

# 固定化酵母发酵糖化醪生产酒精及其动力学研究

钟光祥

(浙江省化工研究院轻化室, 杭州 310014)

李祥麟

(浙江工学院化工系, 杭州 310032)

**摘要** 以糖化醪为底物, 对其增殖固定化酵母和固定化连续酒精发酵的特征进行了研究。根据实验数据, 通过拟合, 得出了在此条件下较佳的发酵动力学模型及其动力学参数。

**关键词** 淀粉质糖化醪; 固定化酵母; 酒精发酵

现行的淀粉质原料酒精发酵, 仍然沿用传统的游离酵母间歇发酵工艺, 生产能力很低。因此, 酒精发酵工艺的改进已势在必行。在众多的改进方法中最有前途的方法之一, 就是采用固定化酵母发酵。目前国内外对于固定化酵母酒精发酵的研究, 一般以葡萄糖作为底物<sup>[1-16]</sup>, 与酒精工业实际所用的原料差距较远。本文报道以淀粉质原料糖化醪为底物, 研究固定化酵母连续酒精发酵的特性及其动力学模型。

## 材料与amp;方法

### 1 材料

菌种: K 酵母, 属啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*), 由杭州长征化工厂提供。

固定化材料: 海藻酸钠, CP, 上海化学试剂分装厂。

糖化醪: 将取自杭州长征化工厂的薯干原料糖化醪或玉米糖化醪, 在 58—62℃ 下继续糖化一段时间, 使其初始糖化率在 95% 左右, 真空过滤除去固体杂质。

### 2 分析方法

酒精含量: 用 SP2305E 型气相色谱仪测得。

糖含量分析: 总糖和还原糖含量的测定, 均采用以 Lane-Eynon 法为基础的反滴定法。

酵母细胞计数: 采用血球计数板法, 并用次

甲基蓝染色, 检测细胞活性。

固体含量的测定: 准确称取一定量的发酵液或发酵成熟液, 置于 120℃ 的鼓风干燥箱中, 干燥至恒重。

### 3 醪液组成

葡萄糖增殖液 (g/L): 葡萄糖 50—80, 蛋白胨 3, 尿素 2, 酵母膏 3, CaCl<sub>2</sub> 5, NaCl 1, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5, 柠檬酸 3, pH 2, 高温杀菌。

糖化醪增殖液 (g/L): 总糖 50—80, 蛋白胨 3, 尿素 2, 酵母膏 3, CaCl<sub>2</sub> 5, NaCl 1, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5, 柠檬酸 3, pH 4。

发酵液: 玉米糖化醪 + CaCl<sub>2</sub> 5g/L, pH4; 或薯干糖化醪 + CaCl<sub>2</sub> 5g/L + 尿素 0.5g/L, pH4。

4. 增殖与发酵主反应器: 采用玻璃质柱式反应器。小径玻璃管, 中间设有取样口, 下部设有排渣口和固定档板用的刺。

5. 固定化酵母的制备: 将用米曲汁培养 24 小时, 处于对数生长期的 K 酵母细胞液离心分离、洗涤, 与经高温杀菌的海藻酸钠溶液混匀, 制成含海藻酸钠 40—60g/L、酵母浓度为  $3 \times 10^7 - 1 \times 10^8$  个/ml 的酵母液。静置一段时间后, 于室温下压注到已杀菌处理的 20g/L CaCl<sub>2</sub> 溶液中钙化, 即得到直径为 4—5mm 的球形颗粒。

1992-12-22 收稿

6. 固定化酵母的增殖：在两根相同的增殖柱中装入同体积同性质的固定化酵母颗粒，分别通入糖化醪增殖液或葡萄糖增殖液，并在同一套恒温系统中进行增殖对比试验。

表1 增殖对比试验之增殖试验

反应器	增殖液	增殖温度 (C)	增殖液流量 (ml/h)	初始酵母浓度 (个/ml-gel)	增殖 54h 时酵母浓度 (个/ml-gel)
1 <sup>#</sup>	糖化醪	23—25	60	$9.17 \times 10^7$	$5.8036 \times 10^8$
2 <sup>#</sup>	葡萄糖	23—25	55	$9.17 \times 10^7$	$6.6317 \times 10^8$

从表1中可以看出，应用糖化醪增殖液同样能够增殖固定化酵母，只是增殖的速度稍慢于葡萄糖增殖液（约慢1/8）。由此推断，如果适当延长增殖时间或适当改变增殖液中的组份

配比，用糖化醪增殖固定化酵母是有可能的。

将上述1<sup>#</sup>、2<sup>#</sup>两组已增殖的固定化K酵母，在相同的条件下，用于薯干糖化醪发酵。

表2 增殖对比试验的发酵试验

反应器	进料总糖 (g/L)	糖化率 (%)	流量 (ml/h)	温度 (C)	酒精浓度 (g/L)
1 <sup>#</sup>	120.166	87.41	56	33—35	44.493
2 <sup>#</sup>	120.166	87.41	56	33—35	44.051

从表2中可以看出，经糖化醪或葡萄糖增殖液增殖的固定化K酵母具有几乎相同的发

酵性能。经过较长时间的发酵试验，两组反应器中的固定化K酵母浓度见表3。

表3 不同发酵时间的酵母浓度 ( $\times 10^{12}$ 个/L-gel)

反应器 \ 时间 (d)	1	8	20	25	30	38
1 <sup>#</sup>	0.5804	0.9353	1.2073	1.4141	1.3014	1.7985
2 <sup>#</sup>	0.6632	0.8219	1.3639	1.4167	1.2639	1.7379

发酵进行到第32天时，重新对酵母进行增殖。发酵进行到第41天时，因工厂停工而停止了本次发酵实验。此时固定化酵母的发酵情况仍良好，机械强度也较好。从表3中可以看出，尽管起初的酵母浓度有差别，但经过一段时间的发酵，两组的酵母浓度已趋于接近。由此推断，用糖化醪增殖液来增殖固定化酵母是可行的。

流量通入发酵柱进口，自下而上地通过已增殖的固定化K酵母床层。控制发酵温度为33—35℃。定期检测酒精浓度和固定化酵母浓度。

我们选取几个较为常见的酒精发酵动力学模型。根据表4的实验数据，采用麦夸脱非线性最小二乘法来拟合动力学模型参数，并计算其模型相对误差的绝对平均值 $\eta$ 。通过 $\eta$ 拟合精度值，来确认本发酵的合适动力学模型。

由于在发酵试验中，进料多糖的浓度低、停留时间短，使出料与进料的多糖含量相差无几。在这种情况下，多糖的水解量可以忽略。故在

### 结果与讨论

用电子蠕动泵将糖化醪发酵液按所要求的

拟合的动力学模型中, 不考虑多糖的水解。

底物浓度进行拟合, 结果如表 5。

根据表 4 的实验数据, 将还原糖浓度作为

表 4 玉米糖化发酵液

空时 (h)	进料还原糖浓度 (g/L)	进料总糖浓度 (g/L)	糖化率 (%)	固定化酵母浓度 (10 <sup>12</sup> 个/L)	酒精浓度 (g/L)
0.7162	114.368	118.364	96.62	1.0747	28.409
0.9716	109.656	115.518	98.33	1.1876	32.779
1.1894	103.481	106.602	97.07	0.9761	36.722
1.3700	115.946	119.996	96.62	0.9436	39.197
1.3905	99.712	104.373	95.53	1.0109	40.163
1.7083	103.481	106.602	97.07	1.1781	41.507
1.8873	109.656	115.518	98.33	1.2391	44.594
1.9493	115.946	119.996	96.62	1.0379	45.126
2.1864	132.492	136.774	96.87	1.0458	51.324
2.2619	128.351	130.349	98.47	1.1357	50.236
3.0897	132.492	136.774	96.87	1.2402	57.481
3.1761	132.492	136.774	96.87	1.0807	53.171
2.4039	132.492	136.774	96.87	1.2712	58.512

表 5 6种拟合模型比较

序号	模型	拟合值	精度值 (η)
1	$-r_s = \frac{Xv_m S}{k_m + S + S^2/K_{is}} \cdot \frac{K_{ip}}{K_{ip} + P}$ $r_p = Y_{p/s} (-r_s)$	$v_m = 197.04$ $K_m = 69.00$ $K_{is} = 1059.5$ $K_{ip} = 31.64$	6.69%
2	$-r_s = \frac{Xv_m S}{K_m + S} \cdot \frac{K_{ip}}{K_{ip} + P}$ $r_p = Y_{p/s} (-r_s)$	$v_m = 196.56$ $K_m = 71.20$ $K_{ip} = 30.62$	6.60%
3	$-r_s = Xv_m \frac{S}{K_m + S}$ $r_p = Y_{p/s} (-r_s)$	$v_m = 140.61$ $K_m = 91.18$	9.01%
4	$-r_s = \frac{Xv_m S}{K_m + S} \cdot \frac{K_s}{K_s + S}$ $r_p = Y_{p/s} (-r_s)$	$v_m = 173.65$ $K_m = 48.88$ $K_s = 92.20$	11.12%
5	$-r_s = \frac{Xv_m S}{K_m + S} \cdot \frac{K_{ip}}{K_{ip} + P} \cdot \frac{K_s}{K_s + S}$ $r_p = Y_{p/s} (-r_s)$	$v_m = 187.35$ $K_m = 57.24$ $K_{ip} = 111.63$ $K_s = 127.88$	9.50%
6	$-r_s = \frac{Xv_m S}{K_m + S + S^2/K_{is}}$ $r_p = Y_{p/s} (-r_s)$	$v_m = 142.38$ $K_m = 90.08$ $K_{is} = 1005.6$	9.02%

表注:  $K_{ip}$  产物抑制常数, g/L;  $K_m$ 底物抑制常数, g/L;  $K_m$  发酵饱和常数, g/L; P 酒精浓度, g/L; S 底物浓度, g/L; X 固定化酵母浓度,  $10^{12}$ cells/L-gel;  $Y_{p/s}$ 酒精得率因子 ( $Y_{p/s}=0.4825$ );  $r_p$ 酒精的生成速率;  $-r_p$ 底物反应速度;  $\eta$ 模型相对误差的绝对平均值, %;  $v_m$ 最大发酵速度, g-Glucose/h  $\cdot 10^{12}$ cells.

从表 5 可以看出: 在实验范围内, 底物抑制的影响较小, 产物对发酵的抑制影响很大, 产物抑制呈双曲线型 ( $\frac{K_{ip}}{K_{ip}+P}$ )。表 5 的 6 个模型中, 动力学模型 (1) 和 (2) 较适合于本发酵。

### 结论

本研究以淀粉质原料糖化醪为底物, 固定化 K 酵母连续生产酒精的试验, 取得了较好的结果, 同时证实, 用糖化醪配制增殖液增殖固定化酵母, 其活性不亚于经葡萄糖增殖液增殖的固定化酵母。

从实验数据的拟合结果来看, 产物抑制或产物-底物联合抑制的动力学模型, 较适合糖化醪固定化 K 酵母的酒精发酵, 其酒精浓度计算值和实测值之间的相对偏差的绝对平均值均小于 7%。

### 参 考 文 献

[1] 曲立民: 微生物学杂志, 6 (1): 30, 1985.

[2] 李祥麟, 金宁人, 化学反应工程与工艺, 1991, 7 (1): 36.  
 [3] Lee T H *et al.* Enzyme Microb. Technol., 1983, 5: 41.  
 [4] 江俊明、周典湘. 食品与发酵工业, 1988, 3: 34.  
 [5] 张治根等: 生物工程学报, 1989, 5 (1): 77.  
 [6] Wardan R M *et al.* Biotechnol. Bioeng Symp., 1983, 13: 265.  
 [7] Wada M. Eur. J. Appl. Microbiol Biotechnol., 1980, 10: 275.  
 [8] Seki M *et al.* J Chem Eng Japan, 1985, 18 (5): 461.  
 [9] Hamamai H *et al.* Biotechnol Bioeng., 1987, 29: 994.  
 [10] Huong S Y *et al.* Enzyme Microb Technol. 1988, 10: 431.  
 [11] Dourado A *et al.* Biotechnol Bioeng., 1987, 29: 187..  
 [12] Vega T L. Biotechnol. Bioeng., 1987, 29: 633.  
 [13] Daugulis A J *et al.* Biotechnol Biong. 1987, 29: 639.  
 [14] Tyagi R D *et al.* Biotechnol Bioeng . 1982, 24: 781.  
 [15] Godia F *et al.* J. Chem Technol. Biotechnol., 1988, 41: 155.  
 [16] Yamance T *et al.* Biotechnol Bioeng., 1982 24: 2731.

## STUDY ON ETHANOL FERMENTATION AND ITS KINETICS FROM STARCH HYDROLYZATE BY IMMOBILIZED YEAST CELLS

Zhong Guangxiang

(Zhejiang Chemical Industry Research Institute HangZhou 310014)

Li Xianglin

(Zhejiang Institute Of Technology, HangZhou 310012)

**Abstract** The character of breeding immobilized yeast and its continuous ethanol fermentation with starch hydrolyzate was studied. According to the calculated result of the test date, suitable kinetics models of ethanol fermentation in test conditions and their parameters were given.

**Key words** Starch Hydrolyzate; Immobilized Yeast; Ethanol Fermentation