



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103642890 B

(45) 授权公告日 2015. 07. 08

(21) 申请号 201310721968. 9

审查员 王奇

(22) 申请日 2013. 12. 25

(73) 专利权人 山东建筑大学

地址 250101 山东省济南市历城区临港开发  
区凤鸣路

(72) 发明人 张超 陈文兵 武道吉 张贵芹  
祁锋 马永山 赵海涛

(74) 专利代理机构 济南泉城专利商标事务所  
37218

代理人 李桂存

(51) Int. Cl.

*C12P 39/00*(2006. 01)

*C12P 7/06*(2006. 01)

*C12P 19/14*(2006. 01)

*C12N 11/16*(2006. 01)

*C12R 1/865*(2006. 01)

*C12R 1/685*(2006. 01)

权利要求书1页 说明书6页

(54) 发明名称

载体发酵技术制备乙醇的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种载体发酵技术制备乙醇的方法,包括以下步骤:将酿酒酵母和黑曲霉分别进行培养;将酿酒酵母接种到黑曲霉的培养液中,培养形成混合菌丝球;将混合菌丝球倒入发酵培养基中,在 30℃、40-60r/min 的条件下同步糖化发酵制备乙醇。本发明将同步糖化发酵工艺和微生物固定化技术进行了巧妙的结合,降低了发酵液的黏度,有效防止了杂菌污染,降低了废糟液的 COD 值,提高了乙醇的收率。

1. 一种载体发酵技术制备乙醇的方法,其特征是包括以下步骤:

(1)将酿酒酵母按照 5-8% 的接种量接种到种子培养基中,在 30℃、100r/min 的条件下培养 30 h,所得发酵液离心后收集酿酒酵母细胞;

(2)将黑曲霉的孢子悬浮液按照 2-5% 的接种量接种到产酶培养基中,在 30℃、40r/min 的条件下培养至 OD<sub>600</sub>为 0.3-0.5,得到黑曲霉培养液;

(3)将步骤(1)收集到的酵母细胞接入到步骤(2)的黑曲霉培养液中,使黑曲霉和酿酒酵母的菌种个数比为 1:3~10,补充菊芋粉、蛋白胨和 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>使它们的浓度分别为 25g/L、10g/L 和 5g/L,然后在 30℃,100~200r/min 的条件下混合培养至 OD<sub>600</sub>为 0.6-1,实现黑曲霉对酿酒酵母的包裹,得到混合菌丝球;

(4)将步骤(3)制得的混合菌丝球过滤后按照 10% 的接种量倒入发酵培养基中,在 30℃、40-60r/min 的条件下同步糖化发酵制备乙醇。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征是:步骤(4)中,发酵结束后,将混合菌丝球过滤出来,蒸馏水清洗后,重新加入新的发酵培养基中进行发酵制备乙醇,菌种混合体能够重复循环使用 25-30 次。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征是:步骤(1)中,种子培养基组成为:酵母膏 10 g/L,蛋白胨 20 g/L,葡萄糖 20 g/L,水余量,自然 pH。

4. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征是:步骤(2)中,产酶培养基组成为:菊芋粉 25g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5g/L,蛋白胨 10g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6 g/L, NaCl 5 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5g/L, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.001 g/L, pH 5,0.1Mpa 灭菌 15min。

5. 根据权利要求 1 或 4 所述的方法,其特征是:步骤(2)中,黑曲霉的孢子悬浮液中,黑曲霉的个数是 10<sup>6</sup>~10<sup>7</sup>个/ml。

6. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征是:步骤(4)中,发酵培养基组成为:菊芋粉 30-40g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4-6g/L, 玉米浆 4-6g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5-10g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.3-0.6g/L, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.001-0.003 g/L, pH 4.5,0.1Mpa 灭菌 15min。

7. 根据权利要求 6 所述的方法,其特征是:步骤(4)中,发酵培养基组成为:菊芋粉 35g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5g/L, 玉米浆 5g/L, KH<sub>2</sub>P O<sub>4</sub> 6 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5g/L, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.001 g/L, pH 4.5,0.1Mpa 灭菌 15min。

8. 根据权利要求 1、6 或 7 所述的方法,其特征是:步骤(4)中,发酵时间为 48h。

9. 根据权利要求 1-4、6 或 7 中任一项所述的方法,其特征是:步骤(3)中,补充菊芋粉、蛋白胨和 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>的同时,向培养液中加入甘露醇、亚硒酸钠和硼酸,使它们的浓度分别为 8g/L、0.3g/L 和 0.1g/L。

10. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征是:步骤(3)中,黑曲霉和酿酒酵母的菌种个数比为 1:6~10。

## 载体发酵技术制备乙醇的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种载体发酵技术制备乙醇的方法,具体涉及一种将固定化载体作为发酵菌种与同步糖化发酵技术有机结合在一起的一种发酵制备乙醇的方法。

### 背景技术

[0002] 燃料乙醇最早是采用玉米为原料发酵制成,但这一过程使用玉米量较大,对国家粮食安全构成了威胁。2006年以来我国出台了一系列政策,强调发展燃料乙醇应坚持“非粮”原则,控制玉米产品深加工产业的盲目发展。菊芋(俗称洋姜、姜不辣、鬼子姜)主要成分是菊粉,是最简单的一类果聚糖,含糖量为其干重的60%~70%。菊芋水解比淀粉质原料还容易,不需要高温液化,直接用菊粉酶水解即可获得可发酵性糖,工艺流程简单,能耗低,与目前人们普遍关注的以农作物秸秆为代表的木质纤维素类生物质相比,更易于实现产业化。菊芋与其他农作物相比有许多明显的优点,如适应性强、耐贫瘠、耐寒、耐旱、种植简易、产量高等。可在沙漠、盐碱地或滩涂地种植生长,可利用海水养殖废水非灌溉水资源灌溉。菊芋作为一种极具潜力的乙醇发酵原料,与淀粉质原料相比,菊芋低温条件下即可实现糊化,在节能方面具有优势。在2007年在国务院办公厅转发的国家发改委《生物产业发展“十·一五”规划》中明确提出“支持以甜高粱、木薯和菊芋等非粮原料生产燃料乙醇”,鼓励非粮原料燃料乙醇技术的开发和产业发展。

[0003] 以菊芋为原料制备乙醇的生物发酵所用菌种一般为酵母菌,因为菊芋不能直接利用,需要先糖化,所以发酵方法有同步糖化发酵和先糖化后发酵,所谓同步糖化发酵是指糖化菌种和发酵菌种混合培养,边糖化边发酵,先糖化后发酵是指先利用糖化菌种将菊糖水水解,再利用发酵菌种进行发酵。同步糖化发酵的优点为使发酵醪中水解下来的可发酵性糖被及时发酵为乙醇,在过程中不积累,防止糖积累而抑制菊粉酶分泌,避免底物抑制现象出现,可以有效防止杂菌污染,提高乙醇收率,但是目前国内以菊芋为原料酒精发酵技术工艺技术水平低,菊糖利用率不高,损失较大。另外,菌种游离存在菌种难以回收的问题,造成生产成本过高、环境污染,而固定化细胞技术能很好的解决这一问题,所谓固定化细胞技术是指将具有一定生理功能的生物细胞,用一定的方法将其固定,作为固体生物催化剂而加以利用的一门技术。在乙醇制备中,将酵母固定化会大大提高了酶促反应效率,因此具有很好的应用前景。但是目前公开的酵母固定化技术成本高、固定技术单一。

[0004] 大连理工大学的常宝磊的硕士生论文中对菊芋生产乙醇的方法进行了研究,其用絮凝酵母作为发酵菌种制备乙醇,该方法缺点是对菌种要求较高,既要有絮凝活性、糖化能力,又要有发酵能力,这样菌种对底物的利用效率和发酵能力都受到一定的影响,影响乙醇的收率。

[0005] 葛向阳等(葛向阳、张伟国,同步糖化发酵菊芋生产酒精中黑曲霉菌株的选育,食品与生物技术学报,第25卷第2期,2006年3月)利用黑曲霉和酿酒酵母采用同步糖化法制备乙醇。该方法的缺点是菌种没有固定化,无法进行高密度发酵,影响设备的利用率;没有进行发酵菌种的回收,造成发酵菌种的浪费,而且容易造成环境污染。

## 发明内容

[0006] 针对现有技术中存在的不足,本发明提供了一种载体发酵技术制备乙醇的方法,该方法将载体固定的菌种作为发酵菌种和同步糖化发酵技术进行结合和改进,简化了工艺路线,提高了乙醇收率,减轻了环境污染。

[0007] 所述载体发酵技术是指将发酵菌种用微生物载体进行固定,并用载体固定的菌种进行发酵制备乙醇的方法,目前,没有将载体发酵技术与同步糖化发酵技术结合进行乙醇制备的技术公开,一般这两种技术都是单独使用;也没有任何固定化载体作为发酵菌种使用技术的相关报道,本发明首次提出将载体固定的菌种作为发酵菌种这一概念和技术操作方法。本发明在采用产菊粉酶的黑曲霉和酿酒酵母作为菌种采用同步糖化发酵技术制备乙醇的基础上,经过创造性的研究,根据菊芋需要先糖化再发酵的特性,将黑曲霉和酿酒酵母进行了混合培养,形成了黑曲霉包裹酿酒酵母的菌种混合体,该菌种混合体将酿酒酵母包裹在黑曲霉中,即实现了酿酒酵母的固定,又实现了同步糖化,节约了细胞固定化成本,简化了工艺,提高了酵母细胞对于乙醇的耐受性,降低发酵液黏度,降低了废糟液的 COD,提高了乙醇产率。

[0008] 本发明具体技术方案如下:

[0009] 一种载体发酵技术制备乙醇的方法,其特征是包括以下步骤:

[0010] (1)将酿酒酵母按照 5-8% 的接种量接种到种子培养基中,在 30℃、100r/min 的条件下培养 30 h,所得发酵液离心后收集酿酒酵母细胞;

[0011] (2)将黑曲霉的孢子悬浮液按照 2-5% 的接种量接种到产酶培养基中,在 30℃、40r/min 的条件下培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.3-0.5,得到黑曲霉培养液;

[0012] (3)将步骤(1)收集到的酵母细胞接入到步骤(2)的黑曲霉培养液中,使黑曲霉和酿酒酵母的菌种个数比为 1:3 ~ 10,补充菊芋粉、蛋白胨和 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 使它们的浓度分别为 25g/L、10g/L 和 5g/L,然后在 30℃,100 ~ 200r/min 的条件下混合培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.6-1,实现黑曲霉对酿酒酵母的包裹,得到混合菌丝球;

[0013] (4)将步骤(3)制得的混合菌丝球过滤后按照 10% 的接种量倒入发酵培养基中,在 30℃、40-60r/min 的条件下同步糖化发酵制备乙醇。

[0014] 在上述使用黑曲霉包裹酿酒酵母的混合菌丝球同步糖化发酵乙醇的方法基础上,本发明又进一步的进行了大量的实验,对各工艺条件进行了优选,从而保证了发酵结果的进一步提升。具体如下:

[0015] 步骤(4)中,发酵结束后,将混合菌丝球过滤出来,蒸馏水清洗后,重新加入新的发酵培养基中进行发酵制备乙醇,菌种混合体能够重复循环使用 25-30 次。菌种可循环使用,大大降低了生产成本。

[0016] 步骤(1)中,种子培养基组成优选为:酵母膏 10 g/L,蛋白胨 20 g/L,葡萄糖 20 g/L,水余量,自然 pH。

[0017] 步骤(2)中,产酶培养基组成优选为:菊芋粉 25g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5g/L,蛋白胨 10g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6 g/L, NaCl 5 g/L, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5g/L, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.001 g/L, pH 5, 0.1Mpa 灭菌 15min。

[0018] 步骤(2)中,黑曲霉的孢子悬浮液中,黑曲霉的个数是 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup>个/ml。

[0019] 步骤(3)中,黑曲霉和酿酒酵母的菌种个数比优选为1:6~10。

[0020] 步骤(3)中,在补充菊芋粉、蛋白胨和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的同时,优选向培养液中还加入甘露醇、亚硒酸钠和硼酸成分,使它们的浓度分别为8g/L、0.3g/L和0.1g/L。这样形成的菌丝球发酵性能更好。

[0021] 步骤(4)中,发酵培养基组成优选为:菊芋粉30-40g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4-6g/L,玉米浆4-6g/L, $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 5-10g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3-0.6g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001-0.003g/L,pH4.5,0.1Mpa灭菌15min。进一步的,发酵培养基组成最优选为:菊芋粉35g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5g/L,玉米浆5g/L, $\text{KH}_2\text{P}$ 0<sub>4</sub>6g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001g/L,pH4.5,0.1Mpa灭菌15min。

[0022] 采用本发明工艺后,发酵时间可缩短为48h。

[0023] 本发明将同步糖化发酵工艺和微生物固定化技术进行了巧妙的结合,根据菌种自身的特性,不需引进额外的载体对菌种进行固定,这一工艺思路在国内外未见相关报道,本发明首次提出,具有以下优点:

[0024] 1、本发明边产酶边糖化,使发酵醪中水解下来的可发酵性糖被及时发酵为乙醇,在过程中不积累,防止糖积累而抑制菊粉酶分泌,避免底物抑制现象出现,可以有效防止杂菌污染,提高乙醇收率;

[0025] 2、本发明采用菌丝球作为固定化手段,降低了固定化成本,降低了发酵液的黏度。在菊芋发酵乙醇的过程中,由于菊芋干粉吸水溶胀,当底物浓度加大以后,料液黏度增大,流动混合困难,影响传质传热,固形物浓度成为发酵的限制因素。高黏度料液影响发酵过程中的传热与传质效果,发酵过程产生的 $\text{CO}_2$ 也会因排出不畅而积累,导致发酵速度减缓,发酵时间长(60h以上),反应不完全,乙醇收率明显降低。而本发明将菌种经过特殊培养制成了混合菌丝球,菌丝球的形状使其流动阻力比细胞要小的多,可以明显降低发酵液黏度,提高乙醇的收率。

[0026] 3、本发明将发酵菌种进行了集合,形成菌丝球,而非游离的菌种,可以在发酵罐中达到较高的细胞浓度,大大提高了乙醇发酵过程的发酵速率,相应提高了发酵罐的设备生产强度,减少了设备总容积规模和发酵罐固定资产投资。

[0027] 4、本发明利用黑曲霉对酿酒酵母实现了固定化,不用额外的载体,节约了细胞固定化成本,酿酒酵母从发酵系统中容易回收,使用寿命长且能反复使用,操作方便粗放,成本低廉,容易实现工业化生产;

[0028] 5、由于将酿酒酵母包裹在黑曲霉中形成菌丝球,黑曲霉菌丝体富含能提高酵母活力和耐酒精能力的脂蛋白,使固定化后酿酒酵母细胞所处的微环境改变,酿酒酵母细胞对于乙醇的耐受性增强。

[0029] 6、酿酒酵母包裹在黑曲霉中实现了完全固定化后,可回收利用,发酵液酒精精馏后产生废糟液的COD从现有酒精发酵工艺的50000-60000ppm降低到了20000-30000ppm,为酒精发酵工业实现污染物源头减废、清洁生产创造了有利条件。

## 具体实施方式

[0030] 下面通过具体实施例对本发明进行进一步的阐述,应该明白的是,下述说明仅是为了解释本发明,并不对其进行限定。

[0031] 本发明所用黑曲霉(CMCC98003)购自南京便诊仪器设备有限公司,所用酿酒酵母购自安琪酵母股份有限公司。

[0032] 实施例 1

[0033] 一种菌丝球为载体和发酵菌种的同步糖化发酵生产乙醇的方法:

[0034] 1、将酿酒酵母菌种按照 5% 的接种量接种到装有 100ml 种子培养基的 250ml 三角瓶中,30℃,100r/min 的摇床中培养 30 h,发酵液在 5000r/min 离心 5min,收集酵母细胞;种子培养基为酵母膏 10 g/L,蛋白胨 20 g/L,葡萄糖 20 g/L,自然 pH。

[0035] 2、将黑曲霉用无菌水配成孢子悬浮液,按照 4% 的接种量接种到装有 100ml 产酶培养基的 250ml 三角瓶中,30℃,40r/min 的摇床中培养 18h,孢子悬浮液的扩大培养后的 OD<sub>600</sub> 值为 0.4。其中,产酶培养基的配方为菊芋粉 25g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5g/L,蛋白胨 10g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6 g/L, NaCl 5 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5g/L, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.001 g/L, pH 5, 0.1Mpa 灭菌 15min;

[0036] 3、将酵母细胞接种到步骤 2 的黑曲霉扩大培养液中,使黑曲霉和酿酒酵母的菌种个数比为 1:6,然后再补充菊芋粉、蛋白胨和 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 培养基成分至 25g/L、10g/L 和 5g/L, 30℃,140r/min 的摇床中培养 30 h,在黑曲霉菌丝球的形成过程中,将酿酒酵母包裹在里面,获得包埋有酿酒酵母的混合菌丝球的 OD<sub>600</sub> 值为 0.6;

[0037] 4、将制得的混合菌丝球过滤后按照 10% 的接种量倒入发酵培养基中, 30℃、40r/min 的摇床中进行同步糖化发酵生产乙醇;装液量为 200ml 的 500ml 三角瓶中,发酵培养基组成为:菊芋粉 35g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5g/L, 玉米浆 5g/L, KH<sub>2</sub>P O<sub>4</sub> 6 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5g/L, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.001 g/L, pH 4.5, 0.1Mpa 灭菌 15min;

[0038] 5、48h 后发酵结束,过滤回收混合菌丝球,蒸馏水清洗后,然后重复步骤四 25 次,循环使用混合菌丝球进行乙醇发酵,发酵结束后,乙醇浓度达到了 12.48 g/L,乙醇得率(每克菊芋粉产乙醇的量)为 0.357g/g。

[0039] 实施例 2

[0040] 采用下述方法制备乙醇:

[0041] 1、将酿酒酵母菌种按照 8% 的接种量接种到装有 100ml 种子培养基的 250ml 三角瓶中,30℃,100r/min 的摇床中培养 30 h,发酵液在 5000r/min 离心 5min,收集酵母细胞;种子培养基为酵母膏 10 g/L,蛋白胨 20 g/L,葡萄糖 20 g/L,自然 pH。

[0042] 2、将黑曲霉用无菌水配成孢子悬浮液,按照 2% 的接种量接种到装有 100ml 产酶培养基的 250ml 三角瓶中,30℃,40r/min 的摇床中培养 18h,孢子悬浮液的扩大培养后的 OD<sub>600</sub> 值为 0.5。其中,产酶培养基的配方为菊芋粉 25g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5g/L,蛋白胨 10g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6 g/L, NaCl 5 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5g/L, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.001 g/L, pH 5, 0.1Mpa 灭菌 15min;

[0043] 3、将酵母细胞接种到步骤 2 的黑曲霉扩大培养液中,使黑曲霉和酿酒酵母的菌种个数比为 1:10,然后再补充菊芋粉、蛋白胨和 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 培养基成分至 25g/L、10g/L 和 5g/L, 30℃,180r/min 的摇床中培养 30 h,在黑曲霉菌丝球的形成过程中,将酿酒酵母包裹在里面,获得包埋有酿酒酵母的混合菌丝球的 OD<sub>600</sub> 值为 0.8;

[0044] 4、将制得的混合菌丝球过滤后按照 10% 的接种量倒入发酵培养基中, 30℃、60r/min 的摇床中进行同步糖化发酵生产乙醇;装液量为 200ml 的 500ml 三角瓶中,发酵培养基

组成为：菊芋粉 35g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5g/L, 玉米浆 5g/L,  $\text{KH}_2\text{P O}_4$  6 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g/L,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.001 g/L, pH 4.5, 0.1Mpa 灭菌 15min；

[0045] 5、48h 后发酵结束, 过滤回收混合菌丝球, 蒸馏水清洗后, 然后重复步骤四 28 次, 循环使用混合菌丝球进行乙醇发酵, 发酵结束后, 乙醇浓度达到了 13.12 g/L, 乙醇得率为 0.375g/g。

[0046] 实施例 3

[0047] 研究不同的转速条件下形成混合菌丝球对发酵效果的影响

[0048] 按照实施例 1 的方法发酵制备乙醇, 不同的是: 步骤 3 中, 黑曲霉与酿酒酵母进行混合培养时, 摇床转速按照 80r/min、100r/min、180r/min 进行混合培养, 最终所得乙醇性能参数如下表。

[0049]

摇床转速	乙醇浓度 (g/L)	乙醇得率 (g/g)	COD
80	8.26	0.236	36672
100	12.01	0.343	27892
180	12.98	0.371	27142

[0050] 通过实施例 1 与以上数据的对比可以看出: 摇床的转速对混合菌丝球的形成、乙醇的产率等有较大影响。

[0051] 实施例 4

[0052] 研究不同的菌种混合比例对发酵效果的影响

[0053] 按照实施例 1 的方法发酵制备乙醇, 不同的是: 步骤 3 中, 黑曲霉与酿酒酵母进行混合培养时, 按照黑曲霉和酿酒酵母的菌种个数比分别为 1:1、1:3、1:6、1:10、1:12 进行混合培养, 最终所得乙醇性能参数如下表。

[0054]

混合比例	乙醇浓度 (g/L)	乙醇得率 (g/g)	COD
1: 1	7.26	0.207	36872
1:3	11.91	0.34	28753
1: 6	12.48	0.357	27562
1: 10	13.12	0.375	25745
1:12	7.12	0.203	37423

[0055] 通过实施例 1 与以上数据的对比可以看出: 混合菌丝球的形成对两种菌的比例有要求, 混合的比例过低或过高均会影响到混合菌丝球的发酵效果, 进而影响到最终乙醇的浓度。

[0056] 实施例 5

[0057] 研究不同的混合菌丝球培养基对发酵效果的影响

[0058] 按照实施例 1 的方法发酵制备乙醇, 不同的是: 步骤 3 中, 将酵母细胞接种到步

骤 2 的黑曲霉扩大培养液中,使黑曲霉和酿酒酵母的菌种个数比为 1:6,然后再向培养液中补充菊芋粉、蛋白胨、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、甘露醇、亚硒酸钠和硼酸培养基成分,使它们的浓度分别至 25g/L、10g/L、5g/L、8g/L、0.3g/L 和 0.1g/L,30℃,140r/min 的摇床中培养 30 h,在黑曲霉菌丝球的形成过程中,将酿酒酵母包裹在里面,获得包埋有酿酒酵母的混合菌丝球的  $\text{OD}_{600}$  值为 0.6。

[0059] 将该方法所得的乙醇性能参数与实施例 1 的相对比,结果如下。

[0060]

组别	乙醇浓度 (g/L)	乙醇得率 (g/g)	COD
实施例 1	12.48	0.357	27562
实施例 5	16.03	0.458	20521

[0061] 实施例 6

[0062] 研究不同的发酵培养基对发酵效果的影响

[0063] 按照实施例 1 的方法发酵制备乙醇,不同的是:步骤 4 中,发酵培养基不同,第一组所用发酵培养基为:菊芋粉 30g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  6g/L,玉米浆 4g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.3g/L,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.003 g/L, pH 4.5;第二组所用发酵培养基为:菊芋粉 35g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5g/L,玉米浆 5g/L,  $\text{KH}_2\text{P O}_4$  6 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g/L,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.001 g/L, pH 4.5;第三组所用发酵培养基为:菊芋粉 40g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  4g/L,玉米浆 6g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.6g/L,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.002 g/L, pH 4.5。

[0064] 最终所得乙醇性能参数如下表。

[0065]

组别	乙醇浓度 (g/L)	乙醇得率 (g/g)	COD
1	10.48	0.349	29202
2	12.48	0.357	27562
3	10.51	0.263	29001