

利用中温蒸煮工艺进行高浓度酒精发酵

池振明 刘建国* 许平

(山东大学微生物学系 济南 250100)

(山东省公安学校 济南 250014)*

摘要 用中温蒸煮工艺生产高浓度酒精,首先利用耐高温 α -淀粉酶在95~97℃下同时糊化和液化淀粉,接着在60℃下加高转化率的糖化酶进行糖化,最后在30℃下加酵母菌悬液进行发酵。酵母菌W4在60h内可以产生18.3%的乙醇,在成熟发酵醪中的残还原糖和总糖分别为1.2%和4.1%,细胞存活率为68.5%。如果在发酵培养基中添加一定量的硫酸铵,可进一步改进这一工艺,使成熟发酵醪的乙醇浓度提高到18.9%,发酵周期缩短到50h,残还原糖和总糖分别减少到0.27%和3.1%。

关键词 高浓度酒精发酵,耐高温 α -淀粉酶,高转化率糖化酶,中温蒸煮工艺

用传统的酒精发酵工艺只可生产9.5%~10.5%的乙醇。近年来发展起来的高浓度酒精发酵工艺与传统的酒精发酵工艺相比,具有大大节省发酵和蒸馏过程的能量,提高设备利用率,减少劳动力和提高酒精产量等优点^[1~3]。因此这种新的酒精生产技术受到了国内外有关研究者的高度重视^[4~5]。在过去几年中,我们建立了低温蒸煮工艺和生淀粉发酵工艺生产高浓度酒精,所选育的数株酵母菌在70h内可生产17.5%以上的乙醇^[6~8]。但是由于这两种工艺在实际生产中有污染杂菌的可能,因此在这些研究的基础上对高浓度酒精发酵工艺做了进一步的改进。本研究的目的在于弄清中温蒸煮高浓度酒精发酵工艺中耐高温 α -淀粉酶和糖化酶的合适添加量以及硫酸铵对高浓度酒精发酵的影响。

1 材料和方法

1.1 酵母菌株

Saccharomyces sp. W4 是一株能快速产生高浓度酒精的酵母菌^[6,9],由本室保存,以下试验中简称W4菌株。

1.2 酶制剂

耐高温 α -淀粉酶 HTAA-081 (1 000 u/ml)和高转化率糖化酶 GA-200 (50 000 u/ml)由美国独资企业长春力达科技公司提供。雪梅牌糖化酶 XM (50 000 u/g) 购买于中美合资无锡星达生物工程有限公司。

1.3 原料

原料为市场上出售的玉米面,经测定淀粉含量为66.4%。

1.4 酵母菌的培养

制备麦芽汁,调糖度至8~10Bx,把活化过的酵母菌接种于液体麦芽汁培养基中,在

30℃下振荡培养 18h。

1.5 淀粉的糊化和液化

170ml 自来水和 100g 玉米面均匀地混合于 500ml 试剂瓶中，加 2×10^{-5} g CaCO_3 和 0.15ml HTAA-081 α -淀粉酶，然后在 95~97℃下糊化和液化 20min，接着在 105℃下继续糊化和液化 7min。

1.6 淀粉的糖化

液化醪冷却到 60℃，用 10% HCl 溶液调 pH 至 4.5~5.0，加糖化酶 GA-200 糖化 30min。

1.7 发酵试验

糖化醪冷却到 30℃，加 10ml 新培养好的酵母菌悬液，使培养基总体积为 280ml，在试剂瓶接上特制的发酵栓，加 1ml 浓硫酸于发酵栓中，然后在 30℃下进行发酵。每隔一定的时间称重一次，根据失去的 CO_2 重量和成熟发酵醪的乙醇浓度估计酵母菌发酵生产酒精的能力。

1.8 乙醇的测定

发酵液中乙醇浓度的定量分析法用酒精比重计测定法。

1.9 残还原糖和总糖的测定

离心沉淀发酵液中的固体物，上清液中的残还原糖测定用 3,5-二硝基水杨酸比色定糖法^[10]。发酵醪中残总糖的测定根据 Saha 等人^[11]所用的方法：10ml 发酵醪，10ml 25% HCl 和 30ml 蒸馏水混合均匀，在 100℃水浴中水解 3h，水解液调至中性，然后用上述的方法测定水解液中的还原糖。

1.10 酵母菌细胞存活率的测定

利用血球计数板测定发酵液中的细胞数目。

2 结果与讨论

2.1 耐高温 α -淀粉酶添加量对发酵的影响

在高浓度酒精发酵过程中，需要加较高浓度的淀粉原料，添加玉米粉为 35%。高浓度的淀粉经过糊化后，粘度非常大。如果不加淀粉酶进行液化，那么就无法进行糖化和发酵。 α -淀粉酶液化淀粉的最适温度为 95℃，最高可达 105℃，可用这种酶进行边糊化边液化，解决糊化淀粉高粘度的问题。但是在高浓度酒精发酵过程中，这种酶的用量应该合适。为此研究了 α -淀粉酶添加量对高浓度淀粉液化和酒精发酵的影响，表 1 结果表明每 100g 原料添加 0.15ml HTAA-081 α -淀粉酶较为合适，能使淀粉的粘度降低到比较理想的要求。经过 60h 的发酵，W4 菌株可以产生 18.3% 的乙醇。如果这种酶加量少于 0.15ml 发酵速率明显减慢，尤其少于 0.125ml，经过 4~5 d 的发酵，W4 菌株才能产生 18.3% 的乙醇。这种加酶量多于 0.15ml 时，对发酵影响不大。以下试验 α -淀粉酶加量为 0.15ml。

Thomas 等人^[5,12]研究小麦粉高浓度酒精发酵的过程中，使用了 2.5ml 耐高温 α -淀粉酶在 95~97℃下液化 400g 淀粉，液化时间为 60min，所用的混合型活性干酵母在 20℃下经过 4d 以上的发酵可以产生 17.1% 以上的乙醇。

表 1 耐高温 α -淀粉酶添加量对高浓度淀粉液化和酒精发酵的影响Table 1 The effects of the amount of thermophilic α -amylase on the fermentation capacity by *Saccharomyces* sp. W4

The amount (ml) of thermophilic α -amylase per 100g of the raw material	The loss of weight by CO ₂ liberation (g)							Ethanol concentration in the mash (%)	
	0	24	48	60	72	96	120		144
0.075	0	10.0	21.5		25.0	28.0	31.0	32.0	18.3
0.10	0	14.5	23.0		27.5	30.0	32.0		18.3
0.125	0	18.5	29.0		31.5	32.5			18.3
0.15	0	18.5	30.0	32.0					18.3
0.175	0	19.0	29.5	32.0					18.3

2.2 糖化酶添加量对发酵的影响

在酒精发酵过程中,糖化酶添加量应尽量减少。表 2 结果显示,利用力达科技公司提供的糖化酶糖化淀粉时,100g 淀粉所用的糖化酶为 0.25ml (相当于 125u/g) 时较为合适。W4 菌株经过 60h 发酵,可产生 18.3% 的乙醇。当糖化酶加量少于 0.25ml 时,发酵速度开始减慢。多于 0.25ml 时,对发酵并无影响。

表 2 GA-糖化酶添加量对酒精发酵的影响

Table 2 The effects of the amount of GA-glucoamylase on the fermentation capacity by *Saccharomyces* sp. W4

The amount (ml) of glucoamylase per 100 g of the raw materials	The loss of weight by CO ₂ liberation (g)						Ethanol concentration in the mash (%)
	0	24	48	60	72	96	
0.10	0	15.3	25.8		30.3	31.3	17.8
0.15	0	14.5	27.5		32.5		18.3
0.20	0	16.0	28.5		32.0		18.3
0.25	0	18.5	30.0	32.0			18.3
0.40	0	19.0	30.0	32.0			18.3
0.50	0	18.0	29.5	32.5			18.3

当用雪梅牌糖化酶制剂 (XM) 时,100g 淀粉添加量达到 0.40g (相当于 200u/g) 时,发酵速度才能达到比较理想的结果 (见表 3)。所以我们认为 GA-200 型高转化率糖化酶比较适合作为高浓度酒精发酵过程中的淀粉糖化酶。

表 3 XM-糖化酶添加量对酒精发酵的影响

Table 3 The effects of the amount of XM-glucoamylase on the fermentation capacity by *Saccharomyces* sp. W4

The amount (g) of glucoamylase per 100 g of the raw materials	The loss of weight by CO ₂ liberation (g)						Ethanol concentration in the mash (%)
	0	24	48	60	72	96	
0.1	0	15.0	25.0		29.0	30.0	17.8
0.2	0	14.0	25.0		29.5	32.0	18.3
0.3	0	16.5	26.0		29.5	32.0	18.3
0.4	0	19.0	28.5	32.0			18.3

在低温蒸煮工艺和生淀粉高浓度酒精发酵工艺中,通过试验证明,糖化酶添加量为 300~400u/g 较为合适^(6~8),而且发酵周期需要 70h,所用的四倍体酵母 F4Cl, W4 和 H0 菌株发酵 33.0% 的玉米面淀粉只能产生 17.5% 的乙醇。本研究结果表明,利用耐高温 α -

淀粉酶在 95~105℃ 下糊化和液化淀粉后, 使糖化酶添加量明显减少, 发酵周期缩短, 并且成熟发酵醪中的乙醇浓度有所提高。这说明中温蒸煮工艺对高浓度酒精技术有所改进。姜鲁燕等人^[13]也认为使用 100℃ 左右的中温蒸煮工艺能使淀粉迅速液化, 蒸煮醪粘度降低, 明显地降低能耗及动力消耗。

2.3 硫酸铵对发酵的影响

我们在另一研究中发现添加各种氮源对高浓度酒精发酵速度有很大的影响。280ml 发酵培养基含有 0.9g 硫酸铵时, 发酵周期进一步缩短^[14]。图 1 结果再次表明在每 280ml 发酵培养基中含有 0.9g 硫酸铵时, 在 30℃ 下, 经过 50h 的发酵, W4 菌株可以产生 18.9% 的乙醇, 说明与不含有这种氮源的相比较发酵速度有明显的提高。在含有硫酸铵的成熟发酵醪中残还原糖和残总糖分别为 0.27% 和 3.1% (见表 4), 在不含硫酸铵的成熟发酵醪中残还原糖和残总糖分别为 1.2% 和 4.1%, 这说明在发酵培养基中加入一定量的硫酸铵不仅可以加快酒精发酵速度, 还可以提高糖的利用率和酒精产量。但在含有硫酸铵的成熟发酵醪中的细胞存活率为 40%, 在不含有硫酸铵的成熟发酵醪中的细胞存活率为 68.5%, 原因有待于进一步研究。

表 4 成熟发酵醪的分析结果

Table 5 Some analytical results from the fermented media

Fermentation media	Reducing sugar (%)	Total sugar (%)	pH	Alcoholic concentration (%)	Cell viability (%)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.27	3.1	5	18.9	40.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.2	4.1	5	18.3	68.5

参 考 文 献

- [1] 池振明. 微生物学通报, 1993, 20 (3): 180~182.
- [2] D'Amore T *et al.* Enz Micro Technol, 1987, 9: 322~330.
- [3] McCaig R *et al.* ASBC Journal, 1992, 50: 18~26.
- [4] Bertolini M C *et al.* Biotechnol Lett, 1991, 13: 197~202.
- [5] Thomas K C *et al.* Journal of Industrial Microbiology, 1992, 10 (1): 61~62
- [6] 池振明等. 食品与发酵工业, 1993, 4: 29~32.
- [7] 池振明等. 生物工程学报, 1994, 10 (2): 130~134.
- [8] Chi Z M *et al.* Biotechnology Letters, 1993, 15 (8): 877~882.
- [9] Chi Z M *et al.* Annual Reports of ICBiotech, 1991, 14: 135~145.
- [10] 北京大学生物学系生物化学教研室. 生物化学实验指导, 北京: 人民教育出版社, 1980, 22~24.
- [11] Saha B C *et al.* Biotechnol Bioeng, 1983, 25 (4): 1181~1186.

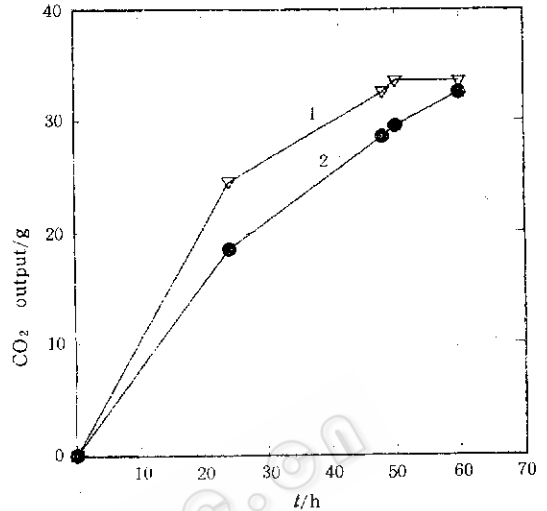


图 1 添加硫酸铵对高浓度酒精发酵的影响
Fig. 1 The effect of added ammonium sulphate on the fermentation capacity by *Saccharomyces* sp. W4

1. In the medium with ammonium sulphate,
2. In the medium without ammonium sulphate.

Volume: 280ml

- (12) Thomas K C *et al.* Can J Microbiol, 1992, 38: 626~634.
(13) 姜鲁燕等. 山东食品发酵, 1994, 1: 22~25.
(14) Chi Z M *et al.* The World Journal of Microbiology and Biotechnology, 1994 (in press).

High-concentration Ethanol Production from Cooked Corn Starch by Using Middle-temperature Cooking Process

Chi Zhenmin¹ Liu Jianguo² Xu ping¹

(Department of Microbiology, Shandong University, Jinan 250100)¹

(Public Security Institute of Shandong, Jinan 250014)²

Abstract An improved process for high-concentration ethanol production from cooked corn starch by *Saccharomyces* sp. W4 was well developed. Simultaneous cooking and liquefaction of corn starch were performed by using thermophilic α -amylase at 95~105°C. The mash was then saccharified at 60°C by using high-efficiency glucoamylase. *Saccharomyces* sp. W4 could produce 18.3% ethanol at 30°C within 60°C hours with 1.2% reducing sugar and 4.1% total sugar remaining in the fermented mash. It is found that ammonium sulphate could accelerate the fermentation rate. When 0.9g of ammonium sulphate was added to 280 ml of the fermentation media, 18.9% ethanol could be reached in the mash after 50 hours of fermentation, leaving 0.27% reducing sugar and 3.1% total sugar in the fermented media.

Key words High-concentration ethanol fermentation, thermophilic α -amylase, high efficiency glucoamylase, middle-temperature cooking process