

海藻酸铝固定化酵母生产高浓度酒精的研究

田小光 彭万霖 于德水 张介弛 金永焕

(黑龙江省科学院应用微生物研究所, 哈尔滨 150010)

摘要 以海藻酸铝凝胶代替海藻酸钙, 可使固定化酵母使用寿命显著延长, 其海藻酸铝凝胶耐磷酸盐能力比海藻酸钙凝胶提高六倍以上。用海藻酸铝固定化增殖酵母进行分批发酵酒精, 成熟醪中酒精含量由 8.5%—9.0%(V/V) 提高到 11.0%(V/V) 左右。在 1.1L 的两个多层生物反应器中, 装入海藻酸铝固定化增殖酵母, 采用逐步提高糖浓度方法, 进行连续发酵, 成熟醪接收器中酒精浓度平均为 10.3%(V/V), 总糖利用率为 92.4%。

关键词 海藻酸铝, 固定化酵母, 糖蜜酒精

海藻酸钙固定化酵母使用寿命较短, 一般为两个月左右, 其主要原因是培养基中的磷酸盐逐渐使海藻酸钙凝胶破裂和解体。延长海藻酸凝胶使用寿命有许多处理方法^[1,2]。为选用操作简便, 成本低的方法, 我们采用铝离子对钙离子置换法^[3], 形成的海藻酸铝凝胶耐磷酸盐能力明显增强。用海藻酸铝固定化酵母, 以逐步提高糖浓度方法生产高浓度酒精。Wada 等曾用葡萄糖为原料的完全培养基连续生产高浓度酒精, 取得很好的结果^[4]。但以粗糖质甜菜废糖蜜为原料连续生产高浓度酒精尚未见报道。现将这一研究结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

菌种: 酒精酵母(*Saccharomyces cerevisiae* 204)。

甜菜废糖蜜: 黑龙江明水糖厂。

海藻酸钠: 大连水产化工厂, 食品级; 氯化

钙: 市售化学纯试剂; 硫酸铝: 沈阳市试剂二厂, 分析纯; 油酸: 沈阳市新西试剂厂, 化学纯。

1.2 培养基(%)

酵母细胞培养基: 葡萄糖 1.0, 蛋白胨 0.3, 酵母膏 0.3, pH 5.0。

细胞增殖培养基: 含糖 10.0 废糖蜜, 尿素

0.5, KH_2PO_4 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025, CaCl 0.2, pH 5.0。

发酵培养基: 含糖 16.0—21.0 废糖蜜 (23.4—30.7 $^\circ\text{Bx}$), KH_2PO_4 0.1, pH 5.0。

1.3 细胞固定化方法

无菌条件下, 将 2% 海藻酸钠溶液 100ml, 同 5ml 酵母细胞均匀混合, 注入 5% 氯化钙溶液中, 固化 4h。将形成的海藻酸钙凝胶球经水洗后, 移入 1% pH 3.0 $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ 溶液中, 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中放置过夜。

1.4 多层生物反应器

玻璃反应柱高 26cm, 内径 6cm, 柱内分层, 每层中放入固定化酵母。培养基由电子微量泵送入柱中, CO_2 由柱顶端排出。反应器置于恒温室中, 发酵温度 32 $^\circ\text{C}$ 。固定化酵母用量为反应器工作体积的 30%。

1.5 分析方法

总糖测定: 廉爱浓法^[5]。

残糖测定: 改进廉爱浓法^[5]。

停留时间: 反应器中凝胶球体积与每 h 供给培养基的体积之比。

酒精生产能力: 以 1L 固定化增殖酵母在 1h 内产生酒精的 g 数来表示。

“八·五”国家科技攻关项目的部分研究成果
姜秀兰同志参加部分试验工作
1994-10-07 收稿

2 结果与讨论

2.1 海藻酸凝胶耐磷酸盐试验

分别称取 1g 海藻酸钙凝胶球和海藻酸铝凝胶球, 分别放在 50ml 0.1mol/L pH 7.0 磷酸盐缓冲液中, 间歇振荡条件下, 于室温下放置, 观察两种凝胶的抗磷酸盐能力^[6]。海藻酸钙凝胶球 24h 已完全破碎; 海藻酸铝凝胶球第 6d 时基本保持原来的强度和弹性。这一结果同山出等人报道的海藻酸铝固定化酵母的稳定性和强度都增加的结果一致。为增强海藻酸凝胶的耐磷酸盐能力以延长使用寿命, 我们还采取了其他处理方法。用甘油在室温下处理海藻酸钙凝胶 4h 和 12h 后, 在磷酸盐溶液中放置 48h, 球体多处裂开。35℃ 将海藻酸钙凝胶脱水 24h, 球体在磷酸盐溶液中 24h 已多处裂开。

从以上试验结果看出, 用 $Al_2(SO_4)_3$ 处理海藻酸钙凝胶, 形成的海藻酸铝凝胶, 抗磷酸盐能力最强。而采用脱水方法处理海藻酸钙凝胶效果不大。

2.2 海藻酸铝固定化酵母发酵条件试验

2.2.1 pH 的影响: 将海藻酸铝固定化增殖酵母凝胶球各 30ml 分别接种于不同 pH 的含 18% 糖的发酵培养基中, 32℃ 静止发酵 24h, 观察不同 pH 的影响。

表 1 pH 的影响

发酵液 pH	成熟醪锤度 (°Bx)	细胞数 ($10^9/ml$)	酒精含量 (%)	残糖 (%)
3.5	19.5	6.2	1.9	12.0
4.0	8.5	7.0	9.0	0.8
4.5	7.0	8.0	9.6	0.83
5.0	6.5	7.5	10.0	0.72
5.5	6.5	8.4	10.0	0.74

从表 1 结果看出, 海藻酸铝固定化酵母最适 pH 范围 4.5—5.5, 同海藻酸钙固定化酵母最适 pH 一致, 而 pH 3.5 情况下, 明显抑制酒精生成。

2.2.2 底物糖浓度的影响: 取海藻酸铝固定化增殖酵母各 30ml, 分别接入含糖 16%、18%、21% (23.4—30.7°Bx) 的 100ml 发酵培养基

中, 观察不同底物浓度对酒精生成的影响。结果见表 2。

表 2 糖浓度的影响

糖浓度 (%)	成熟醪锤度 (°Bx)	细胞数 ($10^9/ml$)	酒精含量 (%)	发酵时间 (h)
16	7.0	6.9	8.9	24
18	7.0	6.5	10.0	26
20	7.0	7.2	10.3	29
21	8.1	7.0	11.0	30

从表 2 看出, 海藻酸铝固定化酵母发酵底物糖浓度应控制在 20% 以内, 因这种凝胶虽然使用寿命延长, 但葡萄糖的有效扩散系数有所下降^[3], 我们采用在培养基中适当增加氮原量的方法, 仍可取得满意结果。

2.2.3 发酵时间的影响: 将海藻酸铝固定化增殖酵母各 30ml, 分别接种于含糖 18% (26.3°Bx) 的 100ml 发酵培养基中, 发酵不同时间, 测定发酵醪中酒精含量。各试验组分别发酵 20、25、30h 后, 成熟醪锤度分别降为 8.8、8.0、7.0°Bx, 终酒精浓度为 9.1、9.5、10.1%。从结果看出, 随发酵时间延长, 糖的转化率逐渐增加, 30h 达到发酵终点。

2.3 海藻酸铝固定化增殖酵母连续生产酒精

2.3.1 凝胶球传质效果的改善: 在总体积 1.1L 的两个多层生物反应器中装入 30% 的海藻酸铝固定化增殖酵母凝胶球。首先注满含 10% 糖发酵培养基, 进行预发酵, 经预发酵后, 凝胶球不再出现上浮现象。亦可采取在凝胶中加入无菌细砂方法, 以改善凝胶传质效果, 结果将另文报告。

2.3.2 逐步提高糖浓度生产高浓度酒精: 在进行连续发酵酒精时, 采用逐步提高糖浓度方法。糖浓度为 10、16、19%, 每种糖先进行两批分批发酵, 然后再进行连续发酵。10%、16% 的糖各连续发酵 5d, 然后再以 19% 的糖进行较长时间连续发酵。在连续供给 19% 糖发酵培养基情况下, 酒精含量为 10.1—10.6% (V/V), 平均为 10.3%。停留时间为 3.3h。总糖利用率为 91.4—93.4%, 酒精生产能力为 23.4g/L 固定化酵母·h。

2.3.3 多层生物反应器发酵稳定性: 采用多层生物反应器和逐步提高糖浓度方法, 进行连续酒精发酵。

胶中活细胞的百分比, 能维持较高的细胞生理活性^[7]。

我们采用逐步提高糖浓度的方法, 未达到 Wada 等人报道的更显著的效果。这可能与他们使用纯葡萄糖底物的完全培养基, 而我们是使用粗质糖原料有关。另外与使用菌种不同也有关系。

参 考 文 献

[1] 严复, 曲立民, 金凤娣, 等. 生物工程学报, 1985, 1(1): 81-84.
 [2] 钱祖泽等. 第一次全国工业生化学术会议文摘汇编, 1983, 66.
 [3] 山出和弘, 吉田真树, 福岛达. 发酵工学会誌, 1989, 67(4): 245-253.
 [4] Wada M, Kato J, Chibata I. Eur J Appl Microbiol, 1981, 11: 67-71.
 [5] 广东轻工业厅. 糖蜜酒精生产化学技术, 广州: 广东科技出版社, 1961 61-75.
 [6] 海洪, 杨根敏, 顾馨. 中国抗生素杂志, 1990, 15(6): 451-456.
 [7] Saigal D, Viswanathan L. Enzyme Microbiol Technol, 1984, 6(2): 78-80.

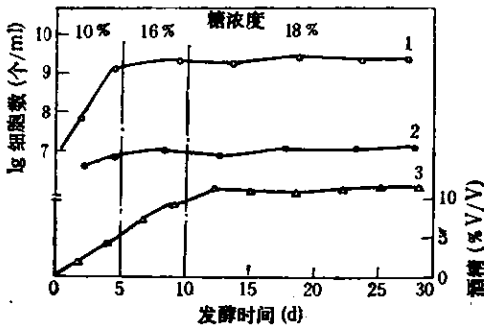


图1 多层生物反应器发酵稳定性
1. 固定化细胞, 2. 游离细胞, 3. 酒精

由结果(图1)看出, 通过逐步提高糖浓度方法, 能达到生产高浓度酒精的目的。凝胶球内的酵母细胞数即使在高浓度情况下, 仍能维持较高水平 (10⁹/ml), 并且保持较高出芽率。在制备固定化酵母时, 加入的添加剂, 提高了凝

STUDY ON HIGH CONCENTRATION OF ETHANOL FERMENTATION OF IMMOBILIZED GROWING YEAST

Tian Xiaoguang Peng Wanlin Yu Deshui Zhang Jiechi Jin Yonghuan
(Institute of Applied Microbiology, Heilongjiang Academy of Sciences, Harbin 150010)

Abstract The useful life time of immobilized yeast was prolonged greatly when alginate calcium repllyed by alginate aluminium. The ability of enduring phosphate of alginate aluminium gel was improved over six times than that of alginate calcium gel. The concentration of ethanol in final broth is increased from 8.5-9.0%(V/V) to about 11.0%(V/V). The final concentration of ethanol of continuous fermentation in two 1.1L multi-storey bioreactor filled with immobilized growing yeast in AL-Alg gel, by the way of improving the concentration of sugar step by step, could be 10.3%(V/V) at average, and the utilization ratio of total sugar is 92.4%.

Key words Alginate aluminium, Immobilized yeast, Molasses ethanol