

# 海藻酸铝固定化酵母生产酒精的研究\*



宋向阳<sup>1</sup>, 毛连山<sup>1</sup>, 杨富国<sup>2</sup>, 勇 强<sup>1</sup>, 余世袁<sup>1</sup>

(1. 南京林业大学 化工学院, 江苏 南京 210037;

2. 中南大学 化学化工学院, 湖南 长沙 410083)

SONG X Y

**摘 要:** 以树干毕赤酵母(*Pichia stipitis*)为发酵菌株,利用海藻酸铝凝胶代替海藻酸钙,可明显延长固定化酵母的使用寿命,海藻酸铝凝胶耐磷酸盐能力是海藻酸钙凝胶的 3 倍。海藻酸铝树干毕赤固定化增殖酵母细胞可同步发酵戊糖、己糖,以混合糖质量浓度 60 g/L(50% 葡萄糖、50% 木糖)为发酵底物,成熟醪中酒精质量浓度由 26.0 g/L 提高至 27.3 g/L,总糖利用率为 93.7%。

**关键词:** 树干毕赤酵母;海藻酸铝;酒精

中图分类号:TQ92

文献标识码:A

文章编号:0253-2417(2002)02-0043-04

固定化细胞技术是自 20 世纪 60 年代发展起来的新技术,主要分为吸附法、包埋法、共价法、交联法和超滤法等几大类,其中以包埋法应用最为普遍。目前固定化细胞技术已成为国际上研究的热点之一<sup>[1~3]</sup>,已在工业、医学、环境保护、能源开发、化学分析以及理论研究等方面得到了广泛的应用。载体是固定化细胞技术的核心部分。包埋法中的载体有多种,如聚丙烯酰胺凝胶、海藻酸钙、卡拉胶、琼脂糖等。

海藻酸钙是目前应用最为广泛的一种固定化载体,其特点是易于成形、无毒、不被绝大多数微生物分解、成本低廉等,但其强度较差,使用寿命短,这主要是由于培养基中的磷酸盐逐渐使海藻酸钙凝胶破裂和解体。延长海藻酸钙凝胶使用寿命的处理方法较多<sup>[4]</sup>。本研究利用铝离子对钙离子置换法,将低浓度的树干毕赤酵母(*Pichia stipitis*)细胞固定,经增殖培养,可高效地同步发酵戊糖和己糖,形成的海藻酸铝固定化酵母细胞耐磷酸盐能力显著增强,海藻酸铝固定化酵母细胞使用寿命明显延长。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌种

树干毕赤酵母,该菌种能够同步发酵戊糖和己糖,由南京林业大学生物化工研究所保藏。

### 1.2 培养基

酵母细胞培养基(g/L):木糖 20.0,蛋白胨 5.0,酵母汁 3.0,培养基 pH 5.0;固定化增殖培养基(g/L):葡萄糖 30.0,木糖 30.0,蛋白胨 3.0,酵母汁 2.5, CaCl<sub>2</sub> 2.5, MgSO<sub>4</sub> 0.25, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.5,培养基 pH 5.0;发酵培养基(g/L):葡萄糖 30.0,木糖 30.0, CaCl<sub>2</sub> 2.5, MgSO<sub>4</sub> 0.25, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.5,培养基 pH 5.0。

### 1.3 固定化细胞的制备

将试管斜面菌种接入液体酵母细胞培养基中,在 30 °C、150 r/min 条件下活化 2 d,取 2 mL 菌液与 3% 的海藻酸钠溶液(68 mL)于常温下混合,注入 2% CaCl<sub>2</sub>水溶液中,固化 4 h,用无菌水将固化后的海藻酸钙凝胶球(直径 2~3 mm)洗 3 次(每次 50 mL),再移入 1% Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>溶液中,放置冰箱(4 °C)中国化 24 h。

\* 收稿日期:2002-01-25

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970597)

作者简介:宋向阳(1965-),男,江苏无锡人,副教授,博士生,从事林产生物化学加工研究。

## 1.4 固定化细胞的增殖

将固定化好的凝胶球(直径约3 mm)置于增殖培养基中,30 ℃、150 r/min 条件下增殖培养,12 h 更换一次新鲜培养液,共增殖4次。

## 1.5 酒精发酵

将固定化凝胶球用无菌水洗3次后,移入发酵培养基中。发酵容器为250 mL三角瓶,发酵液体积与凝胶球的堆积体积之比为3:2,其中发酵液体积为50 mL,总体积为80 mL。将三角瓶置于恒温振荡器中,在35 ℃、150 r/min 条件下进行酒精发酵。利用固定化细胞重复式发酵,每一批发酵结束后,收集发酵液,接入新鲜发酵液。

## 1.6 分析测定

1.6.1 固定化细胞湿重 当1批发酵结束后,倾去发酵液,对装有固定化细胞的三角瓶称重,减去空三角瓶质量,即为固定化细胞凝胶颗粒湿重。

1.6.2 酒精含量 利用高效液相色谱法,测定酒精含量。

1.6.3 还原糖测定 采用3,5-二硝基水杨酸(DNS)法测定<sup>[5]</sup>。

# 2 结果与分析

## 2.1 $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ 溶液质量分数对海藻酸铝固定化酵母细胞酒精发酵的影响

$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  溶液质量分数对海藻酸铝固定化酵母细胞酒精发酵影响较大。在固定化凝胶颗粒制备过程中,分别采用0.4%、0.6%、0.8%、1.0%、1.2%、1.4%和1.6%的 $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  溶液,利用铝离子对钙离子置换法,形成海藻酸铝树干毕赤酵母凝胶颗粒,通过增殖培养,使凝胶珠表面的细胞密集,能够高效地把戊糖和己糖同步发酵成酒精。

由图1可知,当 $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  溶液质量分数为0.4%时,由于 $\text{Al}^{3+}$  质量分数低,与海藻酸根螯合及置换出海藻酸钙中的 $\text{Ca}^{2+}$  离子形成海藻酸铝凝胶的作用较弱,凝胶颗粒强度低,稳定性差,显微镜下观察,溢出的自由细胞较多,糖利用率为91.6%。当 $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  溶液质量分数为1.4%以上时,尽管凝胶颗粒的机械强度明显提高,发酵醪液中自由细胞很少,但其弹性变小,糖的利用率为90.8%,有所下降,其原因是在 $\text{Al}^{3+}$  质量分数较高时,凝胶颗粒的外层硬度变大,而弹性变小,由于外层的凝胶介质过于紧密,导致固定化酵母细胞的传质能力降低,发酵糖液利用率不高。从图1可以看出, $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  溶液质量分数为1.0%时,凝胶颗粒强度较好,富有弹性,糖利用率高达94.6%。

## 2.2 固定化凝胶颗粒耐磷酸盐能力试验

海藻酸钙是一种最为常用的固定化载体,其缺点是强度较差,使用寿命短,在制备海藻酸钙凝胶颗粒过程中添加 $\text{Al}_2\text{O}_3$ 、 $\text{SiO}_2$ 、 $\text{MnCl}_2$ 、活性炭等,虽然可增加海藻酸钙的机械强度和稳定性,但是由于发酵培养基中的磷酸盐逐渐使海藻酸钙凝胶颗粒破裂和解体,故效果并不十分理想。本试验通过铝离子对钙离子置换法,使形成的海藻酸铝固定化酵母细胞耐磷酸盐能力明显增强。试验过程是分别称取1 g 固定化凝胶颗粒,分别溶于50 mL 浓度为0.1 mol/L 的磷酸盐中性缓冲液中,于35 ℃条件下,间歇振荡,观察固定化凝胶颗粒耐磷酸盐能力<sup>[6]</sup>。

由表1可知,海藻酸钙凝胶颗粒中添加剂不同,其耐磷酸盐能力亦有所差异。添加活性炭的固定化凝胶颗粒耐磷酸盐能力没有明显提高,因为活性炭具有多孔性,其比表面积比较大,添加到海藻酸钙凝

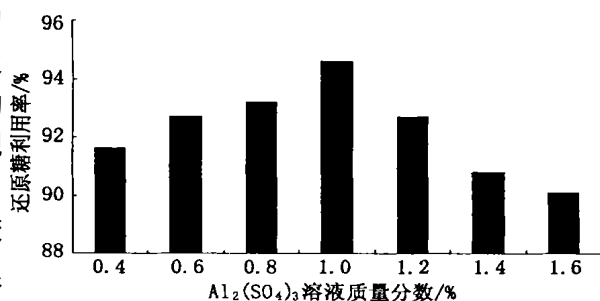


图1  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  溶液质量分数对固定化细胞酒精发酵糖利用率的影响

Fig. 1 Effects of concentration of  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  solution on utilization ratio of sugar in ethanol fermentation by immobilized cells

胶颗粒中,增加了固定化细胞的通透性,但其耐磷酸盐能力提高不多,开裂时间为 30 min,仅比空白即不添加物的多 10 min。添加  $\text{SiO}_2$  比  $\text{Al}_2\text{O}_3$  效果要好,耐磷酸盐能力提高 2 倍,这是由于  $\text{SiO}_2$  为原子型晶体,强度较高,添加至凝胶颗粒中尤如水泥中加钢筋,增加了强度,故耐磷酸盐能力提高 2 倍。而采用置换法形成的海藻酸铝固定化细胞耐磷酸盐能力增强显著,因为铝离子把钙离子从海藻酸钙凝胶颗粒中置换出来,磷酸盐对海藻酸铝凝胶颗粒破坏性减少,故海藻酸铝固定化细胞耐磷酸盐能力提高 3 倍。

另外,从表 1 中可以看出,添加物如  $\text{Al}_2\text{O}_3$ 、 $\text{SiO}_2$ 、活性炭等在灭菌前或灭菌后加入对凝胶颗粒耐磷酸盐能力的影响没有差别。而  $\text{MnCl}_2$  在灭菌前或后加入海藻酸钠溶液中影响较大,灭菌前加入  $\text{MnCl}_2$  形成的固定化细胞耐磷酸盐能力是空白的 2 倍多,这主要是因为灭菌前加入,  $\text{Mn}^{2+}$  置换了固定化凝胶颗粒中的  $\text{Ca}^{2+}$ ,但灭菌后加入影响不大,可能是灭菌后加入溶解不充分,  $\text{Mn}^{2+}$  对固定化凝胶颗粒中的  $\text{Ca}^{2+}$  置换不完全或没有置换。

### 2.3 海藻酸铝固定化细胞酒精发酵

#### 2.3.1 发酵液 pH 值对海藻酸铝固定化细胞酒精发酵的影响

将海藻酸铝固定化增殖酵母凝胶颗粒各 30 mL 分别在不同的 pH 值、体积为 50 mL 混合糖(混合糖质量浓度为 60 g/L,木糖和葡萄糖各占 50%)发酵液中,在 35 °C、150 r/min 条件下,发酵 24 h,结果如表 2。

由表 2 可知,发酵液 pH 值在 3.0~6.0 范围内,发酵液 pH 值越低,越不利于海藻酸铝固定化酵母细胞的生长和繁殖。当发酵液 pH 值 3.5 时,残糖质量浓度高达 16.5 g/L,酒精质量浓度 15.2 g/L,显微镜下观察酵母细胞,部分形态已不圆滑,单细胞较多,芽孢少,即长时间在 pH 值 3.5 以下,酵母细胞变形,其生物功能降低或丧失,糖代谢能力下降,酒精发酵受到明显抑制。而发酵液 pH 值 4.0 时,酵母细胞形态圆滑,糖利用率高,残糖仅 3.58 g/L,酒精质量浓度 26.0 g/L。发酵液 pH 值 5.5 时,酒精质量浓度为 27.3 g/L。发酵液 pH 值再高些(如 6.0),酒精浓度虽有提高,但工业上高 pH 值易染菌。故海藻酸铝固定化细胞酒精发酵最适宜 pH 值为 5.0~5.5,此结果与海藻酸钙固定化酵母酒精发酵最适宜 pH 值一致。

表 2 发酵液 pH 值对海藻酸铝固定化细胞酒精发酵的影响

Table 2 Effects of broth pH value on ethanol fermentation by immobilized cells of aluminium alginate

发酵液 pH 值 broth pH value	发酵时间/h fermentation time	发酵液残糖质量浓度/(g·L <sup>-1</sup> ) residual sugar concn. of the broth	固定化酵母细胞质量/g weight of immobilized cells	酒精质量浓度/(g·L <sup>-1</sup> ) ethanol concn.
3.0	24	28.32	30.1	7.3
3.5	24	16.53	35.3	15.2
4.0	24	3.85	57.4	26.0
5.0	24	2.31	58.7	26.7
5.5	24	2.25	59.3	27.3
6.0	24	2.21	60.1	27.6

2.3.2 海藻酸铝固定化细胞酒精发酵 利用海藻酸钙和海藻酸铝的固定化增殖树干毕赤酵母细胞,对质量浓度为 60 g/L 混合糖(50% 葡萄糖、50% 木糖)分别进行发酵试验。结果表明,两种固定化增殖树干毕赤酵母细胞前 24 d 酒精发酵均较稳定,但 24 d 以后差异明显,见图 2。

由图 2 可知,海藻酸钙和海藻酸铝的固定化增殖树干毕赤酵母细胞酒精发酵,前 24 d 二者酒精发酵均较稳定,其发酵液残糖质量浓度分别为 2.81 和 2.72 g/L,但 24 d 以后差异明显。至发酵 36 d,海藻酸钙固定化细胞酒精发酵,残糖质量浓度由 2.81 g/L(24 d) 上升至 3.53 g/L,其固定化细胞质量由 59.4 g 下降至 53.6 g,而海藻酸铝固定化细胞酒精发酵稳定,固定化酵母细胞流失少,仅减少 1.1 g。产

表 1 固定化细胞凝胶颗粒耐磷酸盐能力试验

Table 1 Test on phosphate endurance of aluminium alginate gel on immobilized cells

实验号 test No.	添加物 <sup>1)</sup> additives	凝胶颗粒溶解时间/min dissolve time of gel	凝胶颗粒破裂时间/min break time of gel
1	$\text{Al}_2\text{O}_3$ (A)	140	40
2	$\text{Al}_2\text{O}_3$ (B)	140	40
3	$\text{MnCl}_2$ (A)	300	180
4	$\text{MnCl}_2$ (B)	120	30
5	$\text{SiO}_2$ (A)	240	60
6	$\text{SiO}_2$ (B)	240	70
7	活性炭 AC(A)	120	30
8	活性炭 AC(B)	120	30
9	空白 control	120	20
10	$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	360	2

1) A 表示添加物在灭菌前加入; B 表示添加物在灭菌后加入。添加物质量浓度均为 1.0% (空白对照除外)。2) 一开始就变透明。

生上述结果是因为发酵培养基中磷酸盐逐渐使海藻酸钙凝胶破裂, 而海藻酸铝固定化细胞耐磷酸盐能力明显强于海藻酸钙固定化细胞, 海藻酸钙固定化细胞发酵 24 d 以后, 固定化细胞逐渐流失, 糖利用率下降, 海藻酸铝固定化细胞发酵至 36 d, 固定化细胞稳定, 总还原糖利用率为 93.7%。

### 3 结论

**3.1 铝离子对钙离子置换形成的海藻酸铝固定化酵母细胞耐磷酸盐能力明显增强, 但  $Al_2(SO_4)_3$  质量分数对海藻酸铝固定化酵母细胞酒精发酵糖利用率影响较大,  $Al_2(SO_4)_3$  质量分数低时(如 0.4%),  $Al^{3+}$  对  $Ca^{2+}$  置换不完全, 耐磷酸盐能力弱,  $Al_2(SO_4)_3$  质量分数过高(如 1.4%), 凝胶颗粒的外层硬度变大, 而弹性变小, 由于外层的凝胶介质过于紧密, 导致固定化细胞的传质能力降低, 故以 1.0%  $Al_2(SO_4)_3$  较适宜。**

**3.2 经耐磷酸盐能力试验, 海藻酸钠溶液中添加  $SiO_2$  效果较好, 形成的海藻酸钙固定化细胞耐磷酸盐能力是不添加的 2 倍, 而置换法形成固定化酵母细胞要比添加法形成的好, 形成海藻酸铝固定化酵母细胞耐磷酸盐能力是不添加的 3 倍。**

**3.3 海藻酸铝固定化酵母细胞酒精发酵 36 d, 固定化细胞稳定, 发酵稳定时间明显长于海藻酸钙固定化酵母细胞酒精发酵, 酒精质量浓度由 26.0 g/L 提高至 27.6 g/L, 总糖利用率为 93.7%。**

#### 参考文献:

- [1] LATA A, GARCIA L A, DIAZ M. A analysis and description of the evolution of alginate immobilized cells systems[J]. Journal of Biotechnology, 2000, 80: 203-215.
- [2] MASSIMILANO F, FEDERICO F, LAURA S, et al. Repeated batch production of pigments by immobilized *Monascus purpureus*[J]. Journal of Biotechnology, 2000, 80: 271-276.
- [3] MAHESH S K, MARIA B, CHRISTOPHER K S, et al. Ethanol production from glucose and xylose by immobilized *Zygomonas mobilis* CP4[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2000, 84-86: 525-541.
- [4] 严复, 曲立民, 金凤鸾, 等. 高联海藻酸钙固定化酵母的制备及其化学稳定性的研究[J]. 生物工程学报, 1985, 1(1): 81-84.
- [5] 葛珠福, 王利火. 花生蛋白饮料的研制[J]. 食品与发酵工业, 1991, (5): 45-48.
- [6] 田小光, 等. 海藻酸铝固定化酵母生产高浓度酒精的研究[J]. 微生物学通报, 1995, 22(5): 282-284.

## STUDY ON ETHANOL FERMENTATION BY IMMOBILIZED CELLS OF ALUMINIUM ALGINATE

SONG Xiang-yang<sup>1</sup>, MAO Lian-shan<sup>1</sup>, YANG Fu-guo<sup>2</sup>, YONG Qiang<sup>1</sup>, YU Shi-yuan<sup>1</sup>

(1. College of Chemical Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China;

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Central South University, Changsha 410083, China)

**Abstract:** Life time of immobilized *Pichia stipitis* yeast cells was prolonged significantly when the gel was formed with aluminium alginate instead of calcium alginate. Endurance against phosphate of aluminium alginate gel was increased 3 times than that of calcium alginate gel. Glucose-xylose mixture could be co-fermented to ethanol by immobilized *Pichia stipitis* yeast cells of aluminium alginate. The concentration of ethanol in final broth was enhanced from 26.0 g/L to 27.3 g/L, and utilization ratio of total sugar was 93.7%.

**Key words:** *Pichia stipitis*; aluminium alginate; ethanol

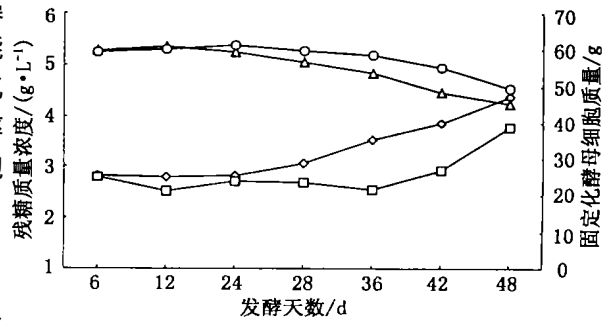


图2 海藻酸钙和海藻酸铝的固定化细胞酒精发酵

Fig. 2 Ethanol fermentation of immobilized cells of calcium alginate and aluminium alginate

- ◇— 海藻酸钙固定化细胞酒精发酵液残糖质量浓度 residual sugar of the broth by immobilized cells of calcium alginate;
- 海藻酸铝固定化细胞酒精发酵液残糖质量浓度 residual sugar of the broth by immobilized cells of aluminium alginate;
- △— 海藻酸钙固定化细胞凝胶颗粒质量 weight of immobilized cells of calcium alginate;
- 海藻酸铝固定化细胞凝胶颗粒质量 weight of immobilized cells of aluminium alginate