

海藻酸钠-PVA 固定化酿酒酵母制备工艺的优化

薛亮^{1,2,3}, 黄祖新^{1,2,3,4}, 罗招城², 曹翠辉², 陈由强^{1,2,3,4}, 陈如凯¹

(1.农业部甘蔗生理生态与遗传改良重点开放实验室,福建 福州 350108;2.福建师范大学生命科学学院,福建 福州 350108;3.教育部工业微生物工程研究中心,福建 福州 350108;

4.发育与神经生物学福建省高等学校重点实验室,福建 福州 350108)

摘要: 利用海藻酸钠与PVA混合载体来固定化酿酒酵母,通过试验测定分析在不同条件下固定化酿酒酵母的发酵性能、机械强度,并对酿酒酵母固定化制备工艺条件进行优化,以达到提高固定化酿酒酵母发酵效果。结果表明,2%的海藻酸钠和7%的PVA混合制成的酿酒酵母固定化颗粒传质性能和颗粒强度较佳;工艺优化最佳方案为A₁B₃C₃,即当CaCl₂溶液的浓度为1%和硼酸溶液的浓度为4%时,分阶段固化时间为在1%的CaCl₂溶液中固化12h后转入4%的硼酸溶液中再固化12h,以其制备的酿酒酵母固定化颗粒发酵甘蔗汁产生的酒精含量最高。

关键词: 微生物; 酿酒酵母; 海藻酸钠; PVA; 固定化; 发酵

中图分类号:Q93-3;TS261.1;Q814

文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2009)02-0027-04

Optimization of the Techniques of *S.cerevisiae* Immobilization by Sodium Alginate and PVA

XUE Liang^{1,2,3}, HUANG Zu-xin^{1,2,3,4}, LUO Zhao-cheng², CAO Cui-hui², CHEN You-qiang^{1,2,3,4} and CHEN Ru-kai¹

(1.Key Lab of Eco-physiology and Genetics Improvement for Sugarcane, Ministry of Agriculture, Fuzhou, Fujian 350108;

2.College of Life Science, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350108; 3. Engineering Research Center of Industrial Microbiology, Ministry of Education, Fuzhou, Fujian 350108; 4.State Key Lab of Development

Biology and Neurobiology, Fuzhou, Fujian 350108,China)

Abstract: Sodium alginate and PVA were used for *S.cerevisiae* immobilization. The fermentation performance and mechanical intensity of immobilized *S.cerevisiae* under different conditions were determined and *S.cerevisiae* immobilization techniques were optimized to improve the fermentation performance of immobilized *S.cerevisiae*. The results showed that *S.cerevisiae* immobilization by 2% sodium alginate and 7% PVA had the best mass transfer performance and strength, and the best technical optimization program was A₁B₃C₃ (12 h immobilization in CaCl₂ solution (its concentration was 1%) and then 12 h immobilization in boric acid solution (its concentration was 4%), sugarcane juice fermented by such immobilized *S.cerevisiae* could produce the highest alcohol content).

Key words: microbe; *saccharomyces cerevisiae*; sodium alginate; PVA; immobilization; fermentation

固定化细胞技术是近10余年生物工程的重点研究领域之一,目前固定化细胞已经在工业、医学、化学分析、环境保护、能源开发等^[1-2]方面得到广泛的应用,而其中固定化酿酒酵母技术是发酵工程中迅速发展起来的新兴技术,它是利用高度密集的细胞生物量来加快发酵速度,达到缩短发酵周期、提高生产效率的目的。固定化所需要的载体各有不同,比如海藻酸钠、PVA、壳聚糖等,但单一的载体有时固定化效果并不是很好,如单纯的海藻酸钠载体发酵时易降解、易软化、易上浮^[3]。因此,理想的载体应具备对微生物低毒性,具有多孔性,传质快、稳定性能好,没有特异性吸附,有适合引入配基的官

能团、不易被微生物降解、强度高、寿命长和价格低廉等特点^[4-5]。

海藻酸钠和PVA都是较为理想的固定化载体。许多实验研究表明^[6-7],在固定化发酵方面,分别以海藻酸钠和PVA作为载体固定化酿酒酵母后产酒率有明显的提高。也有不少实验研究利用混合载体来固定化酿酒酵母^[7],其中有PVA-海藻酸盐、海藻酸钠-麸皮、PVA-明胶等。本实验研究利用海藻酸钠与PVA混合载体来固定化酿酒酵母,通过试验确定海藻酸钠与PVA最佳的混合配比,固定化酿酒酵母制备的工艺条件优化,以期在甘蔗汁发酵生产乙醇的规模化生产中应用。

基金项目 福建省自然科学基金(No.2007J0325);农业部“948”项目(No.2006G37)。

收稿日期:2008-10-30

作者简介:薛亮(1984-),男,江苏宿迁人,硕士研究生,主要从事工业微生物及分子育种研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

酿酒酵母 4608-3, 福建师范大学生命科学学院微生物组保存。

1.1.2 甘蔗汁

甘蔗外购,经榨汁机压榨得甘蔗汁调整为 20°Brix。

1.1.3 麦芽汁

啤酒厂 18°Brix 头号麦芽汁加水配成 10°Brix 麦芽汁备用。

1.1.4 试剂

海藻酸钠、聚乙烯醇(PVA)、CaCl₂(AR)、硼酸(AR)、琼脂、酵母提取物、NH₄Cl(AR)、KH₂PO₃(AR)、MgSO₄(AR)、蒽酮试剂、乙醇(色谱纯)、正丙醇(色谱纯)。

1.1.5 培养基

斜面培养基: 10°Brix 的麦芽汁 100%, 琼脂 2.5%。

液体培养基: 10°Brix 的麦芽汁。

发酵培养基: 酵母提取物 0.05%、NH₄Cl 0.1%、KH₂PO₃ 0.1%、MgSO₄ 0.06%、20°Brix 甘蔗清汁 100%。

1.2 方法

1.2.1 菌悬液制备

用接种环从经过 24 h 活化培养的酿酒酵母菌斜面培养基中挑取 1 环至液体培养基中,将接种好的液体培养基放置在 28℃、180 r/min 的恒温摇床中培养 8 h 备用。

1.2.2 酵母固定化

用蒸馏水配制海藻酸钠和 PVA 一定浓度配比的固定化载体溶液,高压灭菌后待其温度降至室温时,将菌悬液按一定配比注入载体溶液中,充分混匀后,用 10# 针头吸取菌悬液和载体溶液的混合物,再将其滴入经灭菌的凝固剂溶液中制粒固化 24 h,待固定化结束后,用无菌蒸馏水洗涤 2~3 次,再转入发酵培养基中,先置于 28℃、180 r/min 条件下摇瓶培养 8 h,再置于 28℃ 条件下进行发酵。

1.2.3 固定化酵母发酵

酿酒酵母固定化结束后,用无菌蒸馏水洗涤 2~3 次,再转入发酵。用 500 mL 三角瓶装入 200 mL 发酵培养基,固定化颗粒 50 mL,先置于 28℃、180 r/min 条件下摇瓶培养 8 h,再静置发酵 48 h,结束。测定成熟发酵醪的残糖、酒精度。

1.2.4 固定化颗粒性能测定

1.2.4.1 颗粒强度

挑选 50 个颗粒均匀的固定化小球,加水 100 mL,220 r/min 摇床振荡 24 h 后,观察颗粒破损情况,以此来

描述颗粒的强度。

1.2.4.2 颗粒传质性能

在若干小烧杯中加入等量的经稀释的蓝墨水,再称取相同质量的不同配比的固定化颗粒,放入烧杯中放置 24 h,取出固定化颗粒冲洗后,切开颗粒观测其内部染色程度,以此来评价颗粒的传质性能。

1.2.5 总糖量的测定

采用蒽酮比色法^[8]。制取标准曲线,取 7 支干燥洁净的试管,编号后每管加入葡萄糖标准液和水后立即混匀,迅速置于冰浴中,待各管都加入蒽酮试剂后,同时置于沸水浴中,准确加热 7 min,立即取出置于冰浴中迅速冷却。待各管溶液达室温后,用 1 cm 厚度的比色皿,以第 1 管为空白,迅速利用分光光度计测其余各管的吸光度。然后,以第 2 管~第 7 管溶液含糖量(μg)为横坐标,吸光度(A_{620nm})为纵坐标,画出含糖量与 A_{620nm} 值的相关标准曲线,总糖测定标准曲线见图 1。

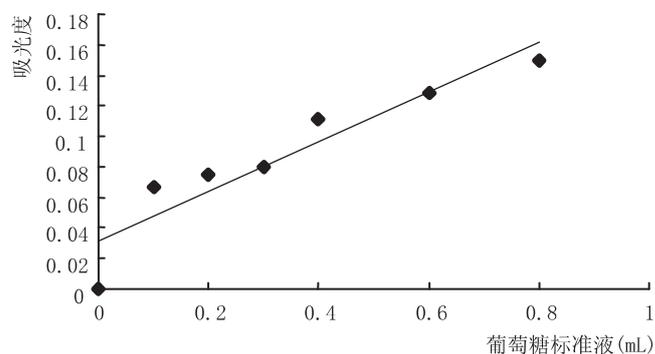


图 1 总糖测定标准曲线

从标准曲线图 1 中可得出,线性回归方程为 $Y = -0.023 + 4.191X$,则总糖含量为 $Y' = Y \times 100 \mu\text{g/mL}$ 。

测定样品的含糖量,取 4 支试管按照制作标准曲线相同的步骤,将 2~4 管测出的 A_{620nm} 平均值,根据 A_{620nm} 平均值从标准曲线上查出相应的含糖量(μg),再换算成 100 g 样品中总糖的含量。

1.2.6 酒精度的测定(气相色谱法)

1.2.6.1 乙醇标准溶液

用 5 个 100 mL 的容量瓶分别吸取色谱纯乙醇 2.00 mL、3.00 mL、3.50 mL、4.00 mL 和 4.50 mL,再分别加水定容至 100 mL。

1.2.6.2 色谱柱与色谱条件

2 m 色谱柱;Chronosorb 103,60~80 目;200℃柱温;240℃气化室和检测器温度;40 mL/min 载气流量;40 mL/min 氢气流量;500 mL/min 空气流量。并将乙醇洗脱时间控制在 1 min,正丙醇在 1.5 min 左右。

1.2.6.3 工作曲线的绘制

分别吸取不同浓度的乙醇标准溶液各 10 mL 于 5

个 10 mL 容量瓶中, 分别加入正丙醇 0.50 mL, 混匀。在上述色谱条件下, 进样 0.3 μ L, 以标样和内标峰面积的比值, 对应酒精度绘制工作曲线。

1.2.6.4 试样的测定

吸取试样 10 mL 于 5 个 10 mL 容量瓶中, 再分别加入正丙醇 0.50 mL, 混匀。在上述色谱条件下, 进样 0.3 μ L。查工作曲线, 计算试样的酒精度(%vol)。

2 结果与分析

2.1 海藻酸钠浓度对固定化颗粒制作的影响(表 1)

表 1 海藻酸钠量对固定化颗粒制作的影响

试样号	海藻酸钠 (%)	溶液粘度	制备难易度	成型情况
1	1	粘度适合	容易	小球状
2	2	粘度较适合	容易	小球状
3	3	粘度中等	较容易	近小球状
4	4	粘度大	不容易	近小球状略有不规则状
5	5	粘度太大	制作困难	不规则状居多

表 1 表明, 随着海藻酸钠浓度的增加, 载体浓度增加使载体凝胶对细胞的封闭程度增强, 影响了物质在凝胶颗粒内部的扩散, 影响了酿酒酵母的颗粒内细胞的生长和发酵性能; 小球状颗粒制作成型好但制作难度增加。而海藻酸钠浓度太低, 又会使凝胶的封闭性能差, 被固定化细胞易泄漏引起固定化颗粒功能失效。综合共固定化载体强度和共固定化细胞的生长及发酵性能, 海藻酸钠浓度一般以 1%~2% 为宜。

2.2 不同配比对固定化颗粒性能的影响

有文献指出^[9], 海藻酸钠与 PVA 均为良好的固定化制备材料, 将其二者结合制备的固定化颗粒可提高其固定化效果。在考虑固定化颗粒制作条件、海藻酸钠与 PVA 混合液量太多不易操作, 海藻酸钠与 PVA 混合液量总量定为 9%。本实验采取了海藻酸钠:PVA 为 1:8、2:7、3:6、4:5 4 组不同配比的海藻酸钠与 PVA 混合液, 并对其所制备的固定化颗粒进行性能检测, 从中得出制备效果较好的配比方案。其实验结果见表 2。

表 2 海藻酸钠与 PVA 不同配比对固定化颗粒性能的影响

项目	试样号			
	1	2	3	4
海藻酸钠 (%)	1	2	3	4
PVA (%)	8	7	6	5
制备难易度	容易	容易	较容易	不容易
成型情况	小球状	小球状	近小球状	近小球状略有不规则状
颗粒强度破损率 (%)	0	0	2	3
颗粒传质性能	++	+++	+++	+

注: 颗粒传质性能: + 差 ++ 较好 +++ 好。

经上述实验证明, 海藻酸钠与 PVA 不同的配比对固定化颗粒的效果有明显的影晌, 其中 2% 的海藻酸钠与 7% 的 PVA 和 3% 的海藻酸钠与 6% 的 PVA 混合, 制备起固定化颗粒较为容易, 所得到的颗粒外观形状较理想, 且经传质性能的检测, 其通透性较佳; 但是, 在颗粒强度的测试中, 3% 的海藻酸钠与 6% 的 PVA 混合所制备的固定化颗粒破损程度大于 2% 的海藻酸钠与 7% 的 PVA 混合所制备的固定化颗粒。所以决定选取 2% 的海藻酸钠与 7% 的 PVA 混合来作为固定化载体对酿酒酵母进行固定化。

2.3 海藻酸钠-PVA 固定化条件的优化

海藻酸钠需在 CaCl_2 中固化, 而 PVA 则需要在硼酸中固化, 其中 CaCl_2 和硼酸的浓度以及固化时间的长短对形成的固定化颗粒性能有很大影响。因此, 本实验对海藻酸钠-PVA 混合载体以不同浓度的 CaCl_2 溶液和硼酸溶液、 CaCl_2 、硼酸分步固化时间作为主要影响因素, 通过正交实验确定最佳工艺条件的固定化颗粒制作方案。正交设计为三因素三水平试验(见表 3), 其正交试验结果见表 4, 方差分析见表 5。

表 3 因素水平设计

水平	因素		
	A CaCl_2 (%)	B 硼酸 (%)	C CaCl_2 、硼酸分步固化时间 (h)
1	1	2	CaCl_2 固化后加硼酸固化 24 h
2	2	3	CaCl_2 固化 4 h 后加硼酸固化 20 h
3	3	4	CaCl_2 固化 12 h 后加硼酸固化 12 h

表 4 正交试验结果

实验号	因素			试验指标	
	A	B	C	残糖量 (g/L)	酒精含量 (%)
1	1	1	1	0.5	8.2
2	1	2	2	0.4	8.7
3	1	3	3	0.3	8.9
4	2	1	2	0.6	8.1
5	2	2	3	0.4	8.7
6	2	3	1	0.7	8.0
7	3	1	3	0.4	8.8
8	3	2	1	0.6	8.1
9	3	3	2	0.5	8.5
K1	25.8	25.1	24.3		
K2	24.8	25.5	25.3		
K3	25.4	25.4	26.4		
k1	8.600	8.367	8.100		
k2	8.267	8.500	8.433		
k3	8.467	8.467	8.800		
R	0.333	0.133	0.700		

由表 4、表 5 数据可知, 实验结果得出的最佳方案为 $A_1B_3C_3$, 即当 CaCl_2 溶液的浓度为 1% 和硼酸溶液的浓度为 4%, 分阶段固化时间为在 1% 的 CaCl_2 溶液中

表5 方差分析表

因素	偏差平方和	自由度	F	F 临界值	显著水平
A	0.169	2	5.828	19.000	
B	0.029	2	1.000	19.000	
C	0.736	2	25.379	19.000	*
误差	0.03	2			

注：“*”表示显著性。

固化12h后转入4%的硼酸溶液中再固化12h。CaCl₂、硼酸分步固化时间所产生的酒精度影响最大,是主要因素,CaCl₂影响次之。各因素与产酒精度的相关性结果见图2~图4。

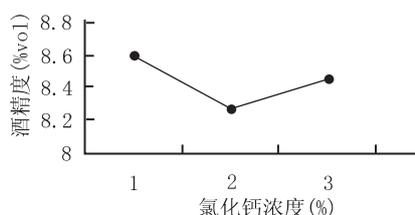


图2 氯化钙浓度与酒精关系

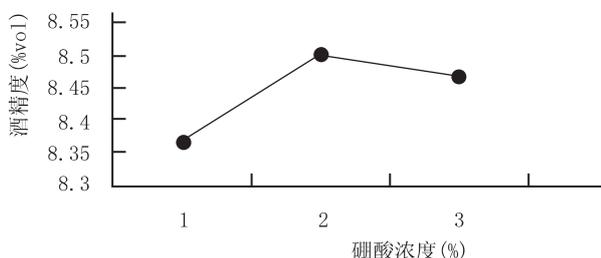


图3 硼酸浓度与酒精关系

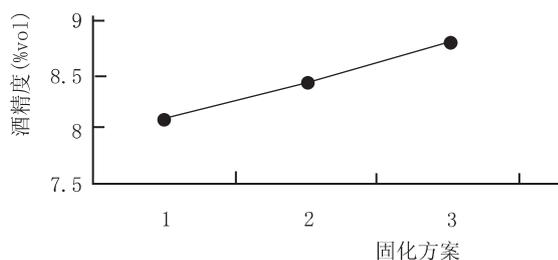


图4 固定化方案与酒精关系

3 结论

3.1 本实验以酿酒酵母为固定化对象,海藻酸钠-PVA混合体为载体。海藻酸钠-PVA混合载体的较好配比组合为2%海藻酸钠:7%PVA,所制成的固定化颗粒的颗粒强度和传质性能效果较佳,并且固定化颗粒容易制作。

3.2 根据正交实验结果得出,工艺制备条件的最佳组合为A₁B₃C₃,即当CaCl₂溶液的浓度为1%和硼酸溶液的浓度为4%,分阶段固化时间为在1%的CaCl₂溶液中固化12h后转入4%的硼酸溶液中再固化12h。由其方案所制备的酿酒酵母固定化颗粒发酵试验结果:20℃甘蔗汁产生的酒精度为8.9%。其中C因素(CaCl₂、硼酸分步固化时间)对产生的酒精度影响最大,是主要因素,CaCl₂浓度的影响次之。

参考文献:

- [1] Jyh-Ping Chen, Yung-Sheng Lin. Decolorization of azo dye by immobilized *Pseudomonas luteola* entrapped in alginate-silicate sol-gel beads[J]. *Process Biochemistry*, 2007, (42):934-942.
- [2] Pilkington P H, Margaritis A, Russell I. Fundamental of immobilized yeast cells for continue beer fermentation[J]. *Journal of the Institute of Brewing*, 1998,104,(1):19-31.
- [3] 严复,周广麒.玉米淀粉原料固定化增殖酵母酒精连续发酵新技术的研究[J].*酒精工业*,1992,7(2):38-45.
- [4] 孙清,代廷广,王君玲.固定化细胞技术在能源与环境工程上的应用[J].*农村能源*,2002,(2):22-23.
- [5] 朱柱,李和平,郑泽根.固定化细胞技术中的载体材料及其在环境治理中的应用[J].*重庆建筑大学学报*,2000,22(5):95-100.
- [6] 李娜,李树立,郭忠鹏.固定化酵母细胞发酵啤酒的初步研究[J].*中国酿造*,2007,(9):18-21.
- [7] 王宇光,许文友,王克明.混合载体固定化酵母酒精萃取发酵的研究[J].*烟台大学学报*,2001,14(4):249-250.
- [8] 李凯,冯小海,吴波,等.利用聚乙烯醇-海藻酸钙固定化 *Propionibacterium freudenreichii* NX-4 制备丙酸[J].*南京工业大学学报*,2008,30(4):20-24.

(上接第26页)

- [4] 李红,康黎东,郭瑞涵,等.啤酒工业中的有机酸及其检测方法[J].*啤酒科技*,2005,(10):13-15.
- [5] 杨毅,顾国贤.啤酒缓冲体系组成的研究[J].*食品与发酵工业*,2003,29(7):6-9.
- [6] Mackenzine K. G. Non-volatile organic acids and pH changes during the fermentation of distiller's wort[J]. *Inst. Brew.*, 1965, (2): 189-201.
- [7] 向阳,李琦,顾国贤.啤酒酿造过程中有机酸的研究[J].*酿酒科技*,2005,136(10):51-54.
- [8] 王妮娅,姜淑芬,张开利,等.不同发酵度低浓啤酒中有机酸与缓冲性的研究[J].*食品与发酵工业*,2008,34(3):78-81.
- [9] 姚浔平,李小平,陈晓红,等.离子排斥色谱法测定啤酒和饮料中有机酸研究[J].*中国卫生检验杂志*,2008,18(5):801-803.
- [10] Barber Loy E. The analysis of organic acids by ion chromatography in beer and woad[J]. *J Am Soc Brew Chem.*, 1990, 48(1): 44-46.
- [11] 管敦仪.啤酒工业手册[M].北京:中国轻工出版社,1999.