

板栗淀粉发酵生产乙醇工艺技术研究

王亚萍, 姚小华, 方学智, 李霞, 任华东

(中国林业科学研究院 亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400)

摘 要:本研究对板栗乙醇发酵的几种主要影响因素进行了研究,并对发酵工艺进行了探讨。实验结果可知,板栗乙醇发酵的较优工艺为:板栗粉碎颗粒大小为 60 目,料水比为 1 : 3.5,液化酶(耐高温 α -淀粉酶)添加量为 20 U/g 原料,液化温度 90℃,液化时间 60 min;糖化酶添加量为 120 U/g,糖化温度 60℃,糖化时间 30 min,糖化 pH 为 5.0;使用酵母为耐高温酿酒高活性干酵母,接种量为 0.02%,发酵温度 30℃,发酵时间 72 h。板栗含有 40%~60%的淀粉,用板栗淀粉发酵生产乙醇,不仅开拓了板栗的应用范围,提高了其经济价值,促进山区的经济发展,也为乙醇生产提供了很好的原料资源,为生物质能源利用提供新的途径与方法。

关键词: 板栗;发酵;乙醇;工艺

中图分类号:S792.670.8 文献标识码:A 文章编号:1001-7461(2009)01-0142-04

Techniques of Ethanol Fermentation by Chestnut Starch

WANG Ya-ping, YAO Xiao-hua, FANG Xue-zhi, LI Xia, REN Hua-dong

(The Research Institute of Subtropical Forestry, CAF, Fuyang, Zhejiang 311400, China)

Abstract: Factors influencing the ethanol fermentation by using chestnut starch were investigated to probe the experimental technology and conditions. The results showed that the optimum conditions of ethanol fermentation by using chestnut starch were as follow: the granule 60 meshes the ratio of chestnut starch to water 1 : 3.5 α -amylase 20 U/g time and temperature of liquefaction:60 min , 90℃ , saccharification temperature and time:60℃ , 30 min, glucoumylase 120 U/g, before saccharification, using sulfuric acid to regulate pH5.0, fermentation temperature 30℃ the quantity of the temperature tolerant active dry yeast 0.02%, and the time of fermentation 72 h. The contents of starch in chestnut fruit ranged from 40% to 60%. The technique not only enlarges chestnut's application, improves its economic value, but also offers the enough materials to produce ethanol, and provides a new approach to the utilization of biomaterial resource.

Key words: chestnut; fermentation; ethanol; technique

板栗(*Castanea mollissima*)俗称栗子,原产我国,是我国著名的干果之一,至今已有 3 000 a 多的栽培历史。近年来我国板栗业发展迅速,目前种植面积约 130 万 hm^2 ,年产量 50 万 t 多,占世界板栗总产量的 1/2 以上,居世界首位^[1]。由于板栗种植面积的不断扩大,产量的急剧增加,加之目前国内板

栗消费形式的单一,导致国内部分板栗产区出现了区域性、阶段性的板栗“过剩”现象。同时,板栗不耐贮藏,每年腐烂变质达 30% 以上^[2],这不仅给国内贮藏加工、销售带来困难,也造成了我国优质板栗资源的严重浪费。因此,开发板栗资源,对板栗进行深加工,具有重要的经济价值和社会意义。

收稿日期:2008-04-15 修回日期:2008-07-21
基金项目:浙江省科技厅重大项目“能源植物种质资源与高能植物品种选育及中试”(2005C12003)中“非木质高生物量能源植物种质资源评价、育种与定向培育技术”子专题。
作者简介:王亚萍,女,硕士,助理研究员,从事经济林产品加工利用技术研究。

乙醇是一种重要的工业原料,其用途非常广泛,目前国内生产乙醇的主要原料为甘薯、小麦、玉米等粮食作物^[3],对粮食的消耗较大,用目前剩余的粮食生产燃料乙醇,只相当于一小部分的石油量,尽管我国粮食基本实现自给,但仍未解决粮食的安全问题。因此,乙醇的生产必须采用非粮食原料或部分使用非粮食原料。板栗果实中的主要成分是淀粉,含量约为 40%~60%^[4],可以作为生产乙醇的原料,若能用来大批量地生产乙醇,将是解决板栗资源过剩的一个重要途径,可以提高板栗的经济价值,促进山区的经济发展。以板栗作为乙醇生产原料在国内还未见有报道,为此,本文就板栗发酵生产乙醇的基本工艺技术进行了试验研究,以期为今后板栗发酵生产乙醇的工业化生产提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 供试材料

板栗(鲜样):由建德市林科所提供;
耐高温 α -淀粉酶(液体):酶活力为 20 000 μ /mL,由江苏无锡杰能科生物工程有限公司——丹尼斯 g 子公司生产;
糖化酶(固体):酶活力 50 000 μ /g,江苏无锡杰能科生物工程有限公司生产;
菌种:安琪牌耐高温酿酒高活性干酵母,由湖北安琪酵母股份有限公司生产。

1.2 试验仪器

梅特勒-托利 AL204 电子天平;HZ-9310KB 立式冷冻摇床;HH. S21-8 数显水浴锅;YXQ-LS-50 灭菌锅;PHS-3C 雷磁酸度计;简易蒸馏装置;FW100 型高速万能粉碎机;Himac CR22E 高速冷冻离心机;723 型分光光度计。

1.3 试验方法

1.3.1 原料处理 板栗脱皮,洗净,先用木棍敲成约 0.5 cm³ 的小块,用粉碎机粉碎至细粉,混合搅拌后使用。
1.3.2 液化 称取 100 g 板栗干粉于 500 mL 烧杯中,按比例往板栗粉中加 70℃ 温水配成浓浆,用玻璃棒不断搅拌,于水浴锅上加热升温至 95℃,加入不同水平用量的 α -淀粉酶进行液化,液化时间为 1 h,加热过程中需补充水分;
1.3.3 糖化 将煮沸的液化醪迅速降温至 60℃,加入浓硫酸调节至所需的 pH 值,再加入不同水平用量的糖化酶进行糖化,糖化时间为 0.5 h,糖化完毕用碘-碘化钾指示剂检验糖化是否完全,转入 1 000 mL 三角瓶灭菌备用;
1.3.4 耐高温活性干酵母的活化 用 38℃ 含糖

5% 的糖水作为活化液,按干酵母:活化液=1:20 的比例加入耐高温活性干酵母,搅拌溶解。活化 20 min 后冷却至 28~30℃ 即可使用。
1.3.5 发酵 将糖化醪降温冷却至 30℃,将一定量的活化好的酵母加入糖化醪中,放入 30℃ 摇床进行发酵,发酵 72 h,取醪液进行各项指标的测定。
1.3.6 蒸馏 按照酒精度的测定方法,蒸馏出酒液,测定乙醇浓度。为防止乙醇挥发,蒸馏时间控制在 30 min 左右。
1.4 指标测定方法
淀粉测定:蒽酮比色法^[5];残总糖和残还原糖:采用菲林试剂滴定法^[6];pH 调整值:用上海精密科学器材厂 pH-3C 计;酸度(以乙酸计):0.1N NaOH 滴定;乙醇浓度:蒸馏比重法^[7]。

2 结果与分析

2.1 原料中粗淀粉含量的测定

原料中淀粉的含量是乙醇工业生产中的重要参数。淀粉含量的高低不仅关系到生产成本,而且还直接影响其他工艺参数。本试验经测定可知板栗干粉中淀粉含量为 64.10%。

2.2 板栗颗粒度对发酵效果的影响

通常情况下,淀粉的颗粒越细,越易于进行液化和糖化,也有利于液化酶和糖化酶的作用;淀粉颗粒过大,单位质量的底物颗粒表面积小,与酶作用的空间小,液化慢且效果差。对不同颗粒大小的板栗淀粉发酵醪液的测定结果可知(表 1),随板栗颗粒度的减小,发酵率和发酵醪的酒精度呈升高趋势,80 目板栗干粉的发酵效果较好,但与 60 目和 100 目颗粒度的醪液酒精度差异不明显,而且 60 目大小的板栗干粉的发酵醪中残总糖含量和酸度均较低,结合实际生产成本,考虑到粉碎度太高,能耗和生产成本增大,而且对粉碎设备的要求也相应提高,不利于实际生产。因此本研究认为板栗淀粉发酵的适合颗粒大小以 60 目为最佳。

表 1 板栗干粉颗粒大小对发酵效果的影响
Table 1 Effect of particle size on fermentation

颗粒度/ 目	酒精度 V/V	残总糖/ (g·L ⁻¹)	残还原糖/ (g·L ⁻¹)	酸度/ %	发酵率/ %
20	9.40	3.81	0.59	0.506	45.80
40	10.50	4.08	0.67	0.523	49.32
60	11.50	3.55	1.13	0.498	54.60
80	11.55	4.54	1.13	0.529	55.28
100	11.54	3.52	0.35	0.518	53.89

2.3 料水比对发酵效果的影响

本研究用不同的料水比进行发酵试验,试验条件为:料水比 1:2.5~4.0,液化酶加入量为 20 U/

g,糖化酶加入量 160 U/g,糖化 pH 4.0,干酵母接种量为板栗干粉重量的 0.05%。如表 2 所示,加水量对发酵结果有重要的影响,适合的料水比是获得最佳工艺条件的前提。为避免原料利用不完全,常常增大加水量,但是加水量也不能无限增大,因为加水量的增加不可避免地造成成熟发酵醪液中的酒精含量降低,增大了蒸馏的能耗,醪液中残总糖和残还原糖含量也开始增大。通过试验可看出,随加量的增大,醪液的酒精度增大,发酵率升高,残总糖含量降低,料水比为 1:3.5 时发酵醪液的酒精度最高,淀粉发酵率也最高,残还原糖和残总糖的含量最低,酸度也较低,说明料水比为 1:3.5 时最有利于板栗淀粉的发酵。这可能是底物、产物浓度对酶和酵母的抑制造成的,淀粉浓度愈高,葡萄糖的浓度也相应增高,当葡萄糖浓度增大到一定程度时,对发酵和呼吸作用均产生抑制作用,甚至抑制酵母生长,不会产生酒精^[8]。

表 2 加水量对发酵效果的影响

Table 2 Effect of the ratio of water on fermentation					
加水倍数	酒精度 V/V	残总糖/ (g·L ⁻¹)	残还原糖/ (g·L ⁻¹)	酸度/ %	发酵率/ %
1:2.5	11.60	10.09	4.32	0.996	56.60
1:3.0	13.60	5.04	1.45	0.855	74.44
1:3.5	14.50	3.16	0.76	0.634	79.42
1:4.0	8.25	4.24	1.16	0.477	37.56

2.4 液化酶添加量对板栗发酵效果的影响

耐高温 α-淀粉酶是由地衣芽孢杆菌经液体深层发酵提炼而成,它是一种内切酶,能水解淀粉分子中的 α-1,4 糖苷键,最终产物主要是糊精和低聚糖,经 α-淀粉酶作用后,含淀粉的料液粘度迅速下降。在淀粉的水解过程中,首先采用 α-淀粉酶进行液化,以利于淀粉的进一步降解,有利于下一步糖化酶的作用。α-淀粉酶的作用效果与其添加量密切相关。如表 3,添加 20 U/g 耐高温 α-淀粉酶时发酵率最高,达 66.12%,发酵醪液的酒精度达 13.7%,其次是 30、40、10 U/g,醪液酸度的变化趋势与酒精度变化基本一致,残总糖和还原糖含量的变化趋势也基本一致,均是在添加 20 U/g 耐高温 α-淀粉酶时,发酵醪中总糖和还原糖的含量相对最低,说明其发酵效果最好^[9]。根据酶促反应速率与底物浓度的关系,当底物达到一定浓度时其反应速率最大,而超过这一浓度时期速率不再改变^[10]。本试验结果表明,板栗淀粉发酵较适合的耐高温 α-淀粉酶添加量以 20 U/g 为佳。

2.5 糖化条件对板栗发酵效果的影响

2.5.1 糖化酶的添加量对板栗发酵效果的影响
糖化酶在板栗淀粉发酵中有很大的作用,由于酵母

自身没有淀粉酶系统,不能直接利用淀粉,糖化酶可以将板栗中的淀粉分解为可发酵性糖,以供酵母发酵成酒精。糖化酶的用量对酒精发酵程度有很大影响,糖化酶用量太少,会造成发酵不彻底;用量过多,则增加了生产成本。由表 4 可知,添加 80 U/g 糖化酶时,发酵醪液的酒精度和淀粉发酵率均为最低,分别为 12.65%和 55.52%,在 120 U/g 时,发酵率达 66.32%,醪液的酒精度较高,为 14.40%,醪液中残总糖和残还原糖的含量最低,分别为 3.99 g/L 和 0.95 g/L,酸度也较小;当糖化酶添加量增加到 200 U/g 时,发酵率最高,达 68.40%,醪液的酒精度达最大值 14.45%,但与添加 120 U/g 时的酒精度差异不明显,残总糖和残还原糖的含量略高于 120 U/g 的发酵结果,但酸度最低。结合考虑生产的经济成本,可以得出 120 U/g 为板栗淀粉发酵的适合糖化酶添加量。

表 3 液化酶用量对发酵效果的影响

Table 3 Effect of the dosage of α-amylase on fermentation					
耐高温 α-淀粉酶用量 U/g	酒精度 V/V	残总糖/ (g·L ⁻¹)	残还原糖/ (g·L ⁻¹)	酸度/ %	发酵率/ %
10	10.70	5.08	1.05	0.562	49.92
20	13.70	3.87	0.93	0.621	66.12
30	11.70	5.75	1.74	0.526	56.36
40	11.30	6.00	1.75	0.529	51.68

表 4 糖化酶添加量对发酵效果的影响

Table 4 Effect of the dosage of glucoumylase on fermentation					
糖化酶 添加量/ U/g	酒精度 V/V	残总糖/ (g·L ⁻¹)	残还原糖/ (g·L ⁻¹)	酸度/ %	发酵率/ %
80	12.65	4.30	1.06	0.467	55.52
120	14.40	3.99	9.50	0.464	66.32
160	13.40	4.69	1.18	0.461	58.72
200	14.45	4.15	1.12	0.451	68.40

表 5 pH 值对发酵效果的影响

Table 5 Effect of different pH on fermentation					
pH 值	酒精度 V/V	残总糖/ (g·L ⁻¹)	残还原糖/ (g·L ⁻¹)	酸度/ %	发酵率/ %
3.5	12.70	6.01	1.59	0.579	57.84
4.0	11.30	6.37	1.66	0.507	52.52
4.5	12.35	6.33	1.82	0.371	57.48
5.0	13.40	6.40	1.60	0.192	69.28

2.5.2 糖化 pH 值对板栗发酵效果的影响
适合的 pH 不仅能使酵母菌处于较佳生长状态,而且使糖化酶的有效酶活力提高。随 pH 的增大,淀粉的发酵率和发酵醪液的酒精浓度总体呈升高趋势,在 pH 5.0 时达最大值,明显高于其它处理。从残糖指标来看,4 种 pH 值的糖化处理无明显差异,残总糖含量均略微高于 6.0 g/L,在 6.0~6.5 g/L 之间,从发酵醪的酸度指标看,pH 5.0 处理发酵醪液的酸

度明显低于其他 3 个 pH 处理。由此可知,pH5.0 是适合板栗淀粉糖化发酵的适合 pH。

2.6 接种量对板栗发酵效果的影响

经液化、糖化处理,大部分的淀粉已被水解为可发酵性糖。在酵母的作用下,可发酵性糖进一步糖化成为乙醇和 CO₂。酵母的添加量也是发酵的一个重要因素,接种量过小,发酵不能顺利进行;接种量过大,会造成酵母繁殖速度减慢,活性降低,此外,酵母的增殖需要原料,这也会降低原料的发酵率。由表 6 可见,耐高温酿酒高活性干酵母接种量越大,发酵效果越好,在接种量为板栗淀粉原料重量的 0.20%时,淀粉发酵率和发酵醪液的酒精度最高,残总糖和残还原糖含量与其他处理差异不明显,酸度最低,为 0.340%。这一结果与前人的研究结果一致。由此可见,用安琪牌耐高温酿酒高活性干酵母对板栗淀粉进行发酵,最适接种量为板栗淀粉原料的 0.20%。

表 6 接种量对发酵效果的影响

Table 6 Effect of different inoculation dosages of yeast on fermentation

接种量/ %	酒精度 (V/V)	残总糖/ (g·L ⁻¹)	残还原糖/ (g·L ⁻¹)	酸 度/ %	发酵率/ %
0.05	10.85	5.51	1.54	0.485	51.08
0.10	9.10	6.51	1.68	0.503	40.52
0.15	12.00	5.76	1.49	0.418	56.30
0.20	12.30	5.69	1.64	0.340	57.28

2.7 乙醇的蒸馏和精馏

发酵完毕的成熟醪经过过滤、蒸馏得到粗乙醇,其中包括一些杂质,乙醇浓度在 10%左右,必须进行重蒸馏,经过重蒸馏可得到浓度 70%以上的乙醇。

3 结论

板栗淀粉发酵生产乙醇的较佳技术参数为:板栗粉碎颗粒大小为 60 目,料水比 1:3.5,液化酶(耐高温 α-淀粉酶)添加量为 20 U/g 原料,液化温度 90℃,液化时间 60 min;糖化酶添加量为 120 U/g 原料,糖化温度 60℃,糖化时间 30 min,糖化 pH 5.0;使用的酵母为耐高温酿酒高活性干酵母,接种量为原料的 0.02%,发酵温度 30℃,发酵时间 72 h。

我国大量生产乙醇需要解决原料问题,基于我国目前原油紧缺的现状,如果有 20%由燃料乙醇替

代,则需要 6 000 万 t 的粮食用于生产乙醇。近年来,农业发展使我国有部分粮食剩余,采用粮食(主要是玉米和战备陈粮大米)发酵法生产乙醇作为车用燃料,可以消耗一定量的陈粮。但是,值得注意的是,我国人口众多,人均耕地面积较少,粮食剩余只是暂时现象。由此可见,我国大力发展燃料乙醇就必须寻找更丰富的可再生资源——生物质资源作为燃料乙醇的生产原料。综合我国的国情和生物质资源状况考虑和分析,一个可行的方案就是有选择性地 在 一些 不 适宜 种植 高产 粮食 作物 的 地区,因地制宜通过发展高产、高淀粉、耐旱、耐盐碱的含淀粉代粮或含糖作物作为生产燃料酒精的主要原料。因此,通过板栗淀粉发酵生产乙醇的方法,符合我国的国情和资源状况,可以综合解决国家石油短缺、粮食过剩及环境恶化三大热点问题,为生物质能源利用提供新的途径与方法,也有利于开拓板栗等木本粮食产品的应用范围,对我国的农业、能源、环保、交通、财政诸方面将起到积极的推动作用,经济效益和社会效益非常显著,开发应用前景广阔。

参考文献:

[1] 谢士兰,吴雪辉. 板栗深加工中淀粉的酶水解研究[J]. 食品科学, 2003,24(10):62-65.

[2] 茅林春. 板栗加工的技术难题及其对策[J]. 食品科技,2000 (1):24-25.

[3] Mural T, Yoshlno T, Ueda M, *et al.* Evaluation of the function arming yeast displaying glucoamylase on its cell surface by direct fermentation of corn to ethanol[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering. 1998,86(6): 569-572.

[4] 徐志祥,高绘菊. 板栗淀粉特性研究进展[J]. 食品研究与开发, 2004,25(6): 6-8.

[5] 邹琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京:中国农业出版社, 2000:110-114.

[6] 韩雅珊. 食品化学实验指导[M]. 北京:中国农业大学出版社,1996:23.

[7] 天津轻工业学院,大连轻工业学院,无锡轻工业学院,等. 工业发酵分析[M]. 北京:中国轻工业出版社,1994.

[8] 章克昌. 酒精与蒸馏酒工艺学[M]. 北京:中国轻工业出版社,2004:99-104.

[9] Reddy O V S, Basappa S C. Direct fermentation of cassava starch to ethanol by mixed cultures of *Endomycopsis fibuligera* and *zymomonas mobilis*: synergism and limitations[J]. Biotechnology Letters. 1996, 18(11): 1315-1318.

[10] 李祥,吕嘉杨. 生料酿酒工艺技术研究[J]. 酿酒科技,2002 (6):42-44.