

木薯淀粉高温浓醪发酵酒精工艺的研究

陆 雁¹, 秦 艳¹, 李明松², 王青艳¹, 关 妮¹

(1. 广西科学院国家非粮生物质能源工程技术研究中心, 广西 南宁 530007;

2. 广西大学生命科学与技术学院, 广西 南宁 530004)

摘 要: 以木薯淀粉为原料, 以筛选到的耐高温酵母为菌种, 进行高温浓醪发酵酒精工艺条件的研究。经单因素、正交实验, 得到最佳工艺为: 按 1:2 的料水比, 经液化糖化后, 冷却到 37 ℃, 调 pH 为 4.0, 加入 0.10 % 尿素, 接种量为 5 %, 发酵 64 h, 最高酒度可达 15.54 % vol。

关键词: 酒精; 浓醪发酵; 耐高温; 木薯淀粉

中图分类号: TS262.2; TS261.4 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2009)09-0023-03

Study on High-temperature and High-gravity Ethanol Fermentation of Cassava Starch

LU Yan¹, QIN Yan¹, LI Ming-song², WANG Qing-yan¹ and GUAN Ni¹

(1. National Engineering Research Center for Non-food Biorefinery, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi 530007;

2. College of Life Science and Technology of Guangxi University, Nanning, Guangxi 530004, China)

Abstract: The technical conditions of high-temperature and high-gravity ethanol fermentation of cassava starch with the screened high-temperature resistance yeast as microbial species were investigated. And the optimum technical conditions were determined as follows through single factor test and orthogonal test: the ratio of raw materials to water was 1:2, then after liquefaction and saccharification, the broth was cooled down to 37 ℃ and its pH value adjusted to 4.0, then 0.10 % urea added and the inoculation quantity was 5 %, then after 64 h fermentation, the highest alcohol content could reach up to 15.54 % vol.

Key words: ethanol; high-gravity mash fermentation; high temperature resistance; cassava starch

木薯是热带和亚热带广泛种植的粮食和经济作物, 耐旱、耐病、耐水, 适应性很强, 对土质要求不高。我国南方盛产木薯, 产量高, 淀粉含量高, 鲜木薯的淀粉含量为 25 %~30 %, 干淀粉含量达 75 %, 被誉为“淀粉之王”^[1], 是不与粮食争地的很有发展前途的酒精生产原料。

目前, 大多数木薯酒精生产中所采用的菌种和生产工艺都是玉米、小麦等淀粉原料发酵中运用较成熟的菌种和工艺, 而木薯淀粉与玉米、小麦等淀粉原料有着较大差别。因此, 高产酒精木薯专用酵母的选育和发酵工艺的改进是实现木薯酒精高温浓醪发酵工业的关键。我国工业用酒精发酵的传统菌种为酿酒酵母及其变种, 其发酵温度通常在 28~35 ℃, 最高很难超过 36 ℃。而酵母发酵是放热过程, 发酵温度可达 37 ℃左右, 尤其在南方, 年平均气温为 29 ℃, 旱季高达 40 ℃, 需要消耗大量的冷却水, 这就大大增加了生产成本^[2]。采用高温浓醪发酵不仅可以加快生产速度, 缩短发酵周期, 而且能节约能源, 降低综合成本, 提高设备的利用率。但浓醪发酵时, 酵母的产酒能力对温度很敏感, 当温度较低时, 酵母发酵能力

随温度上升而升高, 产酒速度加快, 温度过高时, 酵母发酵酶系活力出现钝化, 产酒精能力下降。由于高温增加了酒精对酵母的毒性, 要求在浓醪发酵时选择耐高温酵母菌株来提高酵母的耐性^[3]。

本实验室筛选到一株耐高温高产酒精酵母野生菌, 于 37 ℃条件下能正常生长, 并适用于木薯淀粉浓醪发酵酒精。前期已通过试验确定了木薯淀粉的液化和糖化条件, 本实验在此基础上对影响木薯酒精发酵的几个主要因素进行摇瓶实验研究, 为下一步工艺的改进和扩大实验提供参考。我国传统工艺酒精产率为 9.5 %~10.5 %, 落后于酒精生产技术先进国家酒精产率 11 %~13 % 的水平。

1 材料与方法

1.1 材料

菌种: 本实验室筛选所得 YTJ。

木薯淀粉: 由广西新天德公司提供的带皮木薯干粉碎而成的木薯淀粉。

基金项目: 国家科技支撑计划课题(2007BAD75B05), 国际科技合作项目(2008DFA30710), 桂科院研(0701)。

收稿日期: 2009-06-15

作者简介: 陆雁(1983-), 女, 广西人, 实习研究员, 主要从事微生物生物技术方面的研究。

通讯作者: 王青艳, Email: wqy0106747@sina.com。

耐高温 α -淀粉酶,糖化酶:诺维信公司生产。

1.2 培养基

YPD 液体培养基(100 mL):葡萄糖 2 g,蛋白胨 2 g,酵母粉 1 g,自来水。

YPD 固体培养基(100 mL):于液体培养基中加入琼脂 1.5 g。

1.3 方法

1.3.1 生长曲线的测定

取一环活化好的菌种接于 5 mL 液体 YPD 培养基,37 °C、160 r/min 摇床培养 16 h,取 1 mL 转接到 250 mL 新鲜液体 YPD 培养基,37 °C、160 r/min 摇床培养 24 h,每隔 2 h 取样,以未接种的新鲜液体培养基为对照,测定不同培养时间下,菌悬液于可见光 OD₆₀₀ 值,绘制生长曲线图。

1.3.2 耐高温浓醪酒精发酵条件的单因素优化实验

1.3.2.1 不同接种量和发酵温度的确定

对不同接种量:1%、3%、5%、7%和 10%,不同发酵温度:30 °C、37 °C和 40 °C进行优化。

1.3.2.2 无机盐离子的影响

对发酵醪液中尿素不同终浓度:0、0.01%、0.04%、0.07%和 0.1%,磷酸:0、0.004%、0.011%、0.018%及 0.025%进行优化,定时取样,测酒度、残还原糖及残总糖含量。

1.3.3 耐高温浓醪酒精发酵条件的正交优化实验

根据单因素实验确定对发酵影响最大的 4 个因素,并对这些因素做正交试验,确定最佳的发酵工艺条件。发酵工艺条件正交试验因素水平设计见表 1。

表 1 优化发酵工艺条件正交试验因素与水平

正交因子	糖化 pH 值	尿素用量 (%)	接种量 (%)	发酵温度 (°C)
1	3.5	0.01	3	30
2	4.0	0.04	5	37
3	4.5	0.07	7	38
4	5.0	0.10	9	39

1.3.4 酒精含量、还原糖及残总糖的测定

1.3.4.1 酒精含量

取 1.5 mL 发酵醪液离心,取上清液与 10%乙腈 1:1 (v/v)混合,气相色谱法测定酒精含量。

1.3.4.2 还原糖、残总糖测定

还原糖:取 1 mL 发酵结束的醪液离心,取上清液 50 μ L,加入 450 μ L 蒸馏水,375 μ L DNS,混匀,沸水浴 5 min,冷却,可见分光光度法测定 OD₅₄₀。空白用蒸馏水代替发酵醪液,其他条件不变。残总糖:先用 20%盐酸 10 mL 彻底酸解发酵醪液,再按还原糖测定法测定。

2 结果与分析

2.1 菌种生长曲线图

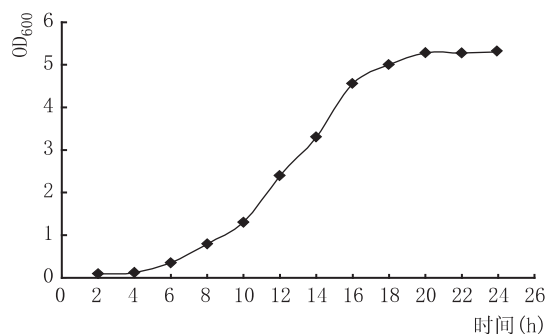


图 1 菌种 YJT 于 37 °C 条件下的生长曲线

图 1 为菌种 YJT 于 37 °C 条件下的生长曲线。由图 1 可知,菌种在 37 °C、160 r/min 培养条件下,耐温性能好,生长迅速,接种后的前 10 h 菌体生长缓慢,处在滞后期,之后生物量急剧增加,对数生长中期在 14 h 左右,20 h 后达到对数生长末期,通过镜检发现,对数生长期的菌体生长一致,代谢旺盛。

2.2 不同接种量和发酵温度的优化结果

接种量对木薯淀粉发酵酒精有一定的影响,其结果见表 2。木薯淀粉发酵酒精过程不同发酵温度对发酵结果的影响见表 3。

表 2 木薯淀粉发酵酒精不同接种量的影响

接种量 (%)	发酵酒度 (%vol)	残还原糖 (%)	残总糖 (%)
1	14.83	0.26	1.84
3	14.89	0.24	1.53
5	14.98	0.32	1.60
7	14.93	0.28	1.40
10	14.96	0.43	1.40

表 2 结果表明,酵母接种量少,发酵醪初始的酵母浓度低,菌体都处于生长繁殖期,发酵能力低,导致发酵时间延长,而且由于酵母较长时间不能在醪液中占绝对优势,容易引起杂菌污染^[4]。酵母接种量大,前发酵期短,总发酵时间减短,但酵母初始浓度太大时,随接种而移入的代谢废物过多,且由于采用的是同步糖化发酵,菌数增殖过快可能会造成糖化速度跟不上需求,酵母因缺乏营养过早衰老,造成产酒能力下降。接种量适宜,既能保证合理缩短发酵周期,又能得到较高的发酵产酒精水平,因此以 5%的接种量为佳。

表 3 木薯淀粉发酵酒精不同发酵温度的影响

发酵温度 (°C)	发酵酒度 (%vol)	残还原糖 (%)	残总糖 (%)
30	15.03	0.30	1.57
37	14.97	0.34	1.43
40	13.92	0.39	2.41

酵母菌生存和繁殖的温度范围很广,一般酵母菌的正常生活和繁殖温度为 29~30 °C。在很高或很低的温度下,酵母的生命活动减弱或停止。酵母发育的最高温度为 38 °C,最低温度为 -5 °C,50 °C 时死亡。温度对酒精发酵的影响主要表现在:发酵前期影响菌体的生长,发酵中、

后期影响酒精的形成。当温度低于最适发酵温度时,菌体生长的速度与产酒率随温度升高而增大,但当温度超过最适发酵温度时,则高温会抑制菌体的生长与酒精的生成。本实验所用酵母是耐高温酵母,其培养和发酵温度都比一般酵母高,对温度的耐受性好,在 30~37℃ 范围内发酵性能稳定,可以适应不同季节的温度变化,即使在炎热的夏季,也可以节省大量冷却水,从而降低生产成本。温度升高至 40℃ 时发酵酒度明显下降,因为过高的温度使酵母细胞过早地衰老,活力降低,此外高温还会增加酒精对酵母的毒害作用。

2.3 无机盐离子的影响

氮源是合成菌体蛋白质、核酸等含氮物质的重要原料,其存在水平直接关系到酵母的合成代谢。氮源不足会导致葡萄糖通透酶的加速运转,从而降低发酵速率,导致发酵终止或不完全。在浓醪发酵中,酵母常因缺乏营养和酒精积累而影响发酵活性,木薯中含氮较少,添加适当氮源,有利酵母生长与发酵^[5]。初始氮源浓度高的糖化醪,不仅醪液中细胞的数量多,而且发酵速度快,发酵彻底,残糖低,酒精转化率高。不同尿素添加量对木薯淀粉发酵酒精的影响见表 4。

表 4 不同尿素添加量对木薯淀粉发酵酒精的影响

无机盐终浓度	发酵酒度(%vol)	残还原糖(%)	残总糖(%)
0 尿素	11.57	0.32	3.18
0.01% 尿素	13.33	0.22	1.32
0.04% 尿素	14.99	0.30	1.54
0.07% 尿素	15.00	0.30	1.54
0.10% 尿素	14.92	0.23	1.52

由表 4 可知,用木薯淀粉浓醪发酵酒精,添加终浓度为 0.04% 的尿素即可满足酵母的生长繁殖,使其保持较高的发酵活性。

磷元素是细胞组成物之一,特别是对腺嘌呤核苷酸的组成,在细胞中起着传递电子和能量的作用。磷元素是酵母增殖所必需的营养元素,酵母中缺少磷将影响细胞出芽,从而影响酒精的发酵。所以,各种培养液、发酵醪中必须含有一定的含磷化合物或添加磷酸。同时磷酸在醪液中与其他物质结合成磷酸盐,又是重要的 pH 值缓冲剂。表 5 为不同磷酸添加量对木薯淀粉发酵酒精的影响结果。

表 5 不同磷酸添加量对木薯淀粉发酵酒精的影响

无机盐终浓度	发酵酒度(%vol)	残还原糖(%)	残总糖(%)
0 磷酸	14.96	0.23	1.47
0.004% 磷酸	14.95	0.21	1.34
0.011% 磷酸	14.97	0.24	1.43
0.018% 磷酸	14.97	0.19	1.49
0.025% 磷酸	14.93	0.15	1.59

由表 5 可知,磷酸的添加量对木薯酒精发酵的影响不大,说明发酵醪中含有的磷元素已经可以满足酵母的

生长需要,不用再添加。

2.4 耐高温浓醪酒精发酵条件的正交优化结果

表 6 木薯淀粉耐高温发酵酒精发酵工艺条件正交试验结果

实验号	发酵 pH	尿素用量 (%)	接种量 (%)	发酵温度 (°C)	最高酒度 (%vol)	总残糖 (%)
1	3.5	0.01	3	30	8.95	3.173
2	3.5	0.04	5	37	13.24	2.592
3	3.5	0.07	7	38	8.28	3.271
4	3.5	0.10	9	39	10.36	3.144
5	4.0	0.01	5	38	12.10	2.851
6	4.0	0.04	3	39	10.30	3.373
7	4.0	0.07	9	30	12.79	2.427
8	4.0	0.10	7	37	13.00	2.142
9	4.5	0.01	7	39	10.68	3.419
10	4.5	0.04	9	38	11.52	2.908
11	4.5	0.07	3	37	12.88	2.806
12	4.5	0.10	5	30	12.86	2.565
13	5.0	0.01	9	37	13.48	2.063
14	5.0	0.04	7	30	12.23	2.620
15	5.0	0.07	5	39	10.60	3.486
16	5.0	0.10	3	38	11.51	3.243
酒度 (%vol)	K1	40.83	45.21	43.64	46.83	
	K2	48.19	47.29	48.80	52.60	
	K3	47.94	44.55	44.19	43.41	
	K4	47.82	47.73	48.15	41.94	
总残糖 (%)	R	1.840	0.795	1.290	2.665	
	K1	12.180	11.506	12.595	10.785	
	K2	10.793	11.493	11.494	9.603	
	K3	11.698	11.990	11.452	12.273	
总残糖 (%)	K4	11.412	11.049	10.542	13.422	
	R	0.346	0.224	0.513	0.955	

由表 6 的极差分析结果可以看出,木薯淀粉浓醪发酵酒精最终酒度的影响因素按大小依次为:温度>发酵 pH 值>接种量>尿素添加量;对总残糖的影响因素按大小依次为:温度>接种量>发酵 pH 值>尿素。由此,可以确定最佳的发酵工艺条件为:发酵温度 37℃,发酵 pH 值 4.0,接种量 5%,尿素添加量 0.10%。利用正交实验确定的最佳发酵工艺进行木薯淀粉高温浓醪发酵酒精,发酵 64 h,最高酒度可达 15.54%vol,残总糖 2.73%。

3 结论

3.1 参照传统酒精发酵工艺生产木薯淀粉酒精,研究影响木薯酒精发酵的几个主要因素。单因素实验结果为:接种量 5%,在 30~37℃ 温度范围内发酵性能稳定、尿素添加量为 0.04%,不用添加磷酸。以发酵 pH 值、接种量、发酵温度和尿素添加量为正交因子,进行正交试验,得到木薯淀粉高温浓醪发酵酒精最佳工艺为:按 1:2 的料水比加水,经液化糖化后,冷却到 37℃,调 pH 为 4.0,加入 0.10% 尿素,接种量为 5%,发酵 64 h 得到最高酒度和较低的还原糖及残总糖含量。

3.2 本实验室所筛选到的酵母菌种不仅适合于木薯酒

(下转第 28 页)

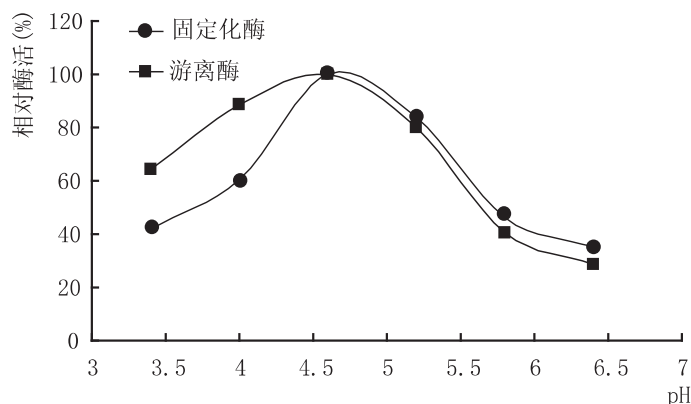


图3 pH对固定化酶活力的影响

锅中保温1 h, 50℃下于2%可溶性淀粉溶液中, 按1.6方法测定固定化酶相对活力, 结果见图4。

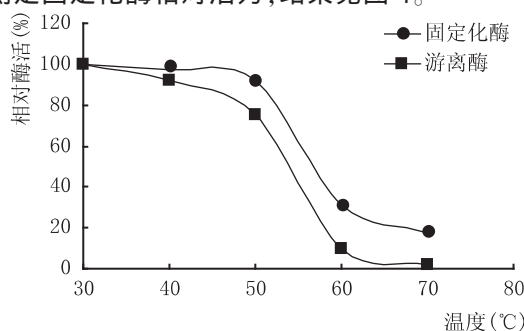


图4 固定化酶的热稳定性

由图4可以看出, 固定化酶在30℃时活力基本无损失; 在40~50℃之间酶活力略有下降; 60℃时酶活下降较快, 而且酶膜有溶解现象; 在70℃时膜已大部分溶解。因此, 固定化酶在30~50℃有较高的热稳定性。与游离酶相比, 固定化酶的耐热性略有提高。

2.3.4 固定化酶 pH 稳定性的研究

分别取0.02 g 固定化酶膜置于pH值分别为3.4、4.0、4.6、5.2、5.8和6.4的缓冲液中浸泡30 min后, 取出置于pH4.6的2%可溶性淀粉溶液中, 按1.6方法测定固定化酶相对活力, 结果见图5。

由图5可以看出, 与游离酶相比, 固定化酶在3.4~5.2范围内酶活损失较小, 这是由于膜载体使糖化酶与反应液的接触减少, 从而使耐酸性有所提高。从整体来看, 固定化酶比游离酶更加稳定。

3 结论

(上接第25页)

精的发酵, 而且产酒率高, 温度耐受范围广, 在30~37℃之间发酵性能稳定, 可用于高温浓醪发酵。下一步将在此基础上进行20 L发酵罐的小型发酵实验, 进一步优化发酵工艺条件, 为实现木薯酒精高温浓醪发酵工业化提供参考。

参考文献:

[1] 朱元芳, 张华, 王旭初, 等. 木薯根块贮藏物质研究进展[J]. 热带

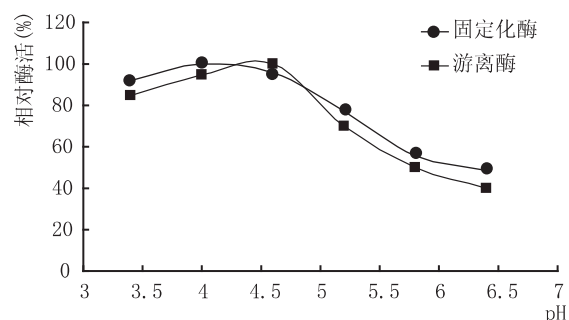


图5 固定化酶的 pH 稳定性

3.1 当杂化膜内碳酸钙含量低时, 膜较柔软, 有弹性, 耐溶解。随着碳酸钙含量的增加, 杂化膜溶胀率由337.3%下降到216.5%, 表明膜中碳酸钙微粒的掺杂可以提高膜的耐水性。当碳酸钙含量达到2.254%时, 杂化膜柔韧性低、较脆, 膜易发生溶解, 性质很不稳定, 不适合长期操作。碳酸钙含量为1.803%的杂化膜相对酶活最高, 达到了74.42%。

3.2 固定化酶的最适作用温度为65℃, 比游离酶高5℃; 最适pH为4.6, 与游离酶相同; 固定化酶的耐热性及酸碱稳定性较游离酶有所提高。

参考文献:

- [1] 邓红涛, 吴健, 徐志康, 等. 酶的膜固定化及其应用的研究进展[J]. 膜科学与技术, 2004, 24(3): 47-53.
- [2] 薛正莲, 汤斌, 张庆庆, 等. TiO_2 膜吸附固定糖化酶特性的研究[J]. 生物学杂志, 2004, 21(6): 19-20.
- [3] 张秋根, 陈建华, 周国波, 等. 填充型有机-无机杂化分离膜研究进展[J]. 现代化工, 2006, 2(7): 22-26.
- [4] Kristien De Sitter, Petra Winberg, Jan D'Haen. Silica filled poly (1-trimethylsilyl-1-propyne) nanocomposite membranes: Relation between the transport of gases and structural characteristics[J]. Journal of Membrane Science, 2006, 278: 83-91.
- [5] Gevers L E M, Vankelecom I F J, Jacobs P A. Solvent-resistant nanofiltration with filled polydimethylsiloxane(PDMS) membranes[J]. Journal of Membrane Science, 2006, 278: 199-204.
- [6] 彭湘红, 王敏娟, 张良. 壳聚糖/碳酸钙杂化膜的研究[J]. 精细化工, 2007, 24(10): 937-940.
- [7] 孙淑琴, 邵冬梅. 比色法快速测定糖化酶活力新方法[J]. 河北省科学院院报, 1997, (2): 35-39.

农业科学, 2006, 26(1): 65-66.

- [2] 丁丽, 朱德明, 匡钰, 等. 实验室木薯酒精发酵中的菌种筛选[J]. 安徽农学通报, 2007, 13(16): 45-46.
- [3] 黄平, 曹健君, 张肖克, 等. 应用浓醪发酵技术推动酒精行业科学发展[J]. 酿酒科技, 2005, (5): 108-113.
- [4] 朱德明, 匡钰, 韩志萍, 等. 木薯酒精发酵工艺研究[J]. 广西农业科学, 2008, 36(4): 470-473.
- [5] 赵江, 赵华. 木薯酒精发酵条件优化[J]. 酿酒, 2003, 30(2): 76-78.