文章编号: 1673-1689(2010)03-0432-05

酒精沼气双发酵偶联工艺中沼液有机酸对酒精发酵的影响

翟芳芳[1,2], 张 静[1,2], 张建华[1,2], 孙付保[1,2], 张宏建[1,2], 毛忠贵*[1,2]
(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘 要: 木薯酒精蒸馏废液经厌氧沼气发酵后的沼液全部回用作为酒精发酵配料的工艺用水, 形成酒精沼气双发酵偶联工艺。研究发现, 乙酸和丙酸是抑制酒精发酵的主要的小分子有机酸。乙酸对酒精发酵产生抑制的有效质量浓度为 0.4 g/dL, 丙酸对酒精发酵产生抑制的有效质量浓度为 0.1 g/dL, 乳酸质量浓度达到 2.5 g/dL 时才会对酒精发酵产生影响。

关键词: 木薯; 酒精发酵; 沼气发酵; 有机酸; 抑制
中图分类号: TQ 920.1 文献标识码: A

Effect of Organic Acid on the Alcohol Fermentation Process Coupling with Biogas Fermentation

ZHAI Fang-fang[1,2], ZHANG Jing[1,2], ZHANG Jian-hua[1,2],
SUN Fu-bao[1,2], ZHANG Hong-jian[1,2], MAO Zhong-gui*[1,2]
(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Recycling the stilliage condensates produced into the fermentation phase, coupled with the alcohol fermentation and the anaerobic biogas fermentation. It has been demonstrated that acetic acid and propionic acid exhibited main inhibition effect on the alcohol fermentation. The concentration of acetic acid inhibit alcohol fermentation was 0.4 g/dL and that of propionic acid was 0.1 g/dL. When the lactic acid concentration increase to 2.5 g/dL, a inhibition effect on alcohol process was detected.

Key words: cassava; ethanol fermentation; organic acid; inhibition

---

酒精工业在国民经济中起着重要的作用, 酒精不仅广泛应用于食品、化工、医药、染料、国防等行业, 也是一种可再生能源。近年来, 世界上已有 2/3 的酒精被用作燃料[1]。燃料酒精是目前国际上受关注的可再生能源, 在汽油或柴油中添加一定比例的燃料酒精, 可减少 30%以上汽车尾气排放引起的

收稿日期: 2009-05-11
基金项目: 国家 863 计划项目(2008AA10Z338)。
* 通信作者: 毛忠贵(1954–), 男, 江苏溧水人, 教授, 博士生导师, 主要从事清洁生产、功能性物质开发及纤维资源高值转化方面的研究。Email: maozg@vip.163.com

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

空气污染。2006 年, 中国酒精产量的 1/3 是以木薯原料生产的。木薯是非粮原料, 木薯生产酒精不与人畜争粮, 但每生产 1 t 木薯酒精约产生 7~ 15 t 废水。该类废水含有大量的有机物及悬浮物, 呈酸性, 属酸性高浓度有机废水[2]。废水污染是木薯酒精工业可持续发展中必须解决的问题。

目前酒精废水处理的一般程式是高浓度有机废水经过厌氧沼气发酵、沼液好氧曝气过程, 以求最终达标排放。国家颁布的味精、酒精、医药原料药、生物制药、苎麻脱胶、皮革、化纤浆粕工业等污水排放一级标准的最高允许排放质量浓度为 COD 100 mg/ L, 而木薯酒精蒸馏废液的 COD 在(8~ 10) $\times 10^4$ mg/ L。因此, 完全达标排放是非常困难的。

为根治木薯燃料酒精废水污染的难题, 作者所在研究室在多年“大宗发酵清洁生产”研究的基础上, 提出了以“零能耗, 零污染”为目标的酒精和沼气双发酵偶联的环形工艺[3]。其关键技术之一是酒精发酵与沼气发酵的偶联匹配问题, 如沼液中小分子有机酸对酵母生长及其酒精发酵的影响等问题[4-5]。作者对厌氧沼液中主要小分子有机酸对酒精发酵过程的影响进行了初步研究。

1　材料与方法

1.1　菌种

耐高温型酿酒高活性干酵母: 湖北安琪酵母股份有限公司制造; 种子培养基: 葡萄糖 2 g/ dL, 酵母膏 0. 85 g/ dL, NH_4Cl 0. 13 g/ dL, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0. 01 g/ dL, $CaCl_2$ 0. 006 g/ dL, pH 值自然, 0. 08 MPa 灭菌 15 min; 28 ℃、100 r/ min 培养 12 h。

1.2　主要原料与试剂

木薯粉: 河南天冠酒精厂提供; 液化酶(100 000 U/ mL): 无锡杰能科生物工程有限公司提供; 糖化酶(1 300 000 U/ mL): 无锡杰能科生物工程有限公司提供。

1.3　分析测试方法

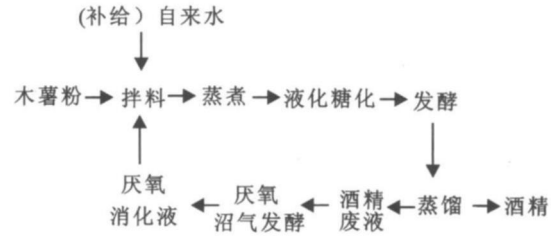
1.3.1　失重　称量法。

1.3.2　总糖、还原糖的测定　费林试剂热滴定定糖法[6]。

1.3.3　酒精度测定　发酵液 100 mL, 加水稀释一倍后蒸馏, 用量筒量取馏出液 100 mL, 测定其酒度和温度, 查表更正成 20 ℃的酒精度[7]。

1.4　酒精沼气双发酵偶联工艺流程

在偶联发酵循环体系之外, 采用木薯原料模拟工业实际生产, 原料粉碎后过 40 目筛, 料水比 1∶ 3, 按照酒精生产的原料处理方式将木薯粉进行液化和糖化, 氮源为尿素, 添加量 0. 3 g/ dL, 酵母种子经活化后接种体积分数 10%, 三角瓶中 30 ℃静止发酵 60 h。



2　结果与分析

2.1　乙酸对酵母生长及酒精发酵的影响

乙酸是沼气发酵中甲烷的主要前体物质, 因此在沼液(厌氧消化液) 中有少量存在。如果酒精发酵过程污染乙酸菌, 也会有乙酸生成。乙酸会对酵母的生长产生不利的影响。K. C. Tomas 报道, 在不添加酵母膏等保护剂的基本培养基中, 乙酸对酵母的最小抑制质量浓度为 0. 6 g/ dL[8]。

按照酒精发酵的工艺方法进行液化糖化, 发酵前向发酵醪液中添加不同量的乙酸, 质量浓度梯度分别为 0、0. 1、0. 2、0. 3、0. 4、0. 5 g/ dL。

如图 1 所示, 随着乙酸质量浓度的增大, 酒精发酵受到抑制, 酵母开始发酵的时间推后, 即酵母接种后的延迟期延长。当发酵液中的初始乙酸质量浓度达到 0. 4 g/ dL 时, 表现出对酵母明显的抑制作用, 0. 1 g/ dL 的乙酸对酵母发酵没有明显的影响。乙酸质量浓度在 0. 2~ 0. 4 g/ dL 之间, 随着质量浓度的增大, 抑制作用更加明显。乙酸质量浓度达到 0. 5 g/ dL 时, 酒精发酵受到强烈的抑制, 接种后酵母生长的延迟期长达 24 h。

发酵液中乙酸达到一定的质量浓度时会抑制酵母的生长, 反映在酒精发酵的前期, 发酵液中的酵母数量不增加, 但酵母还保持自身活性。发酵液中的总糖不消耗, 还原糖在糖化酶的作用下质量浓度不断升高。当酵母增殖达到一定数目后, 酵母发酵耗糖及 CO_2 产生速率与不添加乙酸时主酵期的速率近乎相等。这时在添加乙酸的发酵液中出现一段快速耗糖期。经过这段时期, 添加乙酸的发酵液中的残糖质量浓度只是略高于不添加乙酸的发酵液中的残糖质量浓度。最终发酵液中的酒精体积分数表明, 一定质量浓度的乙酸不会对酵母的酒精发酵能力产生抑制, 见图 2。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

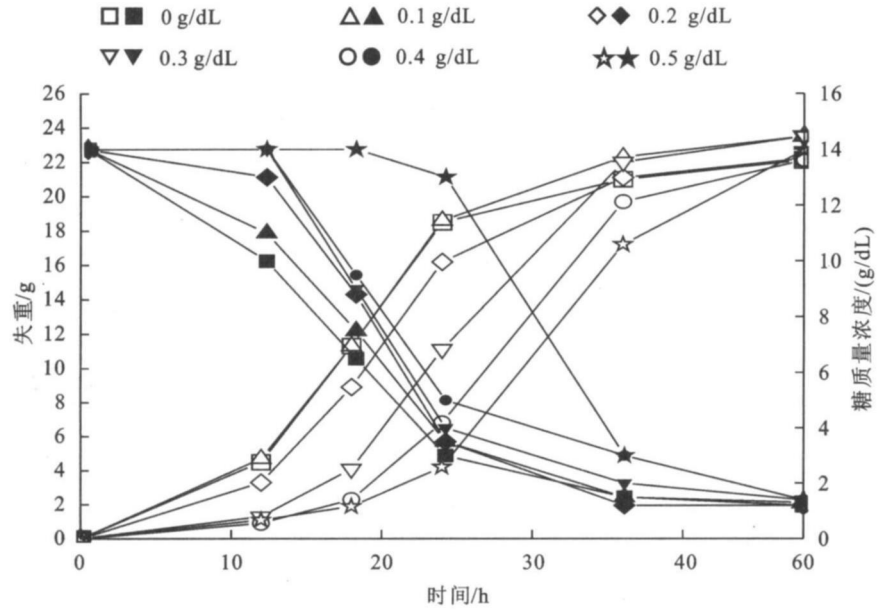


图 1 不同质量浓度乙酸对酒精发酵的失重(空) 及糖耗(黑) 的影响

Fig. 1 Effect of acetic acid on weight loss(open) and sugar(filled) consumption

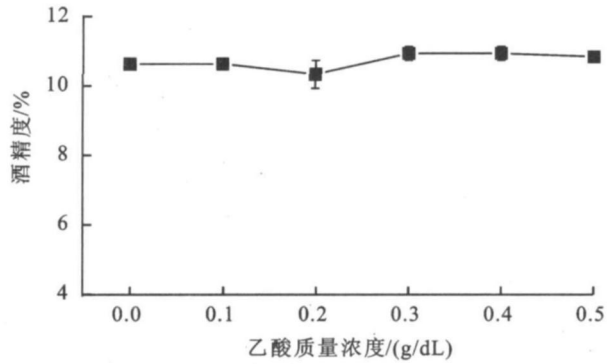


图 2 不同质量浓度的乙酸对发酵液终酒精度的影响

Fig. 2 Effect of acetic acid on the alcohol concentration

2 2 丙酸对酵母生长及酒精发酵的影响

经过一级厌氧沼气发酵, 虽然会去除 80% 的 COD, 但一级出水的 COD 还是在 10 000 mg/ L 以上, 其中含有大量未转化成沼气的有机酸(如乙酸、丙酸、丁酸), 会对双发酵偶联工艺中的酒精发酵造成影响。在这些有机酸中, 丙酸对酒精发酵产生的抑制是比较强烈的。同时丙酸也是沼气发酵中一个重要的中间产物, 与其他中间产物相比, 丙酸向甲烷的的转化速率是最慢的, 它是甲烷发酵的限制性物质, 也是整个双发酵偶联工艺的限制性物质。

作者对丙酸抑制酒精发酵的质量浓度进行了研究。按照酒精发酵的工艺方法进行液化糖化, 在发酵前向发酵液中添加不同量的丙酸。质量浓度分别为 0、0. 05、0. 1、0. 15、0. 2、0. 25 g/ dL, 发酵过程中的失重及糖耗见图 3。

丙酸对酒精发酵产生强烈的抑制作用, 0. 1 g/ dL的丙酸对酒精发酵产生明显的抑制作用。同时, 丙酸表现出来的对酵母生长和酒精发酵的抑制形式与乙酸一致, 即随着丙酸质量浓度的升高, 抑制作用更加明显。当丙酸质量浓度达到 0. 25 g/ dL 时, 可将酵母起酵时间延长至 16 h。丙酸质量浓度大于 0. 1 g/ dL 时, 发酵终点明显滞后。

2 3 乳酸对酵母生长及酒精发酵的影响

乳酸是由于酒精发酵时污染的乳酸菌产生的乳酸脱氢酶使丙酮酸成为受氢体而形成的。作者按照酒精发酵的工艺流程进行液化糖化, 在发酵前向发酵液中添加不同量的乳酸, 乳酸的添加量分别为 0、0. 5、1. 0、1. 5、2. 0、2. 5 g/ dL, 见图 4。

乳酸对酵母生长及酒精发酵的影响比乙酸要弱, 当乳酸质量浓度达到 2 5 g/ dL 时才表现出了与对照的差异。并且当乳酸质量浓度达到 2 5 g/ dL 时, 并没有延迟酵母的起酵时间。从失重和糖耗图中还可以看出, 乳酸对酒精发酵的影响是降低了酵母生长和酒精发酵的速率, 使耗糖速率减慢, 对酵母的延迟期并无影响。K. C. Tomas et al 曾报道, 在基本培养基中, 乳酸对酵母的最低抑制质量浓度为2. 5 g/ dL[9-11]。乳酸对酒精发酵的抑制情况与乙酸和丙酸不同, 对其抑制机理的探究还在进一步的研究中。在酒精沼气双发酵偶联工艺中沼液中乳酸的实际质量浓度要远远低于 2 5 g/ dL, 因此乳酸在偶联工艺中并不是主要的抑制物质。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

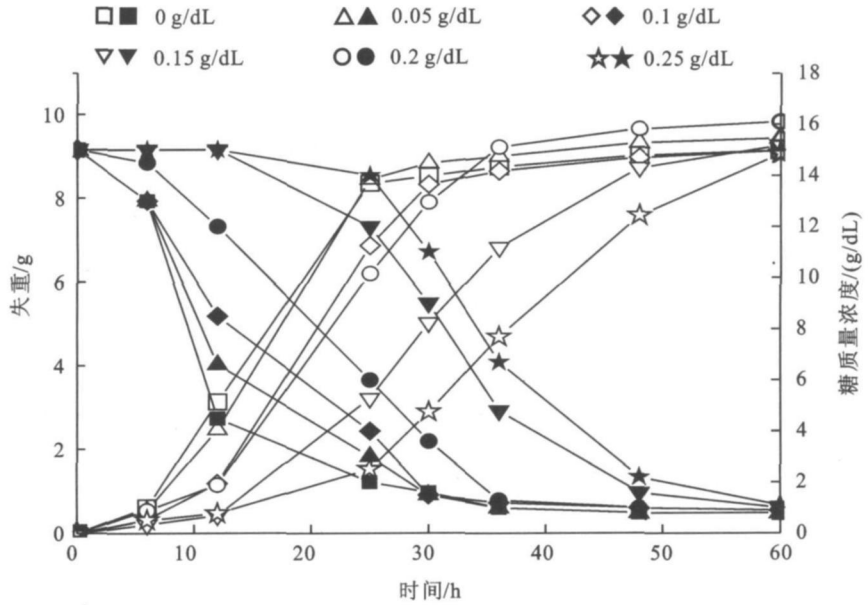


图 3　不同质量浓度丙酸对酒精发酵的失重(空) 及糖耗(黑) 的影响

Fig. 3　Effect of propionic acid on weight loss(open) and sugar(filled) consumption

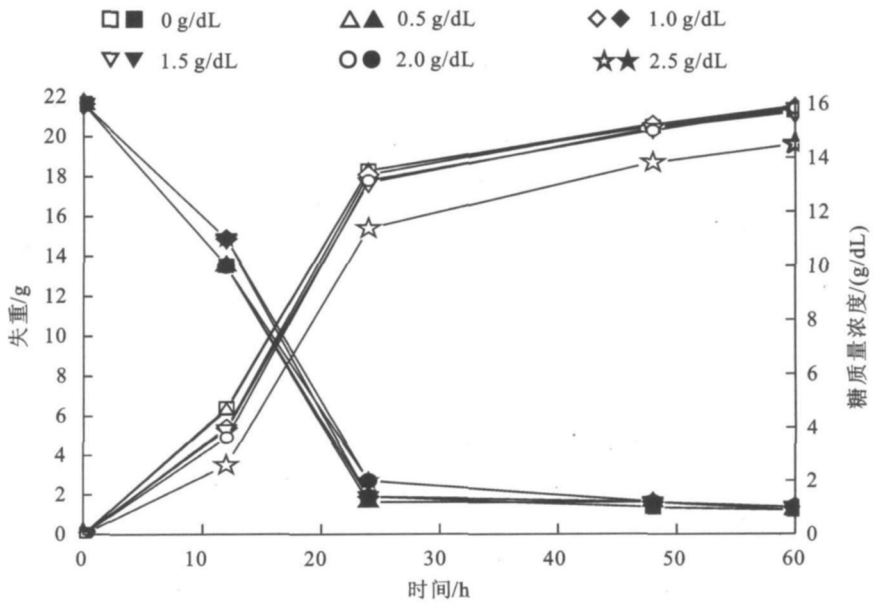


图 4　不同质量浓度乳酸对酒精发酵的失重(空) 及糖耗(黑) 的影响

Fig. 4　Effect of lactic acid on weight loss(open) and sugar(filled) consumption

3　讨　论

众所周知, 酒精发酵发生污染产生有机酸将降低原料转化率, 但有机酸对酵母的生长及其对酒精发酵的影响报道很少。作者通过以木薯为原料模拟工业生产, 着眼于废水的资源化, 对酒精沼气双发酵偶联新工艺中的关键问题进行了研究。研究发现, 小分子有机酸是抑制酒精发酵进行的主要物质之一。在双发酵偶联体系中, 丙酸是影响最大的有机酸, 它对酵母的酒精发酵产生较大抑制, 质量浓度较高时也会抑制沼气发酵中甲烷菌的活性。

实验证明, 在实际的木薯原料发酵液中, 乙酸对酒精发酵产生抑制的有效质量浓度为 0. 4 g/ dL, 丙酸对酒精发酵产生抑制的有效质量浓度为 0. 1 g/ dL, 乳酸影响酒精发酵的有效质量浓度为 2. 5 g/ dL。小分子有机酸是沼气发酵过程的中间产物, 也是产生沼气的重要底物。沼气发酵控制不当易偏向丙酸型发酵, 引起丙酸的积累。因此在双发酵偶

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

联工艺中, 控制沼气发酵部分稳定高效的运行是整 个工艺实现的重要前提。

参考文献(References) :

[1] 应晓屹. 酿酒酵母高转化率酒精发酵工艺条件优化研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2006.

[2] 浦跃武, 赵晓生, 刘族安. 木薯酒精废水厌氧处理研究[J] . 现代食品科技, 2009, 25: 50- 54.
PU Yue-wu, ZHAO Xiao-sheng, LIU Zu-an. Study on anaerobic treatment of cassava alcohol wastewater[J]. **Modern Food Science and Technology,** 2009, 25: 50- 54. (in Chinese)

[3] 毛忠贵, 张建华. 燃料乙醇制造的"零能耗零污染"趋势. 生物工程学报[J] . 2008, 24(6): 946- 949.
MAO Zhong-gui, ZHANG Jian-hua. Trend of "zero energy consumption and wastewater" in fuel ethanol production[J]. **Journal of Biotechnology,** 2008, 24(6): 946- 949. (in Chinese)

[4] Estelle Morin-Couallier, Claire Fargues, Richard Lewandowski. Reducing water consumption in beet distilleries by recycling the condensates to the fermentation phase[J] . **Journal of Cleaner Production,** 2008, 16: 655- 663.

[5] 王进, 刘慧霞. 糖蜜酒精废液回用中重金属对酒精发酵的影响[J] . 酿酒, 2004, 3: 22- 25.
WANG Jin, LIU Hui-xia. Study on effect of heavy metal ions to the recycling of waste liquid from alcoholic fermentation of sugarcane molasses[J] . **Liquor Making,** 2004, 3: 22- 25.

[6] 张龙翔, 张庭芳, 李玲媛. 生物化学实验指导[M] . 北京: 人民教育出版社, 1983.

[7] 王福荣. 酿酒分析与检测[M] . 北京: 化学工业出版社, 2005: 267.

[8] Narendranath N V, Thomas K C, Ingledew W M. Effect of acetic and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium[J] . **Journal of Inductrial Microbiology & Biotechnolgy,** 2001, 26: 171- 177.

[9] Thomas K C, Hynes S H, Ingledew W M. Effect of *Lactobacilli* on yeast growth, viability and batch and semi-continuous alcoholic fermentation of corn mash[J] . **Journal of Applied Microbiology,** 2001, 90: 819- 828.

[10] Essia Ngang J J, Letourneau F, Villa P. Alcoholic fermentation of beet molasses: effects of lactic acid on yeast fermentation parameters[J] . **Applied Microbiology Biotechnology,** 1989, 31: 125- 128.

[11] Nancy J Moon. Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and peopionate and their synergistic mixtures[J] . **Journal of Applied Microbiology,** 1983, 55: 453- 460.

(责任编辑: 李春丽)

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net