

固定化酵母用于白酒丢糟降解液乙醇发酵的研究

吴正云¹ 杨耀宗¹ 邓宇² 张文学¹

(1.四川大学轻纺与食品学院,四川 成都 610065;2.农业部沼气研究所,四川 成都 610041)

摘要: 为了提高白酒生产中废弃物的资源化利用效率,探讨了利用固定化酵母实现丢糟降解液连续发酵生产乙醇的工艺。采用固定化的 LR3.1300 酵母菌株(*Saccharomyces sp.*)进行丢糟降解液的批次和连续乙醇发酵试验。批次发酵试验结果显示,固定化酵母在白酒糟降解液与葡萄糖混合液中发酵的底物利用和产酒效率都较高。在固定化酵母连续发酵中,当固定化酵母液为 60 mL,降解糖液进料速度为 15 mL/h 时,还原糖利用率为 83.7%,流出液酒精度达到了 3.97 %vol,乙醇发酵的效率与前期的游离酵母发酵相比提高了 43%。

关键词: 白酒丢糟; 固定化酵母; 酒精发酵; 连续发酵

中图分类号:TS262.3;TS261.4;X797

文献标识码:A

文章编号:1001-9286(2011)10-0087-03

Research on Ethanol Production from the Hydrolyzate of Spent Grains by Using Immobilized *Saccharomyces*

WU Zhengyun¹, YANG Yaozong¹, DENG Yu² and ZHANG Wenxue¹

(1. Department of Food Engineering, College of Light Industry and Food Engineering, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610065;

2. Biogas Institute of Ministry of Agriculture, Chengdu, Sichuan 610041, China)

Abstract: To enhance the utilization efficiency of the byproduct from liquor production, the application of immobilized yeast to achieve continuous ethanol fermentation from the hydrolyzate of spent grains was investigated. Immobilized yeast strain LR3.1300 (*Saccharomyces sp.*) was used in batch and continuous ethanol fermentation from the hydrolyzate of spent grains. The batch fermentation results showed that both substrate utility and ethanol productivity were higher when diluted hydrolyzate of spent grains mixed with glucose solution was used as the medium. In continuous fermentation with immobilized yeast, in conditions of 60 mL of immobilized yeast and 15 mL/h of inflow rate, the utility of reducing sugar was 83.7 %, ethanol concentration in the effluent was 3.97 %vol, and ethanol productivity was 43 % higher compared with that by free yeast fermentation in our previous study.

Key words: spent grains; immobilized yeast; ethanol fermentation; continuous fermentation

我国传统白酒独特的固态发酵生产方式伴随着大量丢糟的产生。据估计,每年丢弃的酒糟量在 1500~2000 万 t^[1],这些废弃资源到目前为止尚未得到充分有效的利用。另一方面,能源危机对于高效新型能源的开拓提出了迫切要求,以木质纤维素为原料的生物乙醇生产是新型能源重要获取途径之一^[2]。

在木质纤维素降解液的乙醇发酵生产中,高效发酵菌剂开发是一个重要方面^[3]。固定化细胞技术是采用物理或化学手段,将游离细胞固定在一个有限空间内,使之保持催化活性,以实现反复使用。固定化的细胞能持续增殖、休眠、衰亡,但是它的酶活性得以保持,并且因为被固定之后细胞密度提高,反应速度变得更快。产物容易分离,能实现连续操作,耐毒害能力加强,可大大提高生产

力^[4]。本论文探讨了将高效酵母细胞固定化,用于提高丢糟酸降解液酒精发酵效率的可行性。

1 材料与方法

1.1 菌种

四川大学酿造与食品生物技术实验室保存的 LR3.1300 酵母(*Saccharomyces, sp.*)。通过 2 %YPD 斜面培养基(含 11 %乙醇)保持其遗传稳定性。在 YPD 试管斜面(葡萄糖 2 %,蛋白胨 2 %,酵母膏 1 %,琼脂 2 %)上分别接种 1 环菌种 LR3.1300,28 °C 活化 1 d。以 1 环/100 mL 的接种量将新鲜酵母菌苔接入 10 °Birx 的米曲汁(米曲汁制备根据文献^[5])中,28 °C 静置培养 1~2 d。每天摇晃 1~3 次,当有正常酿造香,发酵液变浑浊,酵母活菌数达到 10⁸ 个/mL 以上,镜检酵母细胞健壮整齐,出芽率 15 %

基金项目:农业部沼气研究所开放基金项目(2009002) 国家科技部国际合作项目(2009DFA60890)。

收稿日期:2011-07-25

作者简介:吴正云(1970-),男,博士(后),研究方向为食品生物技术。

通讯作者:张文学(1963-),男,博士,教授,研究方向为发酵工程,E-mail: foodbiotech@126.com。

~30%、无杂菌污染时,即可用于酵母固定化操作。

1.2 酵母菌细胞固定化

将经过 30 min 的紫外杀菌后的海藻酸钠溶于适量无菌水中,以 1:10 比例将增殖后的酵母菌液与海藻酸钠溶液混合,搅拌均匀。使用 5 mL 的医用注射器吸取海藻酸钠-酵母菌悬液,以恒定速度滴到盛有 10% 的氯化钙溶液中。将微囊胶珠转移到含有氯化钙溶液的三角瓶中,于 4℃ 下静置 24 h 备用。

1.3 丢糟降解液的固定化酵母发酵

以四川全兴酒厂提供的新鲜丢糟为原料,参照本实验室前期试验结果^[5]制备丢糟降解液。将丢糟烘干、浓硫酸降解后,以氧化钙中和、过滤、浓缩至还原糖浓度为 7.15%。用于固定化酵母乙醇发酵实验。

固定化酵母批次发酵:参考前期丢糟降解液乙醇发酵试验的结果^[5],在固定化酵母批次发酵中设计两组不同的发酵培养基试验:试验组一采用丢糟降解液原液(还原糖浓度为 7.15%);试验组二采用丢糟降解液与葡萄糖的混合液,将降解原液稀释 1 倍后补加葡萄糖至还原糖浓度为 7.15%。发酵培养基用硫酸调 pH3.5~4.5,加入 1600 U/mL 青霉素钠抑菌。将 100 mL 发酵培养基加入 500 mL 三角瓶中,加入 10 mL 固定化酵母菌液,以保鲜膜封口。在 28℃ 下进行批次发酵,每 24 h 称重并取样分析测定。

固定化酵母连续发酵:采用丢糟降解液和葡萄糖的混合液(降解糖液稀释 1 倍后补加葡萄糖至还原糖浓度为 7.15%)作为发酵培养基,用硫酸调 pH3.5~4.5,加入 1600 U/mL 的青霉素钠抑菌。采用自制连续发酵装置进行试验(图 1,发酵罐为 500 mL 塑料化学试剂瓶改制,将玻璃管插入塑料试剂瓶并将接口密封),将 500 mL 发酵培养基装到原料罐(1 L 三角瓶)中,通过恒流泵调节进料流速进入连续发酵罐。以保鲜膜封口的 500 mL 烧杯接收发酵流出液。连续发酵罐中初始发酵培养基体积 400 mL,加入固定化酵母菌液 60 mL。在 28℃ 下封闭发酵 24 h,随后开启恒流泵进行连续发酵。设置两组不同的进料流速进行试验:试验组一进料流速为 20 mL/h;试验组二进料流速为 15 mL/h。每 24 h 取样分析测定。

1.4 分析测定

产气量根据电子天平称量的连续发酵罐重量变化计算;还原糖采用斐林试剂法测定;木糖采用间苯三酚法测定^[6];酒精度采用重铬酸钾法测定^[7];微囊酵母菌细胞数测定根据文献^[8];固定化连续发酵中游离酵母采用血球计数板计数;pH 用精密酸度计测定。还原糖、木糖利用率、产酒率及乙醇发酵效率计算如下:

还原糖利用率(%)=(还原糖初始浓度-还原糖终浓度)/还原糖初始浓度

木糖利用率(%)=(木糖初始浓度-木糖终浓度)/木

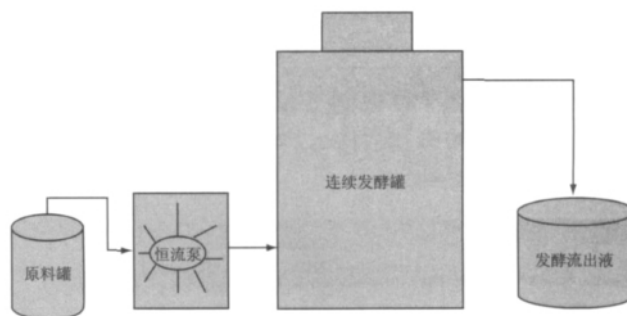


图 1 固定化酵母连续发酵自制装置图

糖初始浓度

产酒率(%)=实际产酒量/理论产酒量

乙醇发酵效率(g/mL·h)=发酵液中的乙醇浓度/发酵时间

2 结果与讨论

2.1 采用固定化酵母的丢糟降解液乙醇批次发酵

固定化酵母用于丢糟降解液批次乙醇发酵过程的动态测定结果见图 2。混合液的产气速度快于降解原液(图 2A),其还原糖的利用速度也明显较快(图 2B),这与本课题组前期使用游离的 1300 酵母细胞发酵丢糟降解液试验中的情况类似^[5]。分析其原因可能有两方面,一是混合液中的葡萄糖含量相对高于降解原液,而酵母利用葡萄糖的效率较高;二是混合液由于经过稀释,其中的发酵抑制因子浓度降低。

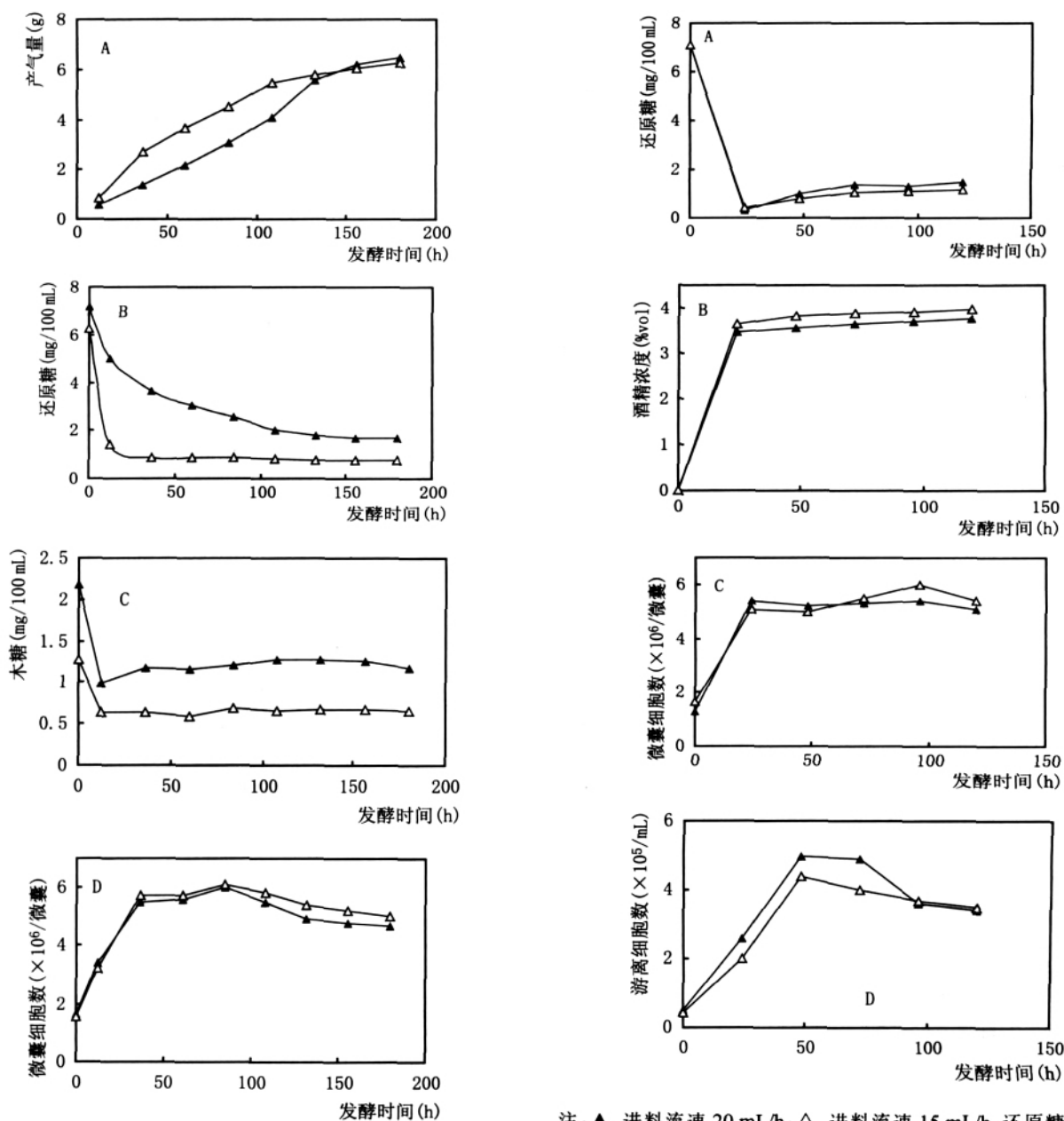
由图 2C 可见,两组试验培养基中的木糖浓度在第一天都有明显降低,然后无明显变化;降解液原液中的木糖起始浓度和终浓度都较高,但木糖浓度降低幅度高于混合液。这表明,固定化的 1300 酵母细胞对木糖能有限地利用,其利用程度可能与培养基中木糖的起始浓度有一定关系。固定化酵母微囊细胞数的测定结果(图 2D)显示,采用混合液发酵过程后期的微囊细胞数量略高,但差异不明显。

此外,两组批次发酵试验过程中,pH 值无明显变化,基本维持在 3.5 左右(详细数据略)。酒精测定结果显示,采用丢糟降解液发酵的最终酒精度为 2.89%vol(产酒率为 76.4%);采用混合液发酵的最终酒精度为 3.01%vol(产酒率为 84.3%)。

综上,采用降解液与葡萄糖混合液的乙醇发酵效果更好,这与前期使用游离 1300 酵母的发酵试验的结果类似^[5]。因此,使用混合液作为发酵培养基进行后续的固定化酵母连续发酵研究。

2.2 丢糟降解液的固定化酵母连续发酵

在固定化酵母用于丢糟降解液连续乙醇发酵试验中,采用 15 mL/h 和 20 mL/h 进料流速的还原糖浓度、酒精浓度、微囊细胞数及游离细胞数的动态变化趋势基本相同(图 3)。在第二天的封闭发酵阶段,还原糖迅



注: ▲-降解液原液; △-降解液与葡萄糖混合液; 产气量(A)、还原糖浓度(B)、木糖浓度(C)、微囊细胞数(D)

图2 固定化酵母用于丢糟降解液批次乙醇发酵过程动态变化

速消耗殆尽,酒精浓度提高到3.5%vol左右(图3A、图3B)。在随后的连续进料阶段,还原糖浓度缓慢回升至1 mg/100 mL左右,酒精浓度变化不大。总的来看,进料流速为15 mL/h的连续发酵其最终还原糖浓度较低而酒精浓度略高,原因可能是较慢的进料流速有利于降解液与固定化酵母细胞的充分接触。

由图3C、图3D可以看出,微囊细胞数经过第一天的封闭发酵,增加了约 4×10^6 /微囊,在随后的连续发酵阶段变化不大;游离细胞数在前两天迅速增加,然后缓慢下降。这表明,第一天的封闭发酵阶段,微囊内外的酵母

注: ▲-进料流速20 mL/h; △-进料流速15 mL/h; 还原糖浓度(A)、酒精浓度(B)、微囊细胞数(C)、游离细胞数(D)

图3 固定化酵母用于丢糟降解液连续乙醇发酵过程动态变化

都得以大量增殖,随后由于连续进、出料开始,游离酵母逐渐被洗出。由于微囊酵母数基本保持稳定,证明在连续发酵过程中微囊未出现破损情况。

两组试验过程中pH值都没有太大变化,基本维持在pH3.5左右(详细结果略)。

在固定化1300酵母连续发酵中,当固定化酵母液为60 mL,降解糖液进料速度为15 mL/h时,流出液酒精度达到3.97%vol,还原糖利用率为83.7%。

与前期酵母1300的降解液发酵试验结果相比^[5],固定化酵母连续发酵的酒精度要略低,而还原糖浓度较高,显示其发酵相对不够彻底。但是计算结果显示,固定化酵母连续发酵效率是1 g/mL·h;而未固定化的酵母发酵效

(下转第92页)

时的电离;测定钾时加入 0.1% 的氯化铯到标样及样品中作为抑制剂以消除钾在燃烧时的电离。在以上基础上进行系列标准溶液测定,得到各元素与吸光度之间均呈良好的线性关系,相关系数均大于 0.9990。

3.3 侗家奇液酒中含有较为丰富的钾、钙和镁,同时还含有铁、铜、锌、锰、硒、钼和锂等人体必需的微量元素,而铅元素含量较低,符合国家对酒饮料的标准要求。钾是人体必需元素之一,维持生命个体中血液的酸碱度及电解质平衡,同时还能使酒中活性成分之间达到平衡而增加酒的醇甜感,也许这就是侗家奇液酒深受侗族人民喜爱的原因之一。

参考文献:

- [1] 刘桂同.我国保健酒市场开发策略研究[D].天津大学,2005.
- [2] 李安陵.关于保健酒的研发思考[J].酿酒,2009,36(5):87-89.

- [3] 黄书声,韩娜,佟晓芳.中国保健酒的历史、现状和发展[J].酿酒,2008,35(4):16-21.
- [4] 王晓慧.“保健酒”再现掘金潮[J].新财经,2010(1):76-77.
- [5] 王晓慧.保健酒为何频现“无间道”[J].新财经,2010(11):90-91.
- [6] 宁准梅,黄玮岚,王勤.传统保健酒中药浸提工艺的研究[J].酿酒科技,2011(5):81-83.
- [7] 罗莉.四川淫羊藿属植物组织培养及其总黄酮和无机元素含量研究[D].四川农业大学,2010.
- [8] 徐银娣,施丹萍,吴晓燕,吴芬芳,沈晓红,周玉波.FAAS 测定酒当归中的微量元素[J].光谱实验室,2011,28(3):1212-1214.
- [9] 李茵萍,刘丛,杜为军,龚兰新,朱惠忠,关明.穆塞莱斯葡萄酒中微量元素的分析[J].中国酿造,2009,2(203):150-151.
- [10] 李玉珍,邓宏筠.原子吸收分析应用手册[M].北京:北京科学技术出版社,1990.
- [11] 曾琦斐.微量元素与人体健康[J].中国科技信息,2008(3):158-159.

(上接第 89 页)

率则为 0.7 g/mL·h。与未固定化酵母相比,固定化酵母的发酵效率提高了 43%。

3 结论

3.1 在海藻酸钠包埋固定化酵母 1300 的乙醇发酵中,使用丢糟降解液与葡萄糖的混合溶液作为发酵培养基,比使用降解液原液具有更高的底物利用和产酒效率。

3.2 与游离的 1300 酵母相比,使用固定化酵母的丢糟降解液连续乙醇发酵效率有显著提高。

3.3 在使用固定化酵母的丢糟降解液连续发酵中,当固定化酵母液为 60 mL,降解糖液进料速度为 15 mL/h 时,流出液酒精度达到 3.97 %vol,还原糖利用率为 83.7%。

参考文献:

- [1] 徐发,谢武.我国白酒行业总体概况和发展趋势分析[J].酿酒,2009,36(2):23-25.
- [2] 孙清.燃料乙醇技术讲座(二)燃料乙醇的生产方法[J].可再生能源,2010,28(2):154-156.
- [3] Bui K & Galzy P.Yeast Technology[J]. Spencer JFI & Spencer DM (eds), 1990(27):241-265.
- [4] 赵龙飞,徐亚军,周红杰.酵母菌综合利用的研究进展[J].食品研究与开发,2004,25(4):29-31.
- [5] 李琼.降解糖液半连续发酵酒精发酵工艺研究[D].成都:四川大学,2010.
- [6] 黎君友,孙丹.间苯三酚显色法微量快速测定木糖含量[J].感染.炎症.修复,2002(3):167-169.
- [7] 沈怡方.白酒生产技术全书[M].北京:中国轻工业出版社,2007.
- [8] 刘晓峰,李莉.固定化酵母的性能和管理[J].广西轻工业,2003(6):17-19.

双沟酒业获全国“安康杯”竞赛优胜企业称号

本刊讯 近日,江苏省宿迁市总工会常务副主席王勇等领导到江苏双沟酒业公司调研了解生产情况,对双沟酒业公司在全国安康杯劳动竞赛活动中所取得的优异成绩给予了表彰,并现场将全国安康杯优胜企业匾额授予公司。

自双沟洋河联合组建苏酒集团以来,在新的运营体制下,双沟酒业的宣传力度不断加大,市场开拓能力不断增强,取得了令同行业瞩目的业绩,企业呈现出强劲的发展势头。快速发展的同时,公司把安全生产放在了首位,坚持软、硬件“两手抓”的指导思想,积极开展平安企业创建工作。

工作中成立了以董事长为组长的“平安企业”创建工作领导小组,加强对创建工作的领导。制订了《江苏双沟酒业股份有限公司社会治安综合治理创建“平安企业”实施方案》,把创建方案融入到公司《安全生产管理办法》、《治安保卫处罚规定》、《治安管理办法》、《消防安全管理规定》、《调解组织规则》等企业内部管理规则之中,把创建目标和任务分解到各个处室和车间,并通过月检查、季考核、年评比等形式,对基层创建工作实行监督,有效地推动了创建工作的深入开展。

不断完善制度的同时,公司加强了硬件建设,先后投资百万元安装了先进的电视监控系统,为治安保卫人员配备了对讲机、警车、消防车等制防执勤器械及车辆,形成了人防、技防、设施防、制度防等四位一体的防范体系,实现了对生产区、办公区、外圍区、宿舍区等区域全方位、全覆盖、无死角的监控,彻底消除了治安、消防隐患,改变了厂区的环境,使公司成为无刑事案件、无治安案件、无火灾事件的“三无”企业,公司已连续 15 年无安全生产事故,企业先后被评为“市十佳安全文明企业”、市级“平安企业”和江苏省“平安企业”。(王昆)