

# 一种固定化酵母细胞的复合载体 ——PVA-海藻酸盐凝胶

李俊安

(贵阳生物工程研究所 贵阳 550002)

周 建

(贵州农学院园艺系 贵阳 550025)

固定化细胞这一生物技术在近 20 年来发展迅速,已涉及食品、发酵、化工、医疗、生化等各领域。新型载体研制是发展固定化细胞技术的一个主导因素。PVA(聚乙烯醇)是近年来用于固定化细胞的一种新载体材料<sup>[1-3]</sup>,但目前制备 PVA 凝胶的方法通常是在 PVA 溶液凝固后(或加入固化剂、乳化剂等让其凝固)手工切块。为了解决 PVA 载体的成球问题,简化制备方法,我们进行了这方面的研究<sup>[4,5]</sup>。本文报道了用 PVA 和海藻酸钠制备的一种固定化细胞载体新配方,比较了几种常用载体及几种 PVA 载体的性能及用于乙醇发酵的实验结果。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

酿酒酵母。

### 1.2 试剂

海藻酸钠,青岛水产公司产品;卡那胶,湛江第一食品厂产品;PVA(平均聚合度  $1750 \pm 50$ ),北京新光化学试剂厂产品;PVA-124(平均聚合度 2400—2500),日本进口分装。其它试剂均为化学纯或分析纯。

### 1.3 增殖培养基和发酵培养基<sup>[5]</sup>

### 1.4 固定化细胞制备

1.4.1 海藻酸钙凝胶:按文献[6]的方法制备。

1.4.2 卡那胶:按文献[7]的方法制备。

1.4.3 PVA 凝胶:将 10% 的 PVA 溶液按 9:1 的比例与 10% 的菌悬液混匀,倒入一适当容器中铺成平板,约 3mm 厚,经冷冻后切成边长 3—5mm 的方块备用。

1.4.4 PVA-硼酸凝胶:按文献[2]的方法制备。将 10% 的 PVA 溶液与菌悬液混匀后滴入饱和硼酸溶液中,反应 2—15h 洗净备用。

1.4.5 PVA-海藻酸盐凝胶:将 5—15% 的 PAV 溶液与 0.5—2.0% 的海藻酸钠及菌悬液混匀后,滴入 0.5mol/L 的  $\text{CaCl}_2$  溶液中,充分反应,滤出洗净,冷冻后得球状固定化细胞颗粒,直径为 3—5mm。

• 贵州省科学基金资助课题。

本文于 1994 年 6 月 17 日收到。

## 1.5 分析方法

葡萄糖测定: 邻甲苯胺法<sup>[4]</sup>。乙醇含量测定: 比重法。细胞计数: 血球计数法。

## 2 结果和讨论

### 2.1 常用载体与 PVA-海藻酸盐凝胶的比较

各种类型的固定化细胞分别接入增殖培养基中, 30℃ 振荡培养 48h 后, 滤去培养液, 接入发酵培养基中, 30—33℃ 静止发酵 8.5h, 结果 (表 1) 表明, 由几种常用载体 (除卡那胶外) 制备的固定化细胞经多次发酵后, 由于载体的机械强度下降, 其乙醇浓度和乙醇生产能力均有不同程度的下降, 而 PVA-海藻酸盐凝胶制备的固定化细胞, 则具有较高的乙醇生产能力和较好的机械强度。

表 1 不同载体的比较

载 体	乙醇生产能力 (mg · g <sup>-1</sup> · h <sup>-1</sup> )	乙醇浓度 (%)	凝胶强度
海藻酸钙	47.8 (24.8)*	7.7 (4.0)*	珠体破裂
卡那胶	32.0 (32.1)	5.1 (5.1)	强度较好
明 胶	26.6 (18.1)	4.3 (3.0)	凝胶软化
琼 脂	43.4 (27.9)	7.0 (4.5)	凝胶软化
PVA-海藻酸盐	47.4 (47.6)	7.7 (7.7)	强度较好

\* 括号内为第 11 次发酵的结果。

### 2.2 几种用 PVA 制备的载体的比较

对用不同聚合度的 PVA 及不同制备方法所得的 PVA 载体的研究结果 (表 2) 表明, 用聚合度为 1750±50 的 PVA 制备的载体, 其乙醇生产能力和机械强度都比用聚合度为 2400—2500 的 PVA 制备的载体好, 后者在使用 5 次以后, 机械强度逐渐下降, 乙醇生产能力也随之降低。用聚合度为 1750±50 的 PVA 按不同方法制备的载体中, 以 PVA-硼酸凝胶的机械强度最差, 在制备过程中容易产生空心珠体, 发酵时空心珠体上浮, 导致乙醇生产能力降低, PVA 在饱和硼酸溶液中易形成极硬的珠体, 对细胞活性影响较大。如果缩短反应时间, 则机械强度更低。单独用 PVA 制备的载体, 其机械强度和乙醇生产能力都较为理想, 但不易制成球形, 需手工切块, 难以大量制备。用 PVA 与海藻酸钠按一定量混合制备的一种新配方载体, 具有高的机械强度, 成球容易, 方法简单, 便于大量生产, 并具有较高的乙醇生产能力。

表 2 用 PVA 制备的几种载体的比较

载 体	乙醇生产能力 (mg · g <sup>-1</sup> · h <sup>-1</sup> )	乙醇浓度 (%)	凝胶强度
聚乙烯醇	46.5 (46.5)*	7.5 (7.5)*	较强
聚乙烯醇-124	46.5 (40.2)	7.5 (6.5)	较弱
聚乙烯醇-硼酸*	42.1 (37.1)	6.8 (6.0)	较弱
聚乙烯醇-硼酸**	39.1 (37.2)	6.3 (6.0)	较弱
聚乙烯醇-海藻酸盐	47.6 (47.6)	7.7 (7.7)	较强

\* 括号内为第 11 次发酵的结果。\* 反应时间为 2 h (室温)。\*\* 反应时间为 15h (4—8℃)。

### 2.3 聚乙烯醇及海藻酸钠的最适浓度

分别将不同浓度的 PVA 与不同浓度的海藻酸钠混合, 制成一系列 PVA-海藻酸盐凝胶, 经 48h 增殖培养后进行发酵试验, 结果表明 PVA 的浓度对固定化酵母的乙醇发酵有明显影响, PVA 的最适浓度为 10%, 海藻酸钠的浓度对凝胶机械强度有明显影响, 浓度为 1% 时机械强度较好, 并乙醇产量也较高。

### 2.4 PVA-海藻酸盐固定化细胞发酵乙醇稳定性

为检验 PVA-海藻酸盐凝胶固定化细胞发酵乙醇的稳定性, 进行了 40 多批次发酵试验, 其结果表

明, 重复使用机械强度基本保持不变, 乙醇产量及生产能力一直保持在较高水平, 乙醇生产平均能力达  $42.7 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . 表现出良好稳定性, 这表明 PVA-海藻酸盐凝胶是一种较好的有工业应用前景的固定化细胞载体。

## 参 考 文 献

- [1] 杨廉婉, 郑长义, 陈泽芳, 等. 微生物学报, 1992, 32 (4): 266—271.
- [2] Hashimoto S, Furukawa K. *Biotechnol Bioeng*, 1987, 30 (1): 52—59.
- [3] 杨 萍, 董家灿, 刘士清. 工业微生物, 1992, 6: 21—19.
- [4] Li Junan. A Collection of Thesis Abstracts by the 9th Symposium of FAOB. Hong Kong. Dec. 15—18, 1991. 63.
- [5] 李俊安, 周 建. 贵州农学院学报, 1993, 12 (2): 94—97.
- [6] 江俊民, 周典湘. 食品与发酵工业, 1988, 1: 34—36.
- [7] Godia F, Casas C, Sola C. *Biotechnol Bioeng*, 1987, 30 (7): 836—843.
- [8] 蔡武城, 袁厚积. 含醛基糖的测定, 见: 蔡武城等主编. 生物物质常用化学分析方法. 北京: 科学出版社, 1982. 9.

## A NEW COMPLEX PVA-ALGINATE GEL FOR IMMOBILIZATION OF YEAST CELLS

Li Junan

(Bioengineering Institute of Guiyang, Guiyang 550002)

Zhou Jian

(Department of Horticulture, Guizhou Agriculture College, Guiyang 550025)

**Abstract** A new complex gel for immobilization of yeast cells was reported. It was prepared with PVA and alginate by a simple and convenient method. The results showed that the complex gel. Was a better carrier for the immobilization of yeast cells than some reported gels. The advantages of the gel are higher ethanol productivity, stronger mechanical strength and easy to be made into globular gel. The tests indicated that the optimum concentration of PVA and alginate were 10% and 1% respectively, the specific productivity of ethanol using the complex gel reached  $47 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , and concentration of ethanol in the medium was 7.7% (V/V). In 40 batches of fermentation, no change of the ethanol concentration or mechanical strength of the gel was observed.

**Key words** PVA-alginate gel, Immobilized cells