

# 新型酵母固定化材料的研究

李永成 胡 燕 陈长明

(华南热带农业大学工学院,海南,571737)

**摘 要** 以玉米芯为载体吸附酵母细胞,再以聚乙烯醇(PVA)进行包埋,于三角瓶中分批发酵。分析了在不同PVA浓度、硼酸浓度、玉米芯大小条件下固定化酵母颗粒的机械强度、传质性能和发酵性能,实验结果表明,pH 6.4、PVA浓度为12%、玉米芯为4 mm、硼酸浓度为4.5%时,固定化酵母发酵速度较快,产乙醇量较多,机械强度高,稳定性好,为最适宜的酵母细胞固定化条件。

**关键词** 固定化酵母,聚乙烯醇(PVA),玉米芯

酵母细胞的固定化技术是生产乙醇的一种高新技术。要将固定化技术应用于工业生产中,首先要解决固定化载体在生产中的软化、破裂、上浮、结团、染菌、成本和使用时间等一系列问题<sup>[6,7]</sup>,目前乙醇酵母细胞固定化大部分采用PVA等包埋法,但存在成本高、易染菌、机械强度低等缺点。

为克服上述缺点,作者先用玉米芯吸附酵母细胞,再用聚乙烯醇对玉米芯进行包埋,取得了较好的固定化效果,兼有包埋法和吸附法的特点<sup>[10,12]</sup>。此方法具有成本低、细胞吸附量大、通透性好、机械强度高优点。

## 1 材 料

### 1.1 菌 种

酿酒酵母(*Saccharomyces carlsbergensis*)南阳K,华南热带农业大学食品系提供。

### 1.2 玉米芯

市售。

### 1.3 试 剂

聚乙烯醇(聚合度 $1\ 750 \pm 50$ ),硼酸、卡拉胶、KCl、NaOH均为分析纯。

### 1.4 培养基

斜面培养基:10%豆芽汁、10%蔗糖、1%酵母膏、2%琼脂、pH4.5~5.5;增殖培养基:10%豆芽汁、10%蔗糖、1%酵母膏、pH4.5~5.5;发酵培养基:10%豆芽汁、15%蔗糖、0.5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、pH4.5~5.5。

## 2 方 法

### 2.1 固定化细胞的制备

#### 2.1.1 玉米芯的吸附

将玉米芯烘干后分别切成4、6、8 mm的颗粒,每份称取15 g,121℃灭菌后分别投入180 mL已培养12 h的增殖培养基中,继续培养吸附12 h。

#### 2.1.2 KCl-H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>成型液的配制

称取一定量的硼酸溶于蒸馏水中,加入KCl,使KCl达到0.1 mol/L,用0.1 mol/L KOH溶液调节pH至6.4,配成一系列不同硼酸浓度的KCl-H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>溶液<sup>[1]</sup>。

#### 2.1.3 玉米芯的包埋

称取一定量PVA于蒸馏水中浸泡1 d,加入0.5%卡拉胶,混匀后置高压锅中于121℃保温20 min,使PVA充分溶化,静置至室温,将已吸附好酵母细胞的玉米芯浸入PVA中进行包埋,再投入KCl-H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>成型溶液中,4℃浸泡固化24 h<sup>[13]</sup>。

### 2.2 机械性能的测定

用手捏包埋好的固定化颗粒,以此定性描述颗粒强度<sup>[14]</sup>。

### 2.3 传质性能的测定

将数颗已包埋好的固定化颗粒分别投入200 mL蒸馏水中,滴加2滴亚甲基蓝液,观察亚甲基蓝进入各种配方固定化颗粒的情况,定性描述固定化颗粒的传质性能<sup>[9]</sup>。

### 2.4 乙醇的测定

蒸馏后用比重计测得<sup>[15]</sup>。

### 2.5 发酵液残糖的测定

费林试剂法<sup>[16]</sup>。

### 2.6 游离细胞浓度

血球计数法<sup>[15]</sup>。

## 3 结果与讨论

### 3.1 固定化载体物理性质的比较

第一作者:博士研究生,工程师。

收稿日期:2005-08-02,改回日期:2005-09-22

不同 PVA 浓度、玉米芯大小、硼酸浓度对固定化载体物理性质的影响如表 1 所示。

表 1 不同 PVA 浓度、玉米芯大小、硼酸浓度对固定化酵母细胞物理性质的影响

	1 <sup>#</sup>	2 <sup>#</sup>	3 <sup>#</sup>	4 <sup>#</sup>	5 <sup>#</sup>	6 <sup>#</sup>	7 <sup>#</sup>	8 <sup>#</sup>	9 <sup>#</sup>
PVA 浓度/%	10	10	10	12	12	12	14	14	14
玉米芯大小/mm	4	6	8	4	6	8	4	6	8
硼酸浓度/%	3.0	4.5	6.0	4.5	6.0	3.0	6.0	3.0	4.5
成形难易	一般	较好	好	较好	好	一般	好	一般	较好
机械强度	一般	较好	好	较好	好	一般	好	一般	较好
传质性能	好	较好	一般	较好	一般	好	一般	好	较好
凝胶特性	透明光滑, 弹性一般	白色光滑, 弹性较好	乳白色光滑, 弹性好	白色光滑, 弹性较好	乳白色光滑, 弹性好	透明光滑, 弹性一般	乳白色光滑, 弹性好	透明光滑, 弹性一般	白色光滑, 弹性较好

由表 1 可看出,硼酸作为 PVA 的交联剂,其浓度对固定化颗粒的成形效果影响最大,硼酸浓度大,成形速度快,机械强度高,但传质性能差;硼酸浓度小,成形速度慢,机械强度差,但传质性能好。综合考虑,选择 4<sup>#</sup>即 PVA 浓度 12%、硼酸浓度 4.5%、玉米芯 4mm 为固定化酵母的基本包埋条件。

### 3.2 玉米芯大小对发酵性能的影响

本实验中使用直径为 4、6、8 mm 3 种大小的玉米芯为固定化材料,对其固定化酵母细胞的发酵性能进行了比较。实验结果如表 2 所示。

表 2 不同玉米芯大小对固定化酵母发酵性能的影响<sup>1)</sup>

发酵性能	玉米芯大小/mm		
	4	6	8
发酵周期/h	35	36	38
发酵结束乙醇体积分数(20℃)/%	7.6	7.3	7.1

1)其他固定化条件 PVA12%,硼酸浓度 4.5%,发酵终点以残糖低于 1.0%计。

从表 2 可看出,玉米芯大小在 4~8 mm 内对发酵没明显影响,但会影响到 PVA 对玉米芯的包埋,玉米芯太小,不易被 PVA 包埋,成型困难。实验中发现,玉米芯大小<4 mm 时,PVA 包埋不易成型,操作困难。

### 3.3 PVA 浓度对固定化细胞发酵性能的影响

本次实验分别选用 10%、12%、14% 三种 PVA 的浓度进行试验,其结果见表 3。

表 3 PVA 浓度对固定化细胞发酵性能的影响<sup>1)</sup>

PVA 浓度/%	10	12	14
发酵周期/h	34	35	40
发酵结束乙醇体积分数(20℃)/%	7.6	7.5	7.0
颗粒的传质性能	+++	+++	++

1)其他固定化条件 玉米芯 4 mm,硼酸浓度 4.5%,发酵终点以残糖低于 1.0%计。

从表 3 看出,PVA 浓度在 10%~12% 范围内对

固定化细胞的发酵没有大的影响,但其浓度>14%时将受到明显影响。

### 3.4 硼酸浓度对固定化细胞发酵性能的影响

选用 3%、4.5%、6% 三个硼酸浓度进行实验,硼酸作为 PVA 的交联剂,发现硼酸浓度对固定化细胞的发酵有较大影响,结果见表 4。

表 4 硼酸浓度对固定化细胞发酵性能的影响<sup>1)</sup>

硼酸浓度/%	3	4.5	6
发酵周期/h	35	35	64
发酵结束乙醇体积分数(20℃)/%	7.4	7.6	5.8
颗粒的传质性能	+++	+++	+

1)其他固定化条件,玉米芯 4 mm,PVA 浓度 12%,发酵终点以残糖低于 1.0%计。

硼酸浓度越大,PVA 对玉米芯的包埋效果越好,包埋层结构越充实,但颗粒传质性能明显下降,不利于营养物质的输送和菌体细胞的增殖。因此要得到良好的传质性能必须选择适当浓度的硼酸,综合考虑 4.5%较好。

### 3.5 固定化酵母最适宜固定化条件的选择

在上述实验基础上,采用正交实验<sup>[17,8]</sup>确定最佳包埋条件,设计 3 因素 3 水平正交实验表,实验因素有 PVA 浓度(A)、玉米芯大小(B)和硼酸浓度(C),发酵实验结果见表 5,各因素水平取值见表 6,各因子水平组合见表 7,各因素对发酵性能的影响见表 8。

比较 R 值可知影响发酵性能决定因素的主次关系为:

硼酸浓度>PVA 浓度>玉米芯大小

根据实验结果,选择最佳固定化条件为:玉米芯 4mm、PVA12%、硼酸 4.5%。

### 3.6 固定化酵母细胞的发酵稳定性

以最佳固定化条件(玉米心 4 mm、PVA12%,硼酸 4.5%)制备固定化颗粒,在 32℃ 条件下进行分批发酵,连续进行 15 批,发酵性能稳定,结果见图 1。

表 5 发酵实验结果<sup>1)</sup>

项 目	序 号												
	1#	2#	3#	4#	5#	6#	7#	8#	9#	10#	11#	12#	13#
PVA 浓度/%	10	10	10	12	12	12	14	14	14	—	—	—	—
玉米芯大小/mm	4	6	8	4	6	8	4	6	8	4	6	8	—
硼酸浓度/%	3.0	4.5	6.0	4.5	6.0	3.0	6.0	3.0	4.5	—	—	—	—
发酵所需时间/h	33	36	64	36	64	38	64	36	38	28	28	28	62
发酵残糖量	0.5	0.8	3.82	1.0	4.37	0.85	4.92	1.03	1.12	—	—	—	1.83
发酵乙醇体积 分数/%	7.2	6.4	5.7	7.0	5.4	7.2	5.1	6.8	6.2	7.6	7.5	7.4	6.7
发酵液游离细胞 浓度×10 <sup>-8</sup> /mL	1.61	1.32	1.17	1.26	1.09	1.43	1.01	1.57	1.19	14.2	12.8	11.3	10.4

1)10#、11#、12#为未包埋玉米芯,13#为非固定细胞发酵。

表 6 各因素水平取值

水 平	因 子		
	PVA 浓度 (A)/%	玉米芯大小 (B)/mm	硼酸浓度 (C)/%
1	10	4	3.0
2	12	6	4.5
3	14	8	6.0

表 7 各因子水平组合表

代 号	因 子								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	1	1	1	2	2	2	3	3	3
B	1	2	3	1	2	3	1	2	3
C	1	2	3	2	3	1	3	1	2

表 8 各因素对发酵性能的影响

实验号	A	B	C
K <sub>1</sub>	208	208	144
K <sub>2</sub>	200	216	212
K <sub>3</sub>	224	208	276
$\bar{K}_1$	69.33	69.33	48
$\bar{K}_2$	66.67	72	70.66
$\bar{K}_3$	74.67	69.33	92
R	8	2.67	44

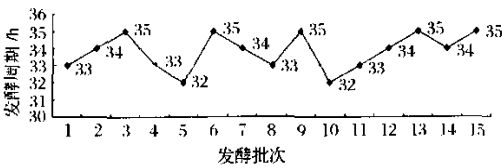


图 1 固定化酵母细胞发酵的稳定性

从图 1 可看出,连续发酵 15 批后,发酵周期变化不大,说明发酵性能基本是稳定的。

4 结 果

(1) 通过实验发现,利用玉米心这种天然有机质多孔材料吸附酵母细胞,再以适当浓度 PVA 包埋玉米芯,具有固定化颗粒机械强度高,表面光滑,重复发

酵稳定性好,操作简便,生产成本低等优点。

(2) 固定化酵母制备的适宜条件为,PVA 浓度 12%、玉米芯大小 4mm,加入 0.5% 卡拉胶、4.5 % 硼酸、pH6.4 进行硬化处理,4℃ 包埋 24 h。

(3) 在选定的 3 个因素中,硼酸浓度对固定化酵母细胞性能的影响较大,其次是 PVA 浓度,再次是玉米芯大小。

参 考 文 献

1 张治根.固定化细胞发酵生产酒精进展[J].工业微生物,1988,18(6):19~24

2 黄亚东.应用固定化酵母进行啤酒连续发酵的研究[J].酿酒,2000(3):54~57

3 李 彤,胡纪翠,俞毓馨.廉价包埋剂聚乙烯醇的研究[J].环境科学,1990,11 (5):41~44

4 陈秀萍.固定化活酵母应用于酒精发酵的机理与实践[J].甘蔗糖业,2002,6(1):33~41

5 许苏葵,何秀良.固定化细胞发酵酒精研究的进展[J].微生物学杂志,2003,11(15):61~65

6 周广麒.应用固定化酵母生产酒精新技术的若干问题[J].酒精工业,1996,11(3):5~8

7 贾树彪,陈世忠,李盛贤,等.固定化酵母在酒精连续发酵中的问题[J].黑龙江大学自然科学学报,2000,17(1):82~84

8 王 建,龙 施,汉 昌.聚乙烯醇包埋固定化微生物的研究及进展[J].工业微生物,1998,28(2):35~39

9 李 峰,吕锡武,严 伟.聚乙烯醇作为固定化细胞包埋剂的研究[J].中国给水排水,2000,16(12):14~17

10 鞠京丽,何秀良,蔡崇光,等.固定化细胞载体的选择及发酵酒精特性[J].微生物学杂志,1998,18(3):40~43

11 何国庆,杨 坚.食品微生物[M].北京:中国农业大学出版社,2002.251~252

12 童群义,陈 坚,堵国成,等.PVA-卡拉胶混合载体固定化大肠杆菌-酵母菌混合体系生产谷胱甘肽[J].工业微生物,2000,30(4):1~5

- 13 王克明,许文友,庄树宏.固定化桔青霉气升式反应器生产核酶 PI 的研究[J].烟台大学学报(自然科学与工程版),2001,14(1):37~41
- 14 谭 锋,易欣欣.酵母细胞固定化的研究[J].北京农学院学报,1996,11(2):45~49
- 15 王 岩.固定化增殖酵母载体与活性干酵母在酒精生产中对照试验[J].酿酒,2003,30(3):23~25
- 16 大连轻工业学院等八大院校.食品分析[M].北京:中国轻工业出版社,1994.274~292
- 17 王钦德,杨 坚.食品实验设计与统计分析[M].北京:中国农业大学出版社,2003.336~350

## Study on New Materials for Immobilized Yeast Cells

Li Yongcheng Hu Yang Chen Chengming

(College of Technology, South China University of Tropical Agriculture, Hainan, 571737, China)

**ABSTRACT** The yeast cells were absorbed by corn cob as carrier and then wrapped by PVA as entrapping agents. The effect of different conditions of immobilization on its mechanical strength, mass transfer and the ability for producing alcohol were investigated by batch fermentation in shaking flasks. The experiment showed that optimal conditions were pH 6.4, PVA12%,  $H_3BO_3$  4.5%, corn cob 4mm. Under those conditions, the fermentation rate was faster and the yield of alcohol was higher.

**Key words** immobilized yeast, polyvinyl alcohol(PVA), corn cob

### 信息窗

#### 食品防腐-抗氧-保鲜剂生产应用科技大会暨中国食品添加剂协会

##### 防腐-抗氧-保鲜剂专业委员会 2005 年年会在京召开

由中国食品添加剂生产应用工业协会和日本食品添加物协会主办,浙江银象生物工程有限公司协办的食品防腐-抗氧-保鲜剂生产应用科技大会暨 2005 年年会于 2005 年 11 月 16~17 日在北京隆重召开。

出席会议的有中国食品添加剂生产应用工业协会齐庆中秘书长、尤新名誉理事长以及日本食品添加物协会常务理事高桥仁一先生等,他们分别在大会上作了精彩发言。

针对广大消费者对食品防腐剂、抗氧剂、保鲜剂的安全性心存疑虑,本次大会突出了两大主题,以解决这些问题。

(1)正确认识防腐剂,合理使用防腐剂,规范生产防腐剂,消除消费者对食品防腐剂、

抗氧剂、保鲜剂的误解。

(2)从技术上解决使用“超标问题”,推出一批针对不同食品能够解决使用“超标”问题的新产品、新技术、新方法,帮助广大应用企业摆脱“超标”的困扰。

#### 中国调味品协会成立十周年庆典活动

##### 暨 2005 年中国国际调味品博览会在京盛大举行



2005 年 11 月 23 日~25 日,由中国调味品协会和中国调味品网主办,北京中味华夏投资咨询有限公司承办,众多国内、国际组织共同协办的中国调味品协会成立十周年庆典活动暨 2005 年中国国际调味品博览会在北京国际会议中心盛大举行。

《食品与发酵工业》作为本次活动的媒体支持单位成功参展。在此次博览会上,《食品与发酵工业》受到参展的 300 多家调味品生

产企业的好评,被认为是一份能及时向行业提供科研经验、技术创新、市场动态,反映企业需求的行业科技期刊,还有多家企业主动联系本刊为其作产品宣传。此次博览会开辟了一个展示窗口,为《食品与发酵工业》与广大读者、生产企业、广告客户创造了更多的交流和沟通机会,扩大了杂志的影响力。