

# 酒精浓醪发酵生产工艺的优化

肖冬光, 许葵, 李瑞青

(天津科技大学食品科学与生物工程学院, 天津 300222)

**摘要:** 以玉米粉为原料, AY-15 为发酵菌种, 在浓醪发酵条件下, 对氮源添加、糖化工艺和发酵条件进行了研究。结果表明, 在酒精发酵过程中添加适量氮源, 可明显提高酵母细胞的数量和发酵能力, 缩短发酵周期 12 h; 优化的糖化工艺为糖化酶用量 150 u/g 原料, 糖化时间 60 min; 最适的发酵条件为初始 pH 值 5.0, 发酵温度 33 ℃。

**关键词:** 酒精; 浓醪发酵; 生产工艺; 玉米

中图分类号: TS262.2; TS261.4

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2004)06-0040-03

## The Optimization of Production Conditions of High-gravity Alcohol Fermentation

XIAO Dong-guang, XU Kui and LI Rui-qing

(College of Food Science and Bioengineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin, 300222, China)

**Abstract:** The effects of different conditions such as the addition of nitrogen, saccharifying technology, fermentation conditions, etc. on high-gravity alcohol fermentation were studied with corn powder used as material and AY-15 employed as fermentation strain. The results showed that the fermentation ability of yeast was promoted by adding suitable nitrogen, and fermentation period was shortened 12 h. The suitable saccharifying technology were glucoamylase concentration 150 u/g, treatment time 60 min. The suitable fermentation conditions were initial pH value 5.0, fermentation temperature 33 ℃.

**Key words:** alcohol; high-gravity fermentation; production technology; corn powder

能源是当今世界最令人瞩目的问题之一, 就目前全世界石油消耗速度以及可开发的原油储量来计算, 到 21 世纪中期石油资源的供应将会逐渐萎缩。因此, 许多国家对开发新能源的项目非常重视<sup>[1]</sup>。酒精是最具发展潜力的替代品, 目前世界上 2/3 的酒精被用作燃料<sup>[2]</sup>。使用酒精汽油时间最长、成效最大的国家是巴西和美国。欧共体自 20 世纪 90 年代初也开始生产和使用燃料酒精<sup>[3,4]</sup>。在我国, 2001 年已将“大力发展燃料酒精”产业列入“十五”计划中, 并在《国民经济和社会发展第十个五年计划纲要》中作了明确的要求。

发酵法生产燃料酒精具有生产原料可再生的特点, 很适合在我国推广。浓醪发酵法生产燃料酒精, 能够提高设备利用率, 降低生产成本, 而且酒糟易处理, 是一种具有巨大应用价值的酒精发酵技术。国内外对酒精浓醪发酵的研究主要集中在两个方面<sup>[5-8]</sup>: 一是高产菌种的选育; 二是发酵工艺的研究。

在菌种选育方面, 传统的物理和化学诱变及细胞原生质体融合技术仍是获得耐高浓度酒精菌株的最有效方法。如 Casey 等人分离获得了可以耐受 12%~15% (v/v) 酒精的菌株, 日本学者应用有性杂交技术获得可生成 20% 酒精的菌株, 章克昌等对菌种进行改造后将发酵醪酒精含量提高到了 16%, 天津科技大学经多次选育后获得了发酵醪酒精含量达 16.2% 的菌株。

在发酵工艺的研究方面, Ingledew 证实发酵一定时间后添加酵母粉和蛋白胨可使酒精产量达 20% (v/v), Thomas 等通过辅

加酵母抽提物、酪蛋白水解物或单一氨基酸来刺激酵母生长, 使发酵周期缩短并使酒精最终含量达 17.1%。国内的研究主要集中在添加营养盐、肌醇和钙离子等营养物质来提高酒精产量。从其试验结果看, 最终酒精浓度可提高至 12%~14% (v/v)。这些研究虽然取得了一定的成果, 但离实际应用还有一定距离。目前, 国际上先进的酒精生产企业发酵醪酒精浓度一般在 10%~12% (v/v), 国内常规发酵的酒精浓度为 9%~10% (v/v)。

本文采用常规酒精发酵菌株, 对玉米原料酒精浓醪发酵工艺条件进行优化, 着重研究氮源添加量、糖化酶用量、糖化时间、pH 值以及发酵温度对酒精发酵的影响。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验主要材料

菌种: 酒精酵母 AY-15, 本研究室保存菌种。  
高温  $\alpha$ -淀粉酶:  $2 \times 10^4$  u/ml, 诺维信公司生产。  
糖化酶:  $10 \times 10^4$  u/ml, 诺维信公司生产。  
玉米粉: 淀粉含量 67.7%, 市售。

#### 1.2 培养基

一级种子培养基: 糖浓度 80 g/L 玉米水解液, 酵母粉 5 g/L。  
二级种子培养基: 糖浓度 120 g/L 玉米水解液, 酵母粉 5 g/L。

#### 1.3 实验方法

##### 1.3.1 种子培养

收稿日期: 2004-07-29

作者简介: 肖冬光(1956-), 男, 湖南人, 硕士, 天津轻工业学院教授、博士生导师, 中国食品科学技术学会青年委员会理事、中国发酵工业协会酵母专业委员会技术组委员, 《酿酒科技》杂志编委, 长期从事生物工程方面的教学与科研, 在生物反应器、活性干酵母和现代酿造技术的研究与应用方面有精深研究, 代表著作有《酿酒活性干酵母生产与应用》等 3 部, 发表科研论文 40 余篇。

接斜面酵母菌种(AY-15)一环于装有4 ml 一级种子培养基的试管中,30℃静置培养32~36 h后,全部转入装有36 ml 二级种子培养基的150 ml 三角瓶内,30℃静置培养12~16 h。

1.3.2 酒精发酵

将玉米粉用70℃水按1:2.0的加水比调浆,加耐高温α-淀粉酶10 u/g 原料,混匀后升温至85~90℃,糊化液化90 min。糊化醪冷却到60℃,按设计的实验条件进行糖化;糖化结束后添加适量氮源,冷却到30℃,将二级种子液转入装有糖化液的250 ml 三角瓶内,30℃恒温静置发酵72 h,每隔12 h 测定发酵液失重,发酵结束后测定残糖和酒精产量。

1.4 分析方法

1.4.1 酒精度的测定

取100 ml 成熟发酵液到蒸馏瓶中,加入100 ml 水,混匀后蒸馏。取馏出液100 ml,用酒精比重计测定馏出液中的酒精浓度。

1.4.2 残糖的测定

采用快速法测定<sup>[9]</sup>。

2 结果与讨论

2.1 添加氮源对酒精浓醪发酵的影响

2.1.1 氮源对酵母生长的影响

氮源是构成菌体物质和一些代谢产物的必需营养物质,是酵母细胞合成代谢的重要原料。本实验研究了添加两种最常用氮源(尿素和硫酸铵)对浓醪酒精发酵的影响,结果见表1。从实验结果看,发酵16 h 时发酵液中的酵母细胞数达最大,并进入发酵高峰期。添加氮源的样品酵母数达6.0 亿/ml 左右,与对照相比明显增加了2 倍左右,说明添加氮源对酵母菌生长有明显的促进作用。

表1 添加氮源对酵母菌生长的影响

发酵时间(h)	发酵液中的酵母细胞数(亿/ml)		
	不加氮源	尿素(0.16g/100g)	硫酸铵(0.38g/100g)
0	0.119	0.098	0.102
12	1.65	5.40	4.35
16	1.95	6.15	5.65
24	1.35	5.75	5.05

2.1.2 氮源添加量对发酵速率的影响

实验考察了不同尿素及硫酸铵加量对发酵速率的影响,结果见图1和图2。从实验结果看,随含氮量的增加发酵速度加快,这表明氮含量的增加提高了酵母的发酵能力。由此可见,在发酵醪中添加适量的氮源,可有效缩短发酵周期,从而可缩短酵母在高酒精浓度下的时间,为酒精浓醪发酵创造条件。

2.1.3 不同氮源对降糖的影响

相同含氮水平下,不同氮源对发酵液降糖的影响结果见图3。在实验范围内发酵液中氮源添加量越大,发酵结束后残糖含量越低。由图3可以看出,当含氮量为0.031 g/100 g 玉米时残糖较高,表明添加氮源不足,酵母生长与代谢受到影响,发酵不彻底。当含氮量高于0.063 g/100 g 玉米时残糖降到较低水平,再继续提高氮源添加量,残糖降低不明显。综合成本因素,氮源添加量以0.063 g/100 g 玉米为宜。

表2 糖化酶用量对AY-15菌株发酵产酒精的影响

糖化酶用量(u/g)	二氧化碳累积失重(g)						酒精度(% v/v)
	12h	24h	36h	48h	60h	72h	
250	5.21	16.46	22.86	28.28	31.21	32.73	13.9
200	4.83	16.72	22.12	28.43	31.22	32.67	14.1
150	4.71	16.96	23.07	28.45	31.13	32.45	14.1
100	3.64	15.61	21.79	27.20	30.62	31.42	13.5

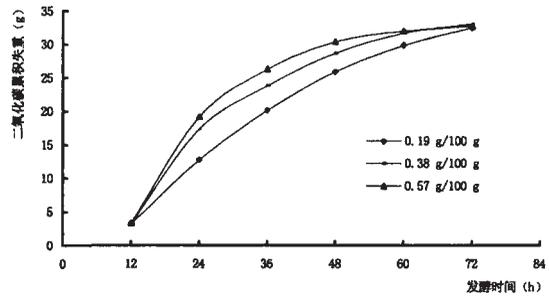


图1 不同硫酸铵加量对发酵速率的影响

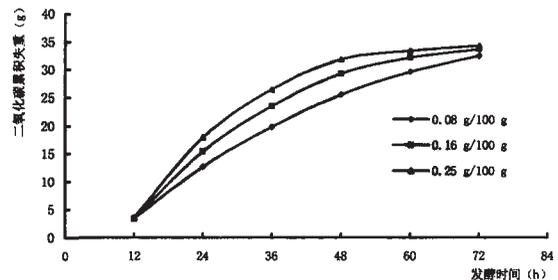


图2 不同尿素加量对发酵速率的影响

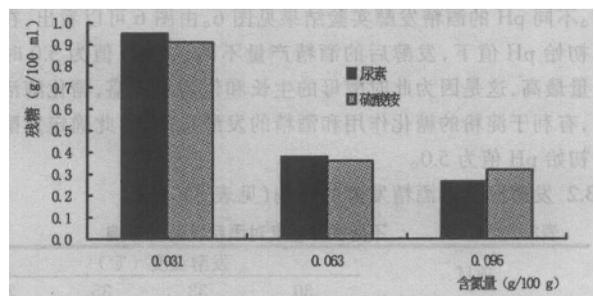


图3 不同氮源加量对降糖的影响

2.2 浓醪发酵糖化工艺的优化

2.2.1 糖化酶用量对酒精浓醪发酵的影响

不同糖化酶用量对酒精浓醪发酵的影响结果如表2所示。从表2可以看出,发酵12 h 时的失重量随糖化酶用量的增加而加大。当糖化酶用量高于150 u/g 玉米,12 h 后的发酵速度基本一致,糖化酶用量为100 u/g 玉米时发酵速度较慢。发酵结束后,酒精浓度基本一样,糖化酶用量为100 u/g 玉米时略低,从节约成本角度出发,选择150 u/g 玉米的糖化酶用量较为适宜。

2.2.2 不同糖化时间对酒精浓醪发酵的影响

在糖化酶用量为150 u/g 玉米时,糖化时间对酒精浓醪发酵的影响见图4和图5。

由图4可以看出,12 h 之前糖化速率高于酵母发酵速度,12~24 h 发酵速率大于糖化速率。24 h 后随着醪液中酒精含量的增加,酵母活性降低,发酵速度开始减缓。糖化时间为20 min 时,初始糖浓度低,发酵过程中淀粉糖化不彻底,发酵高峰期后随酵母活性的降低将会导致发酵不彻底,成熟发酵液残糖较高。

由图5可以看出,随着糖化时间延长,酒精产量逐渐提高,但当糖化时间大于60 min 后,酒精产量不再有明显提高。结合图4结果可以得出,初糖浓度在18 g/100 ml 左右发酵速度基本一致,考虑糖化设备的周转与能耗,糖化时间选择60 min 较为适宜。

2.3 发酵条件对酒精浓醪发酵的影响

2.3.1 pH 值对酒精浓醪发酵的影响

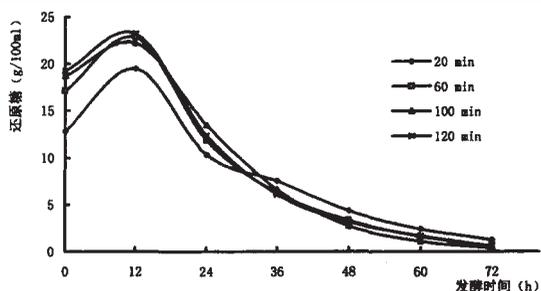


图4 发酵过程中糖浓度变化

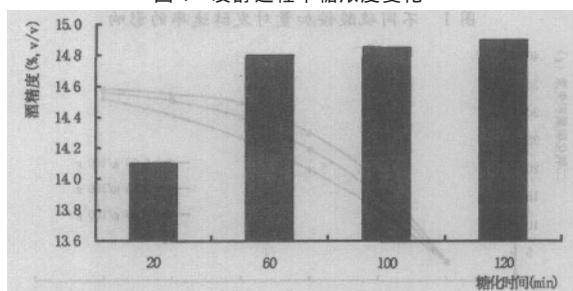


图5 不同糖化时间对酒精发酵的影响

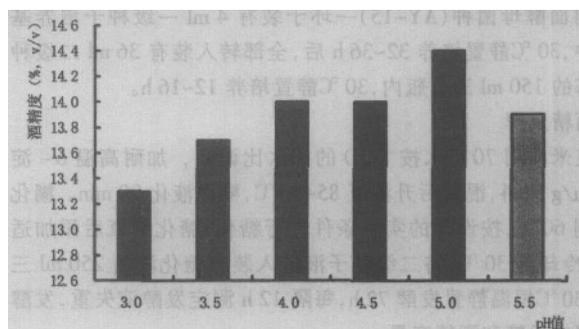


图6 不同初始 pH 值对发酵产酒精的影响

pH 值影响酵母菌体生长繁殖和酿酒酶系的活性,因而影响发酵。不同 pH 的酒精发酵实验结果见图 6。由图 6 可以看出,在不同的初始 pH 值下,发酵后的酒精产量不同,在 pH 值为 5.0 时酒精产量最高,这是因为此时酵母的生长和代谢最旺盛,糖化酶活性较高,有利于淀粉的糖化作用和酒精的发酵作用,因此确定发酵最适的初始 pH 值为 5.0。

2.3.2 发酵温度对酒精发酵的影响(见表 3)

项目	发酵温度(℃)			
	30	33	35	37
发酵液残糖(g/100 ml)	0.222	0.252	1.82	4.50
发酵液酒精度(% v/v)	13.6	14.2	13.0	12.3

从实验结果看,发酵温度对酒精浓醇发酵的影响非常显著,当发酵温度高于 35℃ 时,发酵不彻底,残糖高,酒精产量低。这是由于高温抑制酵母的生长,发酵酶系钝化,代谢活力明显降低,发酵速度减慢。表 3 结果表明,菌株 AY-15 最适发酵温度为 33℃,在此温度下残糖较低,酒精产量最高。

(上接第 39 页)

品 种	糖化力 (mg/g·h)	液化力 (u/g)	酸性蛋白酶活力 (u/g)
日本黄曲霉 1 <sup>#</sup>	960	70	190
苏-16 黄曲霉	1120	64	47.5

目前黄酒生产企业为降低生产成本,普遍采用减少熟麦曲用量,而用糖化酶来补充糖化力的不足。但是使用工业糖化酶用于黄酒生产有两个缺点:一是用量必须控制在 0.1% 以内,否则容易引起成品黄酒混浊。二是糖化酶酶活高,但酶系单纯,减少了麦曲用量,造成发酵醪液内蛋白酶相对不足,影响发酵。因此,建议用日本黄曲霉 1<sup>#</sup> 菌株代替苏-16 培养麦曲,将有利于黄酒生产。

日本黄曲霉 1<sup>#</sup> 是用于味淋酒生产的,国内许多厂在用,所以我们认为是安全的。其次,虽然日本黄曲霉 1<sup>#</sup> 的糖化力比苏-16 低,但它的酸性蛋白酶活力高,弥补了糖化力的不足。因为在酿酒过程中,酸性蛋白酶有解脱 α-淀粉酶对米饭的无效吸附作用,从

3 结论

- 3.1 酒精浓醇发酵中添加 0.063 g/100 g 玉米的氮源(尿素或硫酸铵)可提高酵母的发酵能力,从而缩短发酵周期,并使成熟发酵液中的残糖降到较低水平。
- 3.2 结合生产成本考虑,发酵最适糖化酶用量 150 u/g 玉米;糖化时间 60 min,控制初糖浓度在 18 g/100 ml 左右时,可使糖化速度与发酵速度达到相对平衡,发酵效果较好。
- 3.3 菌株 AY-15 发酵最适的初始 pH 值为 5.0,最适发酵温度为 33℃。

参考文献:

- [1] 上海食品工业公司.酒精生产技术[M].江苏省金坛县教学印刷厂,1986.
- [2] 黄宇彤.世界燃料酒精生产形势[J].酿酒,2001,28(5):24-26.
- [3] 章克昌.发展“燃料酒精”的建议[J].中国工程科学,2000,6(2):89-93.
- [4] Kreger-van Rij Groningen N Y W. The yeasts;a taxonomic study. Third revised and enlarged edition[M].The Netherlands:Elsevier science publishers B.V.1984. 38-40.
- [5] 文铁桥,赵学慧.酵母菌属间原生质体融合构建高温酵母菌株[J].微生物学报,1999,39(2):141-147.
- [6] 尹峻峰,钟娅玲,彭广茜.细胞融合法获取耐高温絮凝酵母研究[J].山地农业生物学报,1999,18(5):333-336.
- [7] 马立安.耐高温酒精酵母菌驯化与筛选[J].湖北农学院学报,2000,20(1):72-74.
- [8] 赵华,赵材欣,才向东,等.玉米原料酒精浓醇发酵技术的研究[J].酿酒科技,1998,(5):38-39.
- [9] 天津轻院,等.工业发酵分析[M].北京:中国轻工业出版社,1997.

而使液化、糖化更好地协同作用,加快了糖化速度和能力,同时,酸性蛋白酶水解蛋白质给酵母提供生长所需氮源,促使发酵旺盛。所以在黄酒生产发酵阶段,应注意醪液中糖化力、液化力与蛋白酶活力 3 个主要酶系的协调与平衡,以此来组配麦曲和糖化酶的用量,不可大幅减少甚至不用麦曲酿制黄酒。

另外,从培养日本黄曲霉 1<sup>#</sup> 的过程中观察到该曲培养基的要求,培养温度、生长状况和工艺操作要求均与苏-16 菌株一致,因此替代后的工艺操作无需变更。但需要提醒生产厂家的是,判断熟麦曲的质量,并不是外观,而是理化指标。根据多年的经验,熟麦曲糖化力在麦曲转黄、长满淡黄色孢子时最高。所以麦曲应培养得嫩一些,而且应现做现用。这样才可以达到既减少麦曲用量,降低生产成本,又保证生产需求的目的。

参考文献:

- [1] 陈卫平,等.制曲工艺[M].南昌:江西科技出版社,
- [2] QB1805.3-94 工业用蛋白酶制剂[S].