

УДК 663.14.031

С.А.Стебакова, научн.сотр.;

Н.С.Ручай, доцент

**СБРАЖИВАНИЕ ГИДРОЛИЗНОГО СУСЛА ИММОБИЛИЗОВАННОЙ
КУЛЬТУРОЙ ДРОЖЖЕЙ**

Techniques have been discussed for immobilization of yeast cells through adhesion onto polymeric fibers. The cells were found to adhere strongly and were not desorbed during continuous use for ethanolic fermentation.

Качественно новый уровень технологии производства этанола из углеводсодержащего сырья связывают с использованием систем с иммобилизованными клетками продуцентов [1]. В настоящей работе исследована эффективность ферментационной системы симобилизованными дрожжевыми клетками при сбраживании гидролизатов растительного сырья.

Из известных методов иммобилизации микроорганизмов самым простым, дешевым и наиболее приемлемым для переработки сложных по составу производственных сред является адсорбция клеток на поверхности носителя [2]. Предсказать тип носителя для иммобилизации клеток микроорганизмов практически невозможно. В связи с этим при создании систем с иммобилизованными клетками определяющим фактором является выбор носителя, который должен прочно удерживать большое количество клеток продуцентов этанола, обеспечить устойчивость ферментационной системы в производственной среде и длительное функционирование ее без снижения активности продуцента.

Объектом исследования являлись дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* Y 1334 (из коллекции культур института ВНИИгенетики) и *Schizosaccharomyces pombe* (продуцент этанола на Бобруйском гидролизном заводе). В качестве носителей исследовали синтетические волокна, несущие на своей поверхности полярные функциональные группы с положительным зарядом.

Для иммобилизации использовали двухсуточные культуры дрожжей, выращенные на сусло-агаре и синтетической среде Ридера. Иммобилизацию клеток на носителе осуществляли из физиологического раствора (0,8%-ный раствор хлорида натрия) и из ферментационной среды (гидролизного сусла) в непроточном режиме в качалочных колбах, а также в условиях потока

суспензии дрожжевых клеток (в лабораторном биореакторе).

Промытые стерильной дистиллированной водой образцы носителей высушивали под вакуумом до постоянной массы, помещали в качалочные колбы с дрожжевой суспензией и выдерживали на качалке при слабом перемешивании и температуре $22 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 8-20 часов. Скорость иммобилизации и степень насыщения носителя клетками контролировали по оптической плотности дрожжевой суспензии. После достижения динамического равновесия в системе дрожжевую суспензию сливали из колбы и носитель отмывали от свободных клеток раствором, из которого проводилась иммобилизация, до отсутствия клеток в промывной жидкости (1-3 клетки в поле зрения микроскопа). Промытый носитель высушивали до постоянной массы и определяли его сорбционную емкость по микробным клеткам - количество сухой массы клеток, сорбированной единицей массы сушеного носителя.

Иммобилизацию клеток дрожжей в проточном режиме и сбрасывание сусла осуществляли на ферментационной установке с термостатированным биореактором, заполненным носителем. Жидкостные потоки дозировали с помощью перистальтических насосов. В исследованиях использовали биореакторы двух типов: колонный биореактор (соотношение высоты и диаметра рабочей зоны $h:d=8:1$) с линейным расположением волокна носителя по высоте аппарата и биореактор с вращающимся ротором ($h:d=2:1$), в котором волокно располагалось линейно в жгутах. Частота вращения ротора 2 мин^{-1} . Плотность упаковки носителя в колонном реакторе составляла $20-30 \text{ кг/м}^3$, в биореакторе с ротором - $10-15 \text{ кг/м}^3$. Наличие в биореакторе вращающегося ротора способствует выравниванию концентрации субстрата в объеме аппарата и облегчает удаление углекислого газа из реакционного пространства.

Иммобилизацию клеток в проточном режиме осуществляли в биореакторе путем подачи дрожжевой суспензии снизу вверх через носитель со скоростью протока $0,1-0,5 \text{ ч}^{-1}$. Продолжительность циркуляции суспензии в замкнутом контуре биореактор-сборник суспензии-насос-биореактор составляла 4-6 часов. После иммобилизации клеток и промывки носителя биореактор переводили на непрерывный процесс сбрасывания сусла

при протоке $0,05-0,3 \text{ ч}^{-1}$, температуре $30 \pm 1^\circ\text{C}$ и pH среды $4,0-4,4$. Эффективность процесса брожения контролировали путем определения содержания редуцирующих веществ (РВ) в сусле и бражке эбулиостатическим методом и спирта в бражке методом газожидкостной хроматографии (детектор пламенно-ионизационный, относительная погрешность определения 5%).

Из числа исследованных волокнистых носителей наибольшей сорбционной емкости по дрожжевой массе отличается синтетическое волокно HA (рис.1), которое и было использовано в последующих экспериментах для иммобилизации дрожжевых клеток.

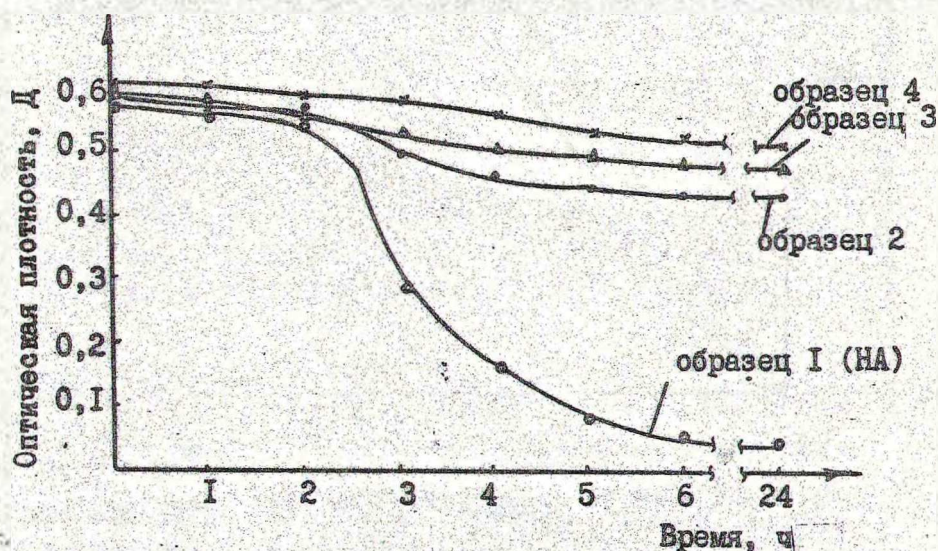


Рис.1. Изменение оптической плотности дрожжевой суспензии при сорбции клеток на волокнистых носителях

Известно, что эффективность процесса иммобилизации клеток на носителе определяется рядом факторов, в том числе видом культуры микроорганизма, а также свойствами жидкой среды, из которой осуществлялась сорбция клеток. Как свидетельствуют результаты эксперимента (рис.2), волокнистый носитель HA сорбирует сахаромицеты в количестве $250-390 \text{ мг/г}$, а мизосахаромицеты — до 230 мг/г . Продолжительность иммобилизации до насыщения носителя дрожжевыми клетками составляет 6-8 часов. При иммобилизации клеток сахаромицетов из физиологического раствора (pH 4,0) количество сорбированных клеток

на 25-30% больше в сравнении с иммобилизацией из гидролизованного сусла. Для пизосахаромицетов изменение вида среды практически не влияет на сорбционную емкость носителя.

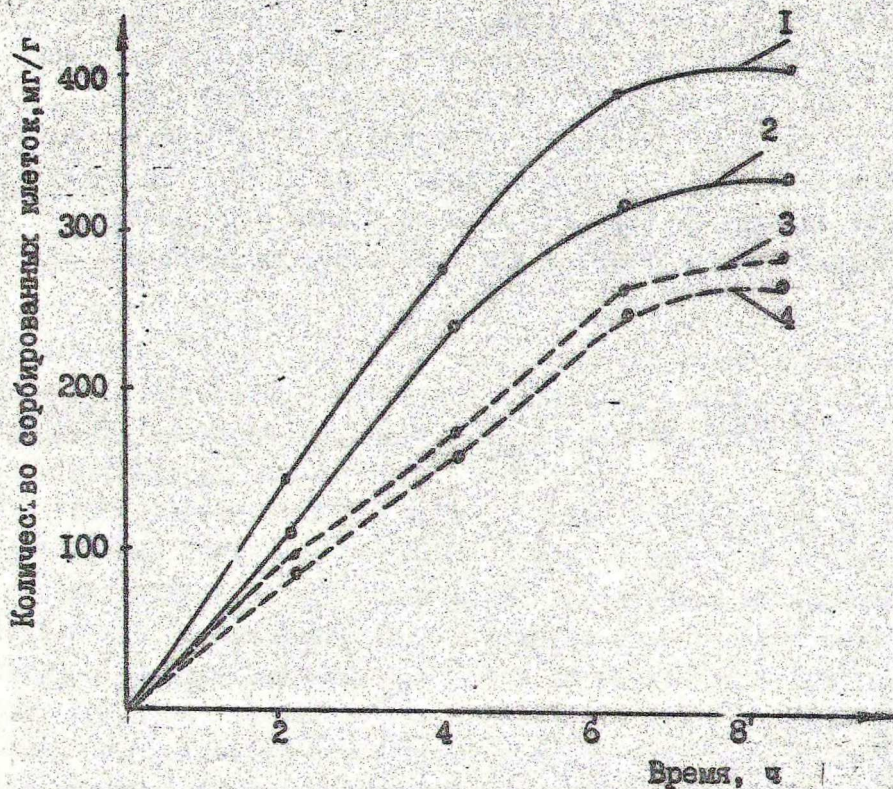


Рис. 2. Динамика сорбции дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* (—) и *Schizosaccharomyces pombe* (---) из физиологического раствора (1) и гидролизованного сусла (2)

Экспериментально установлено, что процесс иммобилизации протекает наиболее эффективно при pH среды 3-5. При увеличении pH среды до 7-8 дрожжевые клетки теряют связь с носителем. Это явление может быть использовано для регенерации носителя с освобождением его от микробных клеток и обновлением сорбированного материала.

При иммобилизации клеток дрожжей в биореакторе в проточном режиме были получены такие же результаты, как и в стационарных условиях.

Эффективность иммобилизованных культур дрожжей исследовали при непрерывном сбраживании в биореакторе сусла Бобруйского ГЗ. Результаты эксперимента (табл.) свидетельствуют, что иммобилизованные клетки дрожжей сохраняют бродильную активность на уровне свободных клеток (степень сбраживания РВ сусла 54-56%, выход этанола 57-59 л из 100 кг сброженных РВ).

Табл. Эффективность сбраживания гидролизного сусла иммобилизованными клетками дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Schizosaccharomyces pombe*

Показатель	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
Плотность загрузки био-реактора, кг/м ³	30	20
Скорость протока, ч ⁻¹	0,30	0,26
Степень сбраживания редуцирующих веществ гидролизного сусла, %	57,32	54,40
Выход этанола из 100 кг сброженных РВ, л	57,50	59,76

Лабораторный биореактор с иммобилизованной культурой дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* обеспечивал устойчивую и эффективную конверсию углеводов гидролизного сусла в этанол в непрерывном режиме брожения в течение 45 суток.

Таким образом, исследованная ферментационная система с иммобилизованными на волокнистом носителе дрожжевыми клетками обладает высокой бродильной активностью и устойчивостью при сбраживании гидролизного сусла и может быть рекомендована для апробации в производственных условиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Козляк Е.И., Якимов И.М., Уткин И.Б. и др. Физико-химические основы иммобилизации клеток методом сорбции // Прикладная биохимия и микробиология. - 1991. - Т. 27, № 6. - С. 786-803.
2. Воробьева Л.И. Промышленная микробиология. - М., 1989.