

# 无机盐对新型固定化酵母蔗汁酒精发酵的影响

张丽<sup>1</sup>, 梁磊<sup>1</sup>, 郭勇<sup>1</sup>, 张远平<sup>2</sup>, 钟映萍<sup>2</sup>

(1. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东 广州 510640)

(2. 广东省甘蔗改良与生物炼制重点实验室, 广东 广州 510316)

**摘要:** 以甘蔗作酒精酵母的固定化载体, 以蔗汁为发酵培养基进行酒精发酵, 通过电镜观察, 酒精酵母不仅能吸附在甘蔗外表面, 同时也能较好地吸附在甘蔗内部, 比较固定化酵母与游离酵母数, 发现固定化酵母数达到  $10^{11}$  个/g, 而游离细胞数只有  $10^7$  个/mL。通过考察不同浓度的  $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{MgSO}_4$  和  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  对酵母酒精发酵性能的影响, 发现 1.0 g/L  $\text{CaCl}_2$  和 1.5 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  可在最短时间内使二氧化碳生成速率达到最大值; 而  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  可明显地提高酒精发酵效率。

**关键词:** 固定化酵母; 蔗汁; 无机盐; 酒精发酵

中图分类号: TQ920.6; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)03-0223-04

## Effects of Inorganic Salts on the Ethanol Fermentation of Sugarcane Juice with Novel Immobilized Yeasts

ZHANG Li<sup>1</sup>, LIANG Lei<sup>1</sup>, GUO Yong<sup>1</sup>, ZHANG Yuan-ping<sup>2</sup>, ZHONG Ying-ping<sup>2</sup>

(1. School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Guangdong Key Laboratory of Sugarcane Improvement and Biorefinery, Guangzhou 510316, China)

**Abstract:** The *Saccharomyces cerevisiae* was immobilized on sugarcane in the absence of physico-chemical external supports and used for the alcohol fermentation of sugarcane juice. The distribution of yeast cells in the inner surfaces of sugarcane was confirmed by SEM. A large number of yeast cells were found to attach to the inner surfaces of sugarcane, among which the immobilized biocatalyst and the free cells were up to  $10^{11}$  cells/g and  $10^7$  cells/mL, respectively. The effects of some inorganic salts, including  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$  and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , on the immobilized yeast catalyzed fermentation were investigated. It was found that 1.0 g/L  $\text{CaCl}_2$  and 1.5 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  could greatly improve the production rate of  $\text{CO}_2$  to the highest value, and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  could obviously enhance the efficiency of alcohol fermentation.

**Key words:** immobilization yeast; sugarcane juice; inorganic salts; ethanol fermentation

固定化细胞技术作为一种有效的生物工程技术, 通过固定化, 可以有效增加细胞浓度, 提高细胞在反应器中的滞留期, 是缩短反应周期, 简化工艺流程的重要手段<sup>[1]</sup>。相对现行使用的聚合类固定化酵母, 以甘蔗为酵母固定化材料更加环保, 除了可以反复利用的优点外, 还可以将其回收作为动物饲料。同时, 本试验将蔗汁直接用于酒精发酵, 相比淀粉、纤维素等原料, 减少了液化、糖化等步骤, 使发酵工艺简化, 大大降低了生产成本, 具有广阔的工业应用前景, 是近年来研究的新方向。

经过多批半连续发酵试验, 发现以甘蔗为载体的固定化酵母具有稳定的发酵性能, 发酵液中酒精浓度在 77 g/L 至 89.76 g/L 之间, 发酵效率高达 90.2%~94.2%, 以上内容即将另文发表。现有研究表明,  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  和  $\text{PO}_4^{4-}$  在酵母的酒精发酵过程中, 有保护细胞膜

和促进酒精生产的作用<sup>[1,2]</sup>, 而二氧化碳生成速率在酒精发酵工艺中具有重要意义, 它是细胞生长和酒精等产物生成的综合指标, 故本试验将这几种无机盐作为研究对象, 考察其在新型固定化酵母酒精发酵中, 对二氧化碳生成速率和酒精发酵效率的影响。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

菌种: 酿酒酵母 AS2.1189, 广州甘蔗糖业研究所提供。

甘蔗: 粤糖 00236, 广州甘蔗糖业研究所湛江甘蔗研究中心提供。

种子培养基 (YPD): 2% 葡萄糖、2% 蛋白胨、1% 酵母抽提物。

发酵培养基 (蔗汁): 将甘蔗榨汁, 储存于  $-70^\circ\text{C}$  超低温冰箱, 用时将蔗汁在  $115^\circ\text{C}$  条件下灭菌 20 min。

收稿日期: 2007-01-17

## 1.2 种子液的制备

将生长良好的斜面酵母接种至种子培养基中, 摇床培养。培养条件为 30 °C, 150 r/min, 12 h。

## 1.3 固定化酵母的制备

将甘蔗去皮, 切成 1 cm 小块, 分别取 50 g 加入 150 mL YPD 中, 115 °C 灭菌 20 min 后, 接入已培养 12 h 的游离细胞, 接种量为 10%, 继续摇床培养 12 h, 培养条件同 1.2。

## 1.4 实验方法

### 1.4.1 无机盐对二氧化碳生成速率的影响研究

将 50 g 制备好的固定化酵母接入 150 mL 灭菌后的蔗汁培养基中, 分别添加 0.5 g/L、1.0 g/L、2.0 g/L 和 3.0 g/L 的 CaCl<sub>2</sub>; 0.2 g/L、0.4 g/L、0.6 g/L 和 0.8 g/L 的 MgSO<sub>4</sub>; 0.5 g/L、1.0 g/L、1.5 g/L 和 2.0 g/L 的 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 加发酵栓, 30 °C 静置发酵 50 h, 每隔 2 h 称重。

### 1.4.2 无机盐对酒精发酵效率的影响研究

分别测定 1.4.1 中各种发酵培养基的初始糖浓度 (g/L)、发酵结束后的残糖浓度 (g/L) 以及发酵结束后实际酒精浓度 (g/L)。

## 1.5 分析方法

1.5.1 固定化情况: 扫描电镜观察。

1.5.2 二氧化碳生成速率: 失重法<sup>[3]</sup>。

1.5.3 酒精浓度: 酒精计测定<sup>[4]</sup>。

1.5.4 糖质量浓度的测定: DNS 法<sup>[5]</sup>。

1.5.5 酵母细胞数目的测定

将 10 g 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 条件下, 震荡 30 min, 经过梯度稀释, 显微镜观察得固定化酵母数。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, 经过梯度稀释, 显微镜观察得发酵液中游离酵母细胞数<sup>[6]</sup>。

1.5.6 发酵效率 (%) 的计算

分别测定蔗汁培养基的初始糖浓度 (g/L)、发酵结束后的残糖浓度 (g/L) 和实际酒精浓度 (g/L), 按公式 (1) 计算发酵速率 (%):

$$\text{发酵效率 (\%)} = \frac{\text{实际酒精浓度}}{(\text{初始糖浓度} - \text{残糖浓度}) \times 0.51} \times 100\%$$

## 2 结果与讨论

### 2.1 固定化酵母制备

#### 2.1.1 电镜观察固定化酵母内部

甘蔗内部主要有维管束和薄壁细胞组成。薄壁细

胞分布于维管束之间, 排列疏松, 有明显的细胞间隙, 而维管束是由纤维细胞组成的维管束鞘和包围在其中的木质部和韧皮部组成<sup>[7]</sup>。将制备好的酵母固定化材料切片观察, 得到的电镜照片如图 1 所示。

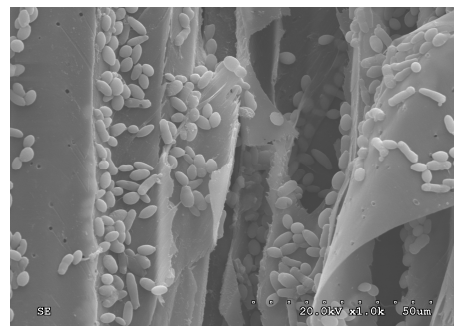


图 1 固定化酵母内截面的电镜照片

Fig.1 Immobile yeasts observed by SEM. Associations of yeast (spherical structures) and vascular bundle can be observed.

从图 1 可看出, 酒精酵母较好地固定在甘蔗维管束空腔内。这可能是由于木质部在分化成熟过程中有些导管被压破, 而与周围的薄壁细胞分离而形成空腔, 使甘蔗内部具有很大的表面积, 有利吸附酵母在其内部生长繁殖。

### 2.1.2 固定化酵母与游离酵母细胞数的比较

比较固定化酵母与游离酵母细胞数, 按 1.5.5 中的方法, 将游离酵母发酵液中细胞数与固定化酵母发酵 7 批后的固定化细胞、游离酵母细胞数相比较, 得表 1。

表 1 固定化细胞与游离细胞数的比较

Table 1 The compare between the content of immobile yeasts and free yeast cells

酵母	游离细胞(个/mL)	固定化细胞/(个/g)
游离酵母发酵	1~3×10 <sup>8</sup>	--
固定化酵母发酵	2~4×10 <sup>7</sup>	10 <sup>11</sup> ~10 <sup>12</sup>

由表 1 可知, 在游离酵母发酵和固定化酵母发酵中, 固定化酵母的数量均远远大于游离细胞数, 是其 1000~10000 倍; 同时, 固定化酵母发酵中, 渗漏至发酵液中的游离细胞数约是直接游离酵母发酵液中细胞数目的 1/10。说明在没有任何物理化学外力的作用下, 甘蔗块也可以很好地固定酒精酵母细胞, 用甘蔗来固定酒精酵母是可行的。

## 2.2 无机盐对二氧化碳生成速率的影响

### 2.2.1 CaCl<sub>2</sub> 浓度对二氧化碳生成速率的影响

在含 50 g 新型固定化酵母的 150 mL 蔗汁发酵培养基中, 分别添加 0、0.5 g/L、1.0 g/L、2.0 g/L 和 3.0 g/L 的 CaCl<sub>2</sub>, 以不添加 CaCl<sub>2</sub> 的普通蔗汁为对照, 30 °C 静置发酵 50 h, 每隔 2 h 测定其失重。以时间为横坐标, 以 dCO<sub>2</sub>/dt 为纵坐标, 得图 2。

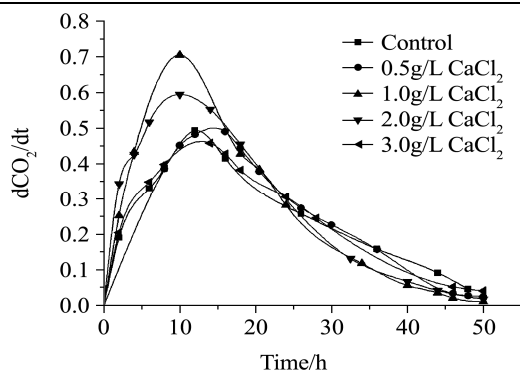


图2 不同浓度 CaCl<sub>2</sub>对二氧化碳生成速率的影响

Fig.2 Effects of CaCl<sub>2</sub> content on CO<sub>2</sub> production rate

由图2可知, 1.0 g/L CaCl<sub>2</sub>对二氧化碳生成速率有明显的促进作用。在发酵10 h, dCO<sub>2</sub>/dt达到最大值0.706 g/h。

2.2.2 MgSO<sub>4</sub>浓度对二氧化碳生成速率的影响

在含50 g新型固定化酵母的150 mL蔗汁发酵培养基中, 分别添加0、0.2 g/L、0.4 g/L、0.6 g/L和0.8 g/L的MgSO<sub>4</sub>, 以不添加MgSO<sub>4</sub>的普通蔗汁为对照, 30 °C静置发酵50 h, 每隔2 h测定其失重。以时间为横坐标, 以dCO<sub>2</sub>/dt为纵坐标, 得图3。

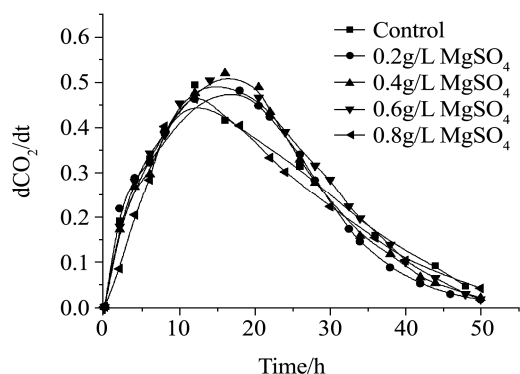


图3 不同浓度 MgSO<sub>4</sub>对二氧化碳生成速率的影响

Fig.3 Effects of MgSO<sub>4</sub> content on CO<sub>2</sub> production rate

由图3可知, MgSO<sub>4</sub>对二氧化碳生成速率的影响不大。

2.2.3 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>浓度对二氧化碳生成速率的影响

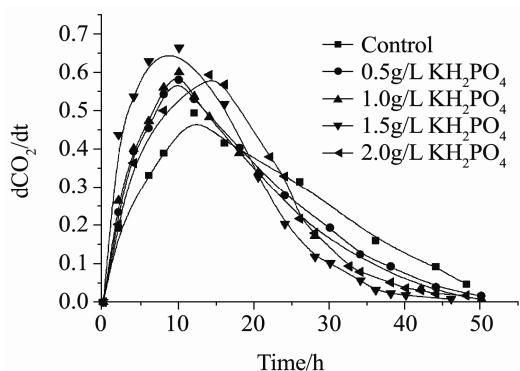


图4 不同浓度 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>对二氧化碳生成速率的影响

Fig.4 Effects of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> content on CO<sub>2</sub> production rate

在含50 g新型固定化酵母的150 mL蔗汁发酵培养基中, 分别添加0、0.5 g/L、1.0 g/L、1.5 g/L和2.0 g/L的KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 以不添加KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>的普通蔗汁为对照, 30 °C静置发酵50 h, 每隔2 h测定其失重。以时间为横坐标, 以dCO<sub>2</sub>/dt为纵坐标, 得图4。

由图4可知, 1.5 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>对二氧化碳生成速率有明显的促进作用, 在发酵10 h, dCO<sub>2</sub>/dt达到最大值0.665 g/h。

2.3 无机盐对新型固定化酵母酒精发酵效率的影响

2.3.1 CaCl<sub>2</sub>浓度对固定化酵母酒精发酵效率的影响

在含50 g新型固定化酵母的150 mL蔗汁发酵培养基中, 分别添加0、0.5 g/L、1.0 g/L、2.0 g/L和3.0 g/L的CaCl<sub>2</sub>, 以不添加CaCl<sub>2</sub>的普通蔗汁为对照, 30 °C静置发酵50 h, 按1.5.6中的方法, 得表2。

表2 CaCl<sub>2</sub>浓度对固定化酵母酒精发酵效率的影响

Table 2 Effects of CaCl <sub>2</sub> content on alcohol fermentation efficiency of immobilized yeasts				
CaCl <sub>2</sub> /(g/L)	初始糖浓度/(g/L)	残糖浓度/(g/L)	实际酒精浓度/(g/L)	发酵效率/%
0	172.3	0.23	80.4	91.62
0.5	172.3	0.19	76.9	87.61
1.0	172.3	0.23	74.3	84.67
2.0	172.3	0.15	77.9	88.73
3.0	172.3	0.21	79.6	90.70

由表2可知, 添加1.0 g/L CaCl<sub>2</sub>后, 发酵速率反而比空白低, 其原因可能是由于发酵过程中, 酒精有挥发, 也有可能是在发酵前期 CaCl<sub>2</sub>促进了菌体的生长, 而基质大量被消耗, 影响了酒精的发酵效率。但如果在流加发酵过程中, 进行适当的补料, 可以使发酵速率始终处于最大值, 从而提高酒精发酵效率。

2.3.2 MgSO<sub>4</sub>对固定化酵母酒精发酵效率的影响

表3 MgSO<sub>4</sub>对固定化酵母酒精发酵效率的影响

Table 3 effect of MgSO <sub>4</sub> content on alcohol fermentation efficiency of immobilized yeasts				
MgSO <sub>4</sub> 浓度/(g/L)	初始糖浓度/(g/L)	残糖浓度/(g/L)	实际酒精浓度/(g/L)	发酵效率/%
0	172.3	0.23	80.4	91.62
0.2	172.3	0.26	79.5	90.61
0.4	172.3	0.30	75.3	85.84
0.6	172.3	0.22	80.1	91.27
0.8	172.3	0.29	76.7	87.43

在含50 g新型固定化酵母的150 mL蔗汁发酵培养基中, 分别添加0、0.2 g/L、0.4 g/L、0.6 g/L和0.8

g/L的MgSO<sub>4</sub>,以不添加MgSO<sub>4</sub>的普通蔗汁为对照,30℃静置发酵50h,按1.5.6中的方法,得表3。

由表3可知,MgSO<sub>4</sub>对酒精发酵速率没有十分明显的作用。

### 2.3.3 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>对固定化酵母酒精发酵效率的影响

在含50g新型固定化酵母的150mL蔗汁发酵培养基中,分别添加0、0.5g/L、1.0g/L、1.5g/L和2.0g/L的KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,以不添加KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>的普通蔗汁为对照,30℃静置发酵50h,按1.5.6中的方法,得表4。

表4 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>对固定化酵母酒精发酵效率的影响

Table 4 effect of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> content on alcohol fermentation efficiency of immobilized yeasts

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 浓度/(g/L)	初始糖浓度/(g/L)	残糖浓度/(g/L)	实际酒精浓度/(g/L)	发酵效率/%
0	172.3	0.23	80.4	91.62
0.5	172.3	0.20	83.0	94.56
1.0	172.3	0.14	81.7	93.05
1.5	172.3	0.27	81.4	92.78
2.0	172.3	0.18	82.7	94.21

由表4可知,添加KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>后,发酵效率均比空白高,最高的达到94.56%,说明KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>能较好地促进酒精生产。同时,在2.2.3中,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>亦能很好地提高酒精发酵速率,两种指标综合考虑,说明KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>对新型固定化酵母的蔗汁酒精发酵有明显的促进作用。

## 3 结论

3.1 扫描电镜照片显示,酒精酵母经过一段时间的培养,已经包埋在甘蔗维管束空腔内部,成为一种新型的固定化酵母。同时,比较固定化酵母和游离细胞的数目,发现固定化酵母的数量达到10<sup>11</sup>~10<sup>12</sup>个,而游离细胞只有10<sup>7</sup>个。

3.2 1.0g/L CaCl<sub>2</sub>、1.5g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>分别对二氧化碳生成速率有明显的促进作用,而MgSO<sub>4</sub>对二氧化碳生成速率的影响不大;KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>使新型固定化酵母的酒精发酵效率有明显的提高,最高可达到94.56%,而CaCl<sub>2</sub>和MgSO<sub>4</sub>的这种效果不明显。如果在发酵速率最大时适量补加相应物质,或流加发酵培养基,从而实现连续流加发酵,为工业化乙醇生产提供有力支持。

## 参考文献

- [1] 田沈,刘然,刘春燕,等. 固定化 *Zymomonas mobilis* 10225 乙醇发酵研究[J]. 首都师范大学学报(自然科学版),2005,26(4):53-56
- [2] 杨建刚,马跃,肖冬光,等. 酿酒酵母酒精耐性研究进展[J]. 酿酒科技.2006,149:86-89
- [3] Rafael A. Peinado, Juan J. Moreno, Jose M. Villalba, et al. Yeast biocapsules: A new immobilization method and their applications [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 40: 79-84
- [4] Quirk PG, Dunley EA, Lee P, et al. Identification of a putative *Bacillus subtilis* roh gene[J]. J Bacteriol,1993, 175 (3):647-654
- [5] Josephs, David WR. Molecular cloning: A Laboratory Manual(3<sup>rd</sup>Edition)[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- [6] Aguirre-Guzmán, G., Ricque-Marie, D., Cruz-Suárez, L.E.. Survival of agglomerated *Saccharomyces cerevisiae* in pelleted shrimp feeds. Aquaculture, 2002, 208(1-2): 125-135
- [7] 陆时万,徐祥生 沈敏健.植物学[M].北京:高等教育出版社, 1991

致谢:感谢广州甘蔗糖业研究所对本论文所提供的支持!

## 通过数学模型预测法式炸薯条的丙烯酰胺含量

来自土耳其的一支研究小组开发出了一套能够模拟炸薯条生产过程的数学模型,该模型能够对薯条中丙烯酰胺的含量进行预估。该模型确定了炸薯条过程中的热量传递参数,并通过糖-天冬酰胺模拟体系得到了丙烯酰胺的生成与降解的动力学参数,最终能够准确地预测产品中丙烯酰胺的含量,因此可能节省大量的时间、金钱及操作过程中优化设计的工作量。

(新闻来源:中国食品科技学会)