

低 pH 值处理对固定化细胞乙醇发酵的影响^{*}



宋向阳, 勇 强, 徐 勇, 姚春才, 余世袁

(南京林业大学 化学工程学院, 江苏 南京 210037)

SONG X Y

摘 要: 利用海藻酸锰凝胶包埋, 将低浓度的树干毕赤酵母(*Pichia stipitis*) 细胞固定, 其凝胶颗粒直径约 2~3 mm, 经增殖培养, 进行乙醇发酵低 pH 值处理研究。结果表明, 以低 pH 值(3.8、2.8、2.4) 无菌水处理海藻酸锰固定化酵母细胞凝胶珠 2~3 h, 再恢复正常 pH 值 5.0。当用 pH 值 2.8 无菌水处理时, 细菌基本上被杀死, 而酵母细胞功能不受影响; 当 pH 值 2.4 时, 对酵母细胞影响较大, 电子显微镜下观察, 酵母细胞由椭圆形变成细长形或不规则形状, 其乙醇代谢功能严重受损。

关键词: 树干毕赤酵母; 海藻酸锰; 戊糖; 乙醇发酵

中图分类号: TQ92; Q53

文献标识码: A

文章编号: 0253-2417(2003)02-0042-05

EFFECT OF LOW PH VALUE TO FERMENTATION OF ETHANOL BY IMMOBILIZED CELLS OF *PICHIA STIPITIS*

SONG Xiang-yang, YONG Qiang, XU Yong, YAO Chun-cai, YU Shi-yuan

(College of Chemical Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: *Pichia stipitis* yeast cells were immobilized by entrapment in marine alga manganese gel, the resulted gel beads with a diameter of 2-3 mm were further incubated to study the fermentation of ethanol under the condition of low pH value. The yeast cell-immobilized gel beads were treated at low pH value(3.8, 2.8, 2.4) respectively for 2-3 h, followed by normal pH value 5.0. When pH value was 3.8, most bacteria were killed after such a treatment, while stabilization of immobilized cells was not affected significantly. When treated at pH value 2.4 or below, however, immobilized cells were injured under electronic microscopic observation, and it was difficult to recover the function, and shape of yeast cells changed into slim or irregular state from the original ellipsoid.

Key words: *Pichia stipitis*; manganese alginate; pentose; ethanol fermentation

固定化细胞技术已成为近年来国际上研究的热点之一^[1-3]。固定化细胞发酵克服了传统游离细胞发酵的不足, 即生产能力低、周期长、设备庞大、操作复杂等。然而, 固定化细胞长期反复循环发酵, 有时会感染杂菌, 影响乙醇正常发酵, 由此制约了固定化细胞乙醇发酵优越性的发挥。在乙醇发酵过程中杆菌为主要杂菌, 杆菌较适宜在高 pH 值或近于中性时生长和繁殖, 而在较低 pH 值下, 杆菌即受到抑制甚至死亡。通常酵母细胞可承受最低 pH 值为 3.8^[4], 低于这个值酵母就会变形, 失去活力。更低 pH 值下乙醇发酵还没有文献报道。本试验以树干毕赤酵母(*Pichia stipitis*) 为发酵菌株, 研究了在不同 pH 值下

* 收稿日期: 2002-10-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39970597)

作者简介: 宋向阳(1965-), 男, 江苏无锡人, 副教授, 博士, 从事林产生物化学加工研究。

海藻酸钙固定化酵母细胞的电子显微镜图, 探讨了固定化细胞经低 pH 值无菌水处理 2~ 3 h 即可抑制或杀死杂菌的可行性, 解决了固定化细胞乙醇发酵时杂菌污染的难题。

1 材料与方法

1.1 菌种和培养基

本实验采用与文献[5]——“海藻酸钙固定化酵母生产酒精的研究”相同的条件选择菌种和培养基。

1.2 固定化细胞的制备和增殖

固定化细胞的制备同文献[5]。用无菌水将固化后的海藻酸钙凝胶球(直径 2~ 3 mm)洗 3 次(每次 50 mL), 再移入 1.2% $MnSO_4$ 溶液中, 放置冰箱(4 °C)中固化 24 h。固定化细胞的增殖见文献[5]。

1.3 乙醇发酵

乙醇发酵试验的条件及方法见文献[5]。

1.4 分析测定

1.4.1 扫描电镜 扫描电镜采用 Philips SEM-505(Made in Holland)。用玻璃刀将固定化细胞凝胶颗粒切开, 经 4% 戊二醛溶液固定、聚乙二醇包埋、干燥、离子溅射等过程, 扫描电镜观察。

1.4.2 固定化细胞湿重 当一批发酵结束后, 倾去发酵液, 称取三角瓶与固定化细胞重量, 减去空三角瓶重量, 即固定化细胞凝胶颗粒湿重。

1.4.3 乙醇含量 利用高效液相色谱法, 测定乙醇含量。

1.4.4 还原糖测定 采用 3, 5-二硝基水杨酸(DNS)法测定^[6]。

2 结果与分析

2.1 低 pH 值处理对固定化酵母细胞形态的影响

固定化树干毕赤酵母在经过不同的初始 pH 值(5.0、3.8、2.8 和 2.4)处理 2~ 3 h 并驯化后, 对正常发酵后的酵母细胞进行电子显微镜扫描, 其扫描照片如图 1。

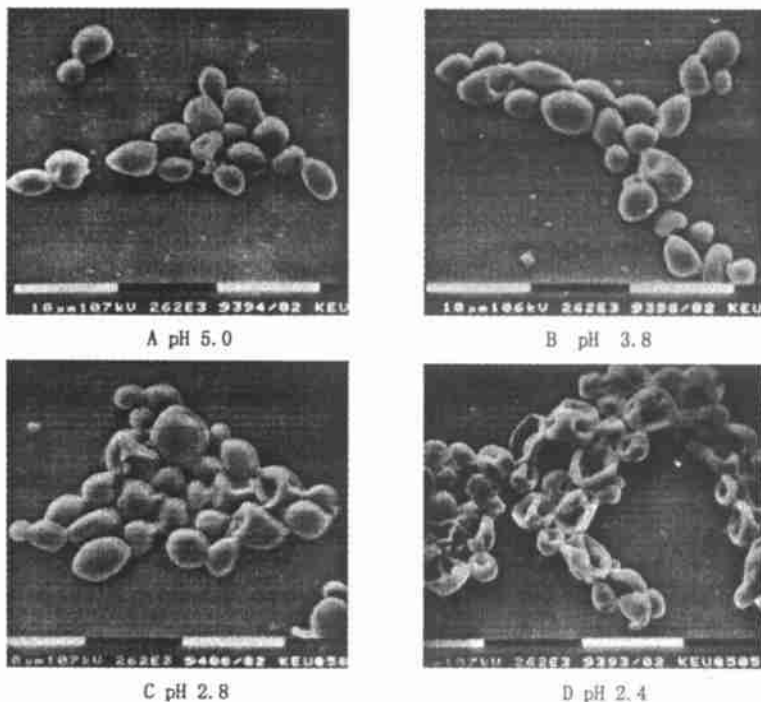


图 1 低 pH 值处理固定化酵母细胞电子显微镜图

Fig. 1 Electronic micrograph of immobilized cells disposed by low pH value solutions

由图 1A 可以看出,在 pH 值为 5.0 的酸性溶液处理后,由于酸性溶液的 pH 值正好在树干毕赤酵母适宜的 pH 值 5.0~5.5 范围内,所以酵母细胞形态圆滑,外形呈椭圆或圆形,形态整齐且健壮,大小较为均匀,出芽率高,酵母细胞生命力旺盛。当处理的酸性溶液 pH 值由 5.0 降至 3.8 时,树干毕赤酵母形态没有图 1A 中的酵母大小均一,出芽率也有所下降,但多数酵母仍然较为健壮,如图 1B 所示。当处理的酸性溶液 pH 值降至 2.8 时,由于酵母还不能完全适应此酸性条件下处理,因此,部分酵母细胞形态不圆滑,有的变得细长,出芽率降低,如图 1C 所示。当处理的酸性溶液 pH 值降至 2.4 时,细胞变形增多,酵母细胞变细长的数目也增多,出芽率较低,细胞的代谢功能严重受损,pH 值越低对酵母细胞损伤越大,如图 1D 所示。酵母发酵能力的大小与 pH 值关系密切,因为溶液 pH 值不同,将会影响酵母原生质膜所带的电荷,原生质膜所带的电荷不同,又会引起某些物质及离子通过原生质膜时通透性的变化,因而会影响酵母对营养物质的吸收、运输并改变代谢途径,即酵母的发酵能力将受到影响。由以上 4 种不同 pH 值条件下的电子显微镜图比较可知,pH 值越低对酵母形态影响越明显,当处理的酸性溶液 pH 值 2.8 或以上时,酵母形态也基本正常;而 pH 值在 2.8 以下时,酵母严重变形,亚甲基蓝指示剂染色显微镜下观察表明,大部分酵母细胞死亡。

2.2 低 pH 值处理固定化细胞的乙醇发酵

固定化细胞乙醇发酵过程中杂菌污染是影响糖利用率和乙醇得率提高的一个主要因素。树干毕赤酵母最适宜 pH 值为 5.0~5.5,但酵母可以耐一定的酸性,pH 值在 2.0~4.0 短时间内(2~3 h)仍能生长和繁殖,经驯化处理耐酸能力增强。杂菌适宜在中性条件下生长和繁殖,而在酸性条件下却受到抑制甚至死亡。所以,可以用低 pH 值处理固定化细胞 2~3 h,杂菌即受到抑制,而固定化细胞仍然能生长、繁殖,酵母代谢功能并不受影响。

以树干毕赤酵母为发酵菌株,60 g/L 混合糖(木糖、葡萄糖各占 50%)为底物,用 pH 值为 3.8、3.2、2.8 和 2.4 无菌水分别处理正常发酵后的固定化细胞,再用中性无菌水清洗 3 次,每隔 4~5 d 即用低 pH 值无菌水处理一次,测试固定化酵母细胞耐酸能力,试验结果如表 1。

由表 1 可知,当第一次用 pH 值 3.8 无菌水浸泡固定化细胞 2 h 后,发酵后还原糖质量浓度为 3.12 g/L,乙醇浓度 24.86 g/L,每克利用的糖乙醇产量 0.437 g,乙醇得率为理论值的 90.1%,与正常发酵即未经低 pH 值处理的发酵结果相比并无差别,以后经第二次、第三次处理,发酵后利用的糖及乙醇得率均较为稳定。显微镜下观察,酵母形态圆滑,芽孢多。这表明,经 pH 值 3.8 无菌水浸泡 2 h,杂菌得到一定的抑制。因此,当用 pH 值 3.8 无菌水处理固定化细胞时,固定化细胞乙醇发酵基本不受影响,而杂菌得到了一定的抑制。

表 1 还列出用 pH 值 3.2 无菌水处理固定化细胞乙醇发酵情况。由此可以看出,用 pH 值 3.2 无菌水处理固定化细胞乙醇发酵会受到一定的影响,但随着处理次数的增加,受到的影响将逐渐减少,直至(三次处理后)正常化。当第一次用 pH 值 3.2 无菌水处理 2 h 时,由于固定化细胞并不能完全适应低酸处理,因此,乙醇得率有所降低,即还原糖浓度由 2.85 g/L 上升至 3.34 g/L,乙醇浓度由 25.45 g/L 下降至 24.27 g/L,乙醇产量由每克利用的糖 0.445 g 下降至 0.428 g,乙醇得率由 91.8% 下降至 88.2%;当第二次处理时,固定化酵母已有所适应,乙醇得率已接近正常值,达到 90.3%;当第三次处理时,固定化细胞已完全适应,其发酵相关数值接近正常值。显微镜观察表明,固定化细胞经 pH 值 3.2 无菌水处理,杂菌基本得到抑制。

为了进一步探讨更低 pH 值对固定化细胞乙醇发酵的影响,用 pH 值 2.8 无菌水处理固定化细胞 2 h,结果亦列入表 1。乙醇得率变化规律与用 pH 值 3.2 处理的变化规律较为相似。即第一次处理时,乙醇得率略有降低,经第三次处理,固定化细胞乙醇得率已基本正常。而用 pH 值 2.4 无菌水处理固定化细胞 2 h,则对固定化细胞乙醇发酵影响较大,显微镜下观察,酵母大部分形态不规则,经亚甲基蓝指示剂染色观察,酵母死亡较多。由表 1 可知,当第一次用 pH 值 2.4 无菌水处理固定化细胞 2 h,对固定化酵母乙醇发酵影响就较大,乙醇得率为理论得率的 74.2%,第二次处理时为 69.5%,第三次处理时仅为 65.1%,随着处理次数的增多,乙醇产量逐步下降,即 pH 值过低(如 2.4)对酵母影响较大,酵母代谢

功能受到损害, 影响其正常生长及对糖的有效利用。

表 1 用不同 pH 值的无菌水处理过的固定化细胞乙醇发酵

Table 1 Ethanol fermentation with immobilized cells disposed by sterilized water of different pH values

pH 值 pH values	发酵周期/d fermentation time	发酵后还原糖 /(g·l ⁻¹) reducing sugar concn. of the broth	发酵后 pH 值 pH value of the broth	酵母湿重/g weight of immobilized cells	乙醇浓度 /(g·l ⁻¹) ethanol concn.	乙醇产量 ⁵⁾ /g ethanol yield	乙醇得率占 理论得率/% theoretical ethanol yield
3.8 ¹⁾	1	2.91	5.01	57.50	25.12	0.440	90.7
	3	2.76	5.02	57.95	25.64	0.448	91.4
	5	3.12	5.03	57.15	24.86	0.437	90.1
	6	2.57	5.03	57.05	25.79	0.449	91.5
	7	2.79	4.97	57.45	25.29	0.442	91.2
	9	2.65	5.04	56.75	25.41	0.443	91.3
	10	2.73	5.03	56.30	25.66	0.448	91.4
	11	3.08	4.98	56.95	24.99	0.439	90.6
	13	2.27	5.04	56.53	25.69	0.445	91.8
	15	2.31	5.02	56.39	25.61	0.444	91.5
16	2.62	5.04	56.42	25.42	0.443	91.3	
3.2 ²⁾	1	3.04	3.73	58.73	24.95	0.438	90.3
	3	2.85	3.69	58.95	25.45	0.445	91.8
	5	3.34	3.65	58.72	24.27	0.428	88.2
	6	3.01	3.57	56.12	25.18	0.442	91.1
	7	2.73	3.60	55.45	25.41	0.444	91.5
	9	2.68	3.52	54.75	25.43	0.444	91.5
	10	3.14	3.56	54.30	24.92	0.438	90.3
	11	2.49	3.61	54.95	25.38	0.441	90.9
	13	2.71	3.63	55.53	25.21	0.440	90.7
	15	2.63	3.53	56.32	25.31	0.441	90.9
16	2.45	3.61	56.28	25.37	0.442	91.1	
2.8 ³⁾	1	3.12	3.73	58.73	24.91	0.438	90.3
	3	2.91	3.69	58.95	25.41	0.445	91.8
	5	3.51	3.65	58.72	24.18	0.428	88.2
	6	3.07	3.57	56.12	24.76	0.435	89.7
	7	2.76	3.60	55.45	25.07	0.438	90.4
	9	2.71	3.52	54.75	25.43	0.444	91.5
	10	3.23	3.56	54.30	24.87	0.438	90.3
	11	2.53	3.61	54.95	25.23	0.439	90.6
	13	2.75	3.63	55.53	25.19	0.440	90.7
	15	2.69	3.53	56.32	25.27	0.441	90.9
16	2.51	3.61	56.28	25.41	0.442	91.1	
2.4 ⁴⁾	1	2.86	3.73	58.73	25.29	0.444	91.5
	3	2.75	3.69	58.95	25.45	0.445	91.8
	5	17.33	3.65	58.72	15.36	0.360	74.2
	6	13.50	3.57	56.12	18.18	0.391	80.6
	7	7.02	3.60	55.45	22.41	0.423	87.3
	9	2.72	3.52	54.75	25.03	0.437	90.1
	10	19.17	3.56	54.30	13.76	0.337	69.5
	11	14.29	3.61	54.95	17.42	0.381	78.6
	13	2.67	3.63	55.53	24.82	0.433	89.3
	15	21.52	3.53	56.32	12.16	0.316	65.1
16	15.40	3.61	56.28	16.28	0.365	75.3	

1) 5 d、9 d、15 d 时样品在 pH 值 3.8 的无菌水中浸泡 2 h; 2) 5 d、10 d、15 d 时样品在 pH 值 3.2 的无菌水中浸泡 2 h; 3) 5 d、10 d、15 d 时样品在 pH 值 2.8 的无菌水中浸泡 2 h; 4) 5 d、10 d、15 d 时样品在 pH 值 2.4 的无菌水浸泡 2 h; 5) 指每克糖所得的乙醇产量。

综上所述, 固定化细胞乙醇发酵经 pH 值 2.8 无菌水处理 2 h, 经多次处理驯化, 乙醇得率能趋于正常化, 而杂菌得到了有效控制。但经 pH 值 2.4 无菌水处理 2 h, 对固定化细胞乙醇发酵影响较大, 乙醇得率低, 经多次处理驯化, 乙醇得率仍然较低且随着处理次数的增多, 乙醇得率就越低。因此, 以 pH 值 2.8~3.2 无菌水处理固定化细胞 2 h 较为适宜, 杂菌能得到有效抑制, 经驯化后的固定化细胞乙醇发酵不受影响。这对固定化树干毕赤酵母细胞乙醇发酵实际工业生产中处理杂菌问题有着重要的指导意义。

3 结论

3.1 由固定化酵母细胞电子显微镜图表明, 当用 pH 值 2.8 以上酸性溶液处理固定化酵母细胞时, 酵母细胞形态基本不受影响, 而当酸性溶液 pH 值 2.8 以下时(如 pH 值 2.4), 酵母形态变化明显, 细胞代谢功能严重受损, pH 值越低对酵母细胞损伤越大。

3.2 用 pH 值为 3.8、3.2、2.8 和 2.4 的酸性溶液分别处理固定化酵母细胞 2~3 h 时, pH 值越低对固定化酵母细胞乙醇发酵影响越大。当用 pH 值 3.8~2.8 处理时, pH 值越低对固定化酵母细胞乙醇发酵影响越大, 但酵母细胞经反复处理驯化, 能逐步适应。经杂菌试验证明, 用 pH 值 2.8 酸性溶液处理固定化细胞能有效抑制杂菌, 而用 pH 值 2.8 以下酸性溶液处理对酵母细胞代谢功能影响较大, 实际操作中酸性溶液处理可控制 pH 值 2.8 及其以上。

参考文献:

- [1] LATA A, GARCIA L A, DIAZ M. Analysis and description of the evolution of alginate immobilized cells systems[J]. Journal of Biotechnology, 2000, 80: 203-215.
- [2] MASSIMILANO F, FEDERICO F, LAURA S, et al. Repeated batch production of pigments by immobilized *Monascus purpureus* [J]. Journal of Biotechnology, 2000, 80: 271-276.
- [3] MAHESH S K, MARIA B, CHRISTOPHER K S, et al. Ethanol production from glucose and xylose by immobilized *Zymomonas mobilis* CP4[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2000, 84-86: 525-541.
- [4] SLININGER P J, BOTHAST R J, et al. Optimum pH and temperature condition for xylose fermentation by *Pichia stipitis* [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1990, 35: 727-731.
- [5] 宋向阳, 毛连山, 杨富国, 等. 海藻酸铝固定化酵母生产酒精的研究[J]. 林产化学与工业, 2002, 22(2): 43-46.
- [6] 洪枫. 里氏木霉合成木聚糖酶及制备功能低聚木糖的研究[D]. 南京: 南京林业大学博士学位论文, 1998. 50-60.

欢迎订阅 2003 年《南京林业大学学报(自然科学版)》

《南京林业大学学报(自然科学版)》由南京林业大学主办, 创刊于 1958 年, 是以林业为主的综合类学术期刊。本刊坚持的| 贯宗旨是鼓励学术创新, 推动科技成果的转化, 促进学术交流和发 展, 培养、扶持学术人才。

主要内容 生物学、森林地学、林学基础理论、森林培育与经营管理、森林资源与环境、森林与自然保护、水土保持与荒漠化防治、木材工业与技术科学、林业机械与电子工程、林产化学与工业学、园林植物与风景园林、林业经济与管理、森林工程、土木工程等以及 与上述领域有关的边缘学科的研究成果。另可设置专栏集中报道重点项目、基金项目及重大课题的研究成果。

刊物地位 国家科技部中国科技论文统计源期刊, 中国科学引文数据库来源期刊, 中国学术期刊综合评价数据库来源期刊, 中国自然科学核心期刊, 万方数据(China info)系统科技期刊群, 《中国学术期刊(光盘版)》首批入编期刊。被国际国内著名的检索刊物如《CA》、《FA》、《FPA》、《SCI》、《中国林业文摘》、《中国生物学文摘》、《竹类文摘》等数据库收录。

1992 年以来, 《南京林业大学学报(自然科学版)》先后获得全国优秀科技期刊三等奖、全国高校优秀学术期刊| 等奖、江苏省优秀自然科学学报| 等奖等, 2001 年入选“中国期刊方阵”, 2002 年入选“江苏期刊方阵”, 并获优秀期刊称号。

读者范围 大中专院校师生, 科研院所研究人员。

本刊为双月刊, 单月末出版, 大 16 开本, 每期定价 6 元, 全年 36 元。

全国各地邮局均可订阅, 邮发代号 28-16; 国外总发行: 中国国际图书贸易总公司(北京 399 信箱), 发行代号 Q552。

如有需要近年过刊的读者可与本刊编辑部联系, 地址: 210037 南京市龙蟠路南京林业大学学报编辑部

电话: 025-5428247 E-mail: xuebao@njfu.edu.cn