

# 琼脂—聚丙烯酰胺固定化酵母发酵生产酒精

李宪臻 严复

(大连轻工业学院食工系, 大连)

固定化载体影响固定化酵母的强度、活性和使用寿命,因此载体制备方法一直受到人们重视。海藻酸钙是一种较常用载体<sup>[1]</sup>,但使用时间不够理想;琼脂化学性质稳定,但强度低、透性差是其缺点;用聚丙烯酰胺时,因试剂毒性使固定化酵母活性降低及不易成型等,故很少用于酵母固定化。据报道,琼脂与海藻酸钙混合固定后再脱去海藻酸钙可改进通透性<sup>[2]</sup>,但强度却变得更低。琼脂固定后再进行聚丙烯酰胺聚合可提高载体强度<sup>[3]</sup>,但通透性却变得更差。

本文在前人工作基础上,提出一种综合法即混胶聚合固定化法,并测定了此载体在糖蜜酒精发酵中的最适增殖发酵条件。

## 材料与方 法

### (一) 材料

酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) AS 2.576由中国科学院微生物研究所提供。

海藻酸钠、琼脂及其他化学药品均为分析纯化学试剂。用吉林新中国糖厂的糖蜜。

### (二) 实验方法

1. 菌的培养:取AS2.576菌悬液5ml接入50ml活化培养基中[成分(%):葡萄糖 12, 酵母膏 0.5, 蛋白胨 0.5, KCl 0.12, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.15, NH<sub>4</sub>Cl 0.15, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.07, 自然pH], 30℃, 振荡培养20h。然后取10ml此菌悬液接入100ml增殖培养基中(14Bx糖蜜, 0.2%酵母膏, 0.4% (NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH5.6), 30℃, 振荡培养6h, 备用。

2. 多孔性混胶载体制备:取30ml 3%(W/V)琼脂加2%(W/V)海藻酸钠混合液,保温45—50℃,与2.1ml菌悬液混匀后,滴入2%

(W/V)CaCl<sub>2</sub>溶液中。待成型后水洗载体,并转入7.5%丙烯酰胺(ACAM)+0.4%N,N'-甲基双丙烯酰胺(BIS)+0.5%β-甲胺基丙腈溶液中,抽真空放置25min。迅速转入真空除氧的0.5%(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>溶液中并抽真空放置30min,立即水洗。最后将载体转入1%(W/V)Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>溶液中缓缓搅拌20min,水洗至澄清,制成的多孔性混胶载体备用。

3. 对照琼脂凝胶载体制备:取30ml 3%琼脂溶液,保温45—50℃,与2.1ml菌悬液混匀后滴入液体石蜡中,倾去石蜡,水洗到全部油滴除去,制成的琼脂凝胶载体备用。

4. 固定化酵母增殖:将两种固定化酵母各30ml放入100ml增殖培养基中,30℃,振荡培养30h。

5. 固定化酵母发酵:将已增殖的固定化酵母转入发酵培养基中,30℃,静止培养36h。

### (三) 测定方法

1. 糖浓度:用3,5-二硝基水杨酸法。

2. 乙醇浓度:用气相色谱法。

3. 细胞数:用血球计数板法。

## 结果与讨论

### (一) 酵母细胞固定化方法的确定

1. 不同聚合条件下的凝胶强度:按前述方法制备载体,测定凝胶强度。由表1结果可看出,经聚合后的载体强度约为琼脂的4倍,聚合底物浓度增加1倍,凝胶强度只略有增加,说明聚合可提高凝胶强度,但底物浓度太高对增加强

本文于1987年8月13日收到。

本工作得到“科学基金”资助。

度影响不大。因此选择7.5% ACAM + 0.4% BIS 为底物浓度。未经真空除氧的凝胶强度未聚合的凝胶差别不大, 说明氧气阻止聚合反应, 应在无氧条件下聚合。聚合底物加入方式对强度几乎无影响。

表 1 不同条件下凝胶强度

	聚合条件		凝胶强度
	ACAM (%)	BIS (%)	
3% 琼脂	0	0	0.12
	7.5	0.4	0.42
+	7.5	0.4	0.15*
2% 海藻酸钠	15.0	0.8	0.49
	7.5	0.4	0.40**

强度单位: 每一胶粒( $\phi = 3\text{mm}$ ) 所能承受的压力(kg)

\* 聚合时未抽真空除氧 \*\* 聚合剂直接与琼脂/海藻酸钠混合

2. 不同固定方法对细胞性能的影响: 经测定, 琼脂、聚合脱钙及聚合不脱钙的凝胶强度分别为 0.10、0.42、0.60kg/粒子, 成规律性递增。增殖时间分别为 25、30、44h, 发酵时间为 23、14、19h。聚合不脱钙增殖时间最长, 主要原因是脱钙使载体通透性比琼脂还差, 而聚合脱钙尽管通透性好, 但因聚合时部分细胞被杀死而导致增殖时间仍比琼脂长。增殖时聚合不脱钙胶在培养基中逐渐脱钙, 从而通透性变得比琼脂好, 但因脱钙不彻底, 其发酵时间仍比聚合脱钙胶长。由发酵时间可知, 脱钙可使载体通透性增加。故聚合脱钙载体比琼脂载体好。

## (二) 固定化酵母的增殖

1. 增殖曲线: 将固定化酵母放入增殖培养基中振荡培养, 定时取样, 测定凝胶间内细胞数(图 1)。肉眼可见, 约 8h 载体表面形成较小菌落, 继续培养, 菌落连成一片, 形成一致密的细胞活化层。由曲线看出, 达到最大细胞数的时间不同, 最大细胞数值也不同, 说明脱钙可增加载体的细胞容量, 从而提高发酵速度。

### 2. 最适增殖条件

(1) 增殖培养基糖浓度: 在不同糖浓度培养基中增殖时, 凝胶内细胞数和乙醇终浓度(表 2) 随糖浓度增加而增加, 但糖浓度太高, 细胞数下降, 活性也受底物抑制而降低。最适糖浓度为 14Bx。

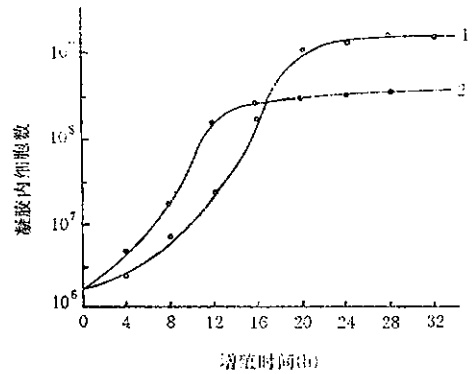


图 1 固定化酵母生长曲线

1. 琼脂-聚丙烯酰胺凝胶 2. 琼脂凝胶

表 2 增殖糖浓度对细胞性能的影响

糖浓度 (Bx)	细胞数 (个/g胶)	乙醇浓度(%V/V)
10	$4.0 \times 10^8$	7.23
14	$3.0 \times 10^9$	8.89
16	$6.90 \times 10^8$	7.62

30Bx, pH5.6, 30℃

(2) 增殖时间: 将固定化酵母放入 14Bx 增殖培养基中培养 12、25、30、35、50h, 细胞数达  $3.5 \times 10^7$ 、 $2.0 \times 10^9$ 、 $3.0 \times 10^9$ 、 $3.0 \times 10^9$ 、 $3.0 \times 10^9$  个/g胶, 并转入 30Bx 糖蜜中培养 30、35、50h, 乙醇浓度分别达到 9.32、9.61、8.92% (V/V)。25—30h 细胞数最大, 乙醇浓度随后也达最大值。但时间过长, 固定化酵母老化, 乙醇浓度降低。

## (三) 固定化酵母发酵

1. 底物浓度对发酵的影响: 不同糖浓度发酵时的乙醇终浓度见表 3。30Bx 糖蜜时乙醇终浓度最高(转化率也最高, 数据未列), 说明最适糖浓度为 30Bx。聚合脱钙胶的乙醇终浓度均比琼脂高, 说明该载体更适于糖蜜酒精发酵。

2. 温度对发酵的影响: 测定了 30Bx pH 5.6 糖蜜中不同温度发酵时乙醇终浓度(表 3), 30℃ 时最高, 且两种载体变化规律相同, 说明聚合脱钙并未改变最适发酵条件。

3. pH 对发酵的影响: 不同 pH 下, 30Bx 糖蜜发酵 (30℃), 由乙醇终浓度(表 3) 数据可看出最适 pH 值为 5.6。

4. 固定化酵母发酵过程: 在最适条件下, 将固定化酵母增殖发酵, 定时取样, 测定乙醇浓度。由图 2 结果可见, 聚合脱钙胶的发酵时间和

表 3 各种因素对乙醇发酵的影响

因 素		乙醇终浓度 (%V/V)	
		聚 合	对 照
底物浓度 (Bx)	20	6.46	3.28
	25	8.80	4.71
	30	9.86	6.34
	35	9.51	6.17
	40	7.37	4.71
温 度 (°C)	25	8.00	6.16
	30	8.65	8.01
	35	6.58	5.11
	40	4.34	4.15
pH 值	5.0	7.07	4.51
	5.6	8.59	6.92
	6.0	6.89	4.97

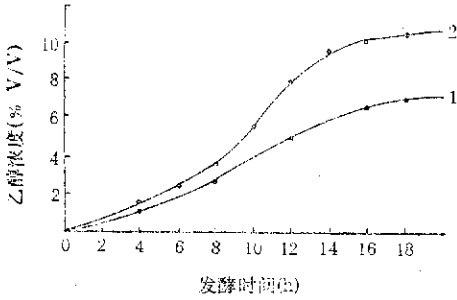


图 2 固定化酵母发酵过程

1. 琼脂凝胶 2. 琼脂-聚丙烯酰胺凝胶

乙醇浓度分别短于和高于琼脂。主要原因是脱钙改进了载体通透性并更适于糖蜜酒精发酵。

## 参 考 文 献

- [1] Kierstan, M. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 19:387, 1977.  
 [2] Shankar, V. et al.: *Biotechnol. Lett.*, 7:615, 1985.  
 [3] Kuu, W.Y. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 25: 1993, 1983.

## AGAR-POLYACRYLAMIDE GEL ENTRAPPED YEAST CELLS FOR PRODUCTION OF ETHANOL FROM MOLASSES

Li Xianzhen Yan Fu

(Dalian Institute of Light Industry Technology, Dalian)

Aqueous solution containing 3% agar, 2% sodium alginate and yeast cells was dropped into 2% calcium chloride solution to give uniform spherical beads. The preformed beads were treated with a mixture of 7.5% acrylamide, 0.4% N,N'-methylene-bis-acrylamide and 0.5%  $\beta$ -dimethyl-aminopropionitrile which were allowed to polymerize by the addition of an initiator. From the composite beads, Ca-alginate was leached out by treating the beads with 1%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  solution to obtain agar-polyacrylamide gel. Because of the removal of sodium alginate and the presence of polyacrylamide, an improved permeation and high mechanical strength were obtained for the beads. Under the optimal conditions of fermentation, 30Bx molasses, pH5.6, 30°C, the final concentration of ethanol was 10.6%. Apparently, this kind of carrier was suitable for molasses fermentation.