大种量流加式高体积分数乙醇发酵工艺的研究

吴 杰[1,2]，王 团[1,2]，王 柯[1,2]，张建华[*1,2]

（1. 江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122）

摘要：间歇式高体积分数乙醇发酵工艺存在残总糖高、糖醇转化率低的问题。通过对残总糖组成分析发现，糊精和还原糖质量浓度随拌料质量浓度的变大而逐步上升。结合文献分析可知，糊精和还原糖量较高的原因主要与糖化酶活力和酵母对糖的利用能力有关。为了解决这一问题，采用大种量流加式高体积分数乙醇发酵工艺，并对接种量、初始流加时间、流加时长和流加方式进行了优化。结果表明，当接种量（体积分数）为 30%，培养 8 h 后开始流加，流加时长为 20 h，且采用匀速的方式流加时，乙醇发酵结果最优。与间歇式高体积分数乙醇发酵工艺比较，残糖降低了 6.5 g/L，糖醇转化率提高了 3.2%。

关键词：高体积分数乙醇发酵；残糖；糖醇转化率；酿酒酵母

中图分类号：TS 262.2　**文章编号：**1673-1689(2019)06-0109-08　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.06.015

Study on The Process of Fed-Batch Very High Gravity Ethanol Fermentation with Massive Inocula

WU Jie[1,2]，*WANG Tuan*[1,2]，*WANG Ke*[1,2]，*ZHANG Jianhua*[*1,2]

（1. School of Biotechnology，Jiangnan University，Wuxi 214122，China；2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology，Ministry of Education，Jiangnan University，Wuxi 214122，China）

Abstract：Very high gravity （VHG） batch ethanol fermentation has the problems of high residual sugar concentration and low sugar-ethanol conversion rate. It was found that the concentrations of dextrin and reducing sugar increased gradually with the increase of the concentration of the mixture. The reasons for the high concentration of dextrin and reducing sugar were mainly related to the activity of saccharification enzyme and the sugar utilization ability of yeast. To resolve these problems，process of fed-batch very high gravity ethanol fermentation with massive inocula was proposed in the study，and the inoculum concentration，initial feeding time，feeding duration and feeding mode were optimized. Results showed that the optimum process is 30% inoculation concentration，the initial feeding time after inoculation 8 h，the feeding duration 20 h and constant feeding speed. Compared with the batch fermentation，the residual sugar decreased by 6.5 g/L，meanwhile，the sugar-ethanol conversion rate of increased by 3.2%.

Keywords：very high gravity，residual sugar，sugar-ethanol conversion rate，*S. cerevisiae*

收稿日期：2016-11-15

基金项目：江苏省科技支撑计划项目（BE2012623）。

***通信作者：**张建华（1969—）男，博士，副教授，硕士研究生导师，主要从事发酵工程方面工作。E-mail：jhzh82@163.com

引用本文：吴杰，王团，王柯，等. 大种量流加式高体积分数乙醇发酵工艺的研究[J]. 食品与生物技术学报，2019，38(06)：109-116.

我国从2002年起开始大力发展燃料乙醇产业,生产技术不断提高,产量也已跃居为全球第三位[1]。但是,常浓度乙醇生产工艺存在发酵浓度低,能耗高和设备利用率低,污染严重等问题,制约了行业的发展[2]。而高浓度乙醇发酵(Very high gravity,VHG)工艺的提出有望解决这些问题[3]。该工艺可有效提高设备利用率和生产效率,降低生产能耗和废水处理负荷[4]。

在实际生产应用中,乙醇发酵主要采用间歇式工艺,发酵的酒度一般在10%~11%(体积分数)。简单提高发酵酒度的后果是残糖上升,淀粉利用率下降。由于乙醇生产中,原料成本占直接生产成本的80%以上,淀粉利用率降低直接导致乙醇生产经济效益降低,这也是国内乙醇高浓度发酵一直没有能够很好推广的主要原因。造成残糖上升,淀粉利用率下降的主要原因是,发酵前期的高浓度底物(葡萄糖)和发酵后期的高浓度产物(乙醇)会对酿酒酵母产生抑制作用,降低酿酒酵母吸收营养的能力。另外,高浓度乙醇还会改变酵母的细胞膜结构及其通透性,导致发酵延迟或者提前终止,进而造成残糖高、淀粉利用率低[5-7]。因此,学者们主要从酵母改造和工艺优化2个方面来解决这一问题。申乃坤等[8]通过单因素实验确定主要因素为淀粉酶用量、底物浓度、初始发酵pH,并采用响应面优化研究主要因素的相互影响,并通过对发酵温度进行梯度降温,最终使发酵后酒度在16.24%(体积分数),残总糖控制在18.8 g/L。唐艳艳等[9]在研究高浓发酵过程发现,采用先糖化再发酵工艺会抑制酵母发酵,提出采用边糖化边发酵工艺有效解决了高浓发酵糖浓过高问题,发酵效率明显提高。LIU等[10]通过向发酵液中添加水溶性聚乙二醇,发现该物质可以对酵母形成外保护,达到提高细胞活力和乙醇产量的效果。WANG等[11]通过基因工程改造的手段获得胞内积聚高浓海藻糖酵母菌株,发现该菌株在高浓发酵工程中的细胞活力和发酵能力明显高于出发菌株,并揭示了高浓乙醇发酵过程中海藻糖对酵母的保护作用。WANG等[12]通过计算获得了高浓酒精发酵氮源及其他微量物质的用量。ZHANG等[13]通过响应面优化和多元回归分析降低了以红薯为原料高浓酒精发酵醪的粘度。潘丰等[14]通过设计发酵过程乙醇浓度在线监控设备,发现乙醇浓度反馈流加方式对于提高发酵效果有明显帮助。

我们提出了大种量流加式来解决传统间歇式高浓度乙醇发酵工艺存在的问题。该工艺是在间歇式发酵前期将部分糖液接种培养一定时间,以提高发酵液中酵母数量,再流加剩余的糖液,这样可缩短发酵体系中酵母生长的延滞期,加快产物合成速度[15]。在流加剩余糖液时,可通过控制流加速度,避免发酵体系出现糖浓度过高的问题。同时,新鲜的糖液扩大了发酵体系,降低了发酵液中的乙醇浓度[16]。本文作者对大种量流加式高体积分数乙醇发酵工艺中的接种量(体积分数)、初始接种时间、流加时长和流加方式进行了优化,获得了大种量流加式高体积分数乙醇发酵的最优工艺,并对其机理作初步探究。

1 材料与方法

1.1 材料

酿酒酵母(*S. cerevisiae*):湖北宜昌安琪酵母有限公司产品;木薯:江苏金茂源生物化工有限责任公司产品;耐高温α-淀粉酶(136 000 U/mL)和糖化酶(10 000 U/mL):无锡杰能科生物工程有限公司产品;其他试剂均为分析纯或优级纯市售商品。

1.2 方法

1.2.1 培养基 种子培养基(g/L):葡萄糖20,酵母粉8.5,$MgSO_4·7H_2O$ 0.1,NH_4Cl 1.3,$CaCl_2$ 0.06。培养条件:摇床培养,200 r/min,30 ℃,17.5 h。

木薯培养基:不同料水比的液化液,添加尿素和糖化酶。

基础培养基(g/L):葡萄糖50,$MgSO_4·7H_2O$ 0.75,KH_2PO_4 1.7,$CaCl_2$ 0.06。

高糖培养基(g/L):葡萄糖质量浓度分别为180、230、260、290的基础培养基。

高乙醇培养基(g/L):乙醇质量浓度分别为0、38、75、110的基础培养基。以上培养基均pH自然,115 ℃灭菌15 min。

1.2.2 液化液制备 分别按1:3、1:2.7、1:2.5、1:2.3、1:2(g:L)5个料水比将木薯粉(过50目筛子,平均粒径0.22 mm)与去离子水混合,用氢氧化钠或硫酸溶液将料液pH调节至5.5,加入耐高温α-淀粉酶(15 U/g木薯粉)。加热至88 ℃,维持100 min。冷却至室温,添加去离子水补充液化过程水分的损失。

1.2.3 乙醇发酵 间歇式乙醇发酵:将不同料水比液化液各取900 mL装入3 L的三角瓶中,加入糖化

酶(180 U/g 木薯粉)、种子培养基(体积分数为10%)和尿素(450 mg/L)启动乙醇发酵。30 ℃培养箱静置发酵 50 h。

大种量流加式高体积分数乙醇发酵(料水比 1 g:2 L):分别将 100、200、300 mL 料水比为 1 g:2 L 的液化液分装到 3 L 的三角瓶中,加入糖化酶(180 U/g 木薯粉)、种子培养基(体积分数 10%)和尿素(450 mg/L),30 ℃培养箱静置培养 2、8、12 h 后,分别将 800、700、600 mL 液化液,加入糖化酶(180 U/g 木薯粉)和尿素(450 mg/L),用 10、20、30 h 按匀速,梯度加速,梯度减速 3 种方式流加到装有不同体积发酵液的 3 L 的三角瓶中。30 ℃培养箱静置发酵 50 h。

1.2.4 分析方法 还原糖和总糖质量浓度采用采用菲林试剂滴定法测定[17]。糊精质量浓度测定是将发酵液离心(10 000 *g*,10 min),测定上清液中的残总糖(清液残总糖)质量浓度,减去发酵液中还原糖质量浓度即为糊精质量浓度。乙醇、葡萄糖采用高效液相色谱法(HPLC,Dionex,U-3000,USA)测定。色谱条件:Aminex HPX-87H 色谱柱(300 mm×7.8 mm,9 μm,Hercules,CA);RI 检测器(Shodex RI-101,Japan)和 UV 检测器(Dionex,USA);流动相为 5 mmol/L 硫酸;柱温 65 ℃;流速 0.6 mL/min;进样量 20 μL。样品预处理:发酵液离心(10 000 *g*,10 min)后,上清液经 0.22 μm 膜过滤,取滤液用于 HPLC 分析。酵母细胞数采用血球板计数法测定[18]。

2 结果与讨论

2.1 不同料水比对间歇式乙醇发酵的影响

分别用料水比为 1:3、1:2.7、1:2.5、1:2.3、1:2(g:L)的液化液进行乙醇发酵,发酵结果如表 1 所示。由表 1 可以看出,随着拌料质量浓度的增大,乙醇体积分数明显上升,但与此同时发酵结束后的残总糖质量浓度也随之增加。当料水比为 1 g:2 L 时,酒度高达 15.8%(体积分数),而残总糖质量浓度也增至 22 g/L。通过对残总糖的构成分析发现(图 1),随着拌料质量浓度的增加,残还原糖和残糊精也不断增加。残还原糖质量浓度的增加说明,随着拌料质量浓度的增加,发酵后期酵母活力逐步下降,耗糖能力随之减弱,这主要是由于在高的拌料质量浓度下,酿酒酵母出现了较强的底物(葡萄糖)和产物(乙醇)抑制作用[18]。残糊精质量浓度的增加说明,随着拌料质量浓度的增加,发酵过程糖化酶的活力降低,抑制了糖化过程。

表 1 不同料液比间歇式乙醇发酵效果

Table 1 Effect of different material-water ratio on batch ethanol fermentation

料液比(g:L)	残总糖质量浓度/(g/L)	酒度/%
1:3	13.42±0.51	11.66±0.02
1:2.7	14.73±0.60	12.63±0.06
1:2.5	16.50±0.53	13.54±0.04
1:2.2	19.07±0.46	15.00±0.05
1:2	21.95±0.55	15.83±0.05

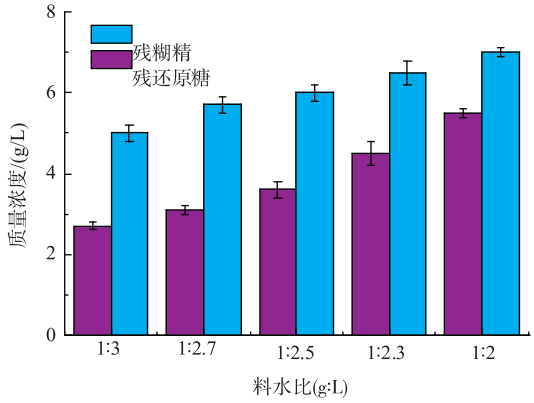


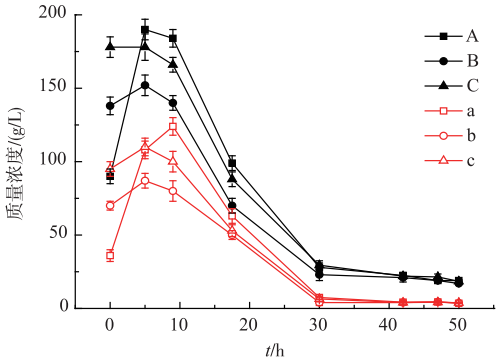
图 1 不同料液比间歇式乙醇发酵液中,残还原糖、残糊精的质量浓度

Fig. 1 Concentrations of residual reducing sugar and residue dextrin in the batch ethanol fermentation with different material-water ratio

2.2 大种量流加式高浓乙醇发酵工艺的优化

2.2.1 接种量对发酵的影响 目前,实际生产中主要采用同步糖化发酵工艺。在高体积分数乙醇发酵过程中,酿酒酵母的延滞期较长,在此过程,料液中糊精被糖化释放出大量葡萄糖,会抑制酿酒酵母的生长与繁殖。这一问题可通过在发酵前期添加部分糖液后培养一定时间,作为含有较高酵母数量的种子来解决。本文作者选择料水比为 1 g:2 L,将种子分别扩培到发酵体积的 20%、30%、40%,培养 8 h 后将剩余料液通过 10 h 匀速流加到发酵瓶中。发酵过程及结束后的总糖及还原糖如图 2 与表 2 所示。Puligundla 等[18]报道,高体积分数乙醇发酵过程中的高糖质量浓度和高乙醇体积分数是影响发酵效果的主要因素,因此应选择较低的糖质量浓度作为工艺优化的目标。当接种量为 20%时,初始糖质量浓度很低,但是开始流加糖液后,发酵液中的糖质量浓度迅速上升。这是因为接种量过小,新流加的糖

不能被迅速消耗,造成糖的积累。接种量 30%,40%时,发酵液中总糖质量浓度增长缓慢,但是接种量40%的还原糖质量浓度明显高于接种量 30%的。从糖醇转化率和残糖来看,经过 50 h 发酵后,接种量为 20%、30%、40%的糖醇转化率、清液残总糖分别为 89.1%、90.5%、90.3%和 10.8、8.8、10.3 g/L。因此,接种量为 30%更适合大种量流加式高浓乙醇发酵过程。



A,a;B,b;C,c 分别表示接种量为 20%,30%,40%。其中 A,B,C 是总糖,a,b,c 是还原糖

图 2 不同接种量流加发酵过程中的总糖和还原糖变化情况

Fig. 2 Change of total sugar and reducing sugar concentration in fed batch ethanol fermentation with different inoculum concentration

表 2 不同大种量流加式发酵工艺对高体积分数乙醇发酵效果的影响

Table 2 Effect of different massive inocula fed-batch processes on very high gravity ethanol fermentation

发酵工艺	酒度/%	糖醇转化率/%	清液残总糖/(g/L)
对照	15.81±0.05	88.5±0.16	12.5±0.22
20%,8 h,10 h,匀速	15.98±0.03	89.1±0.22	10.8±0.15
30%,8 h,10 h,匀速	16.13±0.03	90.5±0.15	8.8±0.18
40%,8 h,10 h,匀速	16.06±0.04	90.3±0.10	10.3±0.30
30%,2 h,10 h,匀速	16.04±0.03	89.8±0.17	10.7±0.09
30%,8 h,5 h,匀速	16.09±0.02	90.2±0.08	11.0±0.20
30%,14 h,10 h,匀速	16.05±0.02	90.0±0.04	10.6±0.25
30%,8 h,20 h,匀速	16.20±0.03	91.7±0.11	6.9±0.17
30%,8 h,30 h,匀速	15.20±0.04	85.0±0.2	13..8±0.27
30%,8 h,20 h,加速	16.20±0.05	91.5±0.12	6.9±0.14
30%,8 h,20 h,减速	16.12±0.02	90.5±0.09	7.5±0.15

注:对照组指间歇式发酵。20%,8 h,10 h,匀速:接种量为20%,初始流加时间为第 8 h,流加时长为 10 h,流加方式为匀速。

2.2.2 *初始流加时间对发酵的影响* 合适的数量及出芽率的酵母能快速地将发酵液中的糖转化为乙醇,确保较高的糖醇转化率。图 3 是在料水比为 1 g:2 L,30%接种量下,酵母培养过程中的酵母数及出芽率情况。接种后第 0~2 h,酵母处于延滞期,酵母增殖缓慢;在第 2~10 h,酵母进入对数生长期,酵母迅速增殖;第 10 h 后,酵母进入平稳期,酵母数基本维持不变。分别选择接种后的第 2、8、14 h 研究初始流加时间对大种量流加发酵的影响。发酵过程中总糖及还原糖质量浓度如图 4 所示,在接种后 2 h 开始流加糖液,流加过程中总糖和还原糖一直维持在 220 g/L 和 105 g/L 左右。在接种后 8 h 开始流加糖液,流加前 5 h 的总糖和还原糖一直维持在 150 g/L 和 75 g/L 左右。在接种后 14 h 开始流加糖液,流加过程中总糖和还原糖分别从 75 g/L 上升到 150 g/L 和 25 g/L 上升到 75 g/L。从发酵效果来看(表 2),初始流加时间为第 2、8、14 h 下的发酵后的糖醇转化率分别为 89.8%、90.5%、90%,清液残总糖分别为 10.7、7.2、10.6 g/L。因此,选择初始流加时间为接种后的第 8 h。

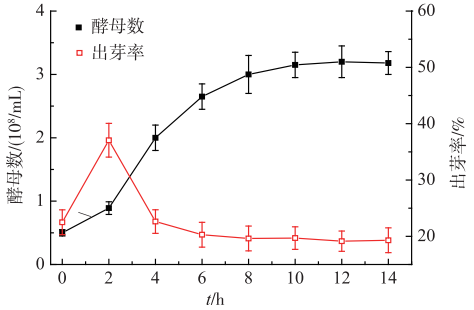
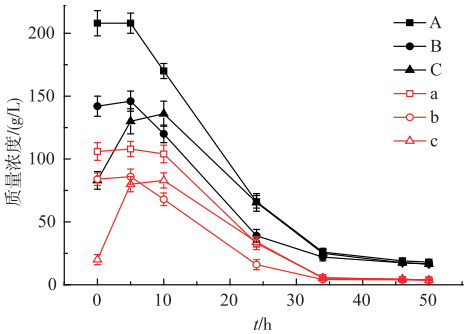


图 3 种子培养过程中的酵母数及出芽率变化情况

Fig. 3 Change of yeast number and budding rate in the process of seed cultivation

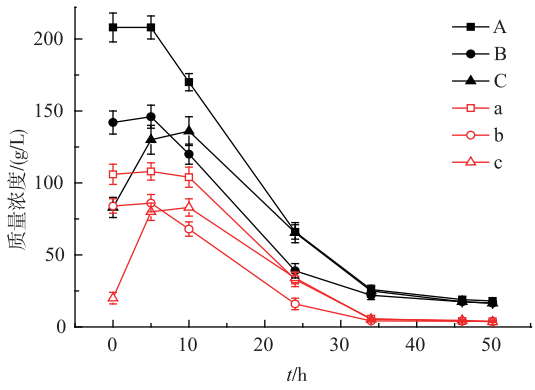


A,a;B,b;C,c 分别表示初始流加时间为接种后第 2、8、14 h。A、B、C 是总糖,a、b、c 是还原糖

图 4 不同初始接种时间下,流加发酵过程中的总糖和还原糖变化情况

Fig. 4 Change of total sugar and reducing sugar concentration in fed-batch fermentation with different initial inoculation time

2.2.3 *流加时长对发酵的影响* 接种量为 30%,种子培养 8 h 后,将剩余料液分别通过 5、10、20、30 h 匀速流加到发酵体系中。发酵过程中的糖变化情况及发酵结果如图 5 和表 2 所示。从发酵过程中的糖浓度变化情况来看,流加时长为 5 h 或 10 h,总糖出现明显的积累现象,还原糖维持在 100 g/L 左右;流加时长为 20 h,流加过程中的总糖迅速下降,还原糖也逐步降低,流加结束后的总糖和还原糖在 120 g/L 和 60 g/L 左右;流加时长为30 h,在发酵后期出现糖累积上升的情况。这说明流加时间过长,料液补加较慢,导致酵母在 25 h 左右处于缺少糖的状态,发酵 50 h 后酒度和残糖仍然很高。从发酵效果来看,流加时长 5、10、20、30 h 发酵后的糖醇转化率分别为 90.2%、90.5%、91.7%、85.5%,清液残总糖分别 11.0、10.6、6.9、13.8 g/L。因此,选择流加周期为 20 h 最为适宜。

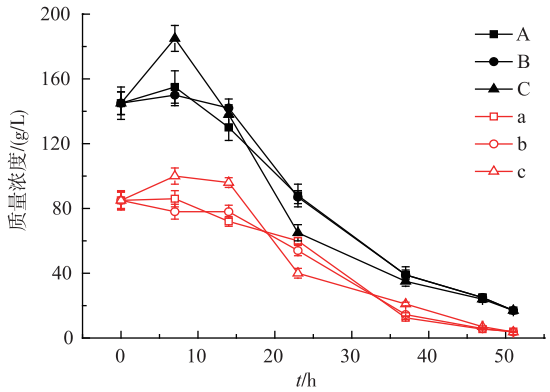


A,a;B,b;C,c;D,d 分别表示流加时长为 5,10,20,30 h。其中 A、B、C、D 是总糖,a、b、c、d 是还原糖

图 5 不同流加时长下,流加发酵过程中的总糖和还原糖变化情况

Fig. 5 Change of total sugar and reducing sugar concentration in fed batch fermentation with different feeding duration

2.2.4 *流加方式对发酵的影响* 30%接种量,种子培养 8 h 后,将剩余料液在 20 h 内分别采用匀速、梯度减速和梯度加速流加到发酵瓶中。其中匀速流加以 35 mL/h 的速度流加;梯度加速流加按 18、27、35、44、53 mL/h 流加;梯度减速速流加按 53、44、35、27、18 mL/h 流加,每个流速流加 4 h。发酵过程中的糖质量浓度变化及发酵结果见图 6 和表 2。流加发酵前期,采用匀速和加速流加,总糖质量浓度维持在 150 g/L 左右。发酵前期流加速率稍慢,确保补充的糖能被酵母利用。在流加后期,随着发酵体系逐渐扩大,此刻流加速度变大不会再导致糖积累。相反的,糖液的快速补充反而可以稀释发酵液中的乙醇,从而延缓高体积分数乙醇对酵母的胁迫作用。而减速流加方式补糖则会糖积累。从表 2 可知,匀速、加速和减速 3 种流加方式后的酒度分别为 91.7%、91.5%、90.5%,清液残总糖分别 6.9、6.9、7.5 g/L。从发酵过程及发酵结束后的情况分析可知,流加过程中采用匀速或加速流加策略均适于高体积分数乙醇发酵。但是考虑到操作的简便性,选择匀速流加方式更加合理。



A,a;B,b;C,c 分别表示匀速,梯度加速,梯度减速 3 种流加方式。其中 A、B、C 是总糖,a、b、c 是还原糖

图 6 不同流加方式下,流加发酵过程中的总糖和还原糖变化情况

Fig. 6 Change of total sugar and reducing sugar concentration in fed batch fermentation with different feeding modes

2.3 大种量流加式与间歇式高体积分数乙醇发酵工艺对比及优势分析

为了研究大种量流加式与间歇式工艺在高体积分数乙醇发酵中的区别,本文对 2 个工艺发酵过程情况进行对比,结果如图 7 所示。大种量流加式工艺按接种量为 30%,种子培养 8 h 后,按匀速流加方式流加 20 h。发酵前 20 h,间歇式和流加式发酵过程中的还原糖质量浓度分别维持在 125 g/L 和 75 g/L。流加式发酵中的糖质量浓度明显低于间歇式,这可以有效避免在发酵初期高质量浓度糖对酵母的抑制作用。

从乙醇生成情况来看,发酵前 7 h 内,大种量流

加式发酵乙醇生成速率为 5.91 g/(L·h)，间歇式发酵过程中乙醇生成速率为 3.04 g/(L·h)。在发酵 7~50 h 内,大种量流加发酵一直保持稳定的乙醇生成速率(2.00 g/(L·h))。在间歇式发酵过程中,发酵的第 7~20 h,20~40 h 和 40~50 h 阶段,乙醇生成速率分别 4.7、13.8、0.39 g/(L·h)。在主发酵期,大种量流加式发酵的乙醇生成速率基本维持恒定。间歇式发酵过程中,乙醇生成速率先快后慢。发酵 15 h 后,间歇式发酵乙醇质量浓度高于流加式,而高乙醇质量浓度会破坏酵母细胞膜的稳定性，降低发酵速率,延长或中止发酵。采用大种量流加式发酵工艺,可以有效避免前期高质量浓度糖和中后期高质量浓度乙醇对酵母的胁迫和毒害作用,使得酵母在整个发酵过程中有较高活力,从而提高乙醇产量。

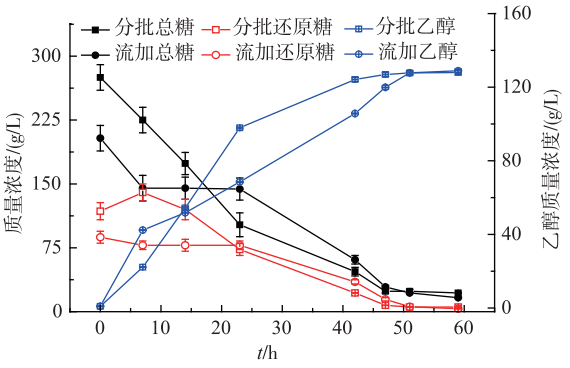


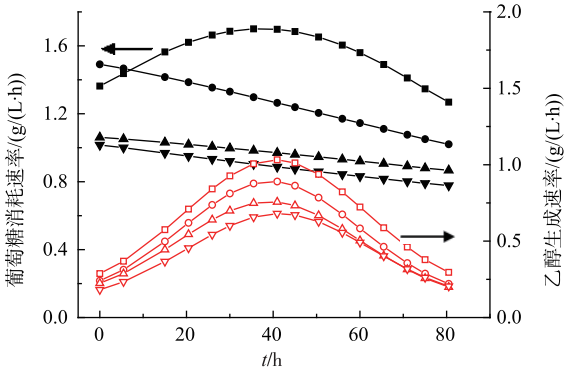
图 7　间歇式,大种量流加式发酵过程中的总糖、还原糖、乙醇变化情况

Fig. 7　Change of total sugar and reducing sugar concentration in batch and massive inocula fed-batch fermentation

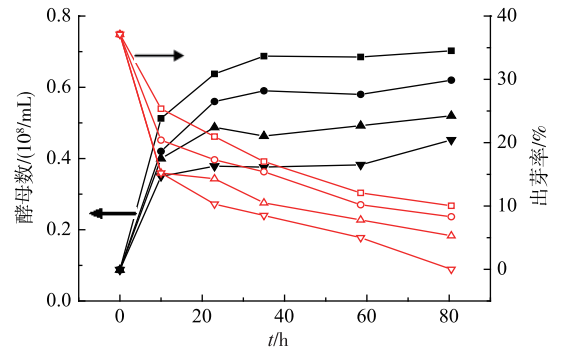
2.4　不同初始糖和乙醇质量浓度对间歇式乙醇发酵的影响

为了进一步证明这一结论,本文作者研究了不同初始糖质量浓度和乙醇质量浓度对发酵的影响。由图 8 可以看出,当初始葡萄糖质量浓度从 180 g/L 上升到 290 g/L，酵母最大耗糖速率降低了 41.2%(从 1.7 g/(L·h)到 1.0 g/(L·h))。与此同时,乙醇最大生成速率降低了 40%(从 1.0 g/(L·h)到 0.6 g/(L·h))。此外,糖质量浓度过高会抑制酵母的生长和繁殖(图 8(b)),导致耗糖速率和乙醇生成速率降低(图 8(a))。因为高质量浓度葡萄糖导致发酵液渗透压增大,抑制酵母生长和发酵的正常进行[19]。

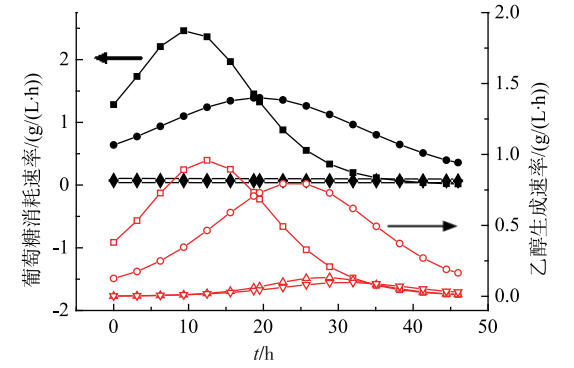
由图 8(c)可以看出,初始乙醇质量浓度从 0 g/L 上升到 38 g/L 后，酵母最大耗糖速率降低了 48%(从 2.5 g/(L·h)到 1.3 g/(L·h))。同时,乙醇最大生成速率降低了 19%(从 1.0 g/(L·h)到 0.81 g/(L·h))。进一步增加初始乙醇质量浓度时，发酵基本停止。高质量浓度乙醇会抑制酵母的生产和繁殖(图 8(d)),导致耗糖速率和乙醇生成速率降低(图 8(c))。这与张强等之前关于乙醇耐受性的研究是一致的[20]。



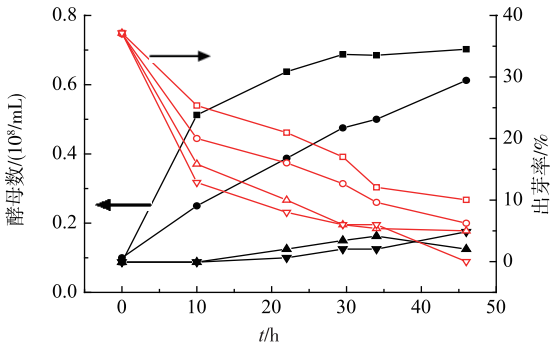
(a)不同初始葡萄糖质量浓度下，间歇式发酵过程中的葡萄糖消耗,乙醇生成速率的变化情况



(b)不同初始葡萄糖质量浓度下，酵母数和出芽率的变化情况



(c)不同初始乙醇质量浓度下，间歇式发酵过程中的葡萄糖消耗和乙醇生成率的变化情况



(d)不同初始葡萄糖质量浓度下,酵母数和出芽率的变化情况

a,b 中,初始糖浓度分别为 180(■,□)、230(●,○)、260(▲,△)、290(▼,▽)g/L。a 中实体表葡萄糖消耗速率,空心表乙醇生成速率。b 中实体表酵母数,空心表出芽率。c,d 初始乙醇浓度分别为 0(■,□)、38(●,○)、75(▲,△)、110(▼,▽)g/L。c 中实体表葡萄糖消耗速率,空心表乙醇生成速率。d 中实体表酵母数,空心表出芽率。

图 8 不同初始葡萄糖和乙醇质量浓度下,间歇式发酵过程中的葡萄糖消耗,乙醇生成速率和酵母数,出芽率的变化情况

Fig. 8 Change of glucose consumption, ethanol production rate and number, budding rate of yeast in batch fermentation process under different initial glucose and ethanol concentration

3 结 语

间歇式稀醪乙醇发酵过程中,糖质量浓度和乙醇质量浓度都比较低,酵母生长繁殖和发酵不会受到抑制,发酵效果良好。高浓度乙醇发酵中,采用间歇式工艺虽然酒度可以提高,但会出现发酵残还原糖和残糊精质量浓度高,糖醇转化率低的问题。其原因是发酵前期糖质量浓度和发酵后期乙醇质量浓度较高[21]。PANCHAL 等[22]提出,当酵母处在高渗透压环境下,会出现胞内乙醇积累现象,这会对乙醇合成相关酶造成不利影响。本文实验证明,随着初始糖质量浓度和乙醇质量浓度的提高,酵母的合成速率和生长繁殖都受到抑制。PULIGUNDL 等[20]报道,高体积分数乙醇发酵过程中的高糖质量浓度和高乙醇质量浓度是影响发酵效果的主要因素,因此应选择较低的糖质量浓度作为工艺优化的目标。采用大种量流加式高浓度乙醇发酵工艺可以显著降低清液残总糖质量浓度。

研究接种量对工艺影响中发现:流加过程出现还原糖增高,且不随着接种量的增大而消除。主要有以下几个原因:1)前期种子数量较少,不能迅速消耗新补给的糖;2)流加速度过快,糖补给太迅速,同样会导致糖无法被迅速消耗[23];3)新料液在添加糖化酶后,前期糖化十分迅速,会产生大量还原糖,同时发酵液中也存在糖化过程,这两者协同作用造成发酵液中还原糖质量浓度上升。初始流加时间过早,会因为种子液本身糖质量浓度较高,流加发酵降低糖质量浓度效果不明显;过晚可能会出现碳源匮乏,不利于种子增殖及发酵。考察流加时长对工艺影响时发现:流加时长过短会导致流加过程糖积累现象严重,发酵前期酵母仍处于高糖环境中;流加时长过长则会出现酵母耗糖速率大于补糖速率,酵母发酵中后期碳源匮乏,导致发酵中止。本文优化后的大种量流加工艺为:30%接种量下,培养 8 h 后将剩余料液通过 20 h 匀速流加到发酵体系。发酵结束后酒度明显提高的同时,发酵残糖明显降低,残糖水平达到了稀醪发酵下的水平。岳雷[24]提出,在谷氨酸发酵中采用低初糖,流加高糖工艺可避免发酵初期高渗透压对菌体的影响,菌体生长旺盛,有利于发酵产物的生成。大种量流加式高体积分数乙醇发酵工艺发酵前期的糖质量浓度和发酵中后期的乙醇质量浓度均较低,有效避免了高质量浓度糖及乙醇对酵母的胁迫和毒害作用,促进了酵母对糖的利用,提高了酵母发酵力。该工艺操作简单,无需添加设备或改动管路,可基于目前大部分工厂现有的发酵设备进行发酵,有望在今后的乙醇发酵行业得到推广。

参考文献:

[1] ZHANG Jianhua, DUAN Zuofei, LI Yongfei, et al. Study on the full circulation process of alcohol distillation waste liquor[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2006, 32(4): 31-34. (in Chinese)

[2] LI Liqun, SUN Hongju. Research on enhancing corn ethanol fermentation in yeast fermentation ability[J]. **Journal of Jilin Institute of Chemical Technology**, 2009, 26(3): 28-32. (in Chinese)

[3] LAOPAIBOON L, NUANPENG S, STINOPHAKUN P, et al. Ethanol production from sweet sorghum juice using very high

gravity technology:effects of carbon and nitrogen supplementations[J]. **Bioresource Technology**,2009,100(18):4176-4182.

[4] LI Chuanlin. Application of fermentation technology,promote energy saving and clean production of[J]. **Liquor-Making Science & Technology**,2005(5):107-107.(in Chinese)

[5] D'AMORE T,PANCHAL C J,RUEESLL I,et al. A study of ethanol tolerance in yeast[J]. **Critical Reviews in Biotechnology**,2008,9(4):287-304.

[6] PIDDOCKE M P,KREISZ S,HELDTHANSEN H P,et al. Physiological characterization of brewer's yeast in high-gravity beer fermentations with glucose or maltose syrups as adjuncts[J]. **Applied Microbiology & Biotechnology**,2009,84(3):453-464.

[7] DODIC S,POPOV S,DODIC J,et al. Bioethanol production from thick juice as intermediate of sugar beet processing[J]. **Biomass & Bioenergy**,2009,33(5):822-827.

[8] SHEN Naikun,CAO Wei,WANG Qingyan,et al. Study on Fermentation of raw cassava fuel ethanol production of high concentration[J]. **Guangxi Science**,2015,22(1):37-43.(in Chinese)

[9] TANG Yanyan,YI Yi,WU Shihua,et al. Study on cassava high gravity alcohol simultaneous saccharification and fermentation process[J]. **Journal of Aahui Agricultural Science**,2010,38(23):12690-12692.(in Chinese)

[10] LIU X M,XU W J,ZHANG C,et al. Vitalized yeast with high ethanol productivity[J]. **Rsc Advances**,2014,4(94):52299- 52306.

[11] WANG P M,ZHENG D Q,CHI X Q,et al. Relationship of trehalose accumulation with ethanol fermentation in industrial *Saccharomyces cerevisiae*,yeast strains[J]. **Bioresource Technology**,2014,152(1):371-376.

[12] WANG F Q,GAO C J,YANG C Y,et al. Optimization of an ethanol production medium in very high gravity fermentation[J]. **Biotechnology Letters**,2007,29(2):233-236.

[13] ZHANG L,CHEN Q,JIN Y L,et al. Energy-saving direct ethanol production from viscosity reduction mash of sweet potato at very high gravity(VHG)[J]. **Fuel Processing Technology,Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering(Transactions of the CSAE)**,2010,91(12):1845-1850.

[14] PAN Feng,FENG Pinru,LI Yin. On line measurement of ethanol concentration in yeast fed batch fermentation[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2000,19(5):488-490.(in Chinese)

[15] 韩北忠. 发酵工程[M]. 北京:中国轻工业出版社,2013.

[16] JOANNIS-CASSAN C,RIESS J,JOLIBERT F,et al. Optimization of very high gravity fermentation process for ethanol production from industrial sugar beet syrup[J]. **Biomass & Bioenergy**,2014,70:165-173.

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

[18] 诸葛健,王正祥. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京:中国轻工业出版社,1994.

[19] THOMAS K C. Production of 21%(v/v) ethanol by fermentation of very high gravity(VHG) wheat mashes[J]. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**,1992,10(1):61-68.

[20] ZHANG Qiang,GUO Yuan,HAN Deming. Research on ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Chemical Industry and Engineering Process**,2014,33(1):187-192.(in Chinese)

[21] PULIGUNDLA P,SMOGROVICOVA D,OBULAM V S,et al. Very high gravity (VHG) ethanol brewing and fermentation:a research update[J]. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**,2011,38(9):1133-44.

[22] PANCHANL C J,STEWAR G G. The effect of osmotic pressure on the production and excretion of ethanol and glycerol by a brewing yeast strain[J]. **Journal of the Institute of Brewing**,1980,86(5):207-210.

[23] CHENGL N G,HASAN M,KUMORO A C,et al. Production of ethanol by fed-batch fermentation[J]. **Pertanika Journal of Science & Technology**,2009,17(2):399-408.

[24] YUE Lei. Study on low sugar and early mid stream heightening concentrated sugar process[J]. **Bulletin of Fermentation Science and Technology**,2009,38(1):5-6.(in Chinese)