

# 混菌固定化发酵乳清生产燃料乙醇的研究

周 珺, 肖冬光, 郭学武, 王 艳

(天津科技大学天津市工业微生物重点实验室, 天津 300457)

**摘要:** 采用克鲁维酵母和酿酒酵母混合发酵, 并对混菌固定化发酵的方法进行研究。结果表明, 两种酵母发酵的最佳比例为 1:1, 酿酒酵母在克鲁维酵母接种 3h 后加入到发酵液中; 在该条件下, 发酵周期由 96h 减少至 72h。

**关键词:** 燃料乙醇; 乳清; 混菌; 固定化酵母

中图分类号: TS262.2; TS261.4; Q814

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2008)01-0042-03

## Study on Whey Fermentation by Mixed Yeast to Produce Fuel Ethanol

ZHOU Jun, XIAO Dong-guang, GUO Xue-wu and WANG Yan

(Tianjin Industrial Microbiology Key Lab, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin, 300457, China)

**Abstract:** Whey fermentation by mixed yeast (*Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*) to produce fuel ethanol was studied. The results showed that the best ratio of the two yeast was 1:1, and *Saccharomyces cerevisiae* was added in the fermenting solution 3 h later after the inoculation of *Kluyveromyces marxianus*, which could shorten fermentation time from 96 h to 72 h.

**Key words:** fuel ethanol; whey; mixed yeast; immobilized yeast

乳清是生产干酪或干酪素的副产品, 营养丰富, 相当于除去酪蛋白的脱脂乳的营养<sup>[1]</sup>。目前国外乳清资源化研究较多的是利用乳清生产乳清蛋白、乳清粉、乳糖、酒精等产品<sup>[2-3]</sup>; 而国内的研究主要集中在利用乳清作为基料生产调配型果汁乳清饮料、发酵型乳酸饮料或发酵型含醇饮料<sup>[1,4]</sup>。1998年 Savova.J 首次利用乳清发酵生产乙醇<sup>[5]</sup>。固定化微生物可以进行高密度增殖培养, 提高生物转化速率, 增加稳定性。采用固定化、共固定化细胞生产酒精、啤酒、果酒及食醋等的研究十分盛行<sup>[7]</sup>。Marwaha 和 Kennedy 用褐藻酸钠和角叉胶包埋固定化克鲁维酵母生产乙醇<sup>[9]</sup>。经试验发现, 克鲁维酵母具有较高的乳糖酶活力, 但对半乳糖的发酵速度较慢, 而酿酒酵母不具备乳糖酶活力, 但其利用半乳糖能力较好。鉴于此, 本文采用混菌固定化的方法发酵乳清生产燃料乙醇, 有效地提高了发酵速度, 缩短了发酵周期。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

菌种: 克鲁维酵母 (*Kluyveromyces marxianus*) TY-13; 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) AY-5。

乳清粉: 地球牌甜乳清粉, 天津奥凯化工贸易有限公司; 海藻酸钠: 上海化学试剂厂; 氯化钙: 天津市凯通化学试剂有限公司。

### 1.2 方法

收稿日期: 2007-09-12

作者简介: 周珺(1982-), 女, 天津人, 硕士研究生, 研究方向: 现代酿造技术。

### 1.2.1 乳清还原液的制备(w/v)

乳清粉 12%, pH6.0; 110℃, 20 min 灭菌; 初始糖度 10.2 g/100 mL。

### 1.2.2 酵母细胞的固定化方法<sup>[9]</sup>

将 TY-13 与 AY-5 分别经种子培养后, 取酵母种子液与海藻酸钠溶液混合均匀, 用注射器滴入  $\text{CaCl}_2$  的溶液中造粒, 浸泡 1 h, 滤出固定化颗粒, 用无菌水洗涤 2 次, 再浸泡入  $\text{CaCl}_2$  溶液中进行固化, 固化后用生理盐水洗涤 2 次备用。其中, 酵母种子液、海藻酸钠和固化剂  $\text{CaCl}_2$  的体积比为 1:1:3。

### 1.2.3 酵母细胞的增殖培养

将制备好的固定化酵母凝胶颗粒接入到乳清还原液中, 30℃ 活化 24 h。

### 1.2.4 分析方法

发酵液总还原糖含量: 菲林滴定法<sup>[9]</sup>。

发酵液葡萄糖含量: SBA-40 型多功能生物传感仪。

发酵液酒精含量: 快速氧化法<sup>[10]</sup>。

发酵液酵母浓度: 在 620 nm 下用分光光度法测定。

发酵液乳糖及半乳糖含量: 先取一定量样液, 经适当稀释后测定其中葡萄糖的含量 (Glu1)。将样液中乳糖全部酸解成为葡萄糖和半乳糖, 再测定其中的葡萄糖含量 (Glu2) 和总还原糖的含量 G。

乳糖  $M = (Glu2 - Glu1) \div 180.16 \times 360.32$ 。

半乳糖 N=G- M- Glu1。

## 2 结果与分析

### 2.1 克鲁维酵母发酵乳清

以乳清还原液为发酵培养基, 接入克鲁维酵母 (TY-13) 进行发酵 (20~40 h 为发酵高峰期), 发酵过程中, 定时测定其酵母生长量、乳糖、葡萄糖和半乳糖的变化量, 并在发酵结束时, 测定酒精含量, 结果见表 1。

表 1 发酵过程中各种参数变化的测定

| 参数             | 时间 (h) |       |      |       |       |       |       |
|----------------|--------|-------|------|-------|-------|-------|-------|
|                | 24     | 28    | 32   | 48    | 60    | 72    | 96    |
| 葡萄糖            | 6      | 3.5   | 3    | 2     | 2     | 2     | 1     |
| 半乳糖            | 1607   | 1233  | 817  | 168.9 | 42.1  | 22    | 10    |
| 乳糖             | 147.5  | 103   | 134  | 124.6 | 111   | 96    | 88    |
| 酒精含量<br>(%vol) | —      | —     | —    | —     | —     | —     | 4.1   |
| OD 值           | 0.145  | 0.206 | 0.22 | 0.581 | 0.608 | 0.635 | 0.705 |

由表 1 中 3 种糖的变化可知, 有半乳糖的积累现象, 葡萄糖基本上无积累。表 1 中酒精含量和 OD 值的变化量可看出在 20~40 h 内酵母生长较快, 到达 24 h 后乳糖基本分解完毕。达 96 h 时发酵基本结束, 发酵液酒精含量为 4.1 %vol。

### 2.2 混合菌发酵菌株的确定

在以半乳糖为唯一碳源的 TTC 平板上, 分别点接克鲁维酵母 A、酿酒酵母 B 与奶酒酵母 C, 鉴别它们利用半乳糖的能力, 由显色反应可以看出, 酿酒酵母菌落显明显的红色, 而克鲁维酵母和奶酒酵母的菌落均为白色 (见图 1)。实验结果表明, 酿酒酵母利用半乳糖的能力较强, 故选用酿酒酵母与克鲁维酵母进行混菌发酵。

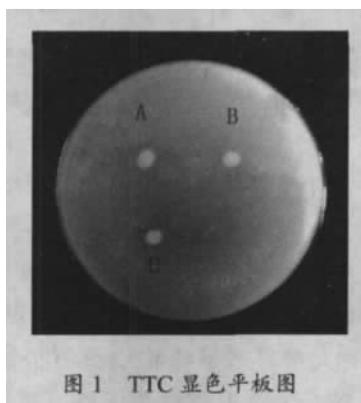


图 1 TTC 显色平板图

### 2.3 克鲁维酵母和酿酒酵母混合发酵乳清产酒精

#### 2.3.1 两种酵母混合发酵比例的确定

为充分利用乳清还原液中的糖, 缩短发酵周期, 提高发酵乳清所产的酒精含量, 将克鲁维酵母和酿酒酵母同时固定化发酵以达到所预想的目标。在固定化粒子中, 克鲁维酵母生长代谢是利用乳清还原液中的

乳糖, 同时乳糖被分解为葡萄糖和半乳糖, 克鲁维酵母也可以较好地利用葡萄糖, 但是对半乳糖利用效果并不理想; 而酿酒酵母利用葡萄糖和半乳糖能力都较强, 可以解除半乳糖积累的问题。所以, 确定合适的克鲁维酵母和酿酒酵母的比例, 对于发酵速率和酒精生成量是十分重要的。为考察不同比例的菌种对比对本实验的影响, 以不同比例的克鲁维酵母制成固定化粒子, 以 10% 接种量接入发酵培养基, 30 摇瓶发酵 60 h, 结果见图 2。由图 2 可知, 当两种酵母的比例为 1:1 时, 残糖值较低, 为 0.23 g/100 mL, 而酒精含量较高, 达到 4.6 %vol。

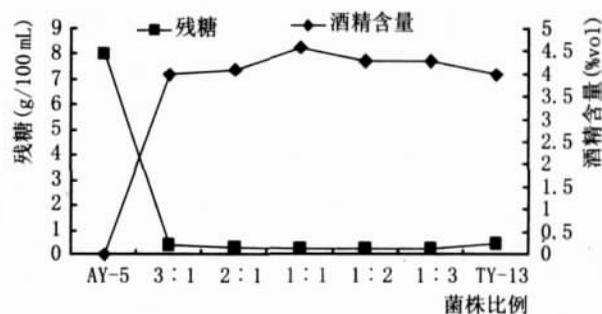


图 2 菌株比例的确定

#### 2.3.2 两种酵母加入时间间隔的确定

为了提高酵母的利用率, 进行了两种酵母加入时间间隔试验, 比较两种酵母加入的最适间隔时间, 结果见图 3。

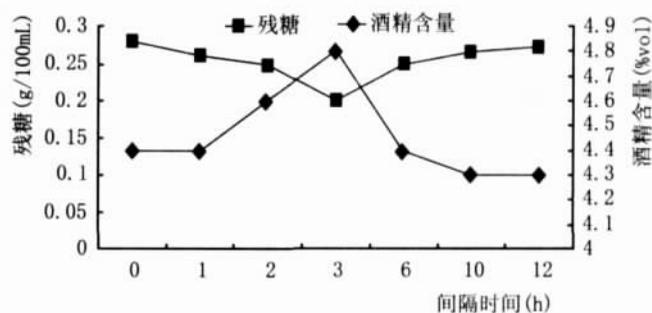


图 3 两种酵母加入时间间隔的确定

由图 3 可知, 先接种克鲁维酵母, 间隔 3 h 后再接入酿酒酵母最合适, 残糖值降至 0.20 g/100 mL, 酒精含量达到 4.8 %vol。

#### 2.3.3 混菌固定化发酵乳清与单一菌株发酵乳清周期的比较

将单一的克鲁维酵母按照 1.2.2 的方法制成固定化凝胶颗粒, 以 10% 的接种量接入到乳清还原液中进行发酵, 结果见图 4。

由图 4 可看出, 由单一菌株固定化发酵, 发酵 96 h 可到达发酵终点, 发酵速度较慢, 到发酵终点时酒精含量可达到 4.56 %vol, 残糖为 0.42 g/100 mL。

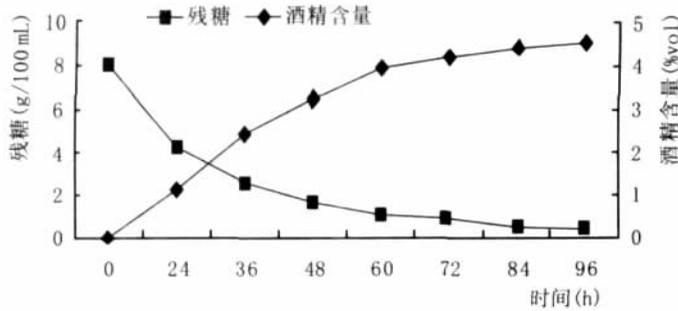


图4 单一菌株固定化发酵试验

将克鲁维酵母与酿酒酵母这两种酵母按照 1.2.2 的方法,以 1:1 的比例分别制成固定化凝胶颗粒,先将克鲁维酵母接入到乳清还原液中进行发酵,之后间隔 3h,再将酿酒酵母加入到乳清还原液中进行发酵试验,结果见图 5。

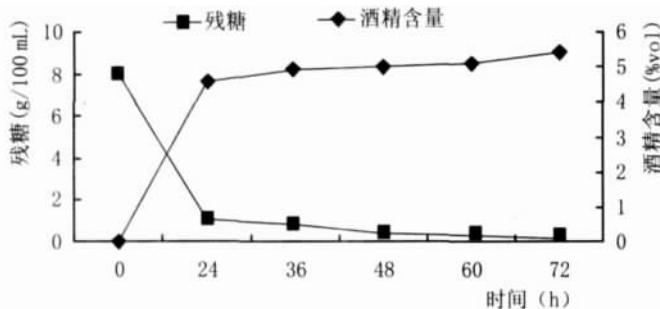


图5 混菌固定化发酵试验

由图 5 可知,在混菌固定化试验中,前 24 h 为发酵高峰期,发酵速度较快,到发酵终点时,酒精含量为 5.4 %vol,残糖值降至 0.18 g/100 mL。较大地提高了发酵速度,使发酵周期缩短了 24 h,发酵液中酒精含量较单一菌株发酵提高了 0.8 %vol,残糖含量比单一菌株发酵降低了 0.24 g/100 mL。

### 3 讨论

3.1 通过测定克鲁维酵母乳清发酵过程中各种糖含量的变化,发现半乳糖积累是导致发酵周期较长的主

要原因。

3.2 TTC 显色平板试验表明,酿酒酵母比克鲁维酵母具有较强的半乳糖发酵能力,因此,采用酿酒酵母与克鲁维酵母混合发酵的方法可有效提高乳清发酵速度。

3.3 优化了两种酵母混合发酵的方法,确定两种酵母发酵的最佳比例为 1:1,酿酒酵母在克鲁维酵母接种 3 h 后加入到发酵液中,效果较好。在此条件下进行混菌固定化发酵乳清生产燃料乙醇,并与单一菌株发酵进行比较,发酵速度有较大的提高,发酵周期由 96 h 缩短为 72 h,酒精含量也有所提高,达到 5.4 %vol。

参考文献:

- [1] 马俪珍,张秀红,等.乳清的营养价值及乳清饮料的研究现状[J].中国乳品工业,1999,27(5): 47-50.
- [2] M. I. Gonzalez Siso. The biotechnological utilization of cheese Whey: A review[J]. Bioresource Technology,1996,(57): 1-11.
- [3] Lucilia Domingues et al. Alcohol production from cheese whey permeate using genetically modified flocculent yeast gells[J].Biotechnology and Bioengineering, 2001, 72(5): 507-514.
- [4] 金世琳,肖坤,宾傲.乳清饮料[J].饮料工业,2001,(5): 22-24.
- [5] Nova.J.Ethylalcohol and yeast biomass from whey and milk[J]. Serum Khranit Promst 1998,39(6): 22-25.
- [6] Marwaha J.Alcohol production from whey permeate by immobilized and free cell of kluycesmarxi an usNCYC 179[J]. Process Biochemistry,1984,(4): 70-80.
- [7] 王克明,王雪筠.固定化细胞发酵海带饮料的研究[J].食品科学,1995,(8): 27-30.
- [8] 潘亚芬,王云庆,权石范.固定化酵母生产蜂蜜酒的研究[J].酿酒科技,2004,126(6): 72-73.
- [9] 蔡定域.酿酒工业分析手册[M].北京:中国轻工业出版社,1988.
- [10] 王亚楠,肖冬光.快速测定啤酒酒精度和真正发酵度的方法[J].酿酒,2002,29(6): 84-86.

社会效益和经济效益。

### 5 讨论

传统的分离提纯工艺主要采用蒸馏提取,但酿酒副产物中含有的大量呈香呈味物质只有极少量被蒸馏到酒中,而超临界 CO<sub>2</sub> 萃取技术在保持原料原有的色、香、味不因受热破坏的前提下,能将其充分提取并回归应用到白酒生产中。因此,该技术在白酒工艺中的应用只是开始,通过对白酒其他酿酒资源如曲药、粮食等原料中呈香呈味成分提取的研究和工艺的优化,将传统的酿酒工艺与现代分离技术完美结合,使白酒质量得到质的飞跃,白酒优质品率将大幅度提高。

(上接第 41 页)

黄水提取物对酒的质量提高幅度最明显,另外由于利用黄水提取酒用呈香呈味物质的同时还生产了 1800 t/年的乳酸,且利用黄水为原料生产的酒用呈香呈味物质得率最高,理化指标及尝评效果最好,工艺较简单,操作方便,因此,该工艺同以丢糟、酒尾为原料的提取工艺相比,其综合效果最好。

项目技术成果推广应用,预计可为白酒行业带来的效益为:年新增税收 6~8 亿元,新增利润 13~15 亿元,节支增收 1.5~2 亿元,带动相关产业增收 16~20 亿元,年累计经济效益 30~40 亿元,同时带来极为显著的