

甘蔗块固定化酵母的制备及其在蔗汁燃料乙醇生产中的应用*

梁磊¹, 张远平², 朱明军¹, 梁世中¹

1(华南理工大学大学生物科学与工程学院, 广东 广州, 510006)

2(广州甘蔗糖业研究所 广东省甘蔗改良与生物炼制重点实验室, 广东 广州, 510316)

摘要 以甘蔗块为载体固定酵母细胞, 通过优化载体大小和预处理方式, 制备得到性能优良的固定化酵母, 应用于蔗汁燃料乙醇的生产。研究结果表明, 大量酵母细胞固定于甘蔗块内部空腔以及吸附于甘蔗块表面; 较小的甘蔗茎块作为固定化载体, 乙醇产率增加 10% 左右; 冷冻储存的甘蔗块经过解冻、去木质素处理后固定酵母, 以 40% 的装填率发酵 36 h, 乙醇浓度达 99.34 g/L, 糖利用率为 99.23%, 发酵效率为 93.09%。

关键词 固定化酵母, 甘蔗块, 燃料乙醇

固定化细胞发酵技术有许多突出的优点: 由于它大大增加了细胞浓度, 增强了菌体对外部条件如温度和酸碱度的抵抗能力; 缩短了发酵周期, 提高反应器单位体积的生物转化速率; 而且由于细胞被固定, 减少了细胞流失, 细胞可长时间反复使用, 并有利于产物分离等。这为发酵的连续化和规模化提供了方便。目前固定化细胞技术已经在食品工业、环境保护、能源开发等方面得到广泛的应用^[1]。酒精酵母细胞固定化大部分采用海藻酸钠、聚乙烯醇(PVA)等包埋法, 但存在成本较高、固定化过程较繁琐且对细胞有损伤, 载体软化现象等缺点^[2]。探索新的固定化载体和固定化方式, 营造更适合细胞生长和代谢的环境是固定化技术发展的方向。各种天然材料, 如水果块、麸皮、去木质素的纤维素残渣, 都曾作为固定化载体被成功应用于酿酒和乳清发酵等食品相关工业^[3~5]。

本文利用甘蔗茎块中天然的细胞纤维间隙和纤维素自身对酵母的吸附作用, 有利于酵母吸附并在其内部生长的特点制备固定化酵母并利用其发酵甘蔗汁生产酒精。主要探讨了甘蔗块固定化酵母的制备方法, 并对其制备条件进行优化, 确定了最佳载体大小、材料的预处理方式、酒精发酵时固定化酵母的装填率。研究结果为能源甘蔗燃料乙醇的实施奠定技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料

第一作者: 博士研究生(张远平高级工程师为通讯作者)。

* 广东省科技计划项目(No. 2005B10501003), 广东省科技攻关项目(No. 20064990055)

收稿日期: 2008-11-24, 改回日期: 2008-12-16

1.1.1 菌种

酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) AS2.1190, 广州甘蔗糖业研究所保藏。

1.1.2 培养基

(1) 种子培养基(YPD) 葡萄糖 20g/L, 酵母粉 10g/L, 蛋白胨 20g/L, 121℃灭菌 15 min。

(2) 发酵培养基: 取堆放 3 d 内的新鲜甘蔗(品种: 00236, 广州甘蔗糖业研究所湛江甘蔗育种基地提供), 榨汁过滤后, 121℃灭菌 15 min。

(3) 甘蔗块: 新鲜的甘蔗茎经清洗去皮后, 切成块状, -20℃保存。

1.2 主要仪器设备

小型甘蔗榨汁机; 酒精比重计; SHP-2500 型生化培养箱; SGD-III 型全自动还原糖测定仪; SKY-2102 型摇床; R205210 型双层立式蒸汽压力消毒器; BA2000 双目显微镜; 血球计数板; HITACHI S-300N 型电镜。

1.3 方法

1.3.1 甘蔗块的预处理

将甘蔗去皮后切成块, 按 5 种不同方式处理, 第 1 组不做处理; 第 2 组用 1% NaOH 浸泡 4 h 去木质素^[3], 并用磷酸调 pH 至中性; 第 3 组置于冷冻干燥机中进行冷冻干燥; 第 4 组冻融处理; 第 5 组冻融处理后进行去木质素处理。

1.3.2 固定化酵母的制备

取适量处理后甘蔗块, 加入 YPD 培养基中, 灭菌后, 接入培养至对数生长期的酵母种子液, 置于 30℃转速为 150 r/min 培养 12 h。

1.3.3 发酵实验

将制备好的固定化酵母按照一定接种量(装填

率)接入 150 mL 蔗汁培养基,静态发酵。每 2 h 称量发酵液的 CO₂ 失重情况,直至重量恒定即发酵结束。发酵开始时测定发酵液中的总糖含量,发酵结束后测定发酵液中的乙醇含量和残糖量。

1.3.4 酵母细胞数的测定

将 10 g 蔗块固定化酵母浸入 90 mL 已灭菌的 1/4 格氏试剂(Merck, Germany)中,100 r/min 振荡 30 min,梯度稀释后,血球板计数。同样,分别取 1 mL 固定化酵母发酵和游离酵母发酵结束后的发酵液加于 99 mL 已灭菌的 1/4 格氏试剂中,梯度稀释后,血球板计数^[5]。

1.3.5 酵母固定化情况电镜观察^[6]

1.3.6 发酵液中还原糖的测定^[7]

1.3.7 发酵液中乙醇浓度测定^[8]

1.3.8 CO₂ 生成速率(dCO₂/dt)计算

$$\text{CO}_2 \text{ 生成速率} / \text{g} \cdot \text{h}^{-1} \times \frac{\text{重量}_t(\text{g}) - \text{重量}_{t-2}(\text{g})}{2(\text{h})} \quad (1)$$

1.3.9 酒精发酵效率的计算

$$\text{发酵效率} / \% = \frac{\text{酒精度}(\text{g})}{[\text{初始糖}(\text{g}) \times \text{残糖}(\text{g})] \times 0.5} \times 100 \quad (2)$$

1.3.10 糖利用率率的计算

$$\text{糖利用率} / \% \times \frac{\text{初始糖}(\text{g}) \times \text{残糖}(\text{g})}{\text{初始糖}(\text{g})} \times 100 \quad (3)$$

2 实验结果与分析

2.1 酵母固定化的电镜观察

由图 1 可知,甘蔗的薄壁细胞、维管束等组织结构经预处理后,形成很大的空腔(图 1A),有利于大量酵母在其内部生长繁殖(图 1B)。同时大量的酵母细胞被吸附固定于甘蔗块的表面(图 1C),说明蔗块天然的细胞纤维间隙和纤维素自身对酵母具有良好的固定化作用,固定化过程兼具吸附作用和包埋作用的特点。

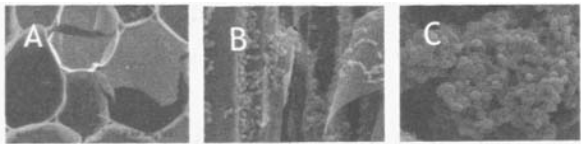


图 1 甘蔗块固定化酵母电子显微镜照片

2.2 载体大小的确定

将甘蔗去皮后切成长度分别为 1 cm、2 cm、2 cm 中空 1 cm 3 种大小,按 1.3.2 方法制备固定化酵母,按 1.3.3 方法进行发酵实验,结果如表 1 所示。

表 1 载体大小对固定化酵母酒精发酵的影响

甘蔗茎块长度 /cm	体积 /cm ³	表面积 /cm ²	总表面积 /cm ²	残糖浓度 /g · L ⁻¹	乙醇体积分数 (20℃)/%	发酵效率 /%	糖利用率 /%
1.0	5.30	19.90	150.2	1.37	11.20	90.9	99.2
2.0	10.60	28.50	107.5	2.36	10.42	87.1	98.7
2.0(中空直径 1cm)	4.71	23.55	200	1.26	11.34	91.9	99.3

由表 1 结果可知,在相同条件下,3 种大小甘蔗块发酵效果比较:2 cm 中空>1 cm>2 cm。1cm 长蔗块的乙醇产率比 2cm 长蔗块增加 10 % 左右,因为小蔗块的总表面积比大蔗块增加 40 % 以上,基于营养吸收和代谢产物扩散因素,在蔗块内部,酵母集中在靠外表面的一侧,大蔗块中心部分酵母的密度很低,形成所谓死亡区域,所以小蔗块发酵乙醇产率较高。将 2 cm 长的蔗块中心部位挖去一直径为 1 cm 的圆形部分,则可以大大增加甘蔗块的表面积,进而改善固定化效果。由于 2cm 中空和 1 cm 发酵效果相差不大,基于制备工艺简化原则,选取 1 cm 蔗块作为载体。

2.3 载体材料预处理

按 1.3.1 方法处理蔗块,按 1.3.3 方法进行发酵

实验。

2.3.1 预处理对 CO₂ 生成速率的影响

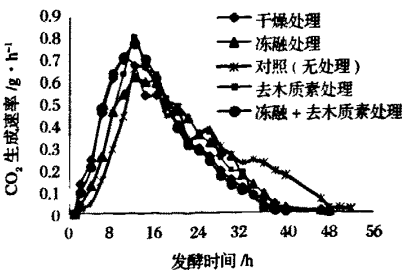


图 2 载体材料预处理方式对 dCO₂/dt 的影响

由图 2 可知,发酵前期冻融+木质素处理组 CO₂ 生成速率最快,其最大的 CO₂ 生成速率达到 0.85 g/h。

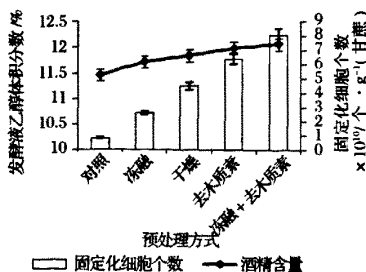


图3 载体材料预处理方式对乙醇体积分数的影响

2.3.2 预处理对固定化和发酵效果的影响

由图3可知,对载体材料进行适当的预处理,将有效提高固定化效果和固定化细胞的催化效能。固定化细胞个数和乙醇体积分数由高到低依次为,冻融+去木质素处理组>去木质素处理组>干燥处理组>冻融处理组>对照组。冻融处理结合去木质素处理的蔗块,固定化效果和发酵效果最好,原因可能为冻融处理和去木质素处理后蔗块内部的空腔面积增加,而且吸附作用增强,固定化细胞能力提高,进而改善发酵效果。

2.4 载体装填率的确定

2.4.1 载体装填率对CO₂生成速率的影响

按1.3.3方法,比较不同固定化载体装填率对CO₂生成速率的影响。由图4可知,发酵过程中的CO₂生成速率随固定化酵母载体装填率的升高而升高。

2.4.2 载体装填量对发酵效果的影响

表2 载体装填量对固定化酵母乙醇发酵的影响

装填率/%	初始糖浓度/g·L ⁻¹	残糖浓度/g·L ⁻¹	乙醇质量浓度/g·L ⁻¹	发酵效率/%	糖利用率/%
20	189.70	2.19	95.67	89.71	98.84
30	189.70	1.73	97.22	91.24	99.09
40	189.70	1.46	99.34	93.09	99.23
50	189.70	1.62	99.25	92.24	99.14

由表2可知,在一定范围内,乙醇体积分数随固定化酵母装填率的升高而升高,装填率为40%时,乙醇质量浓度达到最高99.34 g/L,发酵效率为93.09%;而当固定化酵母装填率大于40%时,乙醇得率和发酵效率几乎保持不变。由此可知,在甘蔗块固定化酵母发酵甘蔗汁生产乙醇的过程中,在一定的固定化酵母装填率以下,发酵效果受装填率的影响较大,而当装填率达到一定程度时,固定化酵母的装填率对发酵效果的影响不显著。原因可能由于一方面固定化酵母的装填率低于一定值时,固定化酵母越多,酵母细胞对于甘蔗汁中的糖分的利用率越充分,

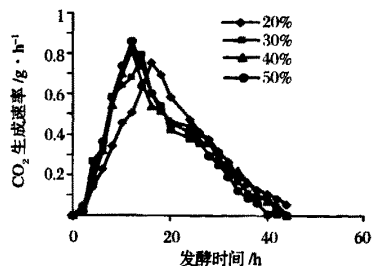


图4 载体装填率对dCO₂/dt的影响

由表2可知,在一定范围内,乙醇体积分数随固定化酵母装填率的升高而升高,装填率为40%时,乙醇体积分数达到最高99.34 g/L,发酵效率为93.09%;而当固定化酵母装填率大于40%时,乙醇得率和发酵效率几乎保持不变。由此可知,在甘蔗块固定化酵母发酵甘蔗汁生产乙醇的过程中,在一定的固定化酵母装填率以下,发酵效果受装填率的影响较大,而当装填率达到一定程度时,固定化酵母的装填率对发酵效果的影响不显著。原因可能由于一方面固定化酵母的装填率低于一定值时,固定化酵母越多,酵母细胞对于甘蔗汁中的糖分的利用率越充分,因而增加装填率,有利于乙醇发酵;另一方面,当发酵过程中固定化酵母的装填率大于一定值时,固定化酵母处于饱和状态,发酵过程中的物质传递受到限制,甘蔗汁中的总糖分一定,因而继续提高装填率对乙醇发酵的效果影响较小。

因而增加装填率,有利于乙醇发酵;另一方面,当发酵过程中固定化酵母的装填率大于一定值时,固定化酵母处于饱和状态,发酵过程中的物质传递受到限制,甘蔗汁中的总糖分一定,因而继续提高装填率对乙醇发酵的效果影响较小。

3 结论

(1)蔗块可作为固定化酵母的载体用于蔗汁乙醇生产。

(2)从载体大小对发酵的影响来看,甘蔗茎块体积小,总表面积大,发酵效果较好,基于制备工艺简化

原则,采用截面直径为 1cm 的蔗块作为固定化载体。

(3)从载体的处理方式对发酵的影响来看,预处理有利于固定化和发酵,无论是 CO₂ 生成速率还是乙醇体积分数,冻融+木质素处理的载体固定化效果较好。

(4)从装填率对发酵的影响来看,一定范围内,装填率越高 CO₂ 生成速率也越大,40 %装填率的发酵液中乙醇体积分数最高,故选择 40 %的装填率较为合适。

参 考 文 献

- 1 张超,王立,高虹,等. 固定化细胞应用进展[J]. 微生物学杂志, 2006, 26(4): 82~84
- 2 Kiran N Sree, Sridhar M, Venkateswar L Rao. High alcohol production by repeated batch fermentation using an immobilized osmotolerant *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2000, 24: 222~226
- 3 Nikolaos Kopsahelis, Nikolaos Agouridis, Argyro Bekatorou, et al. Comparative study of spent grains and delignified spent grains as yeast supports for alcohol production from molasses [J]. Bioresource Technology, 2007, 98(7): 1 440~1 447
- 4 Kourkoutas Y, Xolias V, Kallis M. et al. Cell immobilization on fruit pieces for probiotic additive, fermented milk and lactic acid production[J]. Process Biochemistry, 2005, 40: 411~416
- 5 Plessas P, Bekatorou A. Use of *Saccharomyces cerevisiae* Cells Immobilized on Orange Peel as Biocatalyst for Alcoholic Fermentation[J]. Bioresource Technology, 2007, 98: 860~865
- 6 Liang Lei, Zhang Yuanping, Zhang Li, et al. Study of sugarcane pieces as yeast supports for ethanol production from sugarcane juice and molasses[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology DOI:10.1007/s10295-008-0404-z
- 7 楚杰 王德源 杨艳,张利群,等. 还原糖测定仪的应用[J]. 山东食品发酵, 2003, 4: 42~43
- 8 梁磊,张远平,梁世中,等. 高酵母接种量的抑菌特性及其在蔗汁生产乙醇中的应用[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(12): 1~4

Preparation of Immobilization Yeast with Sugarcane and Its Application for Alcohol Production

Liang Lei¹, Zhang Yuanping², Zhu Mingjun¹, Liang Shizhong¹

1(School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

2(Guangdong Key Laboratory of Sugarcane Improvement and Biorefinery, Guangzhou Sugarcane Industry Research Institute, Guangzhou 510316, China)

ABSTRACT A novel catalyst has been prepared with sugarcane as the carrier, in which the carrier shape and size were optimized and materials pretreatment was investigated. The immobilized yeast was applied to produce fuel ethanol with sugarcane juice. It has been observed that yeasts can be fixed in the sugarcane carrier by electron microscope. The fermentation experiments indicated that the ethanol production using immobilized yeast with 1 cm length carrier was about 10% higher than that of with 2 cm length carrier. Frosted, defrosted and delignified, the immobilized sugarcane pieces were added by 40% (v/v) in the sugarcane juice for 36h fermentation, which showed that the yield of ethanol was 99.34%, the sugar utilization was 99.23% and the fermentation efficiency was 93.09%.

Key words immobilized yeast, sugarcane piece, fuel ethanol