

陶瓷载体固定化酵母发酵动力学研究

朱必凤 马海燕 邓少平

(南昌大学生物工程研究所 南昌 330047)

固定化细胞和固定化酶一样,作为固液两相的非均相催化反应系统,其反应速度无疑受到内外扩散的影响。世界各国的化学工程学者在固定化酶反应动力学方面研究得较多^[1~6],固定化细胞反应动力学研究虽有些报道^[6~9],但主要集中在以海藻酸钙为载体的固定化系统,且载体形状为球形颗粒。对于其他材料的不同形状颗粒载体的固定化细胞动力学研究报道较少。陶瓷作为固定化细胞载体是我们研究的一种固定化细胞的新型载体,在机械强度,孔径大小,细胞与之结合牢固度及其稳定活性,再生性能方面有其特有的优越性^[10]。为了给在生产实践中使用这种新型载体提供理论依据,本文采用球型陶瓷和拉西环陶瓷为载体固定化酵母,对它们的发酵动力学进行了比较研究。

1 材料与方 法

1.1 固定化酵母的制造及发酵方法

1.1.1 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 由南昌酿酒厂提供。培养基 (%) : 葡萄糖 12, 其它成份与张治根报道的比例相同^[7]。经 28℃ 摇瓶培养 24h, 转速 200r/min, 培养液离心收集酵母, 用无菌水洗 3 次, 制得细胞为 1.28×10^9 /ml 的悬浮液。

1.1.2 陶瓷载体物理参数: 主要成份为 SiO_2 、 Al_2O_3 、 CaO 和 K_2O , 1200℃ 烧制而成, 气孔率 53.39%, 孔径 5~18 μm 。

1.1.3 载体的预处理和酵母吸附及底物、产物分析方法: 按文献 [10]。

1.2 反应系统

反应系统如图 1 所示。在贮液瓶中加入 800ml 一定浓度的葡萄糖发酵液, 恒温槽水温 30℃, 致冷器水温 4℃。启动蠕动泵调节流量, 进行发酵。每 20min 取样一次测定发酵液中葡萄糖浓度, 60min 停止反应, 反应速度以每克固定化细胞每小时消耗的葡萄糖的克数表示。

1.3 葡萄糖含量的测定

采用 3, 5-二硝基水杨酸法测定^[11]。

1.4 乙醇的测定

采用气相色谱法进行。

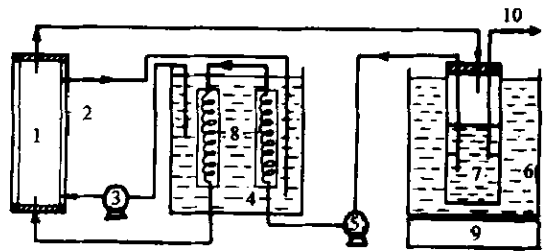


图 1 生物反应器系统

1. 反应器 ($\phi 6\text{cm}$, $L 12\text{cm}$), 2. 夹层, 3、5. 泵,
4. 恒温器, 6. 冰浴, 7. 贮液罐, 8. 蛇形管,
9. 磁力搅拌器, 10. 取样口

2 结果与讨论

2.1 外扩散的影响

通过控制流速, 测定了外扩散对发酵初速度的影响, 结果如图 2 所示。在低流速情况下, 由于底物流体的粘性, 载体颗粒附近其流体不流畅, 载体表面形成滞流区, 该滞流区将产生浓度梯度, 因而产

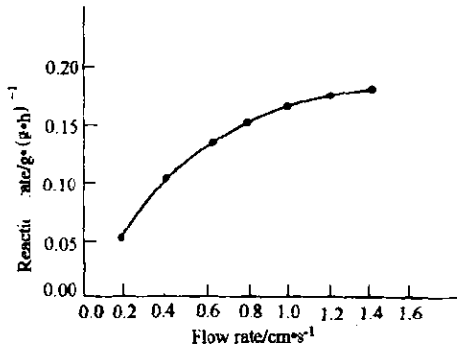


图 2 流速对反应速率的影响

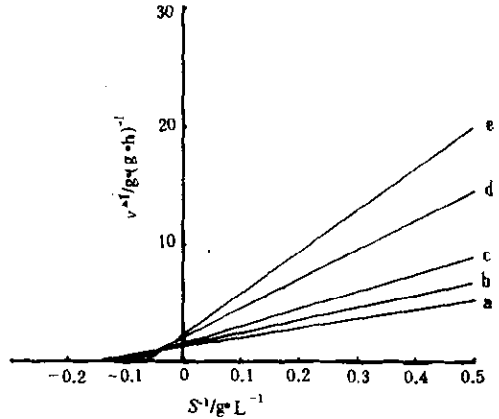


图 3 不同粒径的球形陶瓷载体双倒数曲线

粒径 (mm): a. 1, b. 2, c. 3, d. 4, e. 5

V : 反应速度, 葡萄糖 (g) / 载体 (g) · h⁻¹,

S : 底物浓度, 葡萄糖 (g) / 体积 (L)

生传质阻力, 对反应速度有较明显的影响。随着反应流速的增加, 反应速度逐渐增大, 当流速达到 1 cm · s⁻¹ 时, 流速对反应速度就基本上没有什么影响。尽管增加流速, 反应速度仍有增大, 但增加缓慢。本结果与文献 [7~8] 报道的结果一致。

2.2 内扩散的影响和有效系数

在一定实验条件下, 采用不同粒径的球形陶瓷载体以及不同粒径的拉西环陶瓷载体固定化酵母分别进行了实验。实验结果用双倒数法作图 (见图 3)。求得了不同形态不同粒径固定化酵母的动力学常数 (表 1)。从图 3 可以看出, 在底物浓度高的区域内, 曲线下端未出现弯曲特征, 表明球形陶瓷载体有较大的内扩散阻力。拉西环载体双倒数曲线中虽然也没有明显凹凸现象, 但 K_m 值与图 2 K_m 值相比明显较小, 表明拉西环陶瓷载体的内扩散阻力相对较小。按 Dewey⁽⁹⁾ 的方法求得球形和拉西环陶瓷固定化细胞动力学常数 V_m 分别为 0.49 g · (g · h)⁻¹, 0.55 g · (g · h)⁻¹, K_m 值分别为 5.3 g/L, 4.1 g/L。

表 1 不同粒径的载体对固定化酵母的动力学常数

载体 直径/mm	动力学常数				
	最大反应速度 (V_m) / g · (g · h) ⁻¹	米氏常数 (K_m) / g · (g · h) ⁻¹	底物抑制常数 (K_{ii}) / g · L ⁻¹	产物最大耐受水平 (P_m) / g · L ⁻¹	有效系数 (η)
1 (1.2)*	0.75 (0.92)	7.14 (4.55)	225 (240)	108 (125)	0.46 (0.71)
2 (2.2)	0.73 (0.85)	8.33 (5.88)	235 (265)	113 (135)	0.55 (0.75)
3 (3.5)	0.65 (0.80)	10.00 (7.41)	272 (290)	128 (141)	0.67 (0.84)
4 (4.41)	0.54 (0.78)	12.50 (9.90)	288 (320)	134 (148)	0.51 (0.81)
5 (5.1)	0.48 (0.66)	16.67 (11.11)	312 (350)	140 (154)	0.43 (0.75)

*: 括号外为球形载体数据, 括号内为拉西环载体数据

2.3 底物抑制和产物抑制

调节葡萄糖含量和乙醇含量 (内含 7% 葡萄糖) 分别作为发酵液, 用于研究底物产物对两种形态载体固定化酵母反应速度的影响, 结果表明底物浓度较高时, 对反应速度表现出明显抑制, 且不同粒径表现出不同底物浓度的抑制。抑制系数列于表 1。底物的抑制是由于底物浓度的升高使细胞外环境渗透压升高, 水活度降低, 影响细胞对底物的摄取, 导致反应速度降低⁽¹⁰⁾, 经计算球形载体抑制系数 (K_{ii} = 278 g/L, 拉西环载体固定化细胞 K_{ii} = 320 g/L。反应速度随着产物 (乙醇) 浓度的增加而降低, 但对不

同粒径的固定化酵母反应的抑制无显著差别。球形载体固定化酵母产物的耐受水平 $P_m=120\text{g/L}$, 拉西环形 $P_m=140\text{g/L}$, 与报道的海藻酸钙固定化细胞相似^[7-9]。陶瓷载体固定化细胞对糖的耐受性较高, 对产物的耐受水平也较高, 可能是陶瓷载体内微环境对酵母细胞有某种保护作用 and 生理活性的影响。

参 考 文 献

- [1] Bunting P S, Laidler K J. *Biochemistry*, 1972, 11: 4480.
- [2] Rovito B J, Kittrell J R. *Biotechnol Bioeng*, 1973, 15: 158.
- [3] Yamane T. *Biotechnol Bioeng*, 1977, 19: 754.
- [4] Lee G K, Reilly P. *J Chem Eng Sci*, 1981, 36: 1967.
- [5] Malcata F X, Hill Jr C G, Amundson C H. *Biotechnol Bioeng*, 1992, 39: 984~529.
- [6] Abraham M, Penzes Z, Szajan B. *Biotechnol Bioeng*, 1992, 40: 525~529.
- [7] 张治根, 俞俊棠, 苏尔霞. *生物工程学报*, 1989, 5 (1): 77~83.
- [8] Dewey D Y, Ryu, Kim H S, Hisaharu Taguchi. *J Ferment Technol*, 1984, 62: 255~261.
- [9] Yang S T, Guo M. *Biotechnol Bioeng*, 1991, 37: 375~382.
- [10] 曾繁华, 朱必凤, 薛喜文. *江西大学学报*, 1991, 15 (4): 29~34.
- [11] 北京大学生物系, *生物化学实验指导*, 北京: 高等教育出版社, 1979, pp. 22~24.
- [12] Holcberg I B, Margalith P. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol*, 1981, 13: 133~140.
- [13] Casey G P, Ingledew W M. *CRC Crit Rev Microbiol*, 1986, 13: 219~280.

Study on Fermentation Kinetics of the Yeast Cells Immobilized in the Carriers of Ceramics

Zhu Bifeng Ma Haiyan Deng Shaoping

(*Bioengineering Research Institute of Nanchang University, Nanchang 330047*)

Abstract Spherical and rashig ring ceramics carrier were used to immobilize yeast cells to study the kinetics of their fermentation. The results showed that the kinetics constants of fermentation of the cells immobilized in the ceramics carrier were influenced by the diffusion inside and outside the carrier. The kinetics constants measured are for spherical carrier. Michaelis constant (K_m) = 5.3g/L, maximum velocity (V_m) = 0.49g · (g · h)⁻¹, inhibition constant of substrate (K_{ii}) = 278g/L, maximum level of product resistance (P_m) = 120g/L; for Rashig ring carrier; K_m = 4.1g/L, V_m = 0.55g · (g · h)⁻¹, K_{ii} = 320g/L, P_m = 140g/L.

Key words Ceramics carrier, immobilized cells, kinetics constant, rashig ring