

# 戊糖和己糖共发酵生产燃料乙醇过程动力学研究\*

宋安东<sup>1</sup>, 耿欣<sup>1</sup>, 任天宝<sup>1</sup>, 裴波<sup>2</sup>, 汤建华<sup>2</sup>, 杨炳华<sup>3</sup>

(1.河南农业大学, 河南 郑州 450002; 2.商丘市技术监督局, 河南 商丘 476000;

3.河南天冠燃料乙醇有限公司, 河南 南阳 473000)

**摘要:** 对戊糖和己糖共酵生产燃料乙醇中菌体生长、发酵醪液中糖消耗、酒精产生、关键酶活力进行测定。结果表明, 活化菌种的最佳接种时间为 22 h, 共酵过程糖的利用率较高, 菌种生长和乙醇生产随发酵时间延长而改变。发酵醪液中乙醇最高浓度为 2%。共酵产乙醇过程中存在木酮糖和木糖醇两种途径。

**关键词:** 燃料乙醇; 戊糖; 己糖; 共发酵; 动力学

中图分类号: TS262.2; TQ920.1 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2005)02-0039-03

## Kinetics Research during Co-fermentation of Pentose and Hexose to Produce Fuel Ethanol

SONG An-dong<sup>1</sup>, GENG Xin<sup>1</sup>, REN Tian-bo<sup>1</sup>, PEI Bo<sup>2</sup>, TANG Jian-hua<sup>2</sup> and YANG Bing-hua<sup>3</sup>

(1.He'nan Agricultural University, Zhengzhou, He'nan 450002; 2.Shangqiu Technical Supervision Bureau, Shangqiu,

He'nan 476000; He'nan Tianguan Fuel Ethanol Co. Ltd., Nanyang, He'nan 473000, China)

**Abstract:** During co-fermentation of hexose and pentose to produce fuel alcohol, the measurement of microbial growth, sugar consumption in fermented liquid, alcohol output, and the activity of key enzymes indicated that the best inoculation time of activated microbe species was 22 hours, relatively higher use rate of sugar achieved in co-fermentation, and microbe growth and ethanol production varied along with co-fermentation period. The maximum concentration of ethanol was 2% in fermented liquid. And there were two approaches for co-fermentation as xylulose approach and xylitol approach. (Tran. by YUE Yang)

**Key words:** fuel ethanol; pentose; hexose; co-fermentation; kinetics

燃料乙醇的生产是缓解能源危机、减少环境污染的重要途径之一。在纤维质原料的糖化液中, 主要存在己糖(约 70%, 以葡萄糖为主)和戊糖(约 30%, 以木糖为主)两种成分, 对戊糖和己糖共酵过程特性进行研究是当前纤维燃料乙醇生产中的热点<sup>[1,2]</sup>。

20 世纪 80 年代以来, 国际上掀起了戊糖发酵以及戊糖和己糖同步发酵的研究热潮, 并取得了很大发展。Taniguchi, Deng xu, Olsson 等分别对毕赤氏酵母、固定化酿酒酵母、重组大肠杆菌 K011 发酵木糖和葡萄糖混合液的条件进行了研究, 南京林大用休哈塔假丝酵母(*Candida shehatae*)对己糖和戊糖进行同步发酵乙醇的条件进行了研究, 取得了一定的进展, 但距离混合糖液

的理论乙醇产率还有很大差距<sup>[3,4]</sup>。

本文就利用嗜鞣管囊酵母 P-01 (*Pachysolen tannophilus*) 对木糖和葡萄糖共同发酵生产燃料乙醇的过程的动力学进行了研究, 为纤维原料生产燃料乙醇的工业化做好技术准备。

### 1 材料与amp;方法

#### 1.1 材料

##### 1.1.1 菌种

嗜鞣管囊酵母(*Pachysolen tannophilus* P-01), 河南农业大学生物工程系保藏菌种。

##### 1.1.2 培养基

基金项目: 河南省杰出人才创新基金资助项目(321001300); 河南省教育厅自然科学基金项目(2003180061)。

收稿日期: 2004-10-09

作者简介: 宋安东(1972-), 男, 河南宜阳人, 副教授, 山东大学-河南天冠集团博士后, 主要从事微生物发酵工程、能源与环境工程等方面的研究, 发表论文 20 余篇。

①菌种活化液体培养基(g/100 mL):粗木糖 2,酵母浸汁 0.3,蛋白胨 0.5,pH5.0,121 °C灭菌 30 min。

②混合糖发酵培养基(g/100 mL):葡萄糖 4,粗木糖 2,酵母浸汁 0.3,蛋白胨 0.5,尿素 0.02,磷酸氢二铵 0.01,pH5.0~5.5,121 °C灭菌 30 min。

## 1.2 菌种活化

向装有 60 mL 菌种活化液体培养基的 300 mL 三角瓶内接斜面试管活化菌种 3 环,150 r/min,28 °C摇床培养。

## 1.3 发酵

按 6%的接种量将活化菌种培养液接入 60 mL 装液量的 300 mL 三角瓶内,120 r/min,28 °C摇床发酵。

## 1.4 测定方法

①菌种生长曲线 光密度法(525 nm)。

②总糖含量 3,5-二硝基水杨酸法(DNS 法)<sup>[5]</sup>。

③木糖含量 地衣酚法。

④葡萄糖含量 总糖减去木糖即得葡萄糖含量。

⑤乙醇含量 蒸馏比重法<sup>[6]</sup>。

⑥木糖异构酶(XI)活性 试管中加入 0.1M D-木糖 25  $\mu$ L, 发酵液 25  $\mu$ L, 10 mM MnSO<sub>4</sub> 25  $\mu$ L,pH7.5 的 Tris-HCl 缓冲液 425  $\mu$ L,80 °C反应 1 h, 之后用沸水煮 3 min,得木酮糖溶液,吸 0.35 mL 备用。于试管中加入 0.35 mL 木酮糖溶液,13 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 mL,1.5%半胱氨酸溶液,室温放置 2 h。于 540 nm 测吸光度,对照是将 25  $\mu$ L 0.1 M D-木糖改为蒸馏水代替重做此操作。酶活性定义:吸光度每 1 min 增加 0.001 为 1 个酶活单位。

⑦木糖还原酶(XR)活性 于试管中加入 1 mL 酶液,0.5 mL 0.6 mM 的 NADH,0.5 mL 0.5 M 的木糖,pH0.65 的 PBS 盐酸缓冲液 0.5 mL,25 °C反应 5 min,于 340 nm 测吸光度的减少。酶活性定义:吸光度每 1 min 减少 0.001 为 1 个酶活单位。

⑧木糖醇脱氢酶(XDH)活性 于试管中加入 0.1 M pH9.0 的 Tris-HCl 缓冲液 0.5 mL,4 mM MgCl<sub>2</sub> 1 mL,200 mM 木糖醇 1 mL,20 mM NAD 1 mL,于 340 nm 测吸光度的增加。酶活性定义:吸光度每 1 min 增加 0.001 为 1 个酶活单位。

## 1.5 主要仪器

UV752 型紫外分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);UV722 型分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌种培养动力学分析(见图 1)

由图 1 可以看出,当菌体活化至 14 h 时开始进入

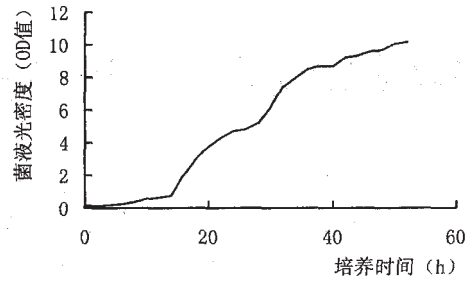


图 1 菌种培养动力学曲线

对数生长期,在大约 38 h 时生长速度明显减慢,逐渐进入稳定期。22 h 左右菌体生长速度最快,处于对数生长期。因此菌种培养至 22 h 左右是最佳接种期。

### 2.2 发酵过程糖消耗动力学分析(见图 2 和图 3)

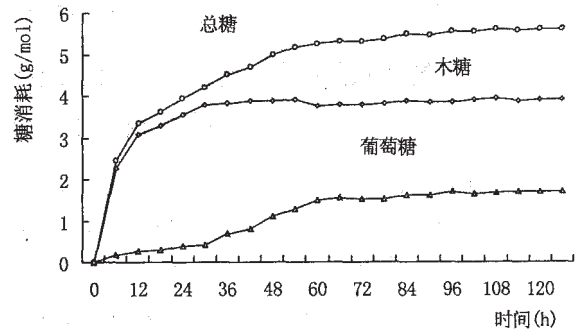


图 2 糖消耗动力学分析

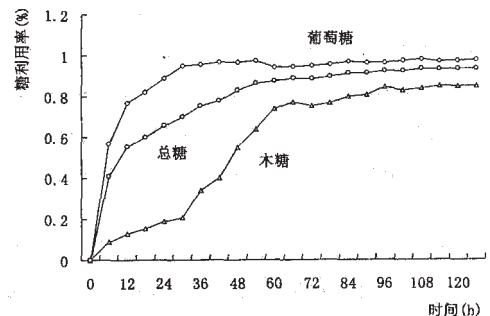


图 3 糖利用率变化情况

从图 2 和图 3 可以看出,在 24 h 之内葡萄糖已基本被消耗,利用率达 89%,24 h 之后葡萄糖的消耗速度逐渐减缓,72 h 之后葡萄糖利用率基本不再变化,最大利用率达 97.8%。木糖在发酵初始阶段利用缓慢,在 24 h 之后消耗速率才明显增长,最大利用率达 85.5%。总还原糖利用率最高可达 93.6%。从图中可知在共酵过程中葡萄糖首先被菌体利用,只有当葡萄糖基本利用完后木糖才大量被利用。

### 2.3 发酵过程中乙醇产生与菌体生长动力学分析(见图 4)

从图 4 可以看出,在发酵期间,菌体在 12 h 前生长旺盛,有较强的代谢能力。20~80 h 之间缓慢生长,80 h

之后菌体不再生长处于稳定期,后期甚至有所下降。发酵醪液中的乙醇在 0~6 h 内基本未产生,从 6~48 h 乙醇浓度大幅增长,在 48 h 左右达到最大值,接近 2%,之后基本保持不变,但在一定范围内稍有下降。在乙醇浓度最高时乙醇产率(糖醇转化率)接近 33.3%,是该条件下理论糖醇转化率的 67.05%。

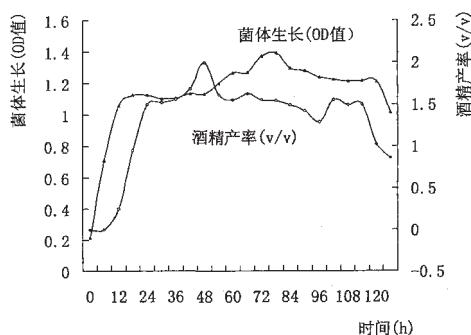


图4 菌体生长与酒精产量变化

#### 2.4 发酵过程中酶产生动力学分析(见图5)

从图5可以看出,在以P-01进行戊糖己糖共发酵条件下,木糖还原酶、木糖脱氢酶的酶活都有下降的趋势,都在60h后变为0。而木糖异构酶的酶活则持续升高,在48h时达到最大值,最大值为66u,48h之后木糖异构酶的活性开始下降。所以在48h之前发酵过程存在两种途径。48h以后在木糖异构酶的作用下,木糖转化为木酮糖,从而被利用。

#### 3 小结

以嗜鞣管囊酵母P-01(*Pachysolen tannophilus*)对木

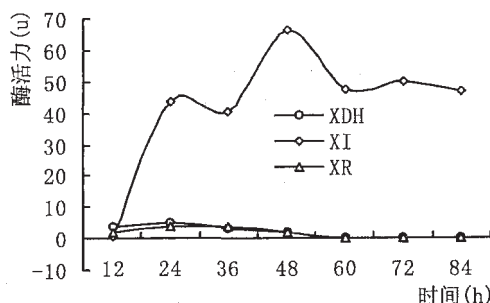


图5 酶产生动力学曲线

糖和葡萄糖混合液共发酵生产燃料乙醇时活化菌种的最佳接种时间为22h,发酵过程中糖的利用率较高,发酵过程中先利用葡萄糖,在葡萄糖利用完后再利用木糖。菌体生长和乙醇产生随发酵时间延长而改变,发酵醪液中乙醇最高浓度为2%。发酵过程包含两种途径:木酮糖途径和木糖醇途径。

#### 参考文献:

- [1] 张继泉,等.发酵戊糖产酒精酵母菌株的选育[J].生物技术通讯,2002,13(4):275-277.
- [2] 陈艳萍,等.戊糖发酵微生物及选育[J].纤维素科学与技术,2001,9(3):57-61.
- [3] 勇强,等.亚硫酸废液戊糖、己糖同步酒精发酵的调控[J].南京林业大学学报,1994,18(4):73-78.
- [4] 勇强,等.氧对亚硫酸盐制浆废液戊糖、己糖同步酒精发酵的影响[J].林产化学与工业,1998,18(4):49-53.
- [5] 王瑞明,等.玉米秸秆水解与木糖酒精发酵的初步研究[J].酿酒,2002,29(1):56-58.
- [6] 王福荣,等.工业发酵分析[M].北京:中国轻工业出版社,1978.

## 河南省酿酒行业首批技能鉴定考核结束

本刊讯:为期10天的河南省酿酒企业首批技师技能鉴定考核于11月30日圆满落下帷幕,来自全省白酒、啤酒及酒精行业参加考核鉴定的206名一线酿造工,经理论和实践考试,195人考核合格。

职业技能鉴定是国家职业资格证书制度的重要组成部分,是一项对劳动者职业技能水平的考核活动。为加快酿酒行业技术人才培养和酿酒行业持证上岗制度的落实,规范酿酒行业技能培训,充分调动和发挥一线酿造工的积极性,使他们的技术地位得到社会承认,为企业培养人才,国家酿酒行业技能培训和鉴定总站把河南作为全国的试点省之一,对全省的白酒、啤酒及酒精行业的酿造工技师进行了首批技能考核鉴定。

此次技师等级职业技能培训是按劳动和社会保障部《职业技能鉴定规定》,由河南省酿酒工业协会组织的。按照《酿造工国家职业标准》的要求,结合各行业从业人员的实际特点,对学员培训采取函授学习与集中面授相结合的方法,由河南省酿酒工业协会提前一个月统一发放教材。技能鉴定由理论知识考试和实际操作考核两部分组成,鉴定站对申报技师职业等级鉴定人员的条件、技术工作总结、鉴定考试成绩等进行综合评审,确定通过技师职业等级考核的名单,并上报中国轻工酿酒行业职业技能培训鉴定总站和中国轻工业职业技能鉴定指导中心审核,对经鉴定合格的技能人员颁发中华人民共和国《技师职业等级证书》,企业聘任后可享受本省及本企业中级专业技术人员的有关待遇。

河南省酿酒行业职业技能鉴定站为这次技能鉴定,聘请了本省白酒和啤酒界专家及技术权威授课,聘请了8名高级考评员和2名考务员负责考核事宜,并成立了5人组成的专家综合评审小组,对参加考核学员的技术工作总结和论文进行评审,中国酿酒行业职业技能培训和鉴定管理总站张立文主任及高级考评员高工唐小雨亲临现场进行考务监督,所出考题全部从国家题库中抽取,考试过程全程录像,十分严格,整个考核过程严谨,秩序良好。

这次举办的首次技能培训,白酒选定在鹿邑县宋河酒业、啤酒选定在河南省金星集团、酒精选定在南阳市天冠企业进行。(小砂)