

固定化酵母细胞发酵生产酒精的研究*

王 连 阳

(华侨大学化工与生化工程系, 泉州 362011)

摘要 研究以活性炭为载体的吸附法制备固定化酵母增殖细胞. 从糖蜜发酵生成酒精的实验结果表明, 对于高浓度底物抑制、产物抑制和温度变化的耐受程度, 固定化细胞系统明显优于游离细胞, 且其表观动力学常数明显受到扩散影响. 在固定化细胞系统的连续发酵过程中, 当稀释度为 0.89 h^{-1} 时, 酒精的最大生产能力为 $19.5 \text{ g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$.

关键词 酿酒酵母, 固定化, 酒精

分类号 TS 261.11

70年代以来, 世界性能源危机, 人们对再生性资源增加兴趣^[1,2]. 近几年, 国外已开始利用汽油加酒精作为汽车燃料^[3], 酒精的供应远远不能满足市场的需要. 因此, 改革酒精生产的传统发酵工艺势在必行. 用固定化的增殖细胞实现连续发酵, 是酒精生产的发展方向^[1,4]. 固定化细胞的活性和稳定性, 在很大程度上受到制备方法和载体的制约. 包埋法制备的固定化细胞, 整体结构较疏松, 在长时间的操作过程中, 机械稳定性不够理想. 吸附法有操作简单、价格便宜、细胞的酶活不受操作的影响、机构稳定性较好等优点. 为此, 本文选用活性炭为载体的吸附法制备固定化细胞. 在研究固定化细胞制备方案的基础上, 比较固定化细胞与游离细胞酒精发酵的一些动力学性质. 在实验室条件下进行连续发酵, 并求知连续过程各参数的关系.

1 材料和方法

1.1 材料

菌种为酿酒酵母古巴-2, 福建仙游糖厂提供; 糖蜜为甘蔗废糖蜜, 福建泉州糖厂提供; 活性炭为上海活性炭厂出品. 其它有关化学药品, 均为 CP 或 AR.

1.2 固定化

(1) 载体预处理^[5]. 活性炭经过筛, 选取适当直径(0.8~0.9 mm)的颗粒, 用水洗3次再加适量蒸馏水煮沸0.5 h, 烘干后即可备用. (2) 固定化增殖细胞制备. 量取一定量预处理过的载体, 加入适量种子培养基, 一起灭菌后接种一定量的酵母细胞悬浊液, 置于31℃下培养, 使细胞边生长边被吸附于载体上. 经24 h之后, 倾去种子培养液, 加入增殖培养基, 增殖一定时间, 倾去增殖液, 加入一定比例的试剂处理, 用生理盐水洗涤2次, 即得到固定化酵母增殖细

* 本文1993-11-16收到

胞(在常规无菌条件下操作)。

1.3 培养基

(1)斜面培养基:在麦芽汁中,加入琼脂 2~2.5%。(2)种子培养基(%):糖蜜为 7~10(总还原糖计), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为 0.2,浓 H_2SO_4 为 0.2,用自来水配制,pH 4.0。(3)增殖培养基(%):葡萄糖为 10.0,酵母膏为 0.5,蛋白胨为 0.3, KH_2PO_4 为 0.15, MnSO_4 为 0.02, CaCl_2 为 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 为 0.05,混合配制。(4)发酵培养基(%):糖蜜 15~20(总还原糖计),自来水配制,pH 4.5。

1.4 实验

(1)分批培养.量取 3 mL 固定化增殖细胞,接进装有 100 mL 已灭菌的发酵培养基的三角瓶中,摇匀后在 31℃ 静态培养 48 h. 游离细胞也在相应条件下培养。(2)连续培养.量取一定体积的固定化细胞,装入置于恒温系统的玻璃柱反应器中.柱高 330 mm,内径 35 mm.柱中心有控制液面的溢流管,上部和底部装有磁填料和玻璃丝,顶端用纱布包裹着.待恒温后调节电子蠕动泵,输入发酵培养基并控制流速.当流入体积大于反应器中固定化细胞体积的 3 倍以上,过程趋向稳定则可取样分析。(3)动力学参数测定方法.采用微分反应系统^[6],将 10 mL 固定化细胞装入微分反应器,恒温之后,由输液泵输入 300 mL 含一定浓度的葡萄糖培养基,并调节流速让其循环流动.每 10 min 取样 1 次,分析其中葡萄糖浓度,共取样 3 次.含不同浓度的葡萄糖培养基按相同方法进行实验.反应速度以在反应初始线性区内,每升固定化细胞每小时消耗葡萄糖的克数表示。

1.5 分析

(1)糖与酒精的浓度和 pH 值.按前报告方法^[7]进行。(2)细胞数.可用血球计数板法测定。(3)固定化细胞机械强度.取一定量的固定化细胞,加入定量水,定时和定转速搅拌后,测定透光率并作相对比较。

2 结果与讨论

2.1 吸附法制备固定化细胞

按正交设计法,安排多因素实验并结合单变数方法,获得较合适的制备方案.即在菌种和载体(活性炭)等因素不变的前提下,加入活性炭的种子培养基 pH 5.5;酵母悬浊液的接种量与载体投入量要求适当配比;固定化细胞增殖时间为 30 h;化学试剂的处理必须量小时间短(其中化学试剂处理是显著因素)。

根据上述条件制备的固定化细胞,能比较完整地保留细胞的天然环境和存活状态,固定在载体上的细胞密度较大且能很好地繁殖,为糖分解代谢生成酒精提供充分的微环境.此外,固定化细胞的机械强度较好.在静态条件下其实验结果:发酵液酒精浓度(p)为 $0.76 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,对酒精的生产能力(p_r)为 $52 \text{ g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$,发酵效率(η)为 92%。

2.2 高浓度糖的抑制程度

选用初糖(还原糖)浓度 $C_r(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$ 为 0.43,0.94,1.71,2.74 和 3.53 的 5 种发酵培养基,分别进行固定化细胞和游离细胞的静态培养.实验结果如图 1 所示(曲线 1 表示固定化细胞,曲线 2 表示游离细胞).由图可见,发酵活性 A_t (因酒精生产属生长关联型,故可用底物消耗速

度即反应速度,表示其活性)随葡萄糖浓度的增加而增大,但当糖浓度为 $1.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,游离细胞发酵活性开始下降,而固定化细胞活性继续增至糖浓度达 $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,方受到过量底物的抑制.可见,固定化细胞在耐受底物抑制方面明显优于游离细胞.当糖浓度超过 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 后,固定化细胞的发酵活性就渐渐明显高于游离细胞.这是由于载体上的细胞密度较大,加快了反应速度,并且固定化细胞与发酵液之间产生固-液界面效应而有利于底物(或产物)的传递.经进一步探讨认为,酵母细胞被固定在载体中局限的小空间,相互制约着的细胞在受压抑下增殖,发生形态和生理上的变化,导致葡萄糖磷酸化的速度和糖摄取速度加快^[8~9].这种变化,可能是固定化细胞耐受高浓度糖和提高发酵活性的主要原因.

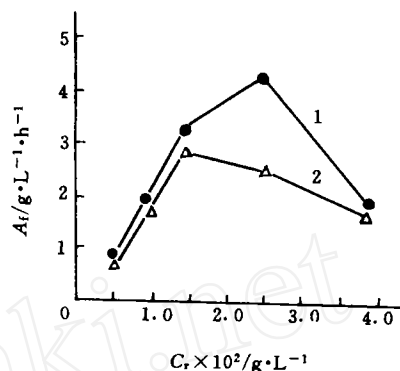


图1 固定化细胞与游离细胞耐受底物抑制程度

2.3 产物抑制的程度

配制含酒精浓度($p/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$):0.5,1,1.25和1.5的发酵培养基(其它组份不变),分别加入固定化细胞和相应的游离细胞进行静态发酵,其结果如图2所示(曲线1表示固定化细胞,曲线2表示游离细胞).随着加入培养基的酒精含量增加,固定化细胞与游离细胞受到抑制的程度均增大,相对活性 A_r 减小.当酒精含量为 $11 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,游离细胞受到抑制,而固定化细胞直至酒精含量达 $1.48 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 方受到完全抑制.据报道[8],海藻酸钙包埋法制备的固定化细胞,在酒精含量为 $1.48 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,也受到完全抑制.显然,如工业上采用固定化细胞发酵,可以得到较高浓度的终产物.

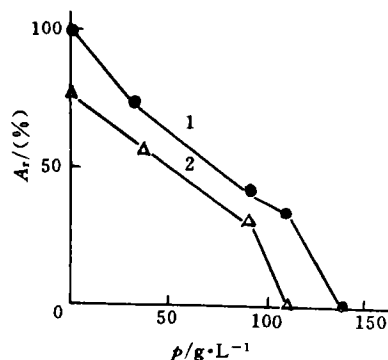


图2 产物抑制的相对比较

2.4 固定化细胞的热稳定性

固定化细胞(放入生理盐水)与游离细胞在各种温度下放置2h后,分别加入发酵培养基,在 31°C 静置培养,其实验结果见附表所示.可以看到,在相同条件下,固定化细胞比游离细胞耐热.换句话说,短时间的温度变化($28\sim 34^\circ\text{C}$)对固定化细胞发酵活性没有明显的影响,这一点与细胞被固定在非可溶性载体上有关系.

附表 不同预处理温度(θ)对发酵的影响

$\theta / (^\circ\text{C})$	28	31	34	37	40
固定化细胞	0.95	1.01	1.01	0.87	0.48
游离细胞($p/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.68	0.74	0.68	0.55	0.24

2.5 固定化细胞的表观动力学常数

从不同粒径(1.25 mm 和 0.5 mm)的固定化细胞实验,获得表观反应速度(v)与糖浓度(C_s)关系的一系列数据,按 Monod 方程的 Lineweaver-Burk 双倒数法进行线性回归并求知表观动力学常数,其结果表示在图 3(曲线 1 与曲线 2 分别表示粒径为 1.25 mm 与 0.5 mm 的固定化细胞)。固定化细胞粒径为 1.25 mm 时,表观最大反应速度, $v_{\max} = 123.5 \text{ g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$, 表观饱和常数, $K_s = 15.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。当固定化细胞粒径为 0.5 mm, 则 $v_{\max} = 152.4 \text{ g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$, $K_s = 12.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。由此可见,粒径较大的固定化细胞,发酵过程中内扩散阻力影响较大。

2.6 固定化细胞连续发酵

量取粒径为 0.9 mm 的固定化细胞 94 mL 装入玻璃柱反应器,培养基初糖浓度为 $1.24 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在 31°C 进行连续发酵,其结果描绘于图 4[曲线 1 表示生产能力,曲线 2 表示酒精浓度,曲线 3 表示发酵效率,曲线 4 表示残糖浓度(C'_s)]。由图可以看到,随着稀释度(D)增大,料液中糖等营养源与细胞床层接触时间减少,导致酒精浓度和转化效率(η)降低,而残糖浓度升高;在稀释度为 0.89 h^{-1} 时,生产能力 ρ_r (按稳态法计算)出现一个峰值为 $19.5 \text{ g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

在游离细胞连续发酵中,如稀释度等于细胞最大的比生长速度 μ_{\max} (酿酒酵母 $\mu_{\max} = 0.4 \text{ h}^{-1}$),反应器中的细胞将被洗出(Washout),连续过程无法继续,而固定化细胞系统不会出现这种现象^[3]。本文在固定化细胞连续发酵中, D 比 μ_{\max} 大 1 倍左右,仍获得较高的生产能力。这是由于料液粘度较低和液固界面保持较高浓度的营养组份,以致不断改善连续流动过程的传递特性^[3];固定化细胞装在填充柱中的连续发酵,生成的酒精不断流出而减小产物抑制,并且减小发酵设备的容积和减轻后处理的负担。

3 结论

(1) 吸附法(活性炭为载体)制备的固定化细胞,活性高、机械稳定性好、操作简便和费用较低,是一种有效的固定化方法。固定化酵母增殖细胞在耐受高浓度底物、产物和温度变化方面

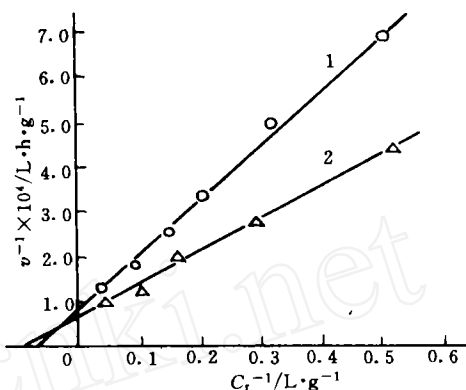


图 3 固定化细胞不同粒径的 Lineweaver-Burk 图

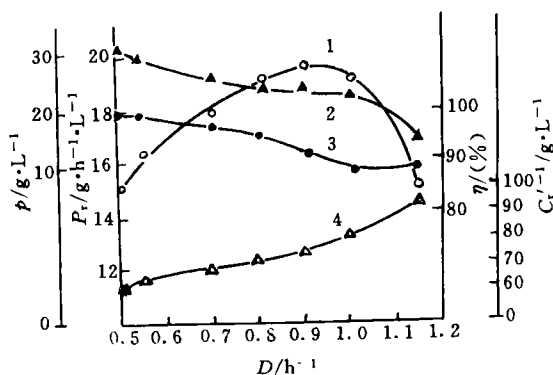


图 4 连续发酵中稀释度对其它参数的影响

明显优于游离细胞。

(2)固定化酵母增殖细胞的表观动力学常数受内扩散的影响, K_s 的值随着固定化细胞粒径的增加而增大,而 v_{\max} 则相反。

(3)从连续发酵过程得到稀释度与诸参数关系的数据是很有意义的,可供参考。

(4)在连续过程中,流速较大时有部分细胞脱落现象,若细胞生长弥补不了细胞的流失,可通入增殖培养基予以恢复原来的活性。流出液中残糖浓度较高,可采用多柱串连的操作。

参 考 文 献

- 1 Shipra D, Mita B, Majumder S K, et al. Production of alcohol from starch by immobilized cells of *saccharomyces diastaticus* in batch and continuous process. *Process Biochemistry*, 1990, 25(2): 43~45
- 2 Godia F, Casas C, Sola C. A survey of continuous ethanol fermentation systems using immobilized cells. *Process Biochemistry*, 1987, 22(2): 43~47
- 3 Tyagi R D, Ghose T K. Analysis of continuous rapid ethanol fermentation in immobilized cell reactor. *Biotech. Bioeng.*, 1982, 24: 781~795
- 4 顾其丰. 利用固定化运动发酵单胞菌在填充床反应器内连续发酵生产酒精. *工业微生物*, 1990, (2): 1~6
- 5 谈家林. 发酵法生产酒精的动向. *食品与发酵工业*, 1981, (4): 32~37
- 6 张治根. 固定化酵母反应动力学的研究. *生物工程学报*, 1989, 5(1): 77~83
- 7 王连阳. 固定化增殖细胞发酵生产酒精的研究. *福建化工*, 1991, (4): 1~5
- 8 曲立民, 严复. 固定化酵母酒精发酵动力学性质的初步研究. *微生物学杂志*, 1986, (6): 30~33
- 9 Galazzo J L, Bailey J E. In vivo nuclear magnetic resonance analysis of immobilization effects on glucose metabolism of yeast. *Biotech. Bioeng.*, 1989, 33(10): 1287~1297

A Study of Ethanol Fermentation by Immobilized Yeast Cell

Wang Lianyang

(Dept. of Chem. and Biochem. Eng., Huaqiao Univ., 362011, Quanzhou)

Abstract For producing ethanol from molasses fermentation, the author studies the preparation of immobilized yeast cell by active carbon adsorption. The immobilized yeast cell system is shown experimentally to be far better than free cell system in high concentration substrate inhibition, production inhibition, and temperature change endurance. The immobilized cell system shows an apparent kinetic constant significantly influenced by diffusion limitation. It leads to a highest ethanol productivity of $19.5 \text{ g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ at a dilution rate of 0.89 h^{-1} during its continuous fermentation test.

Keywords *saccharomyces cerevisiae*, immobilization, ethanol