

鲜甘薯发酵生产高浓度乙醇的技术*

靳艳玲^{1,2} 甘明哲^{1,2} 方扬¹ 李科^{1,2} 付洁^{1,2} 赵海^{1**}

(¹中国科学院成都生物研究所 成都 610041)

(²中国科学院研究生院 北京 100049)

摘要 乙醇作为燃料可以改善能源结构,减少对石油进口的依赖.高浓度发酵技术是一种生产燃料乙醇的新兴技术,有利于降低乙醇的生产成本.本研究采用酿酒酵母以鲜甘薯为底物进行了快速高浓度乙醇发酵的研究.对高浓度乙醇发酵的影响因素如发酵促进剂种类和浓度、无机盐、维生素及初糖浓度进行了探讨,获得了最佳发酵培养基配方,确定最适发酵促进剂为B,浓度为1.20 g kg⁻¹,不需要添加无机盐和和维生素,初糖浓度为270 g kg⁻¹.在最适条件下,28 h可生产乙醇132.86 g kg⁻¹,乙醇发酵强度达4.74 g kg⁻¹ h⁻¹,发酵效率达91.44%.发酵规模放大至10 L时,28 h可产生乙醇131.71 g kg⁻¹,乙醇发酵强度为4.70 g kg⁻¹ h⁻¹,发酵效率为90.53%.图3 表3 参16

关键词 乙醇;鲜甘薯;高浓度

CLC TK6 : S531.099 : TQ920.6

Very High Gravity Fermentation of Ethanol with Fresh Sweet Potato*

JIN Yanling^{1,2}, GAN Mingzhe^{1,2}, FANG Yang¹, LI Ke^{1,2}, FU Jie^{1,2} & ZHAO Hai^{1**}

(¹Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China)

(²Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Ethanol can be utilized as fuel to improve energy consumption structure and reduce dependence on oil. Very high gravity fermentation, as a kind of emerging technique, can greatly reduce the costs of ethanol production. The very high gravity fermentation of ethanol with fresh sweet potato by *Saccharomyces cerevisiae* was studied. The impact factors of this fermentation technique were investigated, including fermentation stimulant, inorganic salt, vitamin and initial sugar concentration. As a result, the optimal fermentation culture was determined: 1.20 g kg⁻¹ fermentation stimulant B, 270 g kg⁻¹ initial sugar concentration and no inorganic salt and vitamin. Under the optimum medium conditions, 132.86 g kg⁻¹ ethanol was produced within 28 hours and the ethanol production rate reached 4.74 g kg⁻¹ h⁻¹. In 10 L fermentor, 131.71 g kg⁻¹ ethanol was produced within 28 hours and the ethanol production rate reached 4.70 g kg⁻¹ h⁻¹. Fig 3, Tab 3, Ref 16

Keywords fuel ethanol; fresh sweet potato; very high gravity

CLC TK6 : S531.099 : TQ920.6

高浓度发酵技术(Very high gravity, VHGF)是一种生产燃料乙醇的新兴技术,被定义为“含270 g kg⁻¹糖化液或更高糖化液的制备和发酵”^[1].高浓度乙醇发酵具有如下优点:①提高单位设备的生产率和利用率;②减少水耗;③增加单位体积醪液中的乙醇,降低蒸馏、发酵、蒸馏和DDGS浓缩干燥过程的能耗;④抑制杂菌的生长.但是高浓度发酵也有发酵时间长、发酵不完全的缺点,这主要是由于底物抑制、产物抑制和营养不足等因素造成的.

目前,国内外关于高浓度乙醇发酵的报道多集中于葡萄糖培养基及玉米、小麦等粮食原料^[2~4],对非粮原料全渣发酵的报道很少,国内文献报道,以木薯为原料进行高浓度发酵,生产8.13% (w)的乙醇需要58 h,发酵效率只有83%^[5].国外文献报道,以土豆为原料进行高浓度发酵,可得到13.10% (w)的乙醇,但是发酵效率只有89.7%,发酵时间长达61.5 h^[6].以上技术只注重乙醇浓度,没有兼顾发酵时间和发酵效率.

本文研究针对高浓度乙醇发酵的不足,以鲜甘薯为原

料,采用同步糖化发酵模式进行乙醇生产,在省略糖化工段的同时部分地解决底物抑制问题;通过研究各种因素对酵母乙醇发酵的影响,确定了最佳发酵条件,解决了产物抑制的问题,实现了快速高浓度乙醇发酵,有望解决我国燃料乙醇生产中长期存在的发酵周期长、能耗大、生产成本高的问题,促进燃料乙醇在我国的推广应用.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 甘薯 试验品种为四川南充农业科学研究所选育的南薯009^[7].

1.1.2 菌种 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)为本实验室选育得到的乙醇高产菌株.

1.1.3 酶制剂 液化酶Liquozyme Supra购自诺维信公司,是一种具有热稳定性的 α -淀粉酶,标准酶活力为90 KNU/g (KNU为诺维信液化酶的专有单位),1 KNU的定义是指是在37 ℃、pH 5.6时每小时水解5.26 g淀粉的酶量.糖化酶Suhong GA II购自诺维信公司,是一种由黑曲霉发酵生产的糖化酶,标准酶活力为500 AGU/mL,1 AGU的定义是指是在25 ℃、pH 4.3标准条件下每分钟水解1 mmol麦芽糖所需的酶量.

收稿日期: 2008-11-25 接收日期: 2008-12-15

*国家科技支撑计划项目(No. 2007BAD78B04)资助 Supported by the National Key Technology R & D Program of China (No. 2007BAD78B04)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: zhaohai@cib.ac.cn)

1.2 方法

1.2.1 发酵培养基制备 鲜甘薯打浆后,按照120 KNU/kg淀粉添加液化酶,于85℃液化至碘反应为红棕色,测定总糖,按照一定比例加水,除特殊说明外,使初始糖浓度为270 g kg⁻¹,初始发酵醪重量为100 g,装入250 mL三角瓶,于115℃灭菌15 min.冷却后接入菌种,同时按1.6 AUG/g淀粉添加糖化酶,采用同步糖化发酵,发酵温度为30℃,接种量为10% (w).

1.2.2 还原糖测定 采用3,5-二硝基水杨酸(DNS)比色法^[8].

1.2.3 可发酵糖测定 采用酸水解法^[9],盐酸水解后用DNS测糖.

1.2.4 乙醇浓度测定 采用气相色谱法^[10],以正丙醇为内标,氢火焰离子化检测器,GDX103填充柱,柱箱温度150℃,检测器温度250℃,进样器温度250℃.

1.2.5 数据分析 试验样品均做3次重复,取平均值进行分析.

2 结果与分析

2.1 不同发酵促进剂对鲜甘薯乙醇发酵的影响

要得到高浓度的乙醇必然需要高浓度的可发酵糖,但过高糖浓度所产生的渗透压会使酵母死亡,发酵产物乙醇对酵母细胞也有毒性,因此解决渗透压和乙醇毒性对酵母的影响成为高浓度乙醇发酵的关键因素.添加发酵促进剂可减少底物与产物抑制^[11],促进高浓度乙醇发酵的顺利进行.本实验选择了3种促进剂添加于发酵醪中,发酵36 h后测定其对酵母乙醇发酵的影响.

结果(表1)表明,与空白对照相比,添加的3种发酵促进剂均能加快酵母乙醇发酵的速度,提高乙醇浓度.主要原因是添加的发酵促进剂可以创造条件使酵母菌维持旺盛的生长繁殖能力,从而得到较高浓度的乙醇,并使糖发酵彻底.根据对乙醇发酵促进的效果,选择发酵促进剂B进行后续实验.

表1 不同发酵促进剂对鲜甘薯乙醇发酵的影响

Table 1 Effect of different fermentation stimulants on ethanol fermentation with sweet potato

发酵效果 Fermentation result	发酵促进剂 Fermentation stimulant			空白对照 Blank control
	A	B	C	
乙醇浓度 Ethanol concentration (w/g kg ⁻¹)	115.13	128.74	121.9	90.28
发酵效率 Fermentation efficiency (r/%)	81.53	90.03	86.10	65.15
残总糖 Residual total sugars (w/g kg ⁻¹)	37.42	16.74	23.68	87.54

2.2 发酵促进剂B浓度对鲜甘薯乙醇发酵的影响

添加不同浓度的发酵促进剂B于发酵醪中,28 h后测定其对酵母乙醇发酵的影响.结果(表2)表明,随着培养基中发酵促进剂B浓度的增加,乙醇浓度也逐渐上升.经SPSS 13.0分析,发酵促进剂B浓度与乙醇浓度之间呈显著正相关($P < 0.01$),相关系数0.971.在发酵促进剂B浓度低于1.20 g kg⁻¹时,不能完全支持酵母的生长及发酵,导致发酵速度较慢和最终乙醇浓度较低;而当发酵促进剂B浓度高于1.20 g kg⁻¹时,乙醇浓度逐渐趋于恒定,因此确定发酵醪中发酵促进剂B的终浓度为1.20 g kg⁻¹.

2.3 无机盐对鲜甘薯乙醇发酵的影响

无机盐类是微生物生命活动不可缺少的物质,其主要

表2 发酵促进剂B不同浓度对鲜甘薯乙醇发酵的影响

Table 2 Effect of different fermentation stimulant concentrations on ethanol fermentation with sweet potato

发酵效果 Fermentation result	发酵促进剂B浓度 Fermentation stimulant B (w/g kg ⁻¹)				
	0.6	0.8	1	1.2	1.4
乙醇浓度 Ethanol concentration (w/g kg ⁻¹)	118.01	122.78	125.89	131.24	132.26
发酵效率 Fermentation efficiency (r/%)	80.54	83.68	85.76	90.13	90.15
残还原糖 Residual reducing sugars (w/g kg ⁻¹)	28.89	19.02	12.64	6.26	5.93
残总糖 Residual total sugars (w/g kg ⁻¹)	35.83	26.59	20.31	16.14	16.06

功能是参与构成菌体成分、作为酶的组成部分,或维持酶的活性、调节渗透压等.其中MgSO₄、KH₂PO₄和CaCl₂对微生物的生长和发酵影响最大,镁能加快酵母利用葡萄糖的速度,培养液中葡萄糖浓度越低,镁的影响越大;钙在微生物细胞中起活化作用;钾不仅是必要的营养元素,也是酵母增殖的刺激剂,无机磷进入细胞的运动是由钾专一性地激发的,而且钾还对酵母细胞的脂类代谢起重要作用;磷是核酸、磷脂和辅酶二磷酸腺苷和硫胺素的组成成分,磷以各种化合物的形式不可缺少地参与细胞许多能量过程^[12].为了考察不同无机盐对酵母乙醇发酵的影响,分别向培养基中添加2.0 g kg⁻¹的KH₂PO₄、MgSO₄和CaCl₂,以不添加无机盐的培养基作为

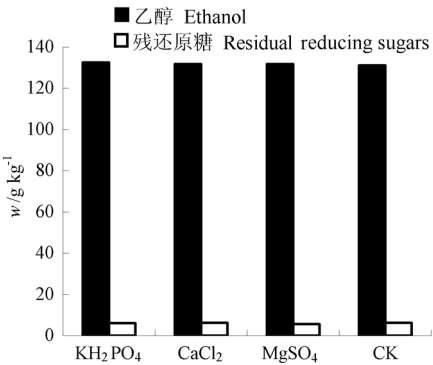


图1 无机盐对鲜甘薯乙醇发酵的影响

Fig. 1 Effect of inorganic salts on ethanol fermentation with sweet potato

对照进行发酵.

结果(图1)表明,在相同的发酵时间里,添加无机盐的试验组乙醇产量与不添加的对照组差别不大,说明鲜甘薯本身含有足量无机盐能满足酵母高浓度乙醇发酵的需要,因此在以鲜甘薯为原料进行高浓度乙醇发酵时无需添加无机盐,可简化乙醇生产工序,这是甘薯作为原料的优势之一.

2.4 维生素对鲜甘薯乙醇发酵的影响

酵母乙醇发酵过程中许多代谢步骤需要维生素的参与,维生素对保持酵母细胞质膜的完整性从而维持细胞活性也具有促进作用^[13, 14].本实验参照文献^[13]添加了在葡萄糖培养基中对酵母乙醇发酵有促进作用的维生素,发酵28 h后的结果见图2.

从图2可以看出,在相同的发酵时间里,添加维生素的试验组乙醇产量与不添加的对照组差别不大,说明鲜甘薯本身含有足够维生素能满足酵母高浓度乙醇发酵的需要,这与

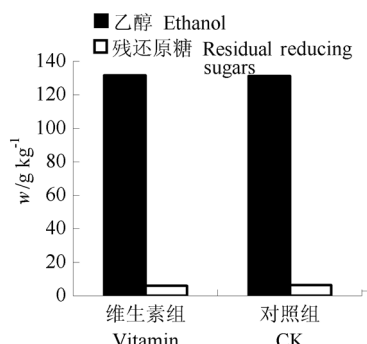


图2 维生素对鲜甘薯乙醇发酵的影响

Fig. 2 Effect of vitamin on ethanol fermentation with sweet potato

甘薯含有丰富维生素的报道一致^[15]。因此,在鲜甘薯为原料进行高浓度乙醇发酵时无需添加维生素,可以节约乙醇生产成本,这是甘薯作为原料的另一个优势。

2.5 初始糖浓度对鲜甘薯乙醇发酵的影响

初始糖浓度的高低直接影响菌体的生长与发酵。乙醇发酵是典型的产物抑制,在乙醇含量达到4%左右时,就开始产生抑制^[16],发酵速度逐渐降低直至发酵停止。为了避免原料利用不完全,工业上常常通过增大加水量来降低初始糖浓度,但增加加水量不可避免地造成成熟发酵醪液的乙醇含量低,增大了水耗和蒸馏的能耗。本实验分别选择270 g kg⁻¹、300 g kg⁻¹、330 g kg⁻¹初始糖浓度进行发酵实验,结果见表3。

从表3可以看出,随着初始糖浓度增加,乙醇浓度增加,但是发酵醪粘度增加,发酵时间延长,发酵强度降低。即随着初糖浓度升高,菌体的发酵受到影响,主要是菌体受到底物和产物的双重抑制,再加上初始糖浓度过高时,培养基的粘度增高,影响了二氧化碳的逃逸,从而使发酵不能正常进行。考虑到原料的利用率和乙醇后处理的成本,鲜甘薯酵母高浓度乙醇发酵的最适初始糖浓度应在270 g kg⁻¹左右。

表3 不同初始糖浓度对鲜甘薯乙醇发酵的影响

Table 3 Effect of different initial sugar concentrations on ethanol fermentation with sweet potato

发酵效果 Fermentation result	初糖浓度 Initial sugar concentration (w/g kg ⁻¹)		
	270	300	330
发酵时间 Fermentation time (t/h)	28	39	48
乙醇浓度 Ethanol concentration (w/g kg ⁻¹)	132.86	146.30	151.19
发酵效率 Fermentation efficiency (r/%)	91.44	90.42	84.15
发酵强度 Fermentation intensity (w/g kg ⁻¹ h ⁻¹)	4.75	3.75	3.15
残还原糖 Residual reducing sugars (w/g kg ⁻¹)	5.64	6.82	20.68
残总糖 Residual total sugars (w/g kg ⁻¹)	15.19	18.38	31.53
粘度 Viscosity (η/mPa s)	1074.75	1798.25	3033.15

2.6 10 L规模鲜甘薯乙醇发酵

在上述最优培养基配方下进行了10 L规模的高浓度乙醇发酵放大实验。结果(图3)表明,在最优发酵条件下,发酵规模放大至10 L,发酵参数与在250 mL三角瓶中相似。发酵28 h产生乙醇为131.71 g kg⁻¹,乙醇发酵强度4.70 g kg⁻¹ h⁻¹,发酵效率90.53%。

3 结论

本研究对酵母以鲜甘薯为原料快速高浓度乙醇发酵

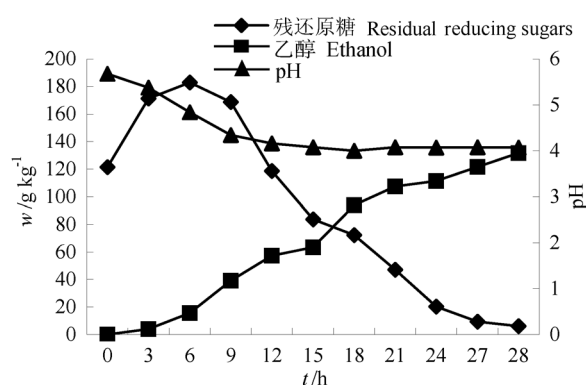


图3 10 L规模鲜甘薯酵母乙醇发酵

Fig. 3 Fermentation in a 10-L fermentor

的条件进行了优化,确定最适发酵促进剂为B,浓度1.20 g kg⁻¹,初糖浓度270 g kg⁻¹,以鲜甘薯为原料进行高浓度乙醇发酵不需要添加无机盐和维生素。在最适条件下28 h可生产乙醇132.86 g kg⁻¹,乙醇发酵强度达4.74 g kg⁻¹ h⁻¹,发酵效率达91.44%,与已有的利用其他底物进行的高浓度乙醇发酵相比,发酵时间缩短了15 h以上,乙醇发酵强度提高40%以上,实现了快速高浓度乙醇发酵。通过10 L发酵罐中的乙醇发酵,证明此快速高浓度乙醇发酵条件可以进一步放大,为其工业化应用提供了理论依据。

References

- Wang FQ, Gao CJ, Yang CY, Xu P. Optimization of an ethanol production medium in very high gravity fermentation. *Biotechnol Lett*, 2007, **29**: 233~236
- Murthy GS, Singh V, Johnston DB, Rausch KD, Tumbleson ME. Improvement in fermentation characteristics of degermed ground corn by lipid supplementation. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2006, **33**: 655~660
- Bafrncova P, Smogrovicova D, Slavikova I, Patkova J, Domeny Z. Improvement of very high gravity ethanol fermentation by media supplementation using *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett*, 1999, **21**: 337~341
- Ozmihci S, Kargi F. Effects of feed sugar concentration on continuous ethanol fermentation of cheese whey powder solution (CWP). *Enzyme & Microbial Technol*, 2007, **41**: 876~880
- Xue WW (薛万伟), Dang XJ (党选举), Li X (李鑫). Study on the technology of cassava ethanol fermentation. *Niangjiu* (酿酒), 2005, **32** (4): 39~40
- Srichuwong S, Fujiwara M, Wanga XH, Seyama T, Shiromaa R, Arakane M, Mukojima N, Tokuyasu K. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of very high gravity (VHG) potato mash for the production of ethanol. *Biomass & Bioenergy*, 2009, **33** (5): 890~898
- Jin YL (靳艳玲), Gan MZ (甘明哲), Zhou LL (周玲玲), Xue HL (薛慧玲), Zhang L (张良), Zhao H (赵海). Comparison on ethanol production with 4 varieties of sweet potato at different growth stages. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2009, **15** (2): 267~270
- Wang JH, Teng D, Yao Y, Yang YL, Zhang F. Expression of *Aspergillus niger* 9891 endonulinase in *Pichia pastoris*. *High Technol Lett*, 2004, **10** (4): 51~56

- 9 Wang LS, Ge XY, Zhang WG. Improvement of ethanol yield from raw corn flour by *Rhizopus* sp. *World J Microbiol Biotechnol*, 2007, **23**: 461~465
- 10 Liu Y (刘艳), Zhao H (赵海), Qi TS (戚天胜), Tang QL (唐秋琳), Huang YF (黄宇峰). Fast production of ethanol by *Zymomonas mobilis* (Zy-1). *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2007, **13** (1): 69~72
- 11 Daeschel MA, Andersson RE, Fleming HP. Microbial ecology of fermenting plant materials. *FEMS Microbiol Lett*, 2006, **46** (3): 357~367
- 12 Zhang KC (章克昌). Technology of Ethanol and Tequila. Beijing, China (北京): China Light Industry Press, 1995
- 13 Alfenore S, Molina-Jouve C, Guillouet SE, Uribe Larrea JL, Goma G, Benbadis L. Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, **60**: 67~72
- 14 Zhao BH (赵宝华), Zhang L (张莉). The effects on ethanol fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* by adding Ca^{2+} and inositol. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), 1999, **39** (2): 174~177
- 15 Zhang LM (张立明), Wang QM (王庆美), Wang MX (王荫墀). The main nutrient components and health care function of sweet potato. *Rain Fed Crops* (杂粮作物), 2003, **23** (3): 162~166
- 16 Liu Z (刘振), Wang JP (王金鹏), Zhang LF (张立峰), Zeng AW (曾爱武), Yuan XG (袁希钢). Production of ethanol by simultaneous saccharification and fermentation from cassava. *Chin J Proc Engin* (过程工程学报), 2005, **5** (3): 353~357

可再生能源的微生物转化技术

宋安东等 编著 科学出版社 出版(2009年5月)

978-7-03-024586-1 ¥55.00

内容简介

本书在分析当前全球面临的能源和环境危机的基础上,阐述了利用生物质转化为主要的生物炼制的内涵,将微生物技术与可再生能源转化有机结合起来,全面论述了利用微生物技术转化可再生能源的基础理论、基本工艺、基本装备、应用情况和发展前景。内容主要包括生物炼制、生物沼气、生物氢气、生物乙醇、生物丁醇、生物柴油、生物采油、生物燃料电池、煤炭的生物转化、能源的洁净化等方面,为读者展示了能源微生物技术的全貌。本书是一部全面反映可再生能源生物转化的新技术、新材料、新方法、新进展的集理论性和实践性为一体的专著。

本书可以作为生物、环境、能源、生物化工等领域有关科研人员、生产技术人员人员的参考书,也可作为高等院校的生物技术、生物科学、生物工程、生物化工、能源工程、资源利用等专业的研究生、本科生的教学用书。

邮购地址: 北京东黄城根北街16号 科学出版社科学出版中心生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 周文宇 联系电话: 010-64031535 网址: <http://www.lifescience.com.cn>

