**3.1酵母细胞的固定化及酒精发酵研究**

固定化技术是20世纪60年代开始发展起来的一项新兴技术,它是用物理或化学的手段将游离细胞定位于限定的空间区域,并使其保持催化活性、反复使用的一种基本技术,包括固定化酶技术和固定化细胞技术。

传统的酒精发酵工艺,采用游离细胞发酵,酵母随发酵醪液流走,造成发酵罐中酵母细胞浓度不够大,使酒精发酵速率慢、发酵时间长、设备利用率不高,发酵生产中酵母细胞数少、产酒率不高、杂菌污染严重以及菌种单一等缺点。固定化细胞发酵，其机理是将活的微生物细胞高度密集于载体之上，并不断生长繁殖，形成高浓度的生物催化剂，从而大大加快了反应速度，使生产能力大幅度提高，简化了生产

工序,节能降耗,提高了设备利用率。

固定化细胞技术具有较好的催化活性和多种优点而被应用在制药行业、食品工业、环境保护及传统发酵工业中,尤其是固定化细胞酒精发酵技术,在工业生产应用中研究得最深入也最为成熟。

目前,用于酵母细胞固定化的方法较多,按照固定化载体与作用方式的不同,可分为吸附法、包埋法、交联法、共价结合法等。

通过蔗糖酶的几种不同固定化方法和特性的比较使学生学会固定化酶的制备及其相关特性研究的方案设计与实践研究，体验固定化酶的制备及其应用的基本原理、研究过程和评价方法。

**1 材料与试剂**

**1.1 实验材料**

安琪高活性干酵母（安琪酵母股份有限公司）

**1.2培养基**

（1）增殖培养基

葡萄糖5.0g/L、蛋白胨0.5g/L、酵母膏0.5g/L、七水硫酸镁0.1g/L 和磷酸二氢钾0.1g/L，调节pH 为5.0。

（2）发酵培养基

葡萄糖12％～15％、蛋白胨0.5g/L、酵母膏0.5g/L，七水硫酸镁0.1g/L、磷酸二氢钾0.1g/L 和硫酸铵0.5g/L，调节pH为5.0。

**1.3 试剂和药品(略)**

**2 检测方法**

**2.1 酒度的检测**（按GB/T 15038- 94 酒精计法）

实验采用酒精计法对酒度进行测量。根据测得的酒精计示值和温度，查附录，换算成20℃时酒精度，所得结果保留至一位小数。

**2.2 酸度的检测**（参考文献：张正奇.分析化学[M].北京:科学出版社，2006：378-401；朱宝铺.葡萄酒工业手册[M].北京:中国轻工业出版社,1995:465-471.）

实验采用酸碱滴定指示剂法。所得数据根据式（1）和式（2）进行计算：

 （1）

式中：c(NaOH)——氢氧化钠标准溶液的物质的量浓度，mol/L；

m——邻苯二甲酸氢钾的质量，g；

V0——空白实验氢氧化钠溶液的用量，mL；

V1——氢氧化钠溶液的用量，mL；

 （2）

式中：X——样品中滴定酸的含量，g／L；

V2——吸取样品的体积，mL；

Si——取值为0.075。

2.3 发酵液糖度的检测（参考文献：Carl Lachat, 马兆瑞. 苹果酒酿造技术[M].北京：中国轻工业出版社,2004：220-227.）

实验将采用直接滴定法。

（3）

式中：F——斐林溶液A、B 各5mL相当于葡萄糖的克数，g；

m——称取葡萄糖的质量，g；

V——消耗葡萄糖标准溶液的总体积，mL。

 （4）

 （5）

式中：X——总糖或还原糖的含量，g/L；

V1——吸取的样品体积，mL；

V2——样品稀释后或水解定容的体积，mL；

V3——消耗试样的体积，mL；

G——葡萄糖标准溶液的准确浓度，g/mL；

3 固定化发酵工艺研究

3.1 活性干酵母的活化

用电子天平各称取1.00g 干酵母，分别放在两个250mL 三角瓶中用50mL 浓度为2%的蔗糖溶液在30℃恒温活化30min，分别编号1#、2#备用。

3.2 酵母菌增殖培养

将活化后的酵母菌1#、2#全部分别加入装有50mL 编号为1#、2#增殖培养基的三角瓶中，放入台式恒温振荡器中在28℃、120r/min 条件下增殖培养24h。

3.3 海藻酸钠-酵母菌悬液制备

用100mL 蒸馏水加热溶解一定量海藻酸钠，将增殖酵母菌液1#与海藻酸钠溶液充分混合均匀，形成海藻酸钠-酵母菌悬液。

3.4 酵母细胞的固定化

**方法一：天然材料包埋法**（参考文献：严复，吴怡莹，孙韵. 固定化蔗糖酶的初步研究. 微生物学杂志. 1981年 创刊号）

①海藻酸钠包理酵母制备固定酵母细胞用海藻酸钠1克加水100毫升,微火加热溶解后冷却到30℃左右,将予先准备好的含3克酵母的菌悬液加入,混匀倒入子先配好的4%氯化钙溶掖中,边倒边搅,即形成海藻酸钙包埋的固定化蔗糖酶。

（附指导方案：称取3g无水氯化钙，溶于150mL 蒸馏水中，配制成所需浓度（2%）的氯化钙溶液，将其置于设定温度（20℃）的电子恒温水浴锅中，将海藻酸钠-酵母菌悬液滴入氯化钙溶液中造粒，并恒温维持2h，使酵母充分固定化。倾去上清液，用蒸馏水冲洗固定化酵母3次，然后重新置于2%的氯化钙溶液中平衡24h后，备用。）

②琼脂包理酵母制备固定酵母细胞

用琼脂3克加水100毫升,加热溶解,冷却后将予先制备好的含3克酵母的菌悬液混入琼脂中,待冷凝后备用 。

③酶明胶包理酵母制备固定酵母细胞

用明胶10克加水100毫升加热溶解,冷却后将予先制备好含3克酵母的菌悬液加入明胶中,待冷却后备用。

**方法二：人工高分子复合材料包埋法**（参考文献：李沁华，张文宇.聚乙烯醇-海藻酸钠复合材料制备及性质 [J ] . 暨南大学学报(自然科学版) , 2001 , 22 (3) : 81285；杨丽,张晶,熊强,李莎.聚乙烯醇-海藻酸钙作为德氏乳酸杆菌包埋剂的研究. 南京工业大学学报.2007， Vol . 29 No . 1）

PVA具有机械强度高、稳定性好、价格低廉等优点,但用它制备的凝胶具有非常强的附聚倾向,在制备珠体时比较困难;而海藻酸钙凝胶含水率高,制备简单,凝胶成形方便,但其网络的孔隙尺寸太大且凝胶珠机械强度较差,重复使用率不高。将互溶性好的海藻酸钠与PVA混合使用,使其优劣势互补,可制得柔韧性好、含水率高、凝胶机械强度和传质性能均较好的固定化细胞载体。

将一定量的PVA和海藻酸钠加蒸馏水煮沸溶解,配成一定浓度混合物 ,冷却后加入体积分数为 2%的菌悬液混匀.在搅拌条件下采用注射器 ,将混合液逐滴滴入一定浓度的 CaCl 2和饱和硼酸混合溶液中 ,形成大小均匀的固定化凝胶珠,固化一段时间后取出, 于4 ℃下在生理盐水中悬浮保存备用。

3.5 固定化酵母的发酵试验

将固定化好的酵母置于1000mL，pH=5.0 的发酵培养基中，放置于温度调节为30℃的电子恒温培养箱中进行发酵，定时记录发酵液糖度、酒精度、酸度和糖锤度的变化。

3.6 游离酵母的发酵试验

用配好的2#瓶酵母菌直接将其添加于1000mL，pH=5.0 的发酵培养基中，放置于温度调节为30℃的电子恒温培养箱中进行发酵，定时记录发酵液糖度、酒度、酸度的变化。

**4结果与讨论**

4.1固定化材料的机械强度和包埋效率

4.2固定化发酵的酒精产量和使用寿命

4.3固定化发酵过程中糖度和酸度的变化

4.4固定化酵母和游离酵母发酵比较

**5结论**

研究表明: 1、2、3、4、… … … … ……