

苹果渣固态酒精发酵工艺研究*

马艳萍¹, 马惠玲¹, 陈长友², 杜宏强³

(1 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100; 2 西北农林科技大学 成教学院, 陕西 杨凌 712100;

3 陕西恒兴果汁有限公司, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 以鲜苹果渣为原料, 利用单因素试验选择苹果渣固态酒精发酵的工艺参数。结果表明, 最佳菌种为混合野生苹果酵母 YA + YC, 适宜发酵时间为 5 d; 纤维素酶的最佳用量为每克苹果渣添加 0.333 4 μmol/s, 最佳酶解时间为 6 h, 在此酶解条件下, 与对照相比, 原料还原糖净增率为 27.7%; 发酵的适宜温度为 25℃; 采用果胶酶、淀粉酶与纤维素酶共同预处理时效果最好, 苹果渣的乙醇产率达 65 mL/kg。

[关键词] 苹果渣; 酒精发酵; 发酵工艺

[中图分类号] TS261.4⁺3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)11-0081-04

我国是世界上最大的苹果生产国, 近年来年总产量已达 2 201 万 t, 占世界总产量的 1/3 以上。随着苹果产量的增加, 苹果采后加工业得到了长足的发展, 由此产生的工业垃圾——苹果渣的数量亦逐年上升。由于苹果渣富含碳水化合物等有机物质^[1,2], 是饲料、发酵工业、固态培养基等的良好原料。国内外在用苹果渣制备果胶^[3-6]、生产柠檬酸^[7-9]、做食用菌培养基^[10,11]等方面均进行了深度开发, 但尚未达到产业化生产要求, 苹果渣的利用在生产中至今仍然是一个亟待解决的问题。本研究探讨了苹果渣固态酒精发酵的工艺条件, 以期在生产上开辟一条新的、可行的苹果渣利用途径, 推动其综合利用的产业化进程。

1 材料与方法

1.1 材料

鲜苹果渣: 分别于 2002 和 2003 年 9 月上旬从陕西恒兴果汁有限公司眉县分公司取材。

酵母菌: 1450 葡萄酒酵母, 由西北农林科技大学葡萄酒学院提供; 野生苹果酒酵母 YA, YB, YC 为本实验室自苹果皮表面分离筛选。

果胶酶及淀粉酶均为丹麦 NOVO 公司产品; 纤维素酶为陕西省酶研究中心的固态制剂产品。

1.2 仪器与设备

WYT-32 型手持糖度计, MC 型 0~40 酒精计, 蒸馏装置, 250D 恒温光照培养箱。

1.3 工艺流程

酵母 活化 扩大培养

果渣(1~2 mm) 糖化处理 冷却, 调 pH 接种 发酵 蒸馏

1.4 试验方法

1.4.1 不同预处理对苹果渣糖化效果的影响

(1) 热处理。称取 100 g 鲜苹果渣若干份, 调 pH 值至 5.0 左右, 分别进行以下 3 种处理: I. 未进行热处理; II. 常压蒸煮处理 30 min; III. 高压灭菌 30 min。然后加入占苹果渣质量分数 0.1% 的果胶酶, 在 50℃ 培养箱中作用 2 h, 再加入占苹果渣质量分数 0.1% 的淀粉酶继续保温 4 h, 测定还原糖含量。

(2) 不同酶解时间试验。称取 100 g 鲜苹果渣若干份, 按每克苹果渣 0.333 4 μmol/s 加入纤维素酶, 用柠檬酸或碳酸氢钾调酸度至适于酶作用的范围 (pH 4.5~5.5), 在 50℃ 下分别酶解 4, 6, 8, 12, 18, 24 h, 测定还原糖含量。(3) 不同酶用量试验。称取 100 g 鲜苹果渣若干份, 常压蒸煮 30 min 后, 调 pH 至 5.0 左右, 每克苹果渣分别添加 0.166 7, 0.250 1, 0.333 4, 0.500 1, 0.666 8 μmol/s 纤维素酶, 密封后于 50℃ 下酶解 6 h, 测定还原糖含量。

1.4.2 固态发酵工艺及参数的确定

(1) 菌种的活化及扩大培养。将原菌种于无菌操作间中移植到灭菌后的 PDA 培养基的试管斜面上, 塞上棉塞, 在 (28±2)℃ 培养 3 d 左右, 将其接入灭菌后装有果汁的试管中进行一级扩大, 培养 20~24 h, 使酵母

* [收稿日期] 2003-10-20

[作者简介] 马艳萍(1976-), 女, 陕西兴平人, 在读硕士, 主要从事苹果渣利用研究。

密度达到 10^7 mL^{-1} 以上。接种量大时, 再于三角瓶中以 10 倍果汁进行二级扩大, 继续培养 20~ 24 h, 酵母密度增长至 10^7 mL^{-1} 时, 用于发酵接种。

(2) 发酵。A. 不同菌种的发酵试验。每处理投入 500 g 鲜苹果渣, 加入占苹果渣质量分数 0.1% 的果胶酶, 在 50 ℃ 培养箱中作用 2 h, 再加入占苹果渣质量分数 0.1% 的淀粉酶继续保温 4 h, 冷却后用柠檬酸或碳酸氢钾调节酸度至适于酵母作用而又能抑制杂菌滋生的 pH 值范围 (pH 3.3~ 3.5), 最后分别将培养好的葡萄酒酵母 1450, 野生苹果酒酵母 YA, YB, YC 及 YA+1450, YA+YB, YB+1450, YA+YC, YC+1450 酵母组合 50 mL/kg 接入其中, 发酵环境温度调至 25 ℃, 发酵至所需天数时终止。B. 不同温度的发酵试验。每处理投入 5 kg 鲜苹果渣, 根据选出的最佳参数加入纤维素酶, 在 50 ℃ 的培养箱中酶解 6 h, 冷却后调 pH 值至 3.3~ 3.5, 再接入培养好的 YA+YC 菌种 50 mL/kg, 置培养箱内在 15, 20, 25, 30, 35, 40 ℃ 下, 于瓷坛中发酵至 5 d 时终止。C. 不同酶作用的发酵试验。根据选出的纤维素酶最佳参数和其他酶产品建议的作用参数, 分别设 0.1% 果胶酶, 0.1% 果胶酶+0.1% 淀粉酶, 0.1% 果胶酶+0.1% 淀粉酶+0.333 4 $\mu\text{mol/s}$ 纤维素酶 3 个处理, 每处理投入 5 kg 鲜苹果渣, 再接入培养好的 YA+YC 菌种 50 mL/kg, 在 25 ℃ 下于瓷坛中发酵至 5 d 时终止。

1.4.3 蒸馏 将发酵好的苹果渣进行常压蒸馏, 测定酒精度。

1.4.4 测定方法 酒精产率测定: 从每份发酵后的酒醪中取出相当于投 100 g 鲜苹果渣所得的酒醪,

加 150 mL 蒸馏水, 于烧瓶中常压蒸馏, 收集馏出液准确定容至 100 mL, 测定酒精度, 换算为每 kg 苹果渣生成的乙醇量 (mL/kg)。

还原糖含量采用斐林试剂法测定^[12]。

2 结果与分析

2.1 不同热处理对鲜苹果渣糖化的影响

热处理是利用水蒸汽的热能使鲜苹果渣中的淀粉质吸水膨胀破裂, 使酶充分作用, 增加还原糖的转化率, 同时可以把原料中的杂菌杀死, 以利于发酵。酶处理后, 3 种处理的鲜苹果渣中还原糖分别为 88.8, 103.7 和 102.6 g/kg。可见, 3 种热处理方式中, 处理 II, III 的效果均优于处理 I, 以处理 II (即常压蒸煮 30 min) 的效果最好。

2.2 纤维素酶酶解工艺条件对苹果渣酒精发酵的影响

纤维素是植物细胞壁的主要成分, 是鲜苹果渣中储藏量较高的植物多糖物质之一。以干物质计, 苹果渣粗纤维含量达到 16.8 g/kg^[2]。用纤维素酶能将苹果渣中的纤维素有效转化为可发酵性糖(糖化), 有利于提高苹果渣发酵乙醇的产率。而纤维素酶作用的时间与添加量不同, 将会影响生产成本和糖化效果。

由表 1 可以看出, 用相同量的纤维素酶酶解 6 h 时, 苹果渣还原糖含量的净增率最大, 为 27.70%。随酶解时间的延长, 还原糖含量呈下降趋势。至 24 h 时, 还原糖含量低于未经酶处理的对照。可见, 酶解时间过长, 苹果渣中的还原糖又会有所降解, 因此, 试验中纤维素酶酶解的最佳时间为 6 h。

表 1 纤维素酶酶解时间对苹果渣还原糖含量的影响

Table 1 Effect of the enzymolysis time on the concentration of reducing sugar

酶解时间/h Enzymolysis Time	还原糖/(g · kg ⁻¹) Reducing sugar concentration	与对照比还原糖增量/(g · kg ⁻¹) Increase of reducing sugar than control	净增率/% Net increase rate
0	76.74	-	-
4	95.89	19.15	24.95
6	98.00	21.26	27.70
8	97.22	20.48	26.69
12	95.11	18.37	23.94
18	91.56	14.82	19.30
24	76.42	-0.32	-

由表 2 可以看出, 在酶解时间均为 6 h 条件下, 随纤维素酶用量的增加, 苹果渣还原糖含量亦增加, 加酶量为 0.333 4 $\mu\text{mol/s}$ 时, 还原糖净增率最大,

为 27.70%。酶用量继续增大时, 还原糖含量增加不明显。因此, 确定纤维素酶的最佳用量为 0.333 4 $\mu\text{mol/s}$ 。

表 2 纤维素酶用量对苹果渣还原糖含量的影响

Table 2 Effect of the amount of cellulase on the concentration of reducing sugar

纤维素酶用量/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$) Enzymatic concentration	还原糖/($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) Reducing sugar concentration	与对比还原糖增量/($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) Increase of reducing sugar than control	净增率/% Net increase rate
0	76.74	-	-
0.1667	90.11	13.37	17.42
0.2501	91.67	14.93	19.46
0.3334	98.00	21.26	27.70
0.5001	97.22	20.48	26.69
0.6668	98.00	21.26	27.70

2.3 菌种及发酵期对苹果渣酒精发酵的影响

由表 3 和图 1 可见, 单菌种用于苹果渣发酵时, 乙醇产率高峰均出现于第 5 天, 以 1450 表现最好, 但与 YC 差异不大。第 7 天开始降低, 以后随时间延长, 下降更加显著。从发酵醪的气味可以闻出, 5 d 后酸味加重, 且很刺鼻, 说明后期乙醇被氧化变酸, 导致其含量下降。复合菌种中, 乙醇产率也于第 5 天达到最大, 菌种以 YA + YC 的效果最突出, 乙醇产率为 53 mL/kg, 比单菌种中表现最好的 1450 提高 7.80 mL/kg。因此, 确定苹果渣的最佳发酵菌种为野生苹果复合酵母 YA + YC, 最适发酵期为 5 d。

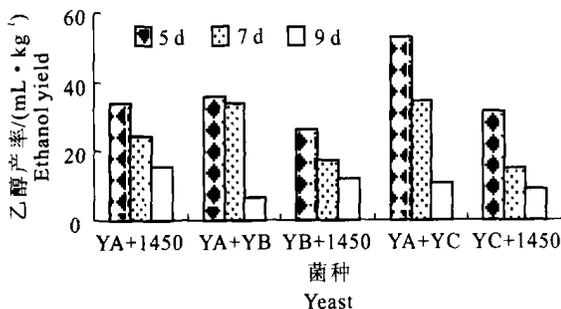


图 1 复合菌种在不同发酵期内对乙醇产率的影响

Fig. 1 Effects of different compound-yeast on the yield of ethanol during different fermentation period

表 3 不同单菌种在不同发酵期内对乙醇产率的影响

Table 3 Effect of different single yeast on the yield of ethanol during different fermentation

发酵时间/d Time of yeast	乙醇产率 Yield of ethanol mL/kg			
	YA	YB	YC	1450
3	22.00	-	18.62	-
5	28.30	27.88	41.14	45.20
7	22.90	25.56	26.64	9.81
9	2.87	5.00	2.07	4.20

2.4 温度对苹果渣酒精发酵的影响

温度是影响发酵的一个关键因素。温度过低, 在

规定时间内发酵不彻底, 温度过高, 则抑制酵母作用的发挥或使酵母的副产物增多, 导致酒精纯度不高, 因而在利用苹果渣进行酒精发酵时, 发酵温度的控制也是非常重要的。以选出的 YA + YC 菌种组合, 0.3334 $\mu\text{mol/s}$ 纤维素酶和作用 6 h 为基准, 进行酒精发酵, 结果见图 2。从图 2 可以看出, 在 15~ 25 时, 乙醇产率呈上升趋势; 25~ 40 时, 乙醇产率呈下降趋势。环境温度为 25 时乙醇产率最高, 达到 49 mL/kg。

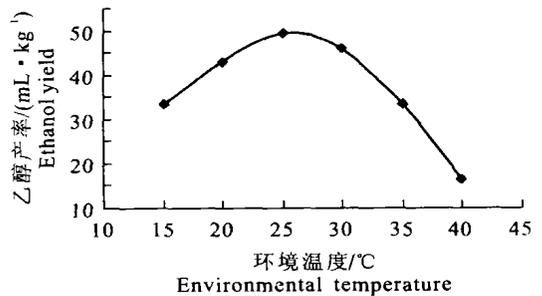


图 2 环境温度对乙醇产率的影响

Fig. 2 Effect of different environmental temperature on the yield of ethanol

2.5 不同酶处理对苹果渣酒精发酵的影响

苹果渣中富含果胶、纤维素及淀粉质, 为使酒精发酵完全, 在预处理中采用多种酶作用于苹果渣。结果表明, 0.1% 果胶酶, 0.1% 果胶酶+ 0.1% 淀粉酶, 0.1% 果胶酶+ 0.1% 淀粉酶+ 0.3334 $\mu\text{mol/s}$ 纤维素酶处理时, 乙醇产率依次提高, 分别达到 45.4, 53.0 和 65.0 mL/kg, 均优于不加酶的对照 (37.6 mL/kg)。表明酶的加入促进了多糖糖化, 提高了乙醇产率。

3 结论与讨论

1) 本研究直接利用鲜苹果渣进行酒精发酵, 主产品苹果渣蒸馏酒有望实现商业化生产, 副产品酒糟可以用作饲料, 不仅有效地解决了果渣对环境的污染问题, 又能充分利用资源, 大大增加苹果的附加

值,是解决废弃果渣出路的一条重要途径,具有重要的经济及社会效益。

2) 根据试验结果确定苹果渣固态酒精发酵的工艺参数为:最佳菌种 YA + YC,最适发酵期 5 d;纤维素酶最佳用量为每克苹果渣 $0.3334 \mu\text{mol/s}$,最适作用时间 6 h;发酵最适环境温度为 25°C ;果胶酶、淀粉酶和纤维素酶均可提高乙醇产率,且三者共同作用效果最好。

3) 在果实类原料酒精发酵时,一般都用葡萄酒酵母^[13]。本研究筛选出在苹果渣上乙醇产率显著高于其他菌株或菌株组合的酵母组合 YA + YC,使乙

醇产率达到 53 mL/kg 。由于 YA, YC 是直接由苹果表皮分离的,因此,本研究为苹果渣高效酒精发酵和保持蒸馏酒产品的苹果风味选定了优良菌株。

4) 本研究结果表明,果胶酶、淀粉酶、纤维素酶共同作用后发酵,鲜苹果渣的乙醇产率达到 65 mL/kg ,比无酶处理提高 72.9% ,比文献报道的无酶产率 $29.7\sim 45.54 \text{ mL/kg}$ ^[14]提高 $42.7\%\sim 118.9\%$,说明酶预处理对增加苹果渣乙醇产率的作用突出,具有很强的实用价值。但由于有些酶制剂的价格昂贵(如纤维素酶),在生产中应视投入产出比的大小,酌情选用。

[参考文献]

- [1] 杨福有,祁周约,李彩凤,等. 苹果渣的营养成分分析及饲用价值评估[J]. 甘肃农业大学学报, 2000, (3): 340- 344
- [2] 李彩凤,杨福有. 苹果渣的营养成分及利用[J]. 饲料博览, 2001, (2): 38
- [3] Kong Z, Liu Z D, Chen S T. Study on the extraction of pectin from apple pomace with microwave[J]. Journal of Zhengzhou Gram College, 2000, 21(2): 11- 15.
- [4] 邓红,宋纪蓉,史红兵. 盐析法从果渣中提取果胶的工艺条件研究[J]. 食品科学, 2002, 23(3): 57- 60
- [5] 陈雪峰,詹雪英,杨大庆. 苹果渣中提取果胶工艺研究[J]. 食品工业科技, 2000, 21(3): 19- 20
- [6] 邓红,张宝善,李小平. 从苹果渣中提取食用纤维和果胶的研究[J]. 食品科技, 2002, (5): 62- 63
- [7] 吴怡莹,张苓花. 以苹果渣为原料固态发酵生产柠檬酸的研究[J]. 大连轻工业学院学报, 1994, (2): 72- 77.
- [8] Shaojaosadati S A, Babaeipour V. Citric acid production from apple pomace in multi-layer packed bed solid-state bioreactor[J]. Process Biochemistry, 2002, 37(8): 909- 914
- [9] 李文哲,宋纪蓉,张小里. 苹果渣酶解制备柠檬酸[J]. 应用化学, 2000, (5): 547- 549
- [10] 黄清荣,辛晓林,卜庆梅,等. 白平菇液体菌种最佳培养料的选择[J]. 江苏农业科学, 2003, (3): 79- 80
- [11] 杨福有,李彩凤. 利用鲜果渣生产平菇试验[J]. 陕西农业科学, 2002, (5): 23- 24
- [12] 邓毓芳. 经济林产品利用及分析[M]. 北京: 中国林业出版社, 1988 221- 228
- [13] 苏刚. 山楂白兰地的研制[J]. 食品工业, 1999, (4): 24- 25
- [14] Ngadi M O, Correia L R. Solid state ethanol fermentation of apple pomace as affected by moisture and bioreactor mixing speed[J]. Journal of Food Science, 1992, 57(3): 667- 670

Study on the ethanol fermentation of apple pomace

MA Yan-ping¹, MA Hui-ling¹, CHEN Chang-you², DU Hong-qiang³

(1 College of Forestry, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 College of Adult Education, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

3 Shaanxi Hengxing Fruit Juice Co. Ltd., Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In this paper, the technology of ethanol producing from fresh apple pomace was studied by single factor experiment. The result showed the optimal strain and time for solid fermentation were the combination of the wild apple yeasts YA and YC and 5 d respectively. The optimal enzymatic concentration and enzymatic time of cellulase were $0.3334 \mu\text{mol/s}$ per gram apple pomace and 6 h. Under above enzymatic condition, net increase rate of reducing sugar reached 27.7% than the contrast. The environmental temperature was 25°C . In addition, the result was the best when pectase, diastase and cellulase were used simultaneously. The yield of ethanol could reach 65 mL/kg .

Key words: apple pomace; alcohol fermentation; fermentation technology