

荔枝核发酵酒精的工艺研究

何 丹^{1,2}, 肖更生¹, 吴继军¹, 张友胜¹, 余元善^{1,2}

(1. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 广东 广州 510610; 2. 江西农业大学生物科学与生物工程学院, 江西 南昌 330045)

摘 要: 利用荔枝核进行酒精发酵, 对蒸煮、液化、糖化和发酵等工艺进行了研究。结果表明, 荔枝核经干燥粉碎后加水比为 1:4, 用硫酸调节 pH 到 2.0 后, 再 110~120 °C 高温高压蒸煮 1 h, 再调节 pH 到 6.0, 添加 α -淀粉酶 40 u/g 进行液化, 调节 pH 到 4.0, 添加糖化酶 120 u/g 进行糖化, 随后接种安琪超级酿酒酵母 0.04 %, 在温度为 30 °C 条件下发酵, 可使酒精得率最高。在发酵过程中添加适量硫酸铵可加快发酵速度, 缩短发酵时间。

关键词: 酒精; 荔枝核; 发酵; 工艺

中图分类号: TS262.2; TS261.4 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2007)12-0021-04

Study on Alcoholic Fermentation by the Use of Litchi Seed Flour

HE Dan^{1,2}, XIAO Geng-Sheng¹, WU Ji-Jun¹, ZHANG You-Sheng¹ and YU Yuan-shan^{1,2}

(1. Sericulture & Agricultural Product Processing Research Institute of Guangdong Academy of Agriculture Science, Guangzhou 510610; 2. College of Bioscience & Bioengineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang, Jiangxi 330045, China)

Abstract: Litchi seed flour was used for alcoholic fermentation and the relative techniques including braizing, liquefying, saccharifying and fermentation etc. were studied. The results indicated that the highest alcohol yield could be achieved under the following conditions: the ratio between litchi seed flour (after drying and grinding) and water was 1:4, after pH value adjusted to 2.0 by sulfuric acid, it braized at the temperature between 110~120 °C for 1 h, then pH value adjusted to 6.0 and addition of 40 u/g α -amylase for liquification, then pH value adjusted to 4.0 and addition of glucoamylase (120 u/g) for saccharification, then inoculation with 0.04 % Angel Super yeast and finally fermentation at 30 °C. Besides, the addition of adequate amount of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in the fermentation could quicken fermentation rate and shorten fermentation time.

Key words: ethanol; Litchi seed; fermentation; technique

荔枝为亚热带无患子科常绿乔木, 岭南四大名果之一。全世界有 20 多个国家和地区栽培荔枝, 中国是世界荔枝生产第一大国, 栽培面积和产量占全世界的 80 % 以上^[1]。统计数据显示^[2]: 2002 年, 全国荔枝产量已高达 152.33 万 t, 而到 2004 年, 仅广州地区的产量就有 7 万 t。在荔枝加工过程中, 荔枝核通常作为垃圾直接弃掉, 造成浪费及环境污染。利用荔枝核加工成酒精, 一方面可以增加荔枝加工业的附加值, 另一方面可以减少环境污染。

荔枝核淀粉含量丰富, 约占全重的 61.52 %, 完全可以作为生产酒精的原料, 若能大批量用于酒精生产, 有助于国家缓解能源危机、减少环境污染, 具有很大的战

略意义和社会效益; 并可以帮助农民致富, 对农村问题的解决有促进作用。以荔枝核为原料生产酒精的工艺研究国内鲜有报道, 我们在传统发酵酒精的基础上^[3], 进行荔枝核发酵酒精工艺的探索, 初步确定了酒精发酵的工艺。

1 材料与方法

1.1 菌种和酶制剂

酵母菌种: 安琪超级酿酒活性干酵母, 湖北安琪酵母股份有限公司生产。

耐高温 α -淀粉酶 (Unikamyl HT): 液体, 酶活力 30000 u/mL, 广州裕立宝生物科技有限公司生产。

基金项目: 广东省 2005 年粤港关键领域重点突破项目 (2005A20302005) 和 2006 年省部产学研结合项目 (2006D90204006) 资助。

收稿日期: 2007-09-20

作者简介: 何丹 (1982-), 女, 江西新余人, 在读硕士研究生, 研究方向: 食品微生物。

通讯作者: 肖更生 (1965-), 男, 湖南祁东人, 研究员, 硕士生导师, 主要从事蚕桑资源综合利用和农产品加工研究。

糖化酶(Unikase GA): 液体, 酶活力 110000 u/mL, 广州裕立宝生物科技有限公司生产。

1.2 原料及试剂

荔枝核, 品种为槐枝, 由广东惠来帝浓酒业有限公司提供, 70 烘干粉碎后过 100 目筛, 经测定淀粉含量为 61.52 %, 水分含量为 11.04 %。

本实验中所用试剂均为分析纯。

1.3 实验方法

荔枝核发酵生产酒精的工艺如下:

原料 → 配浆和蒸煮 → 液化 → 糖化 → 发酵 → 酒精

1.3.1 原料的配浆和蒸煮

称取 50 g 荔枝核粉, 以 1:4 的料水比加水配成浆液, 用硫酸调 pH 值为 2.0, 升温至 110 ~ 120 , 高温高压蒸煮 1 h。

1.3.2 液化

高温高压蒸煮后, 通过研究液化的最适 pH 值、液化酶添加量和时间的关系, 确定荔枝核的最适液化工艺条件。

1.3.3 糖化

荔枝核液化后, 考虑温度、pH、糖化酶加量 3 个因素, 以 $L_9(3^4)$ 正交设计做正交试验, 确定荔枝核淀粉最大转化率的糖化工艺条件。

1.3.4 发酵

荔枝核经蒸煮、液化和糖化后, 研究酵母的接种量和发酵温度对酒精产率的影响、酵母产酒精量及动态变化、酒精发酵过程中还原糖和氨态氮含量的变化以及添加硫酸铵对酒精发酵的影响, 确定荔枝核发酵酒精产率最高的工艺条件。

1.4 分析方法

1.4.1 还原糖测定

取适量发酵液, 将其过滤澄清, 稀释适当倍数, 然后用 3, 5- 二硝基水杨酸(DNS) 比色法测定^[4]。

1.4.2 氨态氮和总酸

0.1 mol/L NaOH 滴定^[5]。

1.4.3 pH 值

用 pH-3C 型精密 pH 计测定。

1.4.4 酒精度测定

采用比重法测定, 取出成熟发酵醪 100 mL, 置于 250 mL 蒸馏烧瓶中, 并用 100 mL 水冲洗, 加入烧瓶中, 蒸馏, 收集 100 mL 蒸馏液, 用酒精计、温度计读取酒度和温度, 计算出醪液在 20 下的酒精度。

2 结果与分析

2.1 液化工艺

荔枝核按 1.3.1 方法蒸煮糊化后, 用 α -淀粉酶进行液化, 使淀粉降解成糊精和低聚糖。

2.1.1 液化最适 pH 值的确定

荔枝核蒸煮完后, 将 pH 值调至 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0 和 6.5。蒸煮液中还原糖含量的高低直接表明液化效果, 测得结果见图 1。

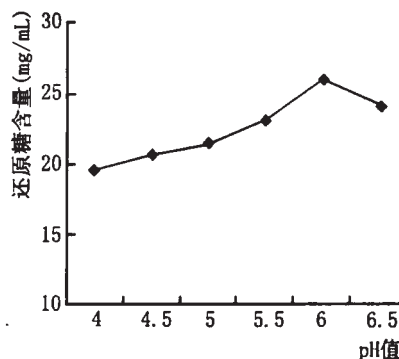


图 1 pH 值对淀粉酶液化的影响

由图 1 可知, pH 值对液化效果影响较大, 过高、过低都不利于淀粉酶的液化, 耐高温 α -淀粉酶液化的最适 pH 值为 6.0, 以下试验中均将液化 pH 调至 6.0。

2.1.2 液化酶添加量的确定

淀粉酶的添加量会直接影响淀粉的液化速度和液化效果。以每克原料添加不同的酶量进行试验, 根据糖化酶对底物分子大小的要求和淀粉酶的作用特点, 以液化液与碘液反应呈浅棕色为淀粉液化终点, 结果见图 2。

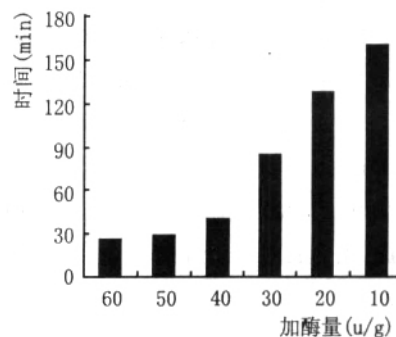


图 2 加酶量与液化时间的关系

由图 2 可知, 在不同酶浓度下, 液化时间有较大的差异。碘反应的时间随酶的添加量的增加而缩短。当酶的添加量超过 40 u/g 原料时, 淀粉的液化时间已无明显差异。而少于 40 u/g 原料时, 液化时间明显增加。因此, 从生产实际考虑, 液化酶的添加量以 40 u/g 原料为宜。

2.2 糖化工艺

糖化工艺是一个复杂的生物化学变化过程, 受多种因素的影响。温度、pH 值、糖化时间和糖化酶添加量对其影响较大。有资料报道, 糖化酶作用的最佳 pH 范围为 4.0 ~ 5.0, 最适作用温度为 55 ~ 65 。本实验以温度、pH、糖化酶添加量 3 个因素, 以 $L_9(3^4)$ 正交表作正交试验以确定荔枝核酒精发酵的糖化过程中实现荔枝核淀

粉最大转化率的糖化工艺条件。正交实验因素水平设计见表 1,测定结果见表 2。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交实验因素水平设计

水平	因 素		
	A 温度(℃)	B 糖化酶添加量(u/g)	C pH
1	55	80	4.0
2	60	100	4.5
3	65	120	5.0

表 2 正交实验测定结果

试验号	A 温度(℃)	B 糖化酶添加量(u/g)	C pH	淀粉转化率(%)
1	55	80	4.0	73.48
2	55	100	4.5	74.50
3	55	120	5.0	76.84
4	60	80	4.5	76.62
5	60	100	5.0	78.85
6	60	120	4.0	80.13
7	65	80	5.0	71.50
8	65	100	4.0	75.69
9	65	120	4.5	74.61
均值 1	74.940	73.867	76.433	
均值 2	78.533	76.347	75.243	
均值 3	73.933	77.193	75.730	
极差	4.600	3.326	1.190	

从表 2 的极差分析结果可以看出, $A_2B_3C_1$ 为最优组合, 即温度为 60℃, 糖化酶添加量为 120 u/g 原料, pH 为 4.0 时为最佳糖化条件。

2.3 发酵工艺

荔枝核淀粉经过液化、糖化等处理后, 大部分淀粉已被水解成可发酵性糖。在酵母的作用下, 可发酵性糖进一步被转化成为酒精和 CO_2 。

2.3.1 温度对酵母产酒精能力的影响

温度的高低决定着酵母菌的生长状况, 从而决定着发酵过程中酵母菌的产酒精能力。荔枝核酒精发酵过程中控制不同的发酵温度, 测定不同温度下 CO_2 失重量的变化情况和最终醪液中的酒精浓度, 结果见表 3。

表 3 温度对酵母产酒精能力的影响

温度(℃)	CO_2 失重量(g/50g)				酒精体积分数(%vol)
	18 h	40 h	66 h	90 h	
25	5.06	10.56	11.13	11.85	6.0
30	5.48	10.80	11.35	12.04	6.2
35	4.93	10.25	11.02	11.43	5.7

从表 3 可知, 发酵温度对酵母菌产酒精影响较大。过高、过低都不利于酵母菌发酵产酒精, 经实验确定以 30℃ 为最佳酒精发酵温度。

2.3.2 酵母接种量对酒精产率的影响

酵母的生长状态决定着荔枝核淀粉原料的出酒率。只有使醪液中保持一定数量的活菌数, 才可实现荔枝核

淀粉的充分发酵, 并且醪液中的酵母菌达到优势生长可以抑制杂菌污染。接入不同量的酵母菌, 测定其对荔枝核发酵酒精的影响, 结果见表 4。

表 4 酵母接种量对酒精产率的影响

酵母量(%, w/w)	CO_2 失重量(g/50g)				酒精体积分数(%vol)
	18h	42h	66h	90h	
0.01	2.99	10.82	11.36	11.58	5.7
0.02	3.83	10.65	11.29	11.91	5.9
0.03	4.59	10.89	11.43	12.04	6.0
0.04	5.48	10.80	11.35	12.04	6.2
0.05	5.85	11.01	11.49	12.09	6.2

从表 4 可知, 酵母接种量为 0.01 %原料总量时, 发酵终止时醪液中酒精含量仅为 5.7 %vol。加大酵母菌的接种量虽在一定程度上可加快发酵初始时酵母菌的增殖速度, 但并不能提高最终酒精产率。接种量为 0.04 %和 0.05 %原料时, 产酒精量相同, 结合生产成本, 优选 0.04 %原料量为合适的酵母接种量。

2.3.3 酵母产酒精量及动态变化

酵母菌产生的酒精量是荔枝核淀粉酒精发酵生产中最最重要的一个质量指标。荔枝核淀粉糖化 1 h 后, 冷却至 30℃, 接入酵母菌, 加发酵栓, 密封瓶口, 定时称瓶重, 以 CO_2 失重量定量表示酒精的产量, 结果见图 3。

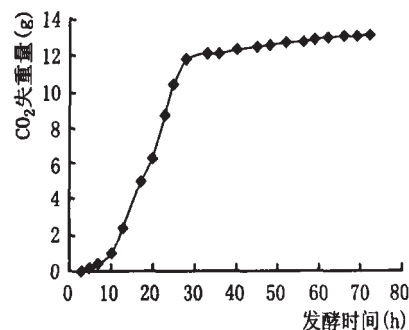


图 3 酵母酒精发酵的动态变化曲线

随着时间的延长, 酵母产生的酒精不断增加。前 30 h 为酵母菌旺盛发酵期, 醪液中酒精含量增加较多。30 h 后, 酒精含量变化逐渐平缓; 发酵 50 h 后醪液中酒精含量变化不大。实验中综合考虑酒精的产率和发酵周期, 确定以 50 h 为酒精发酵终点。

2.3.4 酒精发酵过程中还原糖含量的变化

酒精发酵过程就是酵母菌不断利用还原糖, 将其转化为酒精的过程。荔枝核淀粉酒精发酵醪液中还原糖的含量变化结果见图 4。

糖化结束后, 醪液中的还原糖含量为 14.72 %。接种后, 在酵母菌的作用下, 醪液中还原糖大量被转化为酒精, 还原糖含量下降迅速。发酵进行到第 48 h 时, 醪液中残余还原糖含量下降到 1.91 %, 酒精发酵处于终止状态。

2.3.5 酒精发酵过程中氨态氮含量的变化

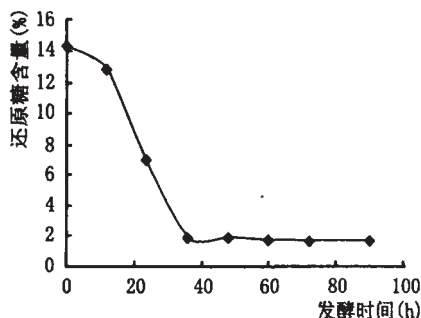


图 4 酒精发酵中还原糖含量变化曲线

氮是构成酵母细胞蛋白质和核酸的重要元素。酵母菌只能利用氨基态氮,因此醪液中氨基态氮的含量会直接影响发酵效果。

荔枝核淀粉酒精发酵过程中氨基态氮含量的变化曲线见图 5。

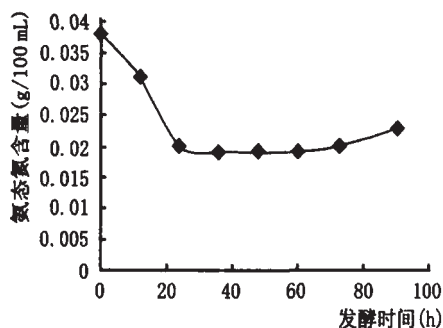


图 5 氨基态氮含量的变化曲线

发酵初期,酵母菌利用氨基态氮合成自身蛋白质进行酵母菌体的生长与繁殖,且酒精发酵过程中,醪液中少量的氨基酸在酵母菌的作用下生成有机酸,造成发酵前 24 h 内醪液中氨基态氮含量迅速下降。从发酵的 32 h 直到 60 h,醪液中的氨基态氮含量维持恒定。发酵后期,由于酵母的衰老,菌体自溶,造成醪液中的氨基态氮含量略有增加。

酵母菌可同化发酵醪液中约 0.25 %的氨基态氮,发酵醪中的氨基态氮含量已低于酵母菌所能利用的氨基态氮,成为酵母酒精发酵的限制因素。因此,荔枝核淀粉

酒精发酵中要适量增加氨基态氮的含量,以保证酵母的完全生长。

2.3.6 添加硫酸铵对酒精发酵的影响

荔枝核淀粉的发酵醪液中添加不同量的硫酸铵,测其酒精发酵过程中 CO₂ 失重量、发酵终止时残余氨基态氮和酒精含量,结果见表 5。

从表 5 可知,相对于不添加硫酸铵的空白对照,不同硫酸铵添加量的发酵试样的最终酒精产量无明显变化,但添加硫酸铵的发酵试样达到发酵终点时的时间比空白对照相应提前。不添加硫酸铵的空白对照约在第 50 h 达到发酵终点,而添加硫酸铵后的试样均在约第 40 h 即已经达到发酵终点,且不同的硫酸铵添加量对发酵时间的影响不同。当添加量达到 0.15 %时,发酵速度达到最大;当硫酸铵添加量超过 0.15 %时,发酵醪液中的残余氨基态氮含量大为增加,但最终酒精产量和发酵速率均无大的变化。因此,在荔枝核淀粉酒精发酵中以硫酸铵的添加量为 0.15 %为佳。

3 结论

通过试验,对利用荔枝核发酵产酒精可初步得出以下结论:荔枝核料液比 1 4, pH 为 2.0 时,110~120 °C 高温蒸煮 1 h 后,液化酶的最适添加量为 40 u/g 原料,最适作用 pH 值为 6.0;糖化酶的最适添加量为 120 u/g 原料,最适作用 pH 值为 4.0,糖化温度为 60 °C;酵母的最佳接种量为 0.04 %,最适发酵温度为 30 °C,发酵过程在 50 h 左右达到终点;荔枝核氨基态氮含量偏低,不利于酵母菌的生长,添加硫酸铵虽对酒精产量作用不大,但可加快发酵速度,可将发酵终点提前约 10 h,最适添加量为 0.15 %。

荔枝核淀粉不同于小麦和玉米淀粉,其支链淀粉含量很高,直链淀粉含量较低,淀粉颗粒粒径较小,颗粒间结合致密,导致其难以糊化^[6],因此,试验中淀粉利用率不高,醪液中酒精含量也较低,但利用荔枝核发酵产酒精属于废物利用,如能将其产业化,对缓解当前能源紧张、开发可再生能源具有很重要的现实意义。

参考文献:

- [1] 杨燕.荔枝研究引文分析[J].玉林师范学院学报(自然科学版),2003,24(4): 80- 82.
- [2] 曾花辑.1993~2003 年中国荔枝单位面积产量[J].世界热带农业信息,2004,(1): 34.
- [3] 章克昌.酒精与蒸馏酒工艺[M].北京:中国轻工业出版社,1995.
- [4] 宁正祥.食品成分分析手册[M].北京:中国轻工业出版社,1997.
- [5] 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.
- [6] 李宝珍,赵谋明,黄立新.荔枝核淀粉理化特性的研究[J].食品科技,2006,(3): 132- 135.

表 5 不同硫酸铵添加量对酒精发酵的影响

硫酸铵添加量(%)	CO ₂ 失重量(g)					发酵终止时残余氨基态氮含量(g/100mL)	酒精体积分数(%vol)
	18 h	30 h	42 h	66 h	90 h		
对照	5.64	9.68	11.37	12.64	13.37	0.0190	6.2
0.05	6.21	11.04	12.17	12.76	13.24	0.0272	6.1
0.10	6.79	11.28	12.43	13.13	13.65	0.0334	6.1
0.15	7.17	11.23	12.35	12.95	13.42	0.0450	6.3
0.20	5.82	11.16	12.27	12.93	13.41	0.0540	6.2
0.25	6.75	11.35	12.23	12.87	13.40	0.0628	6.1
0.30	6.77	11.34	12.25	12.91	13.44	0.0715	6.1
0.35	6.00	11.09	12.10	12.72	13.21	0.0817	6.1
0.40	6.43	11.26	12.34	13.04	13.60	0.0933	6.2
0.45	6.23	11.15	12.38	13.03	13.53	0.1090	6.2
0.50	6.26	11.18	12.04	12.64	13.11	0.1185	6.2