

利用海浮石为载体的 固定化酵母酒精发酵

金其荣 徐 云 姜锡瑞 诸伯荣

(无锡轻工业学院)

(无锡市酒厂)

一、前 言

酶和微生物的固定化是目前生物工程中研究较多的一项技术。其中固定化细胞技术具有简单易行,不需提纯酶,菌体在固定化状态下能再增殖生长等优点,在发酵工业中具有广泛的应用前景。

目前,固定化细胞大多数是采用包埋法或利用吸附法。所谓包埋法,系采用角叉菜胶、海藻酸钠、琼脂、聚丙烯酰胺等作为包埋剂,将微生物细胞埋藏在包埋剂之中。这种方法操作简便,包埋较均匀,粒子具有一定强度。但是,因其形成的粒子机械强度有限,限制了它在工业上的推广和应用。而对于单纯的吸附法来说,由于吸附力较小,在发酵过程中,细胞洩漏严重,因此,应用上也受到限制。为了解决这一问题,我们利用海浮石(即珊瑚石)为载体,先吸附菌体后,再用海藻酸钠包埋于海浮石的外层。这样,既解决了强度问题,又减少了细胞的洩漏。海浮石具有多孔性,因而有较强的吸附能力,也有相当的强度,而且,来源丰富,价格便宜,并且可以回收使用。因此,海浮石是一种较好的固定化载体材料。

二、材料和设备

1. 材料和试剂

- 1) 海浮石 将海浮石粉碎至 $\phi 3-5\text{mm}$ (实验室用)或 $\phi 8-10\text{mm}$ (工厂小试用),用水洗净
- 2) 酵母 使用无锡啤酒厂提供的啤酒酵母,用水漂洗后,10,000 γ/min 离心15分钟,取沉淀,称量后,配成10%细胞悬液,备用
- 3) 3% 海藻酸钠溶液
- 4) 3% CaCl_2 溶液
- 5) 实验室用发酵糖液 150g葡萄糖,0.5g硫酸铵,1g碳酸二氢钾,0.05g硫酸镁,50~100ppm焦硫酸钾加水溶解并稀释至1000ml,120 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌15分钟冷却备用
- 6) 工厂小试用发酵糖液 10 $^{\circ}\text{Bx}$ 无菌大米糖化液
- 7) 0.1mol/l 氢氧化钠溶液
- 8) 斐林试剂 甲液:35g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$,0.05g次甲基蓝,加水溶解并稀释至1000ml。
乙液:117g酒石酸钾钠,126.4g氢氧化钠,9.4g亚铁氰化钾,加水溶液并稀释1000ml

本文1985年9月26日收到。

9) 0.1%标准葡萄糖液

2. 设备

1) 柱 实验室采用带夹套玻璃柱, 柱长150cm直径3cm, 夹套长120cm

工厂小试验采用带夹套碳钢柱, 柱长100cm 内径 20cm, 以及配套贮罐及无菌空气系统

2) 其它设备 实验室使用HL-1型蠕动泵, 超级恒温浴, 灭菌锅, 显微镜等

三、试验方法

1. 海浮石的处理

将粉碎洗净的海浮石经8—10目筛子过筛, 弃去细小颗粒。较大颗粒置烘箱中, 200℃烘2小时, 进行干热灭菌, 待冷却至室温, 置于干燥器中保存备用。

2. 使用过的海浮石再生

使用过的海浮石, 用0.5mol/l磷酸盐溶液泡4小时以上, 用水漂洗, 使海藻酸钙残渣尽量除去。然后, 将浮石置烘箱中150℃烘2小时, 除去水分; 再置马福炉中, 升温至650℃—700℃, 维持15分钟, 关闭电源, 留浮石于炉内, 缓慢冷却至室温, 即可重新使用。

3. 酵母的固定

在无菌条件下, 量取与柱体积相等的已处理好的海浮石颗粒, 置于容器内; 将10%酵母悬液倒入浮石颗粒中, 使酵母悬液完全浸没浮石, 适当搅拌后, 静止吸附4小时以上。双层纱布过滤, 弃去清液, 浮石颗粒及剩余少量酵母一并浸入无菌的3%海藻酸钠溶液中, 海藻酸钠溶液用量以恰好浸没浮石颗粒为限, 浸泡15分钟后, 立即用单层纱布过滤, 弃去清液。浮石颗粒浸于无菌的3%氯化钙液中, 为防止结成大块凝胶, 应在不断搅拌下, 即浮石颗粒分批加入氯化钙溶液中, 放置过夜, 滤去清液, 即可装柱进料。

4. 发酵

柱装好后, 立即用蠕动泵将糖液压入柱内。最初可用较大进液量, 以使糖液尽快进入柱内, 并排出空气。当柱装满后, 可调节流速为60ml/h, 或使糖液留柱时间不小于12小时, 发酵温度: 夏季采用室温发酵或通以冷水冷却, 冬季可用恒温水浴控制温度为30℃。

工厂小试验采用间歇发酵, 即用无菌空气将糖液压入柱内, 至柱装满为止, 发酵18—24小时后, 再将贮藏罐内糖液压入柱内, 收集排出的发酵液, 约一个柱体积的三分之一, 即可停止进料, 继续发酵。

5. 分析方法

1) 酒精度以蒸馏法测定

2) 总酸度以0.1mol/l氢氧化钠滴定后折合成乙酸含量测定

3) 残还原糖以快速定糖法测定

4) 酵母数以血球计数板测定

四、试验结果与分析

1. 海浮石的酵母吸附量测定

称取不同量经10,000 γ /min离心处理后的酵母, 配成20ml菌体悬浮液, 分别加入10g处理过的海浮石, 结果如表1。

表 1 200℃处理的海浮石酵母吸附量测定

加入酵母量 (g)	0.4	0.6	0.8	1	5	10	15
剩余酵母量 (g)	0.2	0.4	0.6	0.7	4.7	9.1	14

海浮石比重接近 1 选择10克海浮石加1g酵母吸附，因此酵母可配成10%悬液使用。

2. 发酵过程中酒精度与酒精转化率的变化

实验室发酵过程中酒精度与酒精转化率见表 2、及图 1 所示。发酵过程中转化率平均为 90%，最高可达98.5%。发酵在一个月左右时间内酒精产率基本保持恒定。图 2 中可见到酒度变化曲线有两个低谷，第一点是6月8日，由于进料过快，使发酵不完全造成，此时酒度下降，而转化率不下。第一点是 6 月 24 日，由于柱内染菌而造成的，此时，酒度及转化率同，时下降，同时，酸度有所增高。

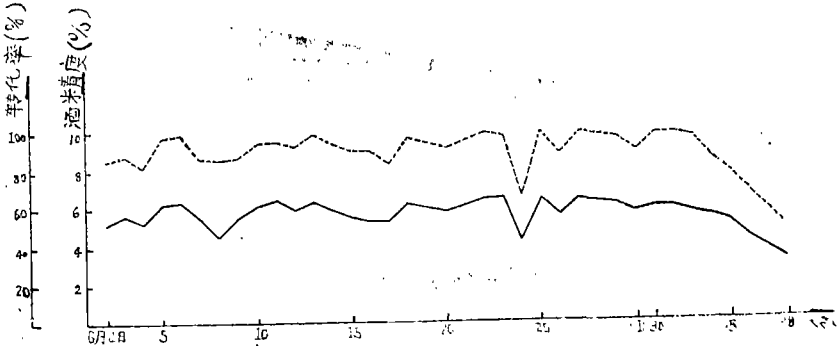


图 1 酒度及转化率的变化(实验室试验)
——酒度 -----转化率

工厂小试的酒精度变化见图 2，由于工厂中操作不稳定，总结不太理想。但是，在二十多天的试验中，多数日期的酒精产率超过在大罐内发酵同样时间的产率。

表 2 实验室试验数据

日 期	酒 度 (%)	残 糖 (%)	转 化 率 (%)	酸 度 (g/100ml)	菌 数 (百万/ml)
6 月 2 日	5.2	1.2	84.7	—	—
3 日	5.6	0.7	87.6	—	9.55
4 日	5.2	0.7	81.3	—	—
5 日	6.2	0.7	97	—	1.25
6 日	6.3	0.7	98.5	—	2.85
7 日	5.5	0.7	86	2.7	5.8
8 日	4.5	2.8	84.8	3.5	13.75
9 日	5.5	0.77	86	2.4	1.3
10 日	6.1	0.47	93.6	—	2.0
11 日	6.4	0.01	94.7	2.83	2.85
12 日	5.9	0.7	92.2	2.6	2.5
13 日	6.3	0.7	98.5	3.16	2.5

(续表 2)

日 期	酒 度 (%)	残 糖 (%)	转 化 率 (%)	酸 度 (g/100ml)	菌 数 (百万/ml)
14日	5.9	0.9	93.8	1.2	—
15日	5.5	1.1	88.9	2.45	2
16日	5.3	1.6	89.4	1.9	2.45
17日	5.3	0.7	82.9	1.24	—
18日	6.2	0.6	96.2	2.1	1.7
19日	停电				
20日	5.8	0.7	90.7	2.2	3.75
21日	停电				
22日	6.4	0.5	98.5	2.1	1.85
23日	6.5	0.1	96.9	2.1	2.45
24日	4.2	0.5	64.6	2.6	4.0
25日	6.4	0.5	98.5	1.6	5
26日	5.6	0.67	87.6	2.95	—
27日	6.4	0.5	98.5	2.36	4.0
28日	停电				
29日	5.2	0.6	96.2	2.63	8.05
30日	5.8	0.5	89.6	2.5	4.55
1 日	6.0	1.2	97.5	2.63	—
7 月 2 日	6.0	1.3	98.3	2.9	3.45
3 日	5.7	1.6	96.1	3	—
4 日	5.5	0.6	85.3	4	—
5 日	5.2	0.1	77.5	4.13	—
6 日	4.4	0.3	66.6	5.5	—
7 日	停电				
8 日	3.2	0.3	48.4	8.5	—

表 3 工厂小试数据

日 期	原 糖 液 (Bx)	酒 精 度 (%)	酸 度 (g/100ml)	残 糖 (%)
5 月 10 日	9	0.3	2.5	9
11 日	9	2.3	1.5	2.36
13 日	9	2.9	1.5	1.27
14 日	8.5	3.3	1.5	1.03
15 日	8.0	3.5	1.5	1.0
16 日	8.0	3.4	2.0	1.1

(续表 3)

日期	原糖液 (Bx)	酒精度 (%)	酸度 (g/100ml)	残糖 (%)
17日	9.0	5.2	1.0	0.46
18日	8.0	4.9	1.5	0.23
20日	9.6	4.95	2.0	0.23
21日	8.78	5.05	1.5	0.62
22日	7.3	5.0	2.5	0.6
23日	5.8	3.0	2.5	0.7
27日	8.0	4.1	2.5	0.2
28日	3.0	2.8	2.0	0.3
29日	10.3	4.1	2.0	1.8
30日	9.3	4.1	2.2	1.3
31日	9.3	4.0	1.8	1.1
6月3日	—	2.5	—	—
4日	—	2.2	—	—
5日	—	1.7	—	—

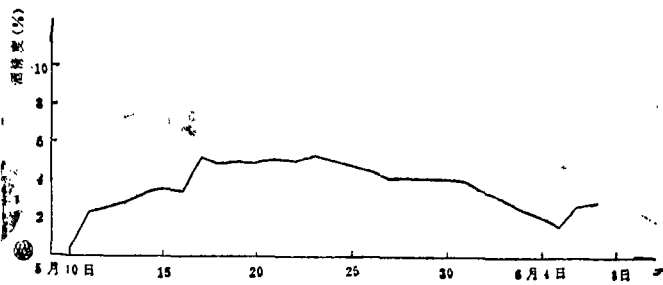
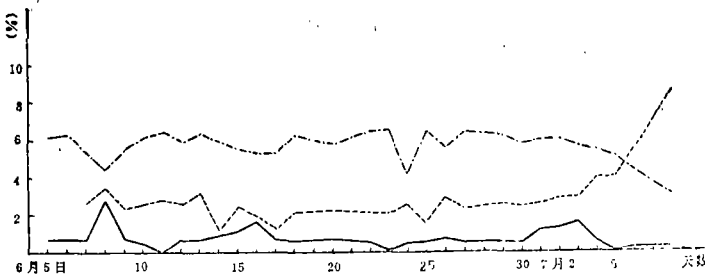


图2 酒度变化(工厂小试)

3. 酸度

在发酵期间，酸度都维持在较低水平。其主要原因是：海浮石主要成分为碳酸钙，发酵中产生的有机酸与碳酸钙反应生成有机酸钙盐，沉积在浮石的表面。但是，如果酸度过高，浮石将会失去其抑制作用。(见图3)



3图 发酵期间酸度和残还原糖的变化
—— 酒度 ---- 酸度 残还原糖

4. 酵母洩漏

在一个月的发酵过程中, 酵母的洩漏数平均为 4×10^6 个细胞/毫升发酵液 (见表4)。酵母的洩漏数与发酵进行的程度有关, 在糖液快速输入, 发酵强烈进行时, 酵母洩漏数可达 10^7 个细胞/毫升发酵液。

表4 发酵过程中酵母洩漏数

日 期	6.1~5	5~10	10~15	15~20	20~25	25~30	30~5	平 均
酵 母 数 (百万细胞/ml)	5.4	5.14	2.46	2.63	3.325	5.53	3.45	3.99

5. 染菌问题

在实验室内及在工厂小试中, 都发现有染菌现象, 杂菌主要是杆菌。可采取如下办法控制。

- 1) 柱内糖液采用单向流动, 加强料液的无菌控制, 减少污染机会。
 - 2) 在糖液中加入50~100ppm 焦硫酸钾, 控制杂菌的生长
- 这些措施的试验有较好的效果。

五、讨 论

仅用包埋法固定微生物细胞, 会因其强度和重量不足, 而在发酵过程中引起如固定化细胞凝胶颗粒被挤压变形造成堵塞, 或颗粒破碎等问题。因此, 仅用包埋法固定微生物细胞填装成具有工业生产规模的柱是有一定困难的。这一困难可以用在包埋体中填加一定的支持物加以解决, 从而有可能使用固定化技术应用于工业化连续生产。这种支持物, 除海浮石外, 还可以用玻璃, 陶瓷, 金属等各种材料。

包埋与吸附法结合固定的酵母, 由于细胞密度较高, 因此发酵进行比较强烈, 一般在糖液进柱半小时之内即可发酵, 12小时左右即可发酵完全。在炎热的夏天, 发酵可维持一个月以上, 而在冬天, 可维持三个月以上。

海浮石除作为细胞吸附载体及包埋的支持物外, 在酒精发酵中, 可以抑制发酵液酸度的上升。另外, 海浮石可以回收使用, 固定方法也比较简单, 这是它的优点。对于有机酸及酿造酒类的发酵, 由于海浮石能与发酵中产生的有机酸起反应, 生成有机酸钙盐沉积在海浮石上, 会使酸度下降, 以致酒的口味变差, 因此要用其它的支持物来代替海浮石。

85001

带肉梨汁护色及加工工艺的研究(Ⅱ)《无锡轻工业学院学报》1986年,第五卷,第一期

主题词 梨;果蔬褐变;食品加工

摘要 本研究用热烫、 SO_2 、抗坏血酸、蔗糖等抑制方法控制带肉梨汁加工过程中的褐变。颜色指标用罗维朋比色计评价。发现在一小时的加工时间内能完全控制梨汁褐变的最佳条件是:100℃热烫3分钟、抑制剂偏重亚硫酸钠的最小用量为20ppm;或抗坏血酸为250ppm;或糖浆浓度为40%。还对糖浆与 SO_2 的协同作用及不同pH下 SO_2 对酶的抑制效果作了研究。

作者: 杨方琪 杨健 费健

85003

影响甘蔗渗出器渗透速率的几个主要因素的研究《无锡轻工业学院学报》1986年,第五卷,第一期

主题词 渗透速度;甘蔗制糖;糖分渗出渗透速率;甘蔗渗出器;蔗汁淋渗

摘要 本文对国内外甘蔗制糖工业中广为应用的渗透式渗出器的渗透速率进行了研究。设计制造了一式两套模拟实验装置。在动态条件下,对淋渗次数,床层含汁量和床层中空气,操作温度,甘蔗品种,蔗糖和循环汁对渗透速率的影响进行了试验,得到了相应的线性回归方程。对床层中液体的流动特性进行了分析,对渗透式渗出器的糖分渗出机理进行了探讨。

作者: 谢样湘 王鸿生

86002

利用海浮石为载体的固定化酵母酒精发酵《无锡轻工业学院学报》

1986年,第五卷,第一期

主题词 海浮石;固定化酵母细胞;酒精发酵

摘要 本文叙述了海浮石作为载体的固定化酵母细胞方法和海浮石再生方法,并分别介绍实验室试验和加工厂小试固定化酵母细胞酒精发酵的情况和数据,试验成果,夏季发酵1个月平均对糖转化率90%,最高为98.5%。工厂小试表明,固定化酵母细胞柱发酵比发酵罐快。

作者: 金其荣 徐云 姜锡瑞等

86004

食品厂蒸发设备热能分析《无锡轻工业学院学报》1986年,第五卷,第一期

主题词 热能;蒸发器;研究/热能分析

摘要 蒸发是食品工厂主要耗能过程之一。本文对蒸发器进行热能分析提出了一个可行的方法。

作者: 韩继光

86003

AN INVESTIGATION OF SOME FACTORS AFFECTING THE JUICE PERCOLATION RATE in the PERCOLATION TYPE DIFFUSERS «Journal of the Wuxi Institute of Light Industry», Vol.5, No.1, 1986

SUBJECTWORD seepage velocity, cane sugar manufacture, sugar

diffusion/percolation rate, cane diffuser, juice spraying

ABSTRACT The percolation rate of the cane diffuser used extensively in cane sugar manufacture has been investigated. Two fixed bed pilot diffusers have been made. A series of regress equations dealing with the percolation rate versus its affecting factors, such as spraying times, liquid and air holdup in bed, operating temperature, cane varieties, quantities of pith on the surface of bed and recirculation of juice have been found from experiments. The liquid flow behaviour and mechanism of sugar extraction in the cane diffuser have been discussed.

Author: Xie Zixiang, Wang Hongsheng

86001

RESEARCH OF PROTECTING COLOUR AND PROCESSING TECHNOLOGY in PLUP PEAR JUICE (II) —Influence of SO₂ and other inhibitors on the maintenance of natural color of plup pear juice in processing «Journal of the Wuxi Institute of Light Industry», Vol.5, No.1, 1986

SUBJECTWORD fruit processing, pear, food discoloration / fruit and vegetable browning

ABSTRACT This paper studied the effect of blanching, and SO₂ ascorbic acid, sucrose as inhibitors in prevention enzymic browning in processing plup pear juice. The color value was evaluated by lovibone color meter. It was found that the blanching at 100°C for 3min., The smallest amount of sodium metabisulfite for 20ppm., ascorbic acid for 250ppm. and 40% sucrose solution can completely inhibit the enzymic browning during processing within one hour. In addition, the synergistic activity between sucrose solution and SO₂ and SO₂ in different pH value in retarding browning of pulp pear juice were investigated respectively.

Author: Yang Fangqi, Yang Jian, Fei Jian

86004

THERMAL ENERGY ANALYSIS OF EVAPORATOR—for FOOD PLANT «Journal of the Wuxi Institute of Light Industry», Vol.5, No.1, 1986
SUBJECTWORD thermal energy, evaporator, researching/thermal energy analysis

ABSTRACT Evaporation is one of the major users of the energy in food plants, this paper will introduce a method to help the operator to analyse the thermal energy consumption of evaporator.

Author: Han Jixian

86002

ALCOHOL FERMENTATION OF IMMOBILIZED SACCHAROMYCETE USING the CORALLITE as the CARRIER «Journal of the Wuxi Institute of Light Industry», Vol.5, No.1, 1986

SUBJECTWORD yeast fermentation, ethanol, industrial

fermentation/corallite, immobilized yeast cells, alcohol fermentation

ABSTRACT A method of immobilizing the yeast cells using corallite as the carrier and renewing the corallite, the situation and data of alcohol fermentation experiment using immobilized yeast cells in the laboratory and in the plant, separately are described and introduced. During a month of fermentation, in summer, experiments show the average conversion ratio of alcohol to sugar to be 90%, with a maximum of 98.5%. The pilot plant experiments show the rate of fermentation in the column of immobilized yeast cell is faster than in the fermentor.

Author: Jin Qirong, Xu Yun