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 86 (2):169-180.
- [5] 高年发.葡萄酒生产技术[M].北京:化学工业出版社,2005. 105-118.
- [6] 李华.葡萄酒品尝学[M].北京:科学出版社,2006.125-134.
- [7] 张晓,张振文.两种溶剂萃取黑比诺葡萄酒香气成分的比较[J].酿酒科技,2007,(5):95-98.
- [8] 李华,胡博然,杨新元,等.蛇龙珠干红葡萄酒香气成分的 GC/MS 分析[J].分析测试学报,2004,23(1):85-87.
- [9] 李华.葡萄酒化学[M].北京:科学出版社,2006.
- [10] 郭志刚,刘天明,赵长增.甘肃产地葡萄酒的酿造研究[J].酿酒科技,2008,(2):22-26.
- [11] 苏龙,刘树文,何玲,等.东北山葡萄自然发酵酵母菌群的研究[J].食品与生物技术学报,2007,26(3):110-115.
- [12] Pradnya Chavan, Sarika Mane, Girish Kulkarni. Natural yeast flora of different varieties of grapes used for wine making in India [J]. Food Microbiology 2009, 26: 801-808.

(上接第 33 页)

酵母繁殖速度慢,发酵速度也相应地减慢,不仅发酵时间延长,设备利用率降低,同时易使杂菌感染和繁殖,酸度增高,导致发酵率下降。随着发酵产物(如酒精、有机酸等)的增多,营养物质的减少以及 pH 发生变化等的影响,其繁殖速率逐渐下降,死亡率逐渐上升,酒精发酵最终就会停止。木薯浓醪发酵生产酒精,发酵终了时,不同菌株的酵母数及酵母死亡率见图 10。

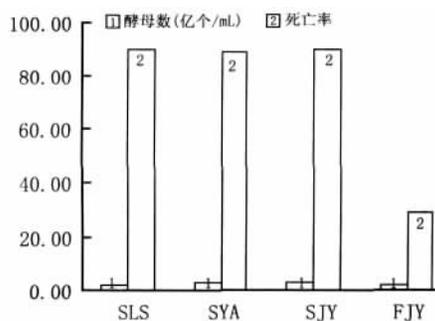


图 10 成熟醪中的酵母数及酵母死亡率

由图 10 可见,4 株酵母菌株在发酵结束时,酵母数在 2.0~2.5 亿个/mL 之间,菌株 SLS、SYA 和 SJY 的死亡率均在 90% 左右,而自絮凝酵母 FJY 的死亡率最低,只有 28%,说明其耐高浓度、高酒精度的能力极强。

3 结论

固定化酵母经 TTC 平板初筛、发酵实验复筛、驯化后二次分离筛选,获得 4 株浓醪发酵生产酒精的酵母菌株。以木薯淀粉为原料进行浓醪发酵生产酒精实验,对其发酵性能进行对比。结果说明,在 4 株酵母菌株中,自絮凝酵母 FJY 耐渗透压、高酒精浓度能力最强,并且乙醇产量高、耗糖能力强、甘油产量低,在发酵 86 h 后,最终酒精分达到 15.7%vol,残总糖 1.35%,甘油产量比其他菌株低 20%。酵母 SYA 的发酵能力次之,酒精分达到 15.3%vol,残总糖 1.29%。

参考文献:

- [1] 广东省糖纸工业公司,轻工业部甘蔗糖业科学研究所.甘蔗糖蜜酒精生产检验方法[M].南宁:广西区糖业公司生产技术处翻印,1998.
- [2] 吴国峰,李国全,马永强,等.工业发酵分析[M].北京:化学工业出版社,2006.
- [3] 池振明.提高酵母菌耐酒精能力的方法[J].微生物学通报,1993,(3):179-182.
- [4] 董博宇,陈叶福,岳瑞雪,等.TTC 在发酵木糖高产乙醇的休哈塔假丝酵母选育中的应用[J].酿酒科技,2008,(10):40-43.