

复合酶在菊芋粉发酵生产燃料乙醇中的应用

李俊俊,唐艳斌,唐湘华,段永忠,许 波,黄遵锡

(生物能源持续开发利用教育部工程研究中心,云南师范大学酶工程重点实验室,
云南师范大学生命科学学院,云南 昆明 650092)

摘要: 菊芋是一种可选择的酒精发酵原料。研究用菊芋粉生产燃料乙醇的工艺参数,在单因素试验的基础上用正交试验进行工艺参数的优化。确定最佳工艺条件为料水比为 1:4.5(m/v),复合酶添加量 0.2%,发酵温度 36℃,酵母液用量为 6 mL,发酵 pH 值为 5.0,发酵时间 24 h。在此工艺条件下酒精度可达 10.8 %vol,酒精产率达 34.10 %。技术经济分析说明,使用复合酶和酵母发酵菊芋粉生产燃料乙醇是可行的。

关键词: 燃料乙醇; 复合酶; 菊芋粉; 正交实验

中图分类号: Q55 ;TS262.2 ;TS261.4

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2009)03-0065-04

Application of Compound Enzyme in Fuel Ethanol Production by Jerusalem Artichoke Powder Fermentation

LI Jun-jun, TANG Yan-bin, TANG Xiang-hua, DUAN Yong-zhong, XU Bo and HUANG Zun-xi

(Engineering Research Center of Sustainable Development and Utilization of Biomass Energy, Ministry of Education, Key Lab of Enzymatic Engineering in Yun'nan Normal University, Life Science School of Yun'nan Normal University, Kun'ming, Yun'nan 650092, China)

Abstract: Jerusalem artichoke is an alternative source for ethanol production. The technical parameters for fuel ethanol production by jerusalem artichoke powder fermentation were investigated. On the basis of single-factor experiment, orthogonal experiment was conducted to optimize the related technical parameters. The optimized parameters were determined as follows: the ratio of materials to water was 1:4.5 (m/v), the addition level of compound enzyme was 0.2 %, the fermentation temperature was at 36 °C, the use level of yeast liquid was 6 mL, the fermentation pH value was 4.5, and the fermentation time was 24 h. Under the above technical conditions, the alcoholicity could reach up to 10.8 %vol, and the yield of ethanol could achieve 34.10 %. The economic analysis showed that fuel ethanol production from jerusalem artichoke powder fermented by compound enzyme and yeast was feasible.

Key words: fuel ethanol; compound enzyme; Jerusalem artichoke powder; orthogonal experiment

菊芋是一种多年生草本植物,俗称洋姜、鬼子姜,属菊科向日葵属。由于其具有耐寒、耐旱、耐盐碱、抗风沙、适应性广、繁殖性强等优点,使其在全国各地均有分布。菊芋的主要成分是多聚果糖,除此之外还含有淀粉、蛋白质、纤维素、半纤维素、果胶质等成分。这些成分可在酶的作用下分解成易于被酵母利用而产生乙醇的物质。由于菊芋具有上述两方面的特征,使其成为可代替粮食作物生产燃料乙醇用的很有潜力的能源植物^[1~3]。

本文研究了采用添加复合酶和耐高温酿酒酵母通过边糖化边发酵的方法生产燃料乙醇的最佳工艺条件,该方法具有操作简单、稳定性好、发酵周期短、生产成本低等优点,对进一步实现利用菊芋发酵、规模化生产燃料乙醇具有一定的指导意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菊芋

2007 年 12 月中旬采收于云南省呈贡县,采收后洗净、切片、晒干、粉碎。

1.1.2 复合酶

自配,组成为:耐高温 α -淀粉酶:10 u/g 菊芋粉;糖化酶:80 u/g 菊芋粉;

普鲁兰酶:40 u/g 菊芋粉;纤维素酶:16 u/g 菊芋粉;酸性蛋白酶:10 u/g 菊芋粉;果胶酶:20 u/g 菊芋粉;菊粉酶:25 u/g 菊芋粉; β -葡聚糖酶:10 u/g 菊芋粉; β -甘露聚糖酶:5 u/g 菊芋粉;木聚糖酶:10 u/g 菊芋粉;植酸酶:5 u/g 菊芋粉。

基金项目:云南省产业重大关键技术开发专项,云发改高技(2008)1657) 云南省应用基础研究计划重点项目(2006C00042)。

收稿日期:2008-12-31

作者简介:李俊俊(1979-),男,山西宁武人,硕士研究生,研究方向:微生物酶工程。

通讯作者:黄遵锡(1964-),男,教授,博士生导师,主要从事微生物基因工程方面的研究,E-mail:Huangzunxi@163.com。

1.1.3 耐高温酿酒干酵母

耐高温酿酒干酵母:安琪酵母有限公司生产。

1.2 方法

1.2.1 菊芋粉成分分析^[4~5]

分析指标:水分,总糖,粗脂肪,粗纤维,粗蛋白,还原糖,灰分。

1.2.2 干酵母活化

称取一定量的干酵母于 40 倍其重量的 35~40 ℃ 的 2 % 的葡萄糖水溶液中,先在 37 ℃ 恒温箱中培养 15~20 min,然后转移到 30 ℃ 恒温箱中培养 60~70 min 即可。

1.2.3 残还原糖测定

将澄清的蒸馏废液稀释到一定倍数,用 DNS 法^[5]测定。

1.2.4 乙醇含量测定

采用酒精计法。将发酵液倒入 500 mL 圆底烧瓶中,加 100 mL 水混匀后常压蒸馏,用 100 mL 容量瓶收集馏出液至刻度,用酒精比重计测馏出液中的酒精浓度和温度,最后换算为 20 ℃ 酒精度。

1.2.5 实验计算

$$\text{酒精产率} = \frac{\text{酒精产量(g)}}{\text{原料总量(g)}} \times 100\%$$

1.2.6 工艺流程

称取 25 g 过 40 目的菊芋粉于 500 mL 三角瓶中→加入一定量溶有 10 u/g 菊芋粉的耐高温 α-淀粉酶的 60 ℃ 左右的自来水→于 100 ℃ 加热蒸煮 30 min→冷却至 35 ℃ 左右加入一定量复合酶和酵母活化液→称重,放于一定温度的恒温箱中→每隔 8 h 称重 1 次,直到发酵结束→蒸馏→测酒精度→测蒸馏废液中残还原糖含量→计算酒精产率。

2 结果与分析

2.1 菊芋粉成分含量(表 1)

表1 菊芋块茎中各种成分含量 (%)			
项目	指标	项目	指标
水分	5.30	粗蛋白	8.91
总糖	77.53	还原糖	25.85
粗脂肪	2.33	灰分	7.54
粗纤维	9.42		

2.2 单因素对发酵过程的影响

2.2.1 料水比对菊芋粉发酵产酒精的影响

料水比影响到发酵的醪液浓度和酶浓度。在此确定料水比分别为:1:4.0、1:4.5、1:5.0、1:5.5 和 1:6.0(每一梯度发酵 3 瓶,结果取其平均值,以下同)。其他条件分别为:复合酶 0.2 %;酵母活化液 6 mL,发酵温度 36 ℃;发酵时

间 24 h;pH5.0(自然)。发酵结束测定乙醇和还原糖含量,结果见表 2。

表 2 料水比对发酵产酒精的影响

料水比	发酵前后失重量(g)	酒精度(%vol)	残还原糖含量(g/100 mL)	酒精产率(%)
1:4.0	8.9	7.5	0.301	23.68
1:4.5	9.3	8.3	0.252	26.20
1:5.0	11.5	10.2	0.206	32.20
1:5.5	11.0	9.9	0.204	31.25
1:6.0	10.8	9.6	0.201	30.31

由表 2 可知,在上述条件下,随着料水比的增大,发酵前后失重量增加,残还原糖量减少,当料水比为 1:5.0 时,酒精度和酒精产率均达到最大值;此后随着料水比的增加,酒精度和出酒率却略有下降。这是因为复合酶的作用与醪液浓度和其自身浓度有一定关系,在一定范围内,酶反应速度随醪液浓度增加而成正比例增大。但当醪液浓度增加到一定程度达到一定值时,反应速度便停止增大,超过时,活力反而下降。同时酶自身浓度在一定浓度范围以内时,浓度高,生成物也多。但这并非完全成正比关系,当酶浓度达到一定限度以上时,反应速度也成一定值而变化极小。因此在适合的醪液浓度和酶液浓度下,产酒最高,原料出酒率也最高。通过此试验,确定 1:5.0 为发酵产酒精的最佳料水比。

2.2.2 复合酶添加量对菊芋粉发酵产酒精的影响

复合酶作为糖化剂,其添加量的多少影响到菊芋粉的水解程度,设其添加浓度分别为 0.1 %、0.15 %、0.2 %、0.25 % 和 0.3 %,其他条件分别为:料水比 1:5.0,酵母活化液 6 mL,发酵温度 36 ℃,发酵时间 24 h,pH5.0(自然)。发酵结束测定乙醇和还原糖含量,结果见表 3。

表 3 复合酶添加量对发酵产酒精的影响

复合酶添加量(%)	发酵前后失重量(g)	酒精度(%vol)	残还原糖含量(g/100 mL)	酒精产率(%)
0.1	5.9	5.2	0.586	16.42
0.15	7.3	6.7	0.458	21.15
0.2	11.7	10.4	0.203	32.83
0.25	11.8	10.0	0.212	31.57
0.3	12.0	9.8	0.235	30.94

由表 3 可知,在上述条件下,随着复合酶添加量的增加,发酵前后失重量增加,残还原糖量减少。当复合酶添加量为 0.2 % 时,酒精度和酒精产率均达到最大值,此后随着复合酶添加量的增加,发酵液中水解产生的可发酵性糖多于酵母的利用量。同时随着发酵的进行,发酵液中酒精浓度增大,酵母逐渐死亡,使得发酵液中部分可发酵性糖未被酵母利用,残糖增多,原料利用率相对降低。因此,复合酶并非添加越多越好,而是有一个最适添加

量,通过此试验确定其最适添加量为 0.2 %。

2.2.3 酵母添加量对菊芋粉发酵产酒精的影响

酵母作为发酵菌种,其添加量的多少影响到发酵周期和酒精产率,设定其添加量分别为:4 mL、6 mL、8 mL、10 mL 和 12 mL。其他条件分别为:料水比 1:5;复合酶 0.2 %;发酵温度 36 ℃;发酵时间 24 h;pH 5.0(自然)。发酵结束测定乙醇和还原糖含量(发酵总体积一定,不足部分用水补足),结果见表 4。

表 4 酵母添加量对发酵产酒精的影响

添加量 (mL)	发酵前后 失重量(g)	酒精度 (%vol)	残还原糖含量 (g/100 mL)	酒精产率 (%)
4	9.8	8.5	0.239	26.84
6	11.9	10.5	0.199	33.15
8	12.0	10.4	0.187	32.83
10	12.3	10.2	0.184	32.20
12	12.5	10.1	0.179	31.89

由表 4 可知,在上述条件下,随着酵母添加量的增加,发酵前后失重量增加,残还原糖量减少。当酵母添加量为 6 mL 时,酒精度和酒精产率均达到最大值,此后随着酵母添加量的增加,水解产生的可发酵性糖不能满足酵母发酵之用,酵母菌处于饥饿状态,就有可能把发酵产物乙醇作为碳源,使之转化为酸。故发酵结束,虽然残糖很低,但酒精度和酒精产率却相对较低。因此,通过此试验,确定酵母活化液的最适添加量为 6 mL。

2.2.4 发酵温度对菊芋粉发酵产酒精的影响

温度影响到复合酶的作用效果和酵母菌的生长繁殖,设定发酵温度分别为 28 ℃、32 ℃、36 ℃和 40 ℃。其他条件分别为:料水比 1:5;酵母活化液 6 mL;复合酶 0.2 %;发酵时间 24 h;pH 5.0(自然)。发酵结束测定乙醇和还原糖含量,结果见表 5。

表 5 温度对发酵产酒精的影响

发酵温度 (℃)	发酵前后 失重量(g)	酒精度 (%vol)	残还原糖含量 (g/100 mL)	酒精产率 (%)
28	10.3	9.2	0.229	29.05
32	10.9	9.9	0.205	31.25
36	12.1	10.5	0.179	33.15
40	12.5	9.7	0.212	30.62

由表 5 可知,在上述条件下,随着发酵温度的增加,发酵前后失重量增加,残还原糖量减少。当发酵温度为 36 ℃时,酒精度和酒精产率均达到最大值,此后随发酵温度的升高,酵母热耐受性降低,虽然起始发酵迅速,但随着发酵时间的延长,酵母死亡率增加,导致后发酵几乎停止,水解产生的可发酵性糖利用不完全,使得酒精度和原料利用率下降。因此,通过此试验,确定发酵的最适温度为 36 ℃。

2.2.5 发酵时间对菊芋粉发酵产酒精的影响

发酵时间影响到原料和设备的利用率,设发酵时间分别为 16 h、24 h、32 h、40 h、48 h、56 h 和 64 h。其他条件分别为:料水比 1:5;酵母活化液 6 mL;复合酶 0.2 %;发酵温度 36 ℃; pH 5.0(自然)。发酵结束,测定乙醇和还原糖含量,结果见表 6。

表 6 发酵时间对产酒精的影响

发酵时间 (h)	发酵前后失重量 (g)	酒精度 (%vol)	残还原糖含量 (g/100 mL)	酒精产率 (%)
16	10.5	9.8	0.213	30.94
24	11.9	10.4	0.198	32.83
32	12.1	10.4	0.189	32.83
40	12.5	10.2	0.185	32.20
48	12.7	10.2	0.182	32.20
56	13.0	10.1	0.182	31.89
64	13.2	10.0	0.180	31.57

由表 6 可知,在上述条件下,随着发酵时间的延长,发酵前后失重量增加,残还原糖量减少。当发酵时间为 24 h 时,酒精度和酒精产率均达到最大值,此后随着发酵时间的延长,酒精度几乎不变,甚至略有下降。说明随着发酵时间的延长,酵母利用的可发酵性糖越来越少,在极度匮乏的条件下,酵母菌有可能利用已生成的乙醇为原料来维持其生存,将乙醇转化为酸等物质,最终导致酒精度随发酵时间的延长而略有下降。因此,通过此试验,确定发酵的最佳时间为 24 h。

2.2.6 发酵 pH 值对菊芋粉发酵产酒精的影响

pH 值影响到复合酶的作用效果和酵母菌的生长繁殖,设定发酵的 pH 值分别为 4.0、4.5、5.0(自然)、5.5 和 6.0。其他条件分别为:料水比 1:5;酵母活化液 6 mL;复合酶 0.2 %;发酵温度 36 ℃;发酵时间 24 h。发酵结束,测定乙醇和还原糖含量,结果见表 7。

表 7 pH 对发酵产酒精的影响

发酵 pH 值	发酵前后失重量 (g)	酒精度 (%vol)	残还原糖含量 (g/100 mL)	酒精产率 (%)
4.0	10.4	9.5	0.218	29.99
4.5	10.9	10.0	0.204	31.57
5.0	12.0	10.4	0.193	32.83
5.5	11.4	10.0	0.180	31.57
6.0	10.0	9.4	0.173	29.68

由表 7 可知,在上述条件下,随着发酵 pH 值的增加,发酵前后失重量增加,残还原糖量减少。当发酵 pH 值为 5.0(自然)时,酒精度和酒精产率均达到最大值,此后随发酵 pH 值的增加,酒精度却在下降,而残糖含量也在减少,这是因为发酵 pH 值偏酸性可以达到“以酸制酸”的目的,抑制产酸菌的污染。pH 偏中性,易感染产酸菌,产酸菌产酸会损失糖分,降低酒精产率,导致虽然残还原糖含量低,但酒精度却不高。另一方面 pH 值过小或

过大会降低复合酶中部分酶制剂的活性,甚至使其失活,不利于对菊芋粉的分解作用。因此,通过此试验确定发酵的最适 pH 值为 5.0,即自然 pH 值。

2.2.7 正交实验

由以上单因素发酵实验可知,料水比、复合酶添加量、酵母添加量、发酵温度对菊芋粉发酵产酒精影响较大,故采用 $L_9(3^4)$ 正交表对料水比、复合酶添加量、酵母添加量和发酵温度进行优化实验,以确定最佳的发酵条件。

2.2.7.1 因素水平设计(表 8)

表8 正交试验因素水平设计

水 平	A: 料水比	B: 复合酶添加量 (%)	C: 温度 (°C)	D: 酵母添加量 (mL)
1	1:4.5	0.15	32	4
2	1:5.0	0.20	36	6
3	1:5.5	0.25	40	8

2.2.7.2 正交试验设计(表 9)

表9 正交试验结果

试验号	A	B	C	D	pH	发酵时间 (h)	20℃ 酒度 (%vol)	酒精产率 (%)
1	1	1	1	1	5.0	24	7.7	24.31
2	1	2	2	2	5.0	24	10.8	34.10
3	1	3	3	3	5.0	24	10.1	31.89
4	2	1	2	3	5.0	24	10.3	32.52
5	2	2	3	1	5.0	24	9.9	31.25
6	2	3	1	2	5.0	24	9.7	30.62
7	3	1	3	2	5.0	24	8.5	26.84
8	3	2	1	3	5.0	24	9.5	29.99
9	3	3	2	1	5.0	24	9.0	28.41
K1	28.60	26.50	26.90	26.60				
K2	29.90	30.20	30.10	29.00				
K3	27.00	28.80	28.50	29.90				
k1	9.53	8.83	8.97	8.87				
k2	9.97	10.07	10.03	9.67				
k3	9.00	9.60	9.50	9.97				
R	2.90	3.70	3.20	3.30				

从表 9 可看出,本实验所选的各影响因素,在不同水平下均可很好地发酵生产乙醇。由极差分析可知:料水比、复合酶添加量、发酵温度、酵母添加量 4 因素极差分别为 2.90、3.70、3.20 和 3.30。因此,在所选定的实验范围内,4 因素主次关系为 $B>D>C>A$,即复合酶添加量>酵母添加量>发酵温度>料水比,通过极差分析得到 $A_1B_2C_2D_2$ 为最佳工艺条件。即:料水比为 1:4.5,复合酶添加量为 0.2%,发酵温度为 36℃,酵母添加量为 6 mL,发酵 pH 值为 5.0,发酵时间为 24 h。在此工艺条件下酒精度可达 10.8%vol,原料出酒率可达 34.10%。

2.2.8 菊芋粉发酵产酒精技术经济分析

菊芋对生长环境要求很低,荒山野坡、盐碱滩地、房

前屋后、南方北方均可种植。管理也比较粗放,一次种植,多次采收;且全植株均可利用,亩产鲜茎叶可达 5~10 t,茎叶经发酵可制成优质饲料,蛋白质含量高。亩产地下块茎可达 3~5 t,可提取菊粉、腌制酱菜,发酵酒精。以淀粉质为原料发酵生产酒精的设备均可以以菊芋为原料发酵生产酒精,且菊芋采收一般在冬季,与其他原料采收季节错开,利于提高设备利用率。

按以上工艺所得的酒精产率,对菊芋粉发酵产酒精进行成本分析,结果见表 10。

表10 菊芋粉发酵产酒精成本分析

项目	数量(t)	单价(元/t)	金额(元)
菊芋干片	3	800	2400
复合酶	0.006	30000	180
干酵母	0.018	22000	396
生产成本	—	—	300
维护和维修	—	—	100
销售	—	—	100
总成本			3476

由表 10 可知,菊芋粉发酵生产酒精成本可控制在 3500 元/t 左右,按国家对燃料价格的规定,目前我国 90[#] 燃油出厂价 5200 元/t,燃料乙醇价格为 4700 元/t 左右。数据表明,单从酒精生产的角度可以实现盈利 1200 元/t 左右。

3 结论

3.1 菊芋粉发酵生产酒精的最佳工艺条件为:料水比为 1:4.5,复合酶添加量为 0.2%,发酵温度为 36℃,酵母添加量为 6 mL,发酵 pH 值为 5.0,发酵时间为 24 h。在此工艺条件下酒精度可达 10.8%vol,原料出酒率可达 34.10%。

3.2 在此工艺条件下发酵生产酒精,其操作步骤简单、稳定性好、发酵时间短,提高了设备利用率。

3.3 应用复合酶发酵菊芋粉生产酒精技术经济可行性分析表明,单从酒精生产的角度可以实现盈利 1200 元/t 左右。因此以菊芋为原料发酵生产燃料乙醇具有很好的潜力。

参考文献:

- [1] 陈铭达,刘兆富.菊芋的加工及开发利用[J].中国林副特产, 2004,(4):35-36.
- [2] 孙纪录,贾英民,桑亚新.菊芋资源的开发利用[J].食品科技, 2003,(1):27-29.
- [3] 周正,曹海龙,朱豫,等.菊芋替代玉米发酵生产乙醇的初步研究[J].西北农业学报,2008,17(4):297-301.
- [4] 沈怡方.白酒生产技术全书[M].北京:中国轻工业出版社, 1998.599-610.
- [5] 王福荣.生物工程分析与检验[M].北京:中国轻工业出版社, 2005.140-148.