

玉米原料无蒸煮发酵酒精工艺的研究

马文超¹,石贵阳^{1,2},章克昌¹

(1.江南大学生物工程学院生物资源研究室,江苏 无锡 214036;2.江南大学工业生物技术教育部重点实验室,江苏 无锡 214036)

摘要: 利用筛选的糖化酶作为糖化剂,进行玉米无蒸煮发酵酒精的试验,确定了糖化酶的最适添加量为 100 u/g 原料,料水比 1:2,自然 pH,以过 40 目筛的玉米粉为原料,活性干酵母添加量 0.3%,30℃条件下恒温发酵 60~70 h,发酵醪酒精度达 15%。外加氮源或酸性蛋白酶对发酵有促进作用,可使酒精度达 16%,原料的淀粉利用率达 88%左右,在 15 L 发酵罐的扩大试验中也取得了较好的效果。发酵过程还原糖始终处于较低水平,有效地抑制了杂菌,使发酵得以顺利进行。该工艺显著地节省了酒精生产过程中的能源消耗,它对进一步提升酒精在我国能源结构中所占的比重具有重要意义。

关键词: 酒精; 生料发酵; 糖化酶

中图分类号:TS262.2;TS261.4 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2005)02-0050-04

Study on Alcohol Fermentation by Uncooked Corn Flour

MA Wen-chao¹,SHI Gui-yang^{1,2} and ZHANG Ke-chang¹

(1.Lab of Biomass Resources, School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi, Jiangsu 214036;2.The key Laboratory of Industry Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi, Jiangsu 214036, China)

Abstract: The study on alcohol fermentation by uncooked corn flour with selected glucoamylase as saccharifying agent was illustrated in this paper. The experiment process was as follows: the optimal addition quantity of glucoamylase as 100 u/g, the ratio of material to water as 1:2 with natural pH value, corn flour as raw materials (filtered by 40 screen mesh) and 0.3% addition of active dry yeast, then 60~70 h fermentation under stable temperature at 30℃, alcoholicity of fermented mash was 15%(v/v), addition of nitrogen source or acid protease could advance fermentation and enhance alcoholicity to 16%(v/v), the utilization rate of amyllum reached about 88, and the scaled-up test (15l big fermentation pot) also showed a good result, in the fermentation course, reducing sugar kept in low level all the time which could effectively inhibit sundry bacteria and ensure fluent fermentation. Such technique could greatly reduce energy consumption in ethanol production and had significant influence on alcohol status in energy structure in China. (Tran. by YUE Yang)

Keyword: ethanol; fermentation by uncooked materials; glucoamylase

自 20 世纪 70 年代发生石油危机以来,石油价格不断上涨,各国政府和大企业开始投资新能源的开发和研究,酒精燃料可再生能源得到各国科学家的重视。在淀粉质原料发酵生产酒精的传统工艺中,蒸煮工段所消耗的蒸汽量占整个生产过程总能耗的 30%~40%^[1],为节能和降低成本,无蒸煮发酵(生料发酵)酒精技术成了国内外研究的热点,虽然在这方面的研究取得了一些可喜的成果,但到目前为止,国内外真正在工业生产上采用

这种技术的还寥寥无几,无蒸煮发酵酒精总体上还处于实验室水平和试验性生产阶段。纵观国内外关于无蒸煮酒精发酵方面的研究,可以发现广大科研工作者把精力主要放在高活力生淀粉糖化酶菌株的选育和糖化机理的研究上,而对糖化发酵工艺等方面缺乏深入细致的研究。早在 20 世纪 80 年代,已有人开始把普通糖化酶应用于无蒸煮酒精发酵的研究,但存在的主要问题是酶的糖化能力弱,用量大,而且还要添加纤维素酶,酸性蛋白

收稿日期:2004-10-19; 修回日期 2004-12-09

作者简介:马文超(1977-),男,河南三门峡人,江南大学硕士。

酶等辅助酶,发酵周期长,易染菌^[2,3]。近20年来,随着酶制剂工业的高速发展,高活力糖化酶不断涌现,从目前国内商业生产的糖化酶中挑选到一种比较高效的糖化酶,以它作为糖化剂,进行玉米无蒸煮发酵酒精是极有可能的。经过对几十种糖化酶的筛选,挑选到一种较好的糖化酶,并以它作为糖化剂,进行了玉米生料发酵酒精的初步试验,取得了很好的效果,为进一步工业化生产奠定了坚实的基础。

1 材料和方法

1.1 菌种

活性干酵母(ADY),酒用耐高温型,湖北安琪酵母股份有限公司生产。

1.2 原料及试剂

玉米粉(过40目筛)购自无锡中盛饲料有限公司,经测定淀粉含量为65.8%,水分含量为8.6%,其他试剂为国产分析纯。

1.3 酶制剂

固体,酶活为120000 u/g,由本实验室筛选。

1.4 酵母活化

称取一定量的活性干酵母(ADY),用2%葡萄糖溶液置于37℃恒温箱中20 min后,移至30℃恒温箱中活化1.5 h,即可以作酒母使用。

1.5 酒精发酵试验

称取80 g过40目筛的玉米粉,加入适量的糖化酶和酵母,按比例与30℃自来水均匀混和于500 mL的三角瓶中,塞上发酵栓,放入恒温培养箱内,30℃进行发酵70 h,间歇振荡,记录CO₂的失重,估计发酵状况。在15 L的发酵罐中,定时取样,测定发酵过程中各参数。

1.6 分析方法

①还原糖,总糖用DNS法测定

还原糖的测定:量取10 mL待测发酵液,于抽滤瓶中抽滤至无液滴下,稀释抽滤液至适当倍数,然后用3,5-二硝基水杨酸(DNS)比色法测出其值。

总糖的测定:取10 mL发酵液于250 mL三角瓶中,加入30 mL水和5 mL 6 N盐酸,于沸水浴中水解1 h,抽滤后将滤液稀释到适当倍数用DNS法测定还原糖。

②酵母的镜检、计数、出芽率的测定^[5]

③酸度用0.1 mol/L NaOH滴定^[6]

④pH值用精密pH试纸测定

⑤酒精度用常规蒸馏法测定

2 结果与分析

2.1 不同糖化酶添加量对发酵的影响

由于玉米生料发酵采用边糖化边发酵工艺,加酶量

的多少直接影响到发酵的好坏,通过添加适量的糖化酶,可使糖化和发酵的速度同步,发酵醪中还原糖的含量始终处于较低水平,从而抑制杂菌生长,提高发酵醪的酒精度。在前期试验的基础上,选用过40目筛的玉米粉,接种量为0.3%,料水比1:2,发酵温度30℃,结果见表1。

表1 糖化酶添加量对发酵的影响

加酶量 (u/g)	CO ₂ 失重 (g)	醪液酒精度 (%, v/v)	残总糖 (g/100mL)	残还原糖 (g/100mL)
50	25.8	13.2	3.8	0.30
100	27.9	15.2	3.4	0.61
150	27.3	14.6	3.6	0.86
200	27.6	14.8	3.3	0.90

由表1可知,当糖化酶用量为100 u/g时,酒精度最高,残总糖、残还原糖都相对较低,表明此时糖化与发酵速度基本协调,保证了发酵醪中还原糖含量的低水平,故在以后的实验中糖化酶的添加量均为100 u/g。

2.2 不同加水比对发酵的影响

醪液浓度的大小直接影响到基质中酶及酵母的代谢活动,同时,合理的浓度对提高出酒率、提高设备利用率和降低能耗也是非常重要的。以淀粉利用率为指标进行比较,结果如表2。

表2 不同料水比对发酵的影响

试验号	料水比	升酸幅度	酒精度 (%, v/v)	淀粉利用率 (%)
1	1:1.8	2.3	16.2	83.2
2	1:2.0	2.9	15.4	86.8
3	1:2.5	3.3	13.4	87.1

从表2看,料水比在1:2.0和1:2.5时,淀粉利用率相差不大,考虑到生料发酵的一大优点是醪液黏度小,有利于高浓度发酵,若采用浓醪发酵,不但节省了能源,提高设备的利用率,而且可相对提高发酵醪中酒精的浓度,这对抑制杂菌是有利的。另外,在发酵过程中还可以看到,加水量越大,发酵液沉淀越严重,故选用料水比1:2,在以后的实验中均采用此料水比。

2.3 初始pH对发酵的影响

发酵醪的pH对酵母的生命活动有显著影响,营养物质进入细胞的速度与醪液的pH值有关,同时pH对酶活也有影响。酵母最适pH为4.2~5,当pH降到4.2以下时,酵母仍能继续繁殖,调节发酵液的初始pH进行发酵,结果见表3。

从表3可以看出,随着初始pH的降低,升酸幅度有所降低,但酒精度大幅下降,残糖量也随之升高,而在自然状态下,酒精度最高,且发酵也正常,故选用在自然状态下(不调酸)发酵,不但节省了成本,同时也省去了

表3 初始pH对发酵的影响

pH	升酸幅度	酒精度 (% v/v)	总糖 (g/100 mL)	还原糖 (g/100 mL)
5.8 (自然)	3.4	15.1	3.64	0.65
3.5	2.6	13.4	5.73	0.44
4.2	2.9	14.2	4.98	0.88
4.8	3.2	14.5	4.0	0.80

调酸工序。

2.4 纤维素酶对发酵的影响

用于酒精发酵的玉米粉淀粉颗粒的表层结合一定量坚硬的纤维组织(主要是纤维素、半纤维素和果胶),如果用酶法除去坚硬的纤维组织,从理论上是能够提高糖化酶水解生淀粉能力的,有关资料也证实了这一点^[7],实验结果见表4。

表4 添加纤维素酶对发酵的影响

项目	酒精度 (% v/v)	升酸幅度	还原糖 (g/100 mL)	总糖 (g/100 mL)
1(对照)	15.1	3.2	0.11	3.2
2(5u/g)	14.9	3.3	0.13	3.4
3(10u/g)	15.1	2.9	0.12	3.5

从表4可以看出,添加纤维素酶对发酵没有明显影响,可能是由于过40目筛的玉米粉中所含的纤维素物质较多之故。

2.5 氮源对发酵的影响

2.5.1 不同氮源对发酵的影响

通常认为玉米原料中的营养物质比较齐全,能够满足酵母菌的生长需求,但由于采用生料发酵工艺,没有蒸煮过程,含氮物质往往是以大分子蛋白质状态存在,而酵母只能吸收氨基态氮,所以氮源可能会供应不足,从而影响发酵^[8]。根据以往实验的研究,首先选用0.5%的 NH_4HCO_3 (按原料计)的添加量,其余氮源以添加 NH_4HCO_3 中所含氮的量为标准。从图1中可以看出,氮源的添加对酒精发酵的影响还是比较明显的,在所考察的氮源中 NH_4HCO_3 的效果最好。

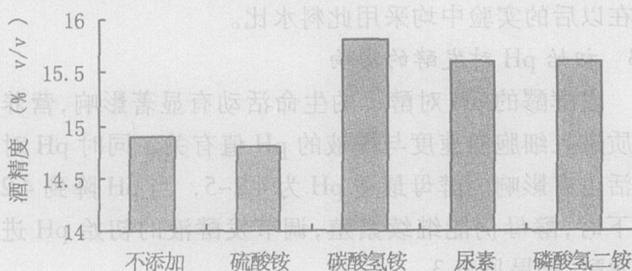


图1 不同氮源对酒精发酵的影响

2.5.2 NH_4HCO_3 添加量的确定

从表5可以看出, NH_4HCO_3 添加量对酒精度有较大影响,当其添加量为0.75%时,效果最好。

表5 NH_4HCO_3 添加量对发酵的影响

NH_4HCO_3 (% w/w)	酒精度 (% v/v)	升酸幅度	总糖 (g/100 mL)	还原糖 (g/100 mL)
0	15.0	3.0	4.0	0.70
0.5	15.6	2.9	3.0	0.31
0.75	16.0	2.7	2.8	0.28
1.0	15.1	2.3	2.6	0.27

2.5.3 酸性蛋白酶对发酵的影响(见表6)

表6 酸性蛋白酶对发酵的影响

蛋白酶 (u/g)	酒精度 (% v/v)	残总糖 (g/100 mL)	升酸幅度	残还原糖 (g/100 mL)
0	15.0	4.3	3.2	0.28
5	15.6	3.8	3.1	0.24
10	15.6	3.2	3.0	0.23
15	15.9	2.8	2.7	0.24

从表6可以看出,添加酸性蛋白酶对发酵有一定的促进作用,当其用量为15 u/g时效果较好。

2.6 发酵过程动态变化曲线

在料水比为1:2时,糖化酶添加量为100 u/g,酵母的添加量为0.3%,发酵温度30℃条件下,进行发酵,间隔一定时间取样进行分析,结果如图2,图3。

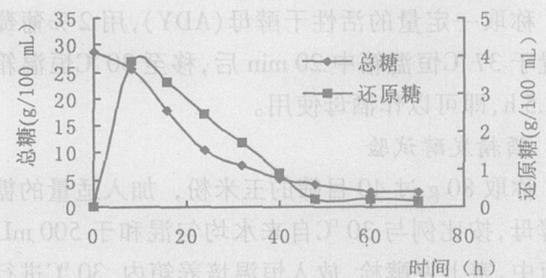


图2 总糖、还原糖随时间的变化曲线

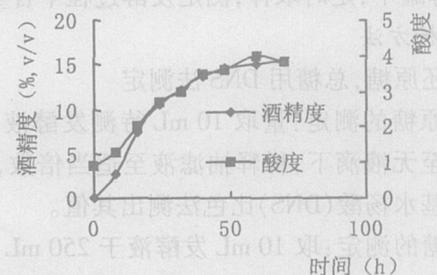


图3 酒精度、酸度随时间的变化曲线

从图2,图3看出,主发酵期在48h左右基本结束,发酵10h酒精度已达5%,这对抑制杂菌是有利的。发酵过程中还原糖保持了较低的水平,发酵液生酸主要在前24h,增酸幅度为3左右。

2.7 15 L发酵罐玉米生料发酵酒精实验

在15 L发酵罐里,玉米粉3.5 kg和7 kg自来水(另外添加0.75% NH_4HCO_3)混合,30℃恒温发酵70 h,结果见表7。

表7 玉米无蒸煮发酵酒精扩大试验结果

时间 (h)	酒精度 (%, v/v)	发酵醪 酸度	还原糖 (g/100mL)	总糖 (g/100mL)
0	0	0.6	-	27.2
24	8.0	2.1	1.9	11.9
48	14.5	3.0	0.6	5.5
70	15.3	4.0	0.3	3.6

从整个发酵过程来看,发酵比较平缓,从发酵结果看,基本上接近在三角瓶里的发酵水平。发酵液虽有一定的升酸,但从发酵液的颜色、气味、状态来看都很正常。发酵初期,醪液明显分为上下两层,玉米粉沉积在罐底,而上清液中溶解的酶显然不能和玉米粉充分作用,造成了损失。由此可见,用普通的酒精发酵罐来进行生料发酵并不理想,它不能有效解决在发酵过程中原料沉淀这个问题,因此,有必要设计适合于生料酒酒精发酵的发酵罐,以提高发酵效率。

3 结论与探讨

经过上述试验,可初步得到如下结论:糖化酶最适添加量为 100 u/g,料水比 1:2,以过 40 目筛的玉米粉为原料,在自然状态下(pH5.5~6.0),30℃恒温发酵 60~70 h,醪液的酒精度在 15%左右,外加氮源或酸性蛋白酶,酒精度有所提升,达到 16%。醪液的升酸幅度在 2.5~3.5,可见醪液中的生酸细菌有少量的污染,原料的淀粉利用率达 88%左右,从整个发酵情况来看是正常的、可以接受的。

从试验结果看,这种糖化酶是一种优良的生淀粉糖化酶,它非常适合于玉米生料发酵,发酵周期只有 60~70 h,而且不需要添加液化酶等。文献上报道的所谓的生淀粉糖化酶用来糖化玉米发酵酒精,达到同样的发酵水平,一般 150 h 以上,而且需要添加辅助酶。目前工业上用来生产酒精的原料还有甘薯、木薯、马铃薯、瓜干、小麦等淀粉质原料,因此,进一步研究该糖化酶的原料适应性已在计划之内。

人们历来认为,杂菌污染引起生酸是制约生料发酵

的瓶颈之一,但无论在三角瓶,还是发酵罐,发酵醪的升酸幅度基本在 2.5~3.5,发酵液的颜色、气味、状态都很正常,而且淀粉利用率也在 88%左右,说明杂菌得到了有效的抑制。之所以能够达到这样的结果,一方面是由于所用的玉米原料质量好,无霉变,杂菌含量少,另一方面是由于如下原因:

①采用边糖化、边发酵工艺,使发酵醪中还原糖始终处于低水平,不利于杂菌繁殖。

②30℃的发酵温度不利于杂菌的生长繁殖。

③酵母的接种量大,和杂菌相比,始终处于生长优势。

④发酵 10 h,酒精度就达到 5%左右,对杂菌有很强的抑制作用,发酵周期短,只需 60~70 h,而以往的生料发酵时间一般在 120 h 以上。

因此,可以认为,要使生料发酵酒精顺利进行,各因素的控制并辅助适当防腐剂、抑菌剂,发酵是可以安全度夏的。在这方面,将进一步做深入研究。

总之,这种生淀粉糖化酶和无蒸煮发酵工艺大大节省了发酵法生产酒精过程中的能源消耗,如果使这一工艺进一步趋于成熟,并在酒精工业化生产中得以应用,将具有极其重要的现实意义。

参考文献:

- [1] 方善康,朱明田.瓜干原料无蒸煮酒精发酵中试研究[J].食品与发酵工业,1990,(4):35-39.
- [2] 吴文睿.论无蒸煮酒精发酵技术[J].中国酿造,2001,(3):26-27.
- [3] 黄平.生料酿酒技术[M].北京:中国轻工业出版社,2001.
- [4] 无锡轻工大学编.微生物学(第2版)[M].北京:中国轻工出版社,2001.
- [5] 蔡定域.酿酒工业分析手册[M].北京:中国轻工业出版社,1988.
- [6] 薛正莲.玉米原料无蒸煮酒精发酵工艺的研究[J].工业微生物,1999,29(4):31-34.
- [7] 谢林,吕西军.玉米酒精生产新技术[M].北京:中国轻工业出版社,2000.

(上接第 49 页)

首先,酸量要控制在合理的范围内,国家标准对此作了明确的规定。不同的酒体,总酸量要多少才有较好或最佳效果是一个不定值,要经过勾调人员的经验和口感来定,但一般来说,低度酒比高度酒调酸量要少,这与羧酸在水中比在乙醇中酸性强度大有极大关系。其次要看含量较多的这几种酸的构成情况是否合理,比例关系是否恰当。

3.3 味觉转变区间的确定

使用复合酸时如何找到最佳味觉转变区间要求勾兑人员具有较高的评酒水平和勾调技巧。同时在进行小样勾调时要求计量准确,最好使用微量进样器。

酸在白酒中作用力之强,功能之丰富,影响面之广,还有待更深层次的研究,亦是容易把握。总之,复合酸在白酒中的应用是不可忽视的。●