

温度对超高浓度酒精生料发酵体系的影响

许宏贤, 段钢

杰能科 (中国) 生物工程有限公司亚太谷物加工酶应用中心, 无锡 214028

摘要: 通过对超高底物浓度生料发酵中温度的影响研究发现, 采用温度梯度的方法可大幅提高酵母的生产效率。以高粱为例, 采用 35% 绝对干物浓度, 在新型生料水解酶的配合下, 通过合适的逐级降温培养方式, 使用普通酒精干酵母, 在 90 h 内发酵醪液酒精浓度可达 20% (V/V) 以上。

关键词: 生料发酵, 生料水解酶, 温度梯度控制, 浓醪发酵, 酒精

Effect of temperature on the no cook, very high gravity ethanol fermentation process

Hongxian Xu, and Gang Duan

Genencor (China) Bio-products Co., Ltd. Application and Technical Service Center, Asia Pacific Grain Processing Enzymes, Wuxi 214028, China

Abstract: The effect of temperature on a very high gravity ethanol fermentation using no cook process was investigated. We found that a gradient temperature control strategy could improve the fermentation efficiency significantly. With the assistance of a new raw starch hydrolyzing enzyme and a gradient temperature control strategy, the ethanol concentration could reach up to 20% (V/V) within 90 h using commercially available dry yeast, when sorghum was used as the raw material and the dry substrate concentration was controlled at 35%.

Keywords: no cooking fermentation, granular starch hydrolyzing enzyme, temperature staging strategy, very high gravity fermentation, ethanol

由于能源价格上涨, 酒精作为可再生能源之一, 生料制酒过程引起更广泛注意, 近期的研究增多^[1-2], 商业化过程进展也加快^[3]。但相对而言, 生料发酵周期偏长, 生料浓醪发酵的研究并不多。而浓醪发酵技术是针对“三农问题”、能源问题、环保问题等社会各种矛盾而产生的酒精生产技术, 符合科学发展观^[4-5]。但若采取传统的蒸煮工艺进行超高浓度酒精发酵, 即便不考虑粘度问题, 往往需要特别耐高酒精度的酵母^[6-7]。生料过程除了可以节约能量外,

由于整个系统中温度远远低于淀粉的糊化温度, 体系粘度比传统过程低得多^[8-9], 因此可以提高发酵浓度而不必担心粘度问题。同时由于生料过程中, 葡萄糖是逐步缓慢释放的, 因此可以进行浓醪发酵而不必担心高初糖浓度和高渗透压对酵母的生长抑制。

传统浓醪发酵的相关研究表明, 发酵温度对酵母的生长和发酵效率非常重要^[10-13], 但未见采用温度梯度培养方式进行的研究, 而针对生料浓醪发酵过程中温度影响的研究尚未见报道。本实验以高粱

为原料来研究生料发酵中体系温度的选择及变化对发酵的影响。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验材料

全磨 30 目高粱 (本地白高粱, 实验室粉碎之后过筛, 淀粉含量对干基 73.67%)。酵母采用安琪牌酿酒高活性干酵母 (耐高温型)。无水乙醇、葡萄糖、麦芽糖、甘油、乳酸、乙酸均购自北京色谱中心, 为色谱级。纯水由 Millipore 制备, 纯水电阻 18.2 MΩ。主要酶制剂由杰能科国际公司提供, 具体为颗粒淀粉水解酶: GC004 酶活力: 443 GAU/g GC004 的酶活力用颗粒淀粉水解单位 (GAU) 来表示, GAU 是由水解生淀粉的酶活力和水解可溶性糊精的糖化酶活力在规 定条件下经过计算得到的。酶活力的高低显示了淀粉预期水解速率的快慢。

1.1.2 实验设备

高压液相色谱为 Agilent 1100 系列。天平为 Sartorius 系列。移液枪购自热电 (上海) 仪器有限公司。酸度计为 Mettler Toledo Delta 320 系列。培养箱购自 Blue Electric Company。冷却电热恒温水浴锅由常州澳华仪器有限公司特制。

1.2 方 法

1.2.1 发酵醪组成的测定

HP1100 高效液相色谱仪, HP Chemstations 色谱工作站, 色谱柱 Bio-rad 87H。色谱分离操作条件 (常温下进行) 流动相: 0.01 mol/L H₂SO₄; 流速: 0.6 mL/min; 柱温 60°C; 进样量 20 μL。

1.2.2 乙醇体积分数测定

采用蒸馏-比重法测定^[14]。

2 结果与讨论

2.1 不同温度对生料浓醪发酵的影响

取一定量全磨高粱粉, 以每个发酵三角瓶含 200 g 醪计, 加入一定量的水, 配制成一定浓度的醪液, 调 pH 至 4.2, 醪液分别在 32°C、28°C、25°C、20°C 恒温水浴锅中培养, 添加颗粒淀粉水解酶 GC004, 添加量为 1.0 GAU/g 原料, 然后接入酵母,

接种量为质量分数 0.04%, 不同时间取样用 HPLC 测定发酵醪组成, 发酵结束后采样测定蒸馏醪液在标准条件下的酒精含量。结果如图所示:

图 1 和图 2 分别显示了绝干浓度为 35% 和 38% 生料浓醪酒精发酵过程中葡萄糖浓度在不同恒定发酵温度下的变化。由图可知, 在发酵初期 24 h 料液中的葡萄糖浓度全部低于 0.2 g/dL, 表明在该阶段, 酵母的代谢非常旺盛, 生料酶水解出的葡萄糖几乎全部被酵母利用, 然而随着发酵时间的延长, 发酵醪液中的葡萄糖逐渐积累, 发酵温度越高, 未被利用的葡萄糖积累越多; 同时配料浓度越高, 相同条件下未被利用的葡萄糖积累越早, 数值也越高。这说明在超高浓度发酵条件下, 尽管生料酶依然能有效地水解颗粒淀粉缓释出葡萄糖, 然而酵母由于衰老、高温、酒精中毒, 已经不能够有效地将葡萄糖转换成酒精。研究表明酒精浓度 ≤ 3.8% 时, 其抑制作用可忽略不计; 酒精浓度 ≥ 5% 时, 酵母出芽受到影响, 随着酒精浓度的继续增加, 它对酵母的生长和发酵能力的抑制作用急剧增加; 酒精浓度 ≥ 15%

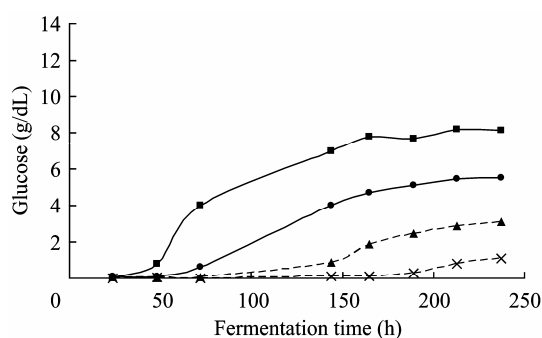


图 1 35% 干物浓度不同发酵温度对应醪液葡萄糖浓度
Fig. 1 Temperature effect on glucose concentration with 35% DS fermentation. ■: 32°C; ●: 28°C; ▲: 25°C; ×: 20°C.

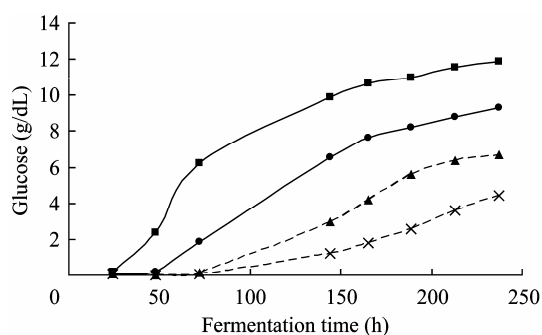


图 2 38% 干物浓度不同发酵温度对应醪液葡萄糖浓度
Fig. 2 Temperature effect on glucose concentration with 38% DS fermentation. ■: 32°C; ●: 28°C; ▲: 25°C; ×: 20°C.

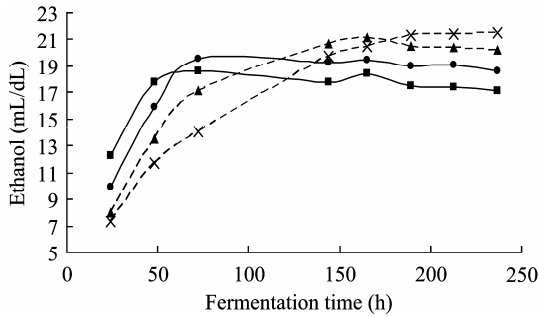


图3 35%干物浓度不同发酵温度对应醪液酒精浓度
Fig. 3 Temperature effect on ethanol concentration with 35% DS fermentation. ■: 32°C; ●: 28°C; ▲: 25°C; ×: 20°C.

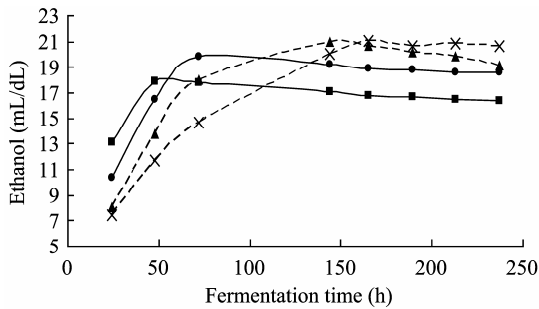


图4 38%干物浓度不同发酵温度对应醪液酒精浓度
Fig. 4 Temperature effect on ethanol concentration with 38% DS fermentation. ■: 32°C; ●: 28°C; ▲: 25°C; ×: 20°C.

时，一般的酵母不再会生长和发酵^[15]。从图1和图2中容易看出，醪液中未被利用的葡萄糖浓度与发酵温度呈正相关，发酵温度越高，残余的葡萄糖浓

度愈高。

图3和图4则分别显示了浓度为35%和38%生料浓醪酒精发酵过程中酒精浓度在不同恒定发酵温度下的变化。由图可知，在35%和38%料液发酵前48 h，发酵温度越高，料液中的酒精浓度也越高，表明在发酵前期，较高的反应温度对酶水解和酵母生产酒精都较为有利；然而随着发酵时间的延长，低温发酵逐步显示出其优势，表现为料液中酒精浓度随着发酵时间延长逐步增长，在发酵终点237 h时，在相同条件下，20°C发酵的酒精产量明显高于其他发酵温度的酒精产量；而高温发酵则明显对后期发酵不利，表现为随着发酵时间延长料液中酒精浓度没有增长或增长缓慢，并且随着发酵温度的升高或/和料液浓度的增加，这一现象出现得越早。

综上所述，对于超高浓度生料酒精发酵，在恒定培养温度条件下，发酵温度越高前期酒精的生产速率越高，但酵母衰老也越早，酒精的产物抑制也越严重；低温发酵虽然非常有利于发酵后期酒精的生产，但前期产酒较慢，发酵周期偏长。

2.2 不同梯度降温过程对生料浓醪发酵的影响

取一定量全磨高粱粉，以每个发酵三角瓶含200 g醪计，加入一定量的水，配制成35%浓度的

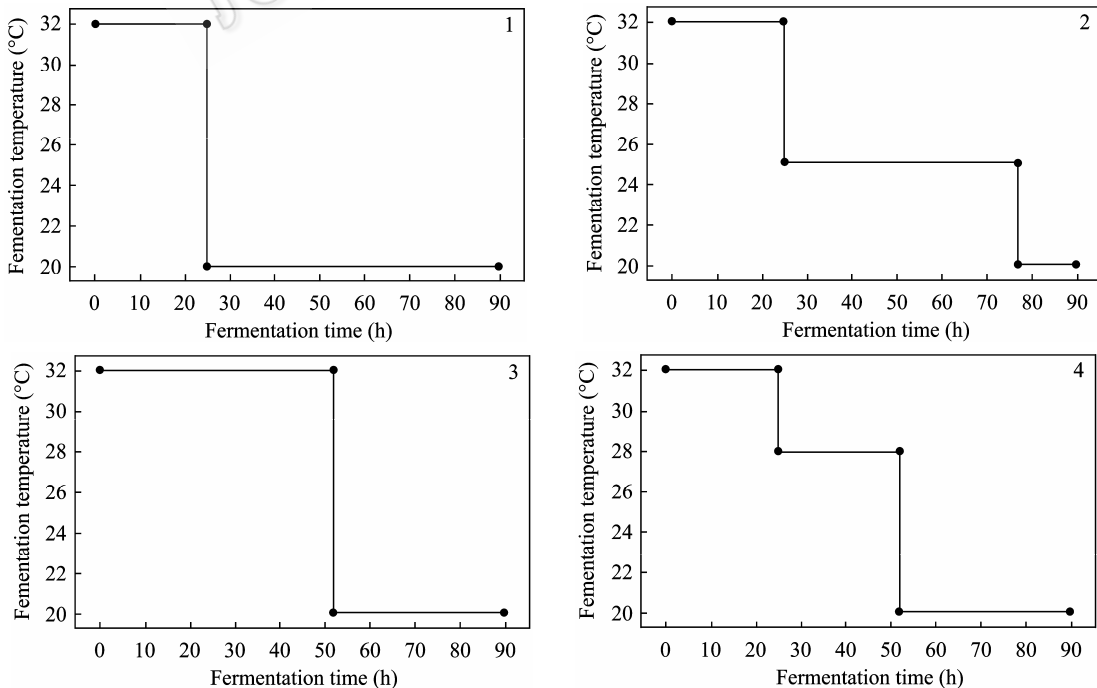


图5 不同方式温度梯度控制
Fig. 5 Different temperature staging ways.

醪液, 调节 pH 至 4.2, 添加颗粒淀粉水解酶 GC004, 添加量为 1.0 GAU/g 原料, 接入酵母, 接种量为质量分数 0.04%, 发酵过程中对醪液分别在 32℃、28℃、25℃、20℃恒温水浴锅中进行温度梯度控制 (图 5), 不同时间取样用 HPLC 测定发酵醪组成, 发酵结束采样进行蒸馏测定醪液在标准条件下的酒精含量 (图 6)。

图 5 显示了不同温度梯度控制的方式, 其中方式一和方式三为一次降温, 方式二和方式四为两次降温。

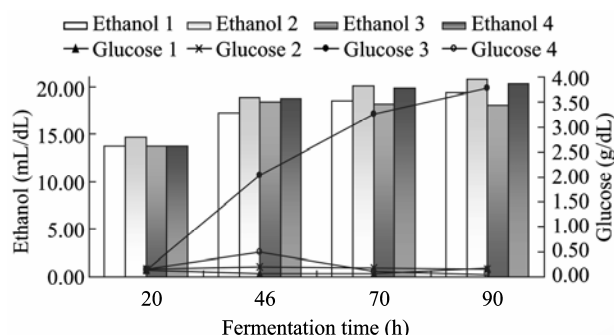


图 6 35%干物浓度不同温度梯度控制对发酵液中葡萄糖和酒度的影响

Fig. 6 Different temperature staging ways effect on glucose and ethanol concentration with 35% DS fermentation.

图 6 显示了浓度为 35% 生料浓醪酒精发酵采取不同方式温度梯度控制过程中葡萄糖浓度和酒精的变化。由图可知, 采取方式一 (0~25 h 32℃, 25~90 h 20℃) 的培养方式, 由于在 25 h 及早降温, 整个过程中残余葡萄糖浓度维持在较低水平, 但是由于发酵温度偏低, 酶反应速度和酵母代谢速度都较慢, 发酵 90 h 的酒度仅为 19.32% (V/V); 若采取方式三 (0~52 h 32℃, 52~90 h 20℃) 的培养方式, 在发酵进行到 52 h 时降温, 由于高温持续的时间较长, 酵母已经表现出中毒症状, 即残余葡萄糖持续升高, 酒度不再增长, 90 h 的酒度仅为 18.08% (V/V), 这说明 52 h 降温太迟了; 方式二 (0~25 h 32℃, 25~77 h 25℃, 77~90 h 20℃) 和方式四 (0~25 h 32℃, 25~52 h 28℃, 52~90 h 20℃) 都采取了两次降温的培养过程, 整个过程中残余葡萄糖浓度维持在较低水平, 同时发酵取得了较好的效果, 90 h 酒度分别达到 20.73% (V/V) 和 20.28% (V/V); 其中又以方

式二 (0~25 h 32℃, 25~77 h 25℃, 77~90 h 20℃) 优于方式四 (0~25 h 32℃, 25~52 h 28℃, 52~90 h 20℃), 由此可见, 对于超高浓度酒精生料发酵, 及时合理调整发酵温度至关重要。

2.3 发酵强度和染菌

发酵强度是考核发酵企业生产能力的一个重要指标。在相同的研究条件下比较了超高浓度生料酒精发酵和常规浓度生料酒精发酵的平均发酵强度, 干物浓度为 35% 实验组的平均发酵强度为 2.26 g/(L·h), 常规浓度 25% 的平均发酵强度仅为 1.58 g/(L·h), 生料超高浓度的平均发酵强度明显高于常规浓度, 从而达到了采用普通市售酵母进行高密度、高强度发酵的目的, 这无疑可以使得企业生产效率最大化, 从而提高企业的生产能力, 降低了生产成本。

染菌是酒精工业发酵控制的一个难题, 对生料过程也不例外。笔者认为采取生料无蒸煮工艺, 由于葡萄糖逐步缓慢释放, 如果发酵初期采用合适的酵母接种量, 使酵母在料液中占绝对优势, 那么缓慢释放出来的葡萄糖将被酵母充分利用, 这样几乎不给杂菌的生长留机会, 从而达到克服染菌的目的; 同时可以采取与传统工艺相似的方法, 适当添加抑菌剂 (如抗生素等) 控制杂菌的生长; 另外低 pH 值发酵也是控制染菌的有效手段, 在欧洲酒精发酵过程中是不允许添加任何抗生素的。自 2005 年起, 以麦类为原料 (包括小麦、黑麦、黑小麦、大麦等) 的生料酒精生产在欧洲得到大规模的推广和应用, 并取得了比传统工艺更高的原料出酒率, 这充分说明采用生料过程生产酒精, 染菌是可防、可控的。

3 总结与展望

发酵强度与细胞的生存环境有关。温度是超高浓度酒精发酵过程中影响菌体生长的重要因素。利用温度控制策略是实现高强度酒精发酵的重要途径。本研究通过温度梯度控制策略, 采取生料无蒸煮工艺使用普通市售酒用干酵母, 在 90 h 内发酵醪液酒精浓度可达 20% (V/V) 以上。笔者认为该工艺可行的原因之一是由于采取生料无蒸煮工艺, 葡萄糖逐步缓慢释放, 淀粉未溶出, 整个体系的渗透压

非常低；同时采取适当的温度梯度控制策略，使酵母细胞的活力得以长久维持，增强了酵母生产乙醇的能力和对酒精的耐受性。这为进一步深入研究超高浓度酒精发酵提供了新的方向。

REFERENCES

- [1] Duan G, Xu HX, Sun CP, *et al.* Progress on ethanol production technology—Breakthrough of new enzyme technology for producing ethanol from raw starch. *Food Ferm Ind*, 2006, **32**(7): 65–70.
段钢, 许宏贤, 孙长平, 等. 乙醇生产的技术进步—新型酶技术给乙醇生料发酵生产带来的突破. *食品与发酵工业*, 2006, **32**(7): 65–70.
- [2] Xu HX, Duan G. Dry solid staging fermentation. *Chin J Biotech*, 2009, **25**(2): 200–206.
许宏贤, 段钢. 固态间歇补料乙醇生料发酵新工艺. *生物工程学报*, 2009, **25**(2): 200–206.
- [3] Duan G, Xu HX. No-cook process for rice fermentation alcohol. *J Food Biotechnol*, 2008, **27**(1): 95–102.
段钢, 许宏贤. 大米生料发酵酒精生产的研究. *食品与生物技术学报*, 2008, **27**(1): 95–102.
- [4] Jiang XR, Duan G, Zhou HW. Q&A Handbook for Industrial Enzyme Application. Beijing: China Light Industry Press, 2008.
姜锡瑞, 段钢, 周红伟. 酶制剂应用技术问答. 北京: 中国轻工业出版社, 2008.
- [5] Huang P, Cao JJ, Zhang XK, *et al.* Application of high-concentration mash fermentation techniques to advance scientific development of alcohol industry. *Liquo Making*, 2005, **131**(5): 108–113.
黄平, 曹健君, 张肖克, 等. 应用浓醪发酵技术推动酒精行业科学发展. *酿酒科技*, 2005, **131**(5): 108–113.
- [6] Dinh TN, Nagahisa K, Yoshikawa K, *et al.* Analysis of adaptation to high ethanol concentration in *Saccharomyces cerevisiae* using DNA microarray. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2009, **32**(5): 681–688.
- [7] Abe H, Fujita Y, Takaoka Y, *et al.* Ethanol-tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated under selective conditions by over-expression of a proofreading-deficient DNA polymerase delta. *J Biosci Bioeng*, 2009, **108**(3): 199–204.
- [8] Xu HX, Duan G. New method to produce ethanol from wheat. *Food Ferm Ind*, 2006, **32**(12): 98–103.
许宏贤, 段钢. 以小麦为原料的乙醇生产方法. *食品与发酵工业*, 2006, **32**(12): 98–103.
- [9] Duan G, Xu HX, Ruan ZH. Direct conversion of fresh cassava root to ethanol. *J Food Biotechnol*, 2009, **28**(3): 413–417.
段钢, 许宏贤, 阮振华. 新鲜木薯直接转化生产乙醇. *食品与生物技术学报*, 2009, **28**(3): 413–417.
- [10] Aldiguer AS, Alfenore S, Cameleyre X, *et al.* Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamic behaviour in ethanol bio-fuel production. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2004, **26**: 217–222.
- [11] Jacques KA, Lyons TP, Kelsall DR. The Alcohol Textbook. 4th ed. Nottingham: Nottingham University Press, 2003.
- [12] Wang S, Thomas KC, Sosulski K, *et al.* Grain pearling and very high gravity (VHG) fermentation technologies for fuel alcohol production from rye and triticale. *Process Biochem*, 1998, **34**: 421–428.
- [13] Wang S, Ingledeew WM, Thomas KC, *et al.* Optimization of fermentation temperature and mash specific gravity for fuel alcohol production. *Cereal Chem*, 1999, **76**: 82–86.
- [14] Cai DY. Handbook of Brewing Industry Analysis. Beijing: China Light Industry Press, 1998.
蔡定域. 酿酒工业分析手册. 北京: 轻工业出版社, 1988.
- [15] Wei JL, Lu Y, Liu S. High gravity fermentation using high activity dry yeast. *Chin Condiment*, 2000, **253**(3): 15–18.
魏君兰, 鲁勇, 刘松. 应用酿酒高活性干酵母进行浓醪酒精发酵的试验. *中国调味品*, 2000, **253**(3): 15–18.