



固定化酵母薯干原料带渣酒精发酵研究

虞炳钧 张福明

(浙江工学院, 杭州 310014)

我国发酶法酒精生产大都采用淀粉质原料,其中尤以薯干最为普遍。其传统生产方法是将薯干粉碎、调浆、高温蒸煮、糖化,然后发酵并经蒸馏而得酒精。在这一生产过程中仅蒸煮工序就要消耗大量的蒸气,其能耗约占整个生产总能耗的30%左右^[1]。为降低蒸煮工序中的能耗,采用低温蒸煮工艺则是较有效的一种方法。固定化细胞技术是七十年代末期出现的新技术。采用固定化细胞酒精发酵,可以加快发酵速率,缩短生产周期,近年来国内外学者对该技术已进行了大量的研究,并已取得不少可喜的成果^[2]。但以往的研究大都系以葡萄糖或糖蜜为原料,而对于含固形物(渣)较多的薯干原料固定化酵母酒精发酵的研究却很少见。所以,在以薯干为原料的酒精发酵中,若能将低温蒸煮工艺与固定化细胞技术很好地结合起来,便有可能使酒精的生产达到节能和高效率。为此,本课题开展了这方面的研究,取得了一些有意义的试验结果。

材料与 方法

(一) 材料

1. 薯干粉: 淀粉含量 69.11%, 水份 14.32%, 杭州酒厂提供。
2. 海藻酸钠: 化学纯, 上海化学试剂厂分装。
3. α -淀粉酶: 酶活力 2600u/g, 海宁酶制剂厂提供。
4. 固体糖化酶: 酶活力 35,000u/g, 海宁酶制剂厂提供。
5. 酵母菌种: k氏酵母(*Saccharomyces sp.* k)。

(二) 方法

1. 低温蒸煮糖化酶制备:

薯干粉 $\xrightarrow[\text{粉水比1:4}]{\text{加水}}$ 调浆 $\xrightarrow[\text{及CaCl}_2\text{溶液}]{\text{加}\alpha\text{-淀粉酶}}$ $\xrightarrow{80^\circ\text{C 保温液}}$
 升温 $\xrightarrow{100^\circ\text{C 灭酶}}$ 降温加酸调pH $\xrightarrow[\text{并加入糖化酶}]{60^\circ\text{C 保温糖化}}$
 冷却 \rightarrow 糖化醪(供发酵)

2. 酵母细胞的固定化: 在灭过菌的2%海藻酸钠溶液中接入酵母细胞悬液(酵母的扩大培养同常规方法),混合均匀后逐滴滴入0.1mol/L CaCl_2 溶液中,使形成凝胶珠,再在稀氯化钙溶液中硬化备用。制备膜片状固定化酵母时,只需将上述过程改为凝胶涂布过程即可。

3. 固定化细胞的培养: 所用的三种对比培养基组成: (1) 麦汁培养基: 麦芽汁调整糖度至12.5—13.5°Bx., 以硫酸调pH4, 灭菌后备用。(2) 薯干糖化液培养基: 糖化率80%以上, 总糖度12.5—13.5°Bx., 补加0.05% 硫酸铵, 以硫酸调pH4, 灭菌后备用。(3) 合成培养基: 葡萄糖 7.5—8.5%, 麦芽糖 5%, 酵母膏 0.5%, 蛋白胨 0.3%, KH_2PO_4 0.15%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, 尿素 0.15%, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.002%, CaCl_2 0.5%, 以硫酸调pH4, 灭菌后备用。培养条件: 在上述培养基中分别接入10% (v/v)的固定化酵母凝胶珠,在29—30℃ (或32—33℃)培养1—2天,直至细胞密度达 10^9 Cells/ml-gel以上。

4. 分析检测方法: 还原糖及总糖: DNS法^[3]。发酵液酒精度: 蒸馏液测比重法^[4]。酵母细胞计数: 游离细胞直接以稀释液血球计数板计数; 死细胞数用0.1% 次甲基蓝染色法计数; 凝胶珠内的细胞数系以10% Na_3PO_4 将一定体积的凝胶珠溶解^[5], 然后稀释计数。

本文于1991年7月11日收到。

结果与讨论

(一) 固定化细胞的较佳培养条件

1. 培养温度和培养基的选定: 表1为固定化k氏酵母在三种培养基和不同温度下培养的结果。可以看出薯干糖化液和麦芽汁培养基均较佳, 两者所需的培养时间短, 细胞总数和存活率

均较高, 但从酒精厂易于自行制备看, 其中以薯干糖化液较为适宜。较佳的增殖温度可取 32—33℃, 它比29—30℃可缩短增殖时间一半以上。图1为凝胶体在此种培养基内培养前、后的显微照片。由此可见, 新增殖的酵母细胞绝大多数系集积在凝胶体的表面, 这将有助于发酵时能保持细胞与基质的良好接触, 使发酵速率加快。

表1 固定化K氏酵母在三种增殖培养基及不同温度下的增殖结果

增殖温度(℃)	29—30			32—33		
	麦芽汁	薯干糖化液	合成培养基	麦芽汁	薯干糖化液	合成培养基
增殖所需时间(h)	60	60	60	24	24	24
增殖前细胞密度 $\times 10^{-7}$ (cells/ml-gel)	1.17	1.17	1.17	1.93	1.93	1.93
增殖后细胞密度 $\times 10^{-8}$ (cells/ml-gel)	10.7	12.1	10.1	10.0	14.0	8.20
增殖后活细胞数 $\times 10^{-8}$ (cells/ml-gel)	9.50	10.0	9.30	9.20	13.0	7.50
增殖过程中重量增加率(%)	39	53	35	40	53	34

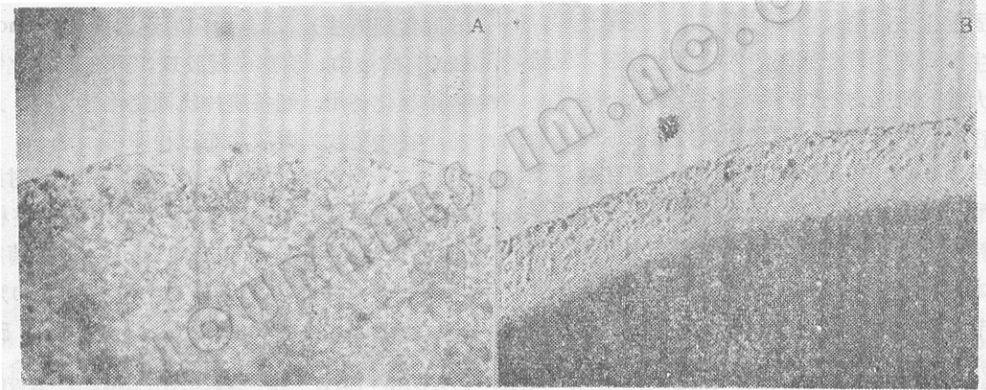


图1 海藻酸钙包埋法固定化k氏酵母凝胶体增殖前、后的显微照片
A 增殖前(6.3 \times 20倍) B 增殖后(6.3 \times 8倍)

2. 固定化酵母细胞增殖动力学: 表2为海藻酸钙固定化k氏酵母在薯干糖化液中的细胞增殖数据。经计算, 增殖至24h时的平均细胞倍增时间 $T_d = 3.84h$; 由图解求得在最快增殖期的 $T_d = 1.29h$, 最大比生长速率 $\mu_{max} = 0.536/h$ 。通常, 在营养和环境条件均较适宜的情况下, 游离酵母可在1.5—2h增殖一代, 但经多次出芽之后, 原母细胞的世代时间就会延长, 后期甚至可长达6h之久^[6]。固定化k氏酵母在对数生长期内的细胞倍增时间为 $T_d = 1.29h$, 增殖至10h后增殖速率明显减慢, 故在24h内的平均细胞倍增时间为 $T_d = 3.84h$ 。后期增殖明显减慢的主要原因在于营养物质的浓度较低, 代谢产物引起的抑制作用, 以及由于细胞密度的增高而使通气量降低

等。由增殖试验数据还可看出, 细胞总数和存活率均随增殖时间的过长而下降, 其原因在于后期新细胞的增加已很缓慢, 而早期的细胞却进入了死亡甚至自溶脱落状态。因此, 除了应选择合适的增殖培养基和适宜的培养温度等条件外, 尚应控制适当的增殖时间。

(二) 固定化酵母酒精发酵

鉴于实施糖化带渣固定化酵母酒精发酵时存在着床层易堵塞的情况, 试验中曾进行过带渣与不带渣(即糖化滤液)的对比发酵试验。结果发现: 采用不带渣且不洗渣工艺时, 尽管对糖化滤液的总糖利用率可高达98%左右, 但对薯干原料的淀粉利用率却比带渣发酵时要低15%左右(原料中约有19%的糖份被滤渣带走)。虽然对

表2 海藻酸钙固定化k氏酵母在薯干糖化液中的增殖状况

增殖时间(h)	0	3	6	9	15	19	24	30	41
培养基残糖(*Bx.)	13.1	11.5	11.0	10.5	8.0	6.0	4.0	3.5	3.0
凝胶内总细胞数 $\times 10^{-7}$ (Cells/ml-gel)	1.93	5.6	28	70	102	132	147	139	125
细胞存活率(%)	—	—	—	—	86.3	87.9	88.4	86.3	84.0

滤渣中的残糖亦曾采用过热水洗渣回收, 但糖的回收率仍很不充分。此外, 糖化胶体积庞大、粘度高, 糖液的过滤及洗渣操作本身就存在着很大的困难, 因而不带渣发酵缺乏工业实用的前景。故在以后的试验中均用带渣的糖化液。

1. 珠粒状与膜片状固定化酵母发酵: 表3为珠粒状固定化酵母和膜片状固定化酵母在相同条件下所得的发酵结果。可以看出, 达到基本相

同的发酵程度(成熟酒度和残糖等指标基本相同时), 膜片状固定化酵母所需的发酵时间明显短于珠粒状固定化酵母, 这不仅可以有效提高发酵器的乙醇生产能力, 而且由于膜片状固定化酵母凝胶系附着在刚性片状材料之表面, 它不会随同醪液一起被冲出, 因而可以采用间歇循环发酵方式防止醪渣的沉降堵塞。

2. 较佳发酵方式探索: 酒精酵母一般只能

表3 珠粒状与膜片状固定化酵母的对比发酵结果(35℃分批式发酵)

固定化酵母成型类型	发酵周期(h)	残总糖(%)	残还原糖(%)	单位醪液CO ₂ 失重速率(mg/g-mash·h)
珠粒状凝胶	43.5	0.77	0.12	1.61
膜片状凝胶	24.0	0.81	0.24	2.87

注: 成熟酒度两者基本相同。

利用可发酵性糖。因此, 在薯干原料的固定化酵母酒精发酵中应充分注意以下几点: (1) 前糖化率应高于传统式游离酵母发酵时的水平。较佳的糖化条件为60—65℃、1h, 糖化率达70%左右。(2) 固定化酵母需多批次使用, 可是在各批发酵后期由于还原糖含量很低而酒度却相当高, 乙醇对发酵速率的抑制作用已相当的大^[7,8], 故继续采用固定化酵母发酵不仅其乙醇生产能力很低, 而且还会影响酵母细胞的存活率。因而尚需设法使细胞处于可以不断活化再生或自行增殖的状态。据文献报道: 分批式发酵时醪液酒度达3.5%以上时, 酵母的繁殖已开始受到抑制^[9]。为此, 试验中采用了先以固定化酵母主酵, 然后利用脱落在醪液中的游离酵母转移至后酵罐内后酵的方式, 取得了表4所列的较好结果: 其中循环主酵12h, 然后转移后酵20h, 其淀粉利用率为89.19%, 固定化酵母凝胶体的乙醇生产能力可达32.31mg-EtOH/g-gel·h, 包括后酵罐在内的乙醇生产能力为2.79g-EtOH/l·h, 该值是目前各酒精厂发酵罐生产能力的3—4倍。从图2所示的膜片状固定化酵母酒精发酵曲线可以看出: 在前12h 酵期内, 发酵速率很快, 糖度直线

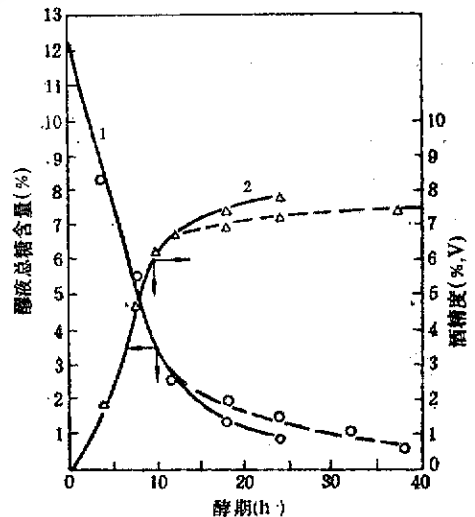


图2 膜片状固定化酵母酒精发酵曲线
注: 1. 发酵条件——35℃分批带渣发酵。
2. -----线为转移至后酵器以游离酵母后酵。

下降, 酒度迅速上升, 而在后12h中, 发酵速率已明显减缓, 糖度只下降1.7%, 酒度仅上升1.1%左右。显然, 后糖化及后发酵速率缓慢是制约薯干原料固定化酵母酒精发酵速率的重要因

表4 不同发酵方式的乙醇生产能力和淀粉利用率

发酵方式	乙醇生产能力			淀粉利用率 (%)	备注
	以凝胶重量计 (mg-EtOH/g·h)	以凝胶床层体积计 (g-EtOH/L·h)	以发酵器总体积计 (g-EtOH/L·h)		
后酵转移法	36.84	11.18	2.63	87.44	主酵10h转移后酵24h
	32.31	9.81	2.79	89.19	主酵12h转移后酵20h
	27.96	8.49	2.35	87.01	主酵14h转移后酵24h
主、后酵-罐法	15.99	4.85	2.19	82.12	固定化酵母静态发酵 24h
	17.86	5.41	2.58	81.08	固定化酵母循环发酵 24h

*: 发酵器总体积指主、后发酵罐的合计体积。

素, 采用后酵转移法则是提高固定化酵母生物反应器乙醇生产能力的有效措施。其较佳的发酵方式可取: 循环主发酵 12h转移至后酵罐静置后发酵 18—20h。这样既有助于提高主酵器的乙醇生产能力, 又可减少醪液循环所需的动力消耗。

3. 固定化酵母乙醇发酵生物反应器的选择: 本研究过程中, 曾自行设计制造和试验过三种生物反应器: (1) 珠粒状固定酵母填充床反应器(采用连续发酵法); (2) 底部设置滤网的珠粒状固定化酵母罐式反应器(采用分批静态发酵); (3) 膜片状固定化酵母填充床反应器(采用循环式发酵法)。试验结果表明: 前两种反应器均易被醪渣所堵塞而难以长周期或多批次稳定运转; 后一种则是较适合于带渣醪液酒精发酵的生物反应器, 它既可供分批式循环发酵, 亦可供部份外循环的连续式发酵。经多批次考察表明, 它不仅

传质性能良好, 二氧化碳易于释放, 乙醇生产能力可比珠粒状固定化酵母生物反应器约高一倍, 而且在防止渣滓的堵塞性能方面更是优于前两者。表5列出了该反应器的主要特性参数, 其乙醇生产能力(带渣主发酵)可达 32mg-EtOH/g-gel·h, 以床层体积计算的生产能力达 9.8g-EtOH/L·h, 此值约为目前酒精厂发酵罐乙醇生产能力的12倍。本试验中由于采用了膜片状固定化酵母生物反应器循环主发酵等有关措施, 已较好地解决了多批次发酵过程中的稳定性问题, 取得了如下结果: 膜片状反应器可反复活化运转三个月以上, 其发酵活力未见明显下降, 发酵周期可比传统式发酵缩短约50%, 淀粉利用率基本达到传统式发酵水平; 凝胶载体的强度和化学稳定性良好; 成熟醪的升酸幅度与现行工厂指标基本相同(升酸1度左右, 属酒精发酵正常升酸)。

表5 膜片状固定化酵母酒精发酵生物反应器主要参数

参数名称	参数值	参数名称	参数值
反应器直径 $\phi_{内}$ (mm)	85	酵母细胞增殖量(g)	151.8
填充层高度(mm)	168	增殖后凝胶层平均厚度(mm)	约0.36
填充物堆体积(cm^3)	953.4	凝胶层细胞密度(cells/g-gel)	$>10^9$
填充物表面积(cm^2)	7660	生产能力, *	
填充物自重(g)	267.5	按凝胶重量计(mg-EtOH/g-gel·h)	约32
固定化酵母凝胶涂布量(g)	137.5	按填充床体积计(g-EtOH/L·h)	约10

(*): 35℃ 薯干糖化醪带渣发酵。

参 考 文 献

- [1] 章克昌等: 食品与发酵工业, (4):31—36, 1986.
- [2] Godia, F. et al.: *Process Biochemistry*, 22(1):43—48, 1987.
- [3] 贾淑颖等: 食品与发酵工业, (2):30—34, 1983.
- [4] 胡嗣明等: 酒精生产分析检验, 轻工业出版社, 北京, pp.142—145, 1983.
- [5] MeGHEE, J. E. et al.: *Applied and Environmental Microbiology*, 44(1):19—22, 1982.
- [6] Phaff, H. J. 王民俊等译: 酵母菌生活史, 《酿酒科技》编辑部出版, 贵州, pp.26—27, 1985.

- [7] Seki, M. et al.; *J. Chem. Eng. Japan*, 18(5):389—393, 1985.
[8] Yamane, T. et al.; *Biotechnol. Bioeng.*, 24:2731—2737, 1982.
[9] 周海山等, 武汉轻工科技, (1):13—18, 1985.

Studies on Alcohol Fermentation from Dried Sweet Potato Mash with Dregs by Immobilized Yeast

Yu Bingjun Zhang Fuming

(Zhejiang Institute of Technology, Hangzhou 310014)

In this paper, a new alcoholic fermentation technology is studied, which is combined with low temperature cooking process and immobilized yeast fermentation technology from dried sweet potato mash with dregs. The results show that the optimum temperature of multiplication is 32—33°C when the calcium alginate gel as carrier and the saccharified liquid of dried sweet potato as multiplication media; the packed bed of thin piece with membrane of immobilized yeast is a better bioreactor for the alcoholic fermentation from saccharified mash of dried sweet potato with dregs, productivity based on bed volume is 9.8g EtOH/L·h; the fermentation scheme is suitable which adopts primary fermentation for 12h at 35°C by immobilized yeast and after fermentation for 18—20h by free yeast cells in mash; the utilization rate of starch has reached 89%.

Key words Sweet potato; immobilized; yeast; alcohol fermentation; alginate; bioreactor