

# PVA 膜固定化酵母发酵酒精的研究

陈 功, 王联结

(陕西科技大学生命与工程学院, 陕西 咸阳 712081)

**摘 要:** 以聚乙烯醇(PVA)和阴离子交换树脂混合制成的生物膜作为固定化酵母载体进行酒精发酵的研究, 结果表明: 发酵的最适条件为 pH5.0, 温度 30℃, 多次批量发酵时, 酒精最高生成量可达 5.74 g/100ml, 残糖为 0.36 g/100ml。进行流速为 20ml/h 的连续发酵 20d, 发酵稳定后酒精含量保持在 5.50 g/100ml 左右。

**关键词:** 聚乙烯醇; 固定化酵母; 酒精发酵

Study on Ethanol Fermentation by Immobilized Yeast using PVA Membrane

CHEN Gong, WANG Lian-jie

(College of Life Science and Engineering, Shaanxi University of Science and Technology, Xianyang 712081, China)

**Abstract:** Ethanol fermentation using biomembrane which was made by polyvinyl alcohol (PVA) and anion exchange resin as carrier of immobilized yeast was studied. The result showed that: the optimum conditions of fermentation was pH5.0, temperature 30℃. While batch fermentation repeated in several times, the highest ethanol concentration could achieve 5.74 g/100ml, the remaining sugar was 0.36 g/100ml. When continuous fermentation last 20 days at the flow-rate of 20 ml/h, the ethanol concentration kept at 5.50 g/100ml after the fermentation was steady.

**Key words** polyvinyl alcohol; immobilized yeast; ethanol fermentation

中图分类号: TS261.43

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)08-0244-04

固定化细胞技术自问世以来, 显示出广阔的发展前景。固定化酵母细胞用于发酵酒精与传统发酵工艺相比, 具有速度快、周期短、生产能力高、工艺设备简单, 易于实现连续化及自动化和产物容易提取等优点, 并在一定程度上减少发酵工厂的设备投资 and 环境污染<sup>[1]</sup>。固定载体中应用最广泛的是海藻酸钙, 虽易成形、无毒、成本低廉, 但强度差, 使用寿命短, 对醪液中  $PO_4^{3-}$  敏感。其它的一些天然高分子化合物, 如琼脂, 明胶和卡拉胶等, 虽强度得到改善, 但价格偏高。我们采用聚乙烯醇(PVA)和阴离子交换树脂(苯乙烯型)混合制成的生物膜, 机械强度高, 对微生物无毒, 不含遇基质中磷酸根离子不稳定的钙离子, 且价格低廉, 来源广。在发酵反应器中进行连续发酵数天, 效果良好, 不变形, 不软化, 给固定化细胞载体的应用提出了一条新路子。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种

南阳 5 号 中国科学院微生物研究所。

#### 1.1.2 原料与试剂

聚乙烯醇(PVA) (平均聚合度 1750±50) 湘中精细化学制品厂; 阴离子交换树脂(苯乙烯型 201×7) 西安蓝晓树脂厂。

#### 1.1.3 培养基

斜面培养基(%): 酵母膏 1、葡萄糖 1、硫酸镁 0.3、琼脂 2。

富集培养基(%): 葡萄糖 5、麦芽糖 5、酵母膏 0.5、蛋白胨 0.3、磷酸氢二钾 0.15、氯化铵 0.15、硫酸镁 0.3、硫酸锰 0.002、氯化钙 0.5。

发酵培养基(%): 葡萄糖 10、酵母膏 0.15、硫酸铵 0.25、磷酸氢二钾 0.55、硫酸镁 0.3。

## 1.2 方法

### 1.2.1 载体制备

称取 10g 聚乙烯醇于 100ml 蒸馏水中, 80~90℃水浴溶解, 溶解后待 40℃左右加入研磨 30min 左右的阴离子交换树脂 10g, 搅拌均匀后倒至制膜盒内(制膜盒长 240mm, 宽 80mm), 随后紫外杀菌 90min, 放入 -20℃的低温冰箱深冻 24h 取出, 用无菌水保藏待使用<sup>[2]</sup>。

### 1.2.2 细胞培养

收稿日期: 2006-04-30

作者简介: 陈功(1981-), 男, 硕士研究生, 研究方向为发酵工程。

斜面培养 3d- 液体试管培养 12h- 小三角瓶培养 12h, 均为 29℃<sup>[3]</sup>。

### 1.2.3 固定化细胞

采用注射接种法, 即用自己研制的注射接种器给胶片均匀注射 5ml 菌悬液。

### 1.2.4 固定化细胞的增殖

取 250ml 锥形瓶, 内加富集培养基 150ml, 灭菌后加入一张聚乙烯醇固定化细胞膜, 30℃ 左右恒温振荡培养 40h。

### 1.2.5 批量发酵

250ml 锥形瓶内加 150ml 发酵培养基, 灭菌后放入一张增殖后的聚乙烯醇固定化细胞膜进行批量发酵。

### 1.2.6 连续发酵

用自制的 1L 有机玻璃柱反应器进行, 恒速泵入发酵培养基, 收集出料进行残糖和酒精度的监测。

### 1.2.7 乙醇含量测定

比重法<sup>[4]</sup>。

### 1.2.8 糖度的测定

裴林试剂法和糖度计<sup>[5]</sup>。

### 1.2.9 酵母菌数的测定

血球板计数法<sup>[6]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 理化因素对酒精发酵的影响

#### 2.1.1 温度的影响

在 pH5.0, 温度分别为 24、26、28、30、32℃ 的条件下进行批量发酵, 发酵时间为 30h。结果如图 1 所示。

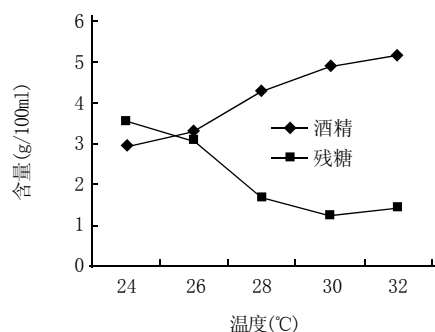


图 1 不同温度下的发酵结果

Fig.1 Result of fermentation under different temperatures

由图 1 可见, 温度高低决定了发酵速度的快慢。温度低, 发酵速度慢; 温度高, 发酵速度快。但如果温度过高, 容易使酵母过早衰老, 后发酵无力, 且易

感染杂菌, 也会使残糖偏高。故选择在 30℃ 为固定化酵母的最适温度。

#### 2.1.2 初始 pH 的影响

在温度为 30℃, 初始 pH 分别为 2.0、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0 的条件下进行批量发酵, 发酵时间为 30h。结果如图 2 所示。

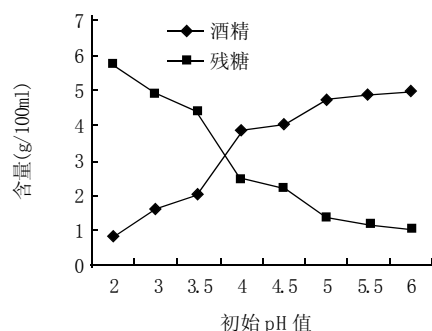


图 2 不同 pH 下的发酵结果

Fig.2 Result of fermentation under different pH values

由图 2 结果可知: pH 低于 3.5 时, 酒精得率均过低, 酵母形态在显微镜下观察均不圆滑, 细长且出芽率低, pH 在最低值 2.0 时大部分已死亡或严重变形。pH 在 5.0 以上时, 各项指标趋于理想。pH 6.0 时, 糖利用率和酒精得率虽有提高, 但幅度很小, 且 pH 过高会感染杂菌(主要为杆菌), 故初始 pH 控制在 5.0 左右比较适宜。

#### 2.2 胶片使用稳定性及重复利用

酒精生产厂家需要固定化过程简单、成本低、无毒、通透性好、细胞密度大、强度好和稳定性好的载体<sup>[7]</sup>, 如果能作到载体的重复利用, 就大大减少了工厂的废弃固体量, 省去了处理的麻烦。在追求低成本和兼具环保意识的现代企业中, 廉价载体和对其二次利用的可行性操作方案, 无疑具有强大的市场竞争力。

##### 2.2.1 胶片的稳定性

用聚乙烯醇制成的胶片具有很强的耐腐蚀和耐污染的性能, 在发酵培养基、自来水和 20% 的乙醇溶液中浸泡, 均未发现自然膨胀和溶解现象。不足之处是这种胶片必须在湿态下保存。

表 1 不同条件保存 PVA 胶片的结果

Table 1 Result of preserving PVA membrane in different conditions

保存条件	20%乙醇60d		自来水60d		发酵培养基室温	空气中
	室温	4℃	室温	4℃	60d	3d
破损情况	无	无	无	无	无	有

注: “无”表示无破损, “有”表示有破损。

##### 2.2.2 胶片的重复利用

发酵由于非正常因素而终止时(如染菌和胶片污染),

表2 不同条件 PVA 的可重复利用性

Table 2 Reutilization performance of PVA membrane in different conditions

PVA 膜的 处理方式	纯聚 乙烯醇	聚乙烯醇 + 树脂	接种后的聚乙烯醇 + 树脂
不杀菌	—	—	可
杀菌	—	—	可
二次成型	可	可	不可

注：“可”表示可重复利用，“不可”表示不可重复利用。

需要对胶片进行重复利用。

### 2.3 批量发酵

控制发酵条件为温度 30℃，初始 pH 调定在 5.0，不杀菌重复利用载体 PVA 膜进行了八次批量发酵，每次发酵的时间均控制在 30 h。结果如图 3 所示。

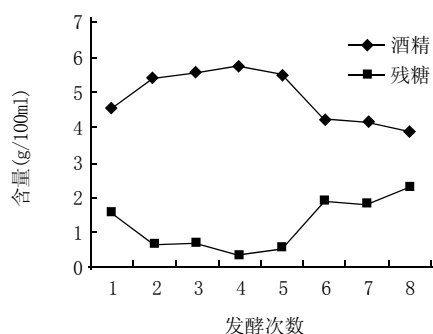


图3 重复使用 PVA 膜进行多次批量发酵的结果

Fig.3 Result of several batch fermentation by reutilize PVA membrane

由图 3 可知，酒精最高生成量可达 5.74g/100ml，在前五次批量发酵中，乙醇生成量逐渐增加，这主要是膜中的细胞仍在不断增殖所致，此时载体中包埋酵母细胞数可稳定 20 亿个 /g 以上，游离发酵酵母数可达 2 亿个 /ml，出芽率 25% 左右。随着发酵次数增加，膜表面所形成的菌落层越积越厚，最终脱落，造成酒精发酵产量下降，稳定在 3.85~4.23g/100ml 左右。

### 2.4 连续发酵

#### 2.4.1 流速的影响

在温度 30℃，初始 pH 调定在 5.0，流速分别为 8、12、16、20，结果如图 4 所示。

由图 4 可知，流速越快，则酵母细胞发酵速度越快，这与酵母细胞接受营养成分的供给有关，为了减少营养物质的损失以及受到设备的影响，最大流速设定为 20ml/h。

#### 2.4.2 连续发酵的结果

在温度 30℃，初始 pH 调定在 5.0，流速设定在 20ml/h 左右，连续发酵 20 d，结果如图 5 所示。

由图 5 可以看出：在连续发酵初期，乙醇生成量

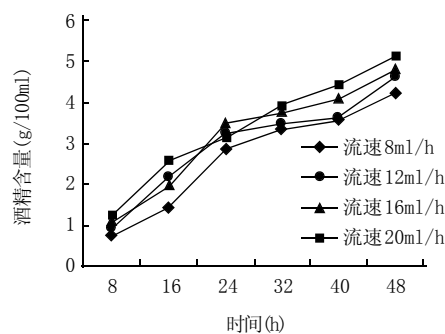


图4 不同流速连续发酵酒精的生成量

Fig.4 Ethanol concentration of continuous fermentation under different flowrate

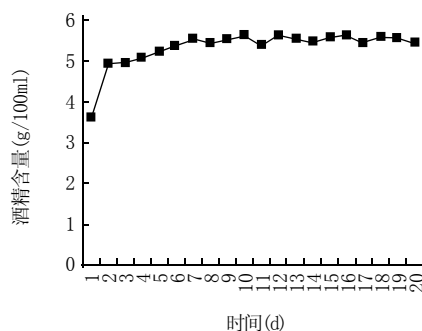


图5 连续发酵结果

Fig.5 Result of continuous fermentation

逐渐增加，这主要是由于膜内的细胞仍在不断增殖所致。从反应器的外观可以看到，随着发酵时间的增加，膜的表面逐渐形成了乳白色的酵母菌落层。发酵稳定后酒精含量保持在 5.50g/100ml 左右。在连续发酵中断后，从反应器中取出的 PVA 膜仍完好无损。

## 3 结 论

利用高分子材料聚乙烯醇作为固定化载体，可用注射接种法固定酒精酵母进行酒精发酵。实验结果同时也证明：PVA 添加少量的阴离子交换树脂，主要为包埋效果；同时，在胶片深冻过程中，由于 PVA 和树脂的热膨胀系数不同，形成了一系列以树脂为中心的孔洞，于是利用树脂的吸附性能将酵母牢牢固定在周围的孔洞中，又给酵母足够的增殖空间，有利发酵。达到了包埋法制备固定化细胞所具备的细胞既能增殖又不脱落的优点，在实际应用中将具有很大的优越性。

在实验中发现接种后的酵母在胶片中向一面生长，因此胶片的正面发白，且较光滑，当发酵进行一段时间之后胶片外侧的菌层开始有小片脱落，此时发酵能力开始有所降低。

聚乙烯醇所制胶片有很强的稳定性和可重复利用性，胶片的重复利用可通过破坏胶片形态的方法和不破

# 南瓜多糖复合酶法提取及纯化的研究

王洪伟, 崔崇士, 徐雅琴\*  
(东北农业大学, 黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘 要:** 南瓜中的有效成分南瓜多糖对糖尿病症状有显著的治疗效果, 为了开发和利用这一功能成分, 本实验采用酶解的方法提取南瓜多糖。首先利用正交试验确定复合酶添加量为纤维素酶 1%, 果胶酶 1.5%, 木瓜蛋白酶 1%; 利用正交试验确定复合酶的最佳反应条件为温度 40℃, pH 值为 5.5, 反应时间为 30min。在最佳条件下, 多糖的提取率为 28.8%。将复合酶法制得的南瓜粗多糖经脱色、透析后, 上 DEAE-纤维素柱层析, 得到三种级分。主要级分 PP III 经 Sepharose CL-4B 凝胶柱层析、紫外扫描和冻融分析鉴定为均一组分。

**关键词:** 南瓜多糖; 提取纯化; 复合酶

Study on Extraction of Pumpkin Polysaccharide with Complex Enzymes and Its Purification

WANG Hong-wei, CUI Chong-shi, XU Ya-qin\*  
(Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract:** In this study, enzymolysis was adopted to extract pumpkin polysaccharide with obvious treatment effects on diabetes. The adding rate of cellulase 1%, pectinase 1.5% and papain 1% respectively is optimal through orthogonal tests. Temperature 40℃, pH 5 and extraction time 30 min are optimal conditions for complex enzymes extraction through orthogonal tests. Under these optimum conditions the extraction rate of pumpkin polysaccharide reaches 28.8%. Three fractions (PP I, PP II, PP III) are identified from the purified pumpkin polysaccharide by DEAE-cellulose chromatography. Sepharose CL-4B gel filtration, ultraviolet spectrometry and freeze-thawing assays show that PPIII is purified.

**Key words** pumpkin polysaccharide; extraction and purification; complex enzymes

中图分类号: 0629.12

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)08-0247-03

南瓜(*Cucurbita* spp.), 葫芦科南瓜属的一年生蔓性草本植物。根据它的产地和性状的不同, 分为中国南瓜(俗称倭瓜、番瓜等), 印度南瓜(俗称笋瓜、搅瓜等)和美洲南瓜(俗称西葫芦)。南瓜生长强健, 对环境适应

力极强, 我国各地普遍栽培。近年来, 人们发现南瓜不但营养丰富, 而且具有保健和防病治病的功效, 南瓜中的有效成分南瓜多糖对糖尿病症状有显著的治疗效果<sup>[1]</sup>。

收稿日期 2006-08-31

\*通讯作者

基金项目: 黑龙江省科技攻关计划项目(GB04B405-03)

作者简介: 王洪伟(1978-), 男, 硕士, 研究方向为食品化学。

坏自身形态两种方法进行。

添加阴离子交换树脂的聚乙烯醇胶片固定化酒精酵母发酵酒精的最适条件为: 初始 pH 为 5.0, 增殖培养温度和发酵温度为 30℃左右。批量发酵酒精含量最高可达 5.74g/100ml。在以 20ml/h 的流速进行连续发酵时, 48h 后酒精含量可达 4.93g/100ml 以上。在连续发酵近 20d 后, 反应正常, 酒精含量稳定在 5.50g/100ml 左右。充分证明了 PVA 膜作为酒精发酵的固定化载体的可行性和优越性。

## 参考文献:

- [1] 罗艺, 杨雪蕊, 孙达远. 固定化酵母细胞连续发酵生产酒精的研究[J]. 海南大学学报: 自然科学版, 1996, 14(2): 119-123.
- [2] 王联结, 王子浩. 酒精酵母固相化新方法—电场吸附[J]. 工业微生物, 1989(2): 18-24.
- [3] 章克昌. 酒精与蒸馏酒工艺学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1995.
- [4] 蔡定域. 实用白酒分析[M]. 成都: 成都科技大学出版社, 1994.
- [5] 王福荣. 酿酒分析与检测[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [6] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986.
- [7] 王建龙. 生物固定化技术与水污染控制[M]. 北京: 科学出版社, 2002.