

改进固定化增殖细胞的稳定性 及发酵乙醇性能的探讨

段俊英 柴明 何秀良 鞠京丽 蔡崇光

(中国科学院沈阳应用生态研究所, 沈阳)

本文报道加入甾醇、不饱和脂肪酸和改变氯化钙浓度对固定化凝胶粒子机械强度及发酵的影响。

材料和方法

(一) 材料

1. 菌种: 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)
2. 原料与试剂: 甜菜糖蜜取自彰武县糖厂。酵母膏(生化试剂), 海藻酸钠系大连水产化工厂产品。其他化学药品均为化学纯。
3. 培养基
 - (1) 斜面培养基: 土豆汁葡萄糖琼脂培养基。
 - (2) 发酵培养基: 基本组成(%): (A) 葡萄糖10, 蛋白胨0.5, 酵母膏0.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1, KH_2PO_4 0.1。 (B) 糖蜜10—18, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1, $(NH_4)_2HPO_4$ 0.2 或 $(NH_4)_2SO_4$ 0.2。
 - (3) 增殖培养基: 同发酵培养基^[1]。

(二) 方法

1. 菌体与凝胶粒子的制备: 取活化菌种接种于种子培养基中, 30℃摇床培养17h左右(转速70rpm)。取3g海藻酸钠置100ml水中于60℃左右溶化, 冷却到40℃以下, 按10%加入菌悬液混匀。在自制的制粒器中, 加压或抽真空滴到2.0% $CaCl_2$ 水溶液中使形成凝胶粒子, 再继续放置2h以上使其充分固定化。

2. 增殖: 于凝胶粒子中加入无菌的增殖培养基, 在30℃摇床上增殖培养, 每隔12h换新鲜培养基, 增殖60h左右, 此时细胞数一般可稳定在 10^8 个/ml左右。

3. 发酵: 将固定化凝胶粒子20ml置125ml三角瓶中, 加入等量的发酵培养基, 30℃恒温静止发酵, 每隔1h取样分析。

4. 凝胶粒子机械强度测定: 挑选粒径均匀的粒子放在玻璃板上, 用500g砝码加压测量粒子的粒径变化。如此重复数次。

5. 乙醇含量的测定: 采用气相色谱法^[2]。

6. 细胞数的测定: 取2—3粒子置研钵中, 加入8ml磷酸缓冲液(pH6.5), 研碎, 加1—2滴Loeffler碱性亚甲基蓝液以鉴别死活细胞。将清液滴至血球计数板上, 计算每毫升细胞数。

7. 胶液中残糖的测定: 采用WTY型手持糖度计和比色法^[3]测定。

结果和讨论

(一) 载体中加入甾醇和不饱和脂肪酸对固定化细胞粒子机械强度的影响

表1结果表明: 加入甾醇和不饱和脂肪酸的粒径可由3.2mm压至4.6mm未破裂, 去掉砝码

表1 不饱和脂肪酸和甾醇对固定化细胞凝胶粒子机械强度的影响

粒子类别	A	B	C	D
测试 (mm)				
受压前粒径	3.2	3.2	3.2	3.2
受压后粒径	4.6	4.7	4.7	4.5
去压1min后粒径	3.1	3.8	3.9	4.5

A: 凝胶粒子中含有1.0%不饱和脂肪酸和0.08%甾醇

B: 凝胶粒子中只含1.0%不饱和脂肪酸

C: 凝胶粒子中只含0.08%甾醇 D: 对照

本文于1989年3月18日收到。

后 1 min 可恢复原形；只加甾醇或不饱和脂肪酸的粒子加压后回复性较差；对照组加压后粒子边缘出现裂纹并不能回复原形。

(二) 固定化细胞凝胶粒子对磷酸盐的抗性

如表 1 所述四种处理的凝胶粒子分别放到 0.1mol/L pH6—6.5 的磷酸盐缓冲液中培养，观察粒子破坏情况。A 组粒子在培养 12h 后保持原状，D 组粒子边缘出现微小裂纹，培养 48h 后，除 A 组外其余三种粒子均有明显的破裂，说明 A 组粒子对磷酸盐有明显的抗性。

(三) 发酵活性比较

在海藻酸钠-菌悬液中加入不饱和脂肪酸和甾醇乙醇溶液，制成固定化细胞凝胶粒子，增殖 60h 左右，与对照组分别在发酵培养基中进行批式发酵试验，共进行 3h，结果如图 1

(四) 固定化细胞凝胶粒子的稳定性观察

将上述制备的固定化细胞和对照组分别置于 125ml 三角瓶中，加入等量的 12% 糖蜜培养基进行批式发酵实验，发酵 3h 为一批，每天一批，共进行 160 批（约 5 个月），加甾醇和不饱和脂肪酸的固定化细胞发酵 160 批后乙醇含量仍保持最初的 42—44mg/ml，对糖的理论转化率为 90%；而对对照组实验 90 批以前乙醇浓度在 40mg/ml 左右，

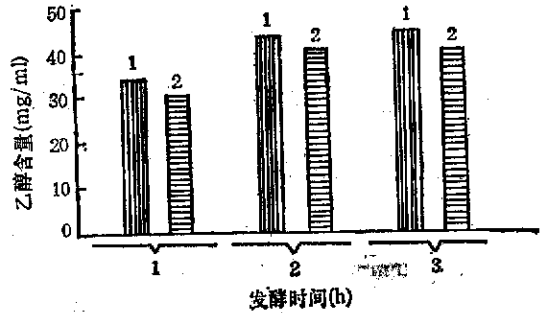


图 1 加入甾醇和不饱和脂肪酸对固定化细胞发酵活性的影响

1. 加甾醇和不饱和脂肪酸 2. 对照

以后逐渐下降，粒子出现裂纹。

(五) 氯化钙浓度对固定化细胞凝胶粒子的影响

实验结果表明：1% 氯化钙制得的固定化细胞强度及弹性都差；2% 氯化钙制得的固定化细胞不易破裂弹性好；4% 和 8% 氯化钙制得的强度大，硬易破裂弹性也差。用 1% 和 2% 氯化钙制备的粒子中细胞数比 4.0% 和 8.0% 氯化钙制备的多。2% 氯化钙制备的固定化细胞发酵效果好，发酵 2 h 残糖可降至 1.0% 以下，乙醇产量较高。

参 考 文 献

- [1] 段俊英等：微生物学杂志，8(4):1—7, 1988。
- [2] 王荣民等：中科酿造，1(1):24, 1982。
- [3] Nagashima, M. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 26(8):992—997, 1984。

THE IMPROVEMENT ON STABILITY AND ETHANOL FERMENTATION OF IMMOBILIZED GROWING CELLS

Duan Junying Chai Ming He Xiuliang Ju Jinli Cai Chongguang
(*Institute of Applied Ecology, Academia Sinica, Shenyang*)

Both unsaturated fatty acid and sterol that were added into the mixture of alginate and *Saccharomyces cerevisiae* cells during preparation of immobilized growing cells were able to enhance the mechanical strength, elasticity and stability of immobilized cells. The yield of ethanol produced by immobilized growing cells containing both unsaturated fatty acid and sterol was about 6.84% more than that produced by immobilized growing cells without both unsaturated fatty acid and sterol.

The mechanical strength, elasticity and amount of cells of immobilized gelled in 2% solution of calcium chloride were higher than that of immobilized growing cells gelled in 1%, 4% and 8% solution of calcium chloride.

Key words

Immobilized growing cells; unsaturated fatty acid; sterol