

# 固定化细胞法生产醋酸影响因素的研究

张良全,魏培莲,王怡耿

(浙江科技学院 生物与化学工程学院,杭州 310023)

摘 要:以海藻酸钠为载体,还研究了固定化细胞的制备,对接种环数、种子培养时间进行了优化,还研究了不同乙醇初始浓度对醋酸产量、菌体个数、菌体生长周期、葡萄糖消耗量、乙醇消耗量的影响。获到如下结论:优化接种数为 15 环、培养时间为 36~48 h 之间;葡萄糖浓度与 OD 值的换算公式:  $y = 4.7237x$ ;菌体个数与菌液 OD 值的相关性:  $y = 402.88x$ ;体积分数 5% 乙醇时发酵液醋酸转化率最高,最佳培养时间为 96 h;乙醇体积分数越高,菌体生长延迟期越长;乙醇的含量越高,则葡萄糖的消耗就越少;培养时间为 72 h 时,乙醇消耗完毕,由于中间产物乙醛的存在,醋酸在 72~96 h 时间段继续生成。

关键词:固定化;乙醇;醋酸菌;醋酸钙镁盐

中图分类号: TQ225.122; TQ033      文献标识码: A      文章编号: 1671-8798(2008)02-0102-05

## Study on production of acetic acid with immobilized cell

ZHANG Liang-quan, WEI Pei-lian, WANG Yi-geng

(School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023, China)

**Abstract:** As the vector of sodium alginate, this paper studys the preparation of immobilized cell, optimizes the number of inoculation rings and culture time, and also researches the effect of the yield of acetic acid, the number of bacteria cell, the cell growth rate, the glucose consumption, and the alcohol consumption under the different initial concentration of alcohol. We obtain the conclusions as follows: the best number of inoculation is 15 rings, and culture time is between 36~48 h; the conversion formula of the concentration of glucose and OD value:  $y = 4.7237x$ ; the conversion formula of the number of bacteria cells and OD value of bacterial liquid:  $y = 402.88x$ ; the 5% alcohol concentration of acetic acid fermentation broth produces the highest conversion rate, and the best time to culture is 96 h; as the alcohol concentration is higher, the cell growth plays an extended period of growth delay; the higher the alcohol content is, the smaller the glucose consumption is; after fermenting 72 h, alcohol consumption has finished, but because of the existence of acetaldehyde—the intermediate, acetic acid in 72~96 h continues to generate.

**Key words:** immobilization; ethanol; acetic acid bacteria; calcium magnesium acetate

收稿日期: 2008-01-18  
基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(Y405140)  
作者简介: 张良全(1965— ),男,安徽铜陵人,教授,博士,主要从事化学反应工程的教学与研究。

醋酸钙镁盐(CMA)是近年来研发的一种新型环保型除冰剂<sup>[1]</sup>。它是 20 世纪 90 年代英国和美国为替代除冰剂氯化钠(NaCl)而开发的一种有机酸盐化学品,用来减少公路基础设施中的混凝土、金属的腐蚀及地表水的污染。与 NaCl 相比,CMA 水溶性较好,熔点低,可生物降解<sup>[2-3]</sup>。美国、加拿大、日本及欧洲等国家和地区应用效果表明,CMA 是一种环保型化学品<sup>[4-6]</sup>。CMA 与 NaCl 相比,价格昂贵,适用于环境控制要求严格的地区,原料醋酸是影响其价格的关键因素<sup>[7-9]</sup>。本文通过优化固定化细胞发酵条件,提高了醋酸产量,利用发酵液来制备 CMA,降低了 CMA 成本,为其广泛应用提供技术基础。

1 实验材料与过程

1.1 实验试剂

菌种:醋酸杆菌 1.01;葡萄糖 C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>,试剂纯,广东光华化学厂有限公司;酵母粉,试剂纯,北京双旋微生物培养基制品厂;酵母浸膏,北京双旋微生物培养基制品厂;无水乙醇 CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH,试剂纯,浙江中星化工试剂有限公司;磷酸二氢钾,试剂纯,湖南湖试化学试剂有限公司;硫酸镁,试剂纯,上海试四赫维化工有限公司;碳酸钙 CaCO<sub>3</sub>,试剂纯,天津市博迪化工有限公司;氢氧化钠 NaOH,杭州萧山化学试剂厂;琼脂,福建泉州市泉港化工厂;酚酞 C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>,试剂纯,上海三爱思试剂有限公司。

1.2 试剂配方

菌种保藏培养基:葡萄糖 1 g,酵母膏 1 g,碳酸钙 1.5 g,琼脂 2 g,自来水 100 mL, pH6.5,甘油 2.5 mL,试管斜面冰箱保藏。

种子培养基:葡萄糖 1 g,酵母浸出粉 1.5 g,磷酸二氢钾 0.05 g,硫酸镁 0.05 g,水 100 mL, pH 6.5,121 灭菌 20 min 后冷至 60 以下加入无水乙醇 3.5 mL。

发酵培养基:葡萄糖 1.3 g,酵母浸出粉 0.9 g,水 100 mL, pH 自然,灭菌后冷至 60 以下加入无水乙醇(乙醇含量为变量)。

每瓶 75 mL 的 1.5 % (g/100 mL)CaCl<sub>2</sub> 溶液,在 121 灭菌 20 min。

3 % (g/100 mL)的海藻酸钠 150 mL, 100 灭菌 20 min。

1.3 实验过程

配制培养基:配制种子培养基 2 瓶,每瓶 100 mL;配制发酵培养基 11 瓶,每瓶 75 mL(其中一瓶

为空白对比);配制 CaCl<sub>2</sub> 11 瓶,每瓶 75 mL;配制 3 % 的海藻酸钠 150 mL。

菌种制备:种子培养基,取菌种接种 15 环,摇床培养 36 ~ 48 h(经优化后)。

取种子液 45 mL,加入 150 mL 海藻酸钠溶液中,混合均匀。

制作固定化颗粒:把步骤 3 制备好的溶液倒入针筒中,针筒容积为 100 mL,向配制好的 CaCl<sub>2</sub> 溶液缓慢滴加小液珠,每瓶滴加 15 mL,待其冷藏制备成固定化颗粒(其中 1 瓶为空白对比),颗粒平均直径为 5.0 mm,平均颗粒体积为 65.42 mm<sup>3</sup>,平均颗粒数目为 230。

固定化细胞发酵液的制备:把步骤 4 制好的固定化细胞颗粒放入冰箱 2 h 后,分离掉 CaCl<sub>2</sub> 液体,然后向其倒入发酵培养基,浸泡颗粒。

游离细胞发酵液的制备:取发酵培养基 10 瓶,用 5 mL 无菌移液管接入 3.5 mL 菌液。

把配制好的固定化和游离细胞发酵液放入摇床中培养,培养条件:摇床转速 180 r/min,温度 30 ,每隔 12 h 分别取出一瓶固定化和游离细胞发酵液测定其乙醇、醋酸含量和菌液、葡萄糖 OD 值。

2 结果和讨论

2.1 样品中含糖量的测定

取 5 支比色管,编号,按表 1 加入各种试剂。

表 1 葡萄糖含量测定方法

Table 1 Glucose determination			
管号	待测糖液/ mL	蒸馏水/ mL	DNS 试剂/ mL
空白	0.00	2.00	1.50
	1.00	1.00	1.50
	1.00	1.00	1.50

将上述各管分别混匀,混匀后置 100 恒温水浴保温 5 min,立即用流动水冷却。最后加蒸馏水稀释至 25.00 mL 刻度线。等各管混匀后,在 540 nm 波长下,用 0 号管调零,分别读取各管的光吸收值,以光吸收值为纵坐标,以葡萄糖的质量浓度(mg/mL)为横坐标绘制标准曲线,测定各管光吸收值。

2.2 葡萄糖标准曲线制作

取 6 支比色管,分别按表 1 的顺序加入各种试剂。混匀后置 100 恒温水浴保温 5 min,立即用流动水冷却。最后加蒸馏水稀释至 25.00 mL 刻度线。等各管混匀后,在 540 nm 波长下,用 0 号管调零,分别读取各管的光吸收值,以光吸收值为纵坐标,以葡萄糖的质量浓度(mg/mL)为横坐标绘制标准曲

线。最后通过测定得到葡萄糖的标准曲线(图 1)。

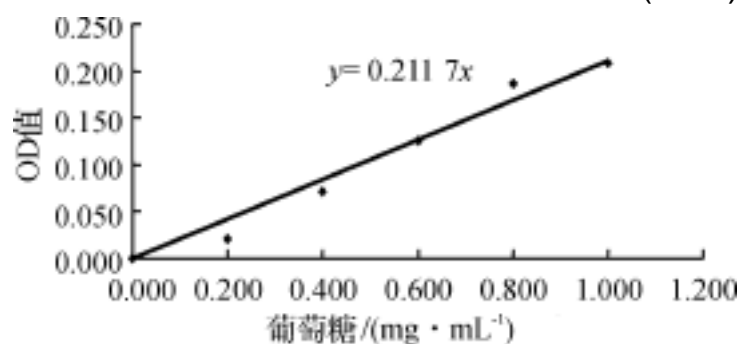


图 1 葡萄糖标准曲线

Fig.1 Glucose standard curve

从图 1 可知:随着葡萄糖浓度的增加,菌体 OD 值持续呈线性增加。对各点作线性趋势线可以得到一直线,并可获得线性方程,该方程式即为葡萄糖浓度与葡萄糖 OD 值的换算公式: $y = 0.2117x$ ,其中  $x$  为葡萄糖质量浓度,  $y$  为葡萄糖 OD 值,为了计算方便把  $x$  跟  $y$  交换,得  $y = 4.7237x$ ,其中  $x$  为葡萄糖 OD 值,  $y$  为葡萄糖质量浓度。

结论:得到葡萄糖质量浓度与葡萄糖 OD 值的换算公式为  $y = 4.7237x$ ,将实验测得的 OD 值代入  $x$  就可得到相应的葡萄糖质量浓度,单位为 mg/mL。

### 2.3 接种量优化

实验条件:配制 3 瓶种子培养基,分别向其中接入 5 环、10 环、15 环、20 环菌种,在摇床中培养,培养温度 30℃,摇床转速为 180 r/min

在不同的时间点取出培养基,用无菌移液管移取一定量菌液,倒入无菌小锥形瓶中,以未接种的种子培养基作为空白对照,在 610 nm 下用分光光度计测量其 OD 值,数据作图如 2、3 所示。

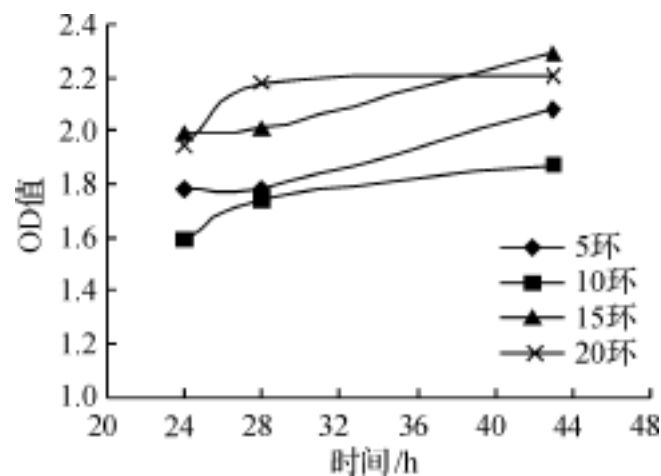


图 2 各环数在不同时间的 OD 值

Fig.2 The ring at different times of OD

从图 2 和图 3 中可以看到:随着时间的增加,5 环、10 环、15 环、20 环的 OD 值都呈现上升状态。其中 5 环 OD 值提升比较少,在 24~28 h 时间段几乎没增加,但 28 h 后提升比较快。而 10 环和 15 环 OD 值随时间增加呈现持续的提升状态,其中各时

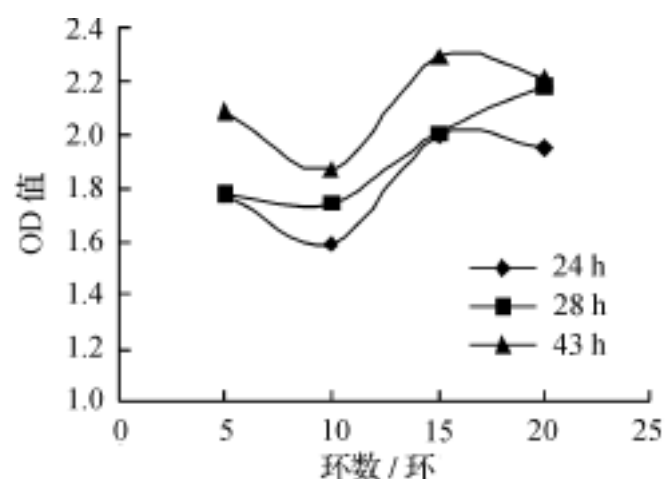


图 3 各时间点不同环数的 OD 值

Fig.3 The different time points of the ring OD

间点中 15 环比 10 环的 OD 值明显高。另外,20 环在 28~43 h 时间段呈下降的趋势。

结论:接种数在 15 环、时间为 43 h 时 OD 值最高,菌种量最大。因此,认为 15 环为最佳接种环数,由于在 28 h 后菌数仍有增加,所以选定培养时间为 36~48 h。

### 2.4 菌种 OD 值相关性研究

分别配制 0.01%、0.10%、0.50%、10%、20%、30%、40% 不同体积分数的菌溶液。用血细胞计数板在显微镜下直接计数出细胞个数,然后再换算成 1 mL 菌液中的总菌数。在 610 nm 下,以没加菌种的空白液为对比,用分光光度计测量各个不同浓度菌液的 OD 值。

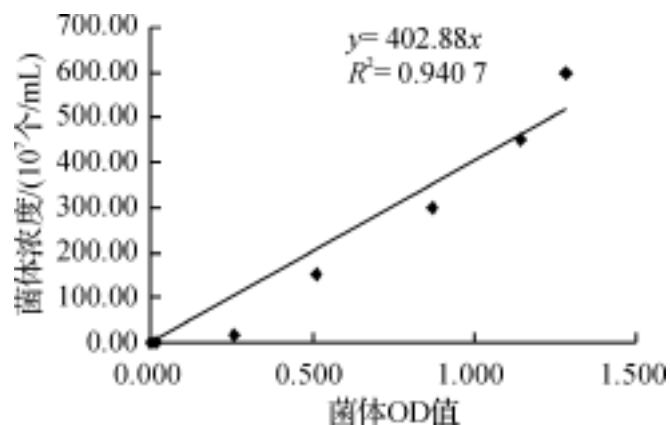


图 4 菌种 OD 值相关性

Fig.4 Strain OD standard curve

从图 4 可知,随着菌体浓度的增加,菌体 OD 值持续增加呈现线性增加。对各点作线性趋势线可以得到一直线,并可获得一直线方程式,该方程式即为菌种数与菌种 OD 的相关性直线。

结论:得到菌体个数与菌液 OD 值的相关性直线: $y = 402.88x$ ,其中  $y$  菌体浓度(单位为  $10^7$  个/mL),  $x$  为菌体的 OD 值。即,当菌种 OD 值为 1 时,该菌液所含菌数为  $1 \times 402.88 \times 10^7$  (个/mL)。

### 2.5 乙醇初始浓度不同时乙醇随时间的变化规律

以 12 h 时间间隔,分别测量乙醇含量(体积分数)为 4.5%、5.0%、6.0%、6.5%、7.0%,培养条件为 180

$r/\text{min}$ 、30, 在不同时间点的乙醇消耗如图 5 所示。

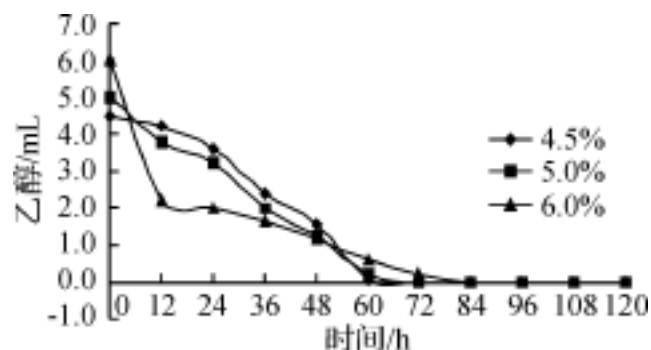


图 5 不同乙醇初始含量下乙醇剩余量随时间的变化

**Fig 5** Different initial ethanol concentration of ethanol surplus changes over time

从图 5 中可知,在 12 ~ 72 h 时间范围内,随着时间的变化,发酵液中不同初始浓度的乙醇呈现直线的下降;在 72 ~ 120 h 时间段,乙醇已经消耗完毕,乙醇含量为零。其中 6 % 体积分数乙醇度在起始点乙醇消耗量最高。

结论:乙醇在发酵培养 72 h 后,已经消耗完毕,其中以 6 % 乙醇的发酵液消耗最快。在 72 h 时间点,乙醇消耗完毕后,醋酸在 72 ~ 96 h 时间段的继续生成,是由于乙醛没随乙醇的消耗完毕马上转化为醋酸而引起的滞后反应。

## 2.6 乙醇初始含量不同时葡萄糖随时间的变化规律

以 12 h 时间间隔,乙醇初始含量(体积分数)分别为 4.5 %、5.0 %、6.0 %,培养条件为 180  $r/\text{min}$ 、30, 在不同时间点的葡萄糖消耗如图 6、7 所示。

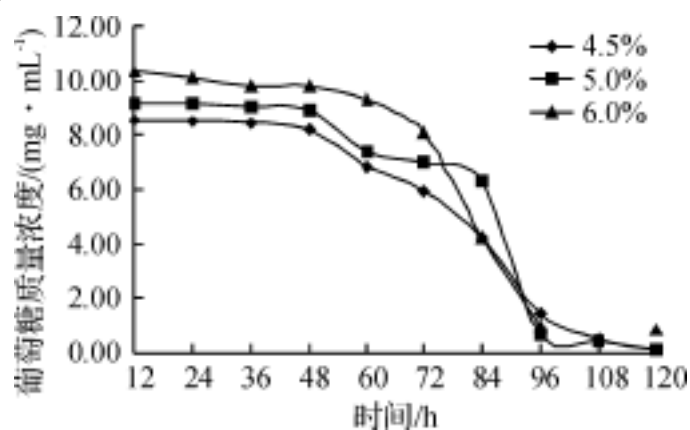


图 6 不同乙醇初始含量下葡萄糖质量浓度随时间的变化

**Fig 6** Ethanol different initial concentrations of glucose concentration changes over time

从图 6、7 中可知,随着时间的变化,葡萄糖出现下降的趋势,并在最后达到最低点。葡萄糖的消耗量随乙醇度的增加而减少。在 12 ~ 48 h 时间段中,葡萄糖的消耗很低,呈平缓状态;在 48 ~ 96 h 时间段,葡萄糖消耗呈现线性下降;在 96 ~ 120 h 时间段,葡萄糖的消耗出现另外一个平缓期。

葡萄糖的作用是为醋酸菌的生长提供碳源,由图可知:葡萄糖的消耗随乙醇含量的增加而减少,乙

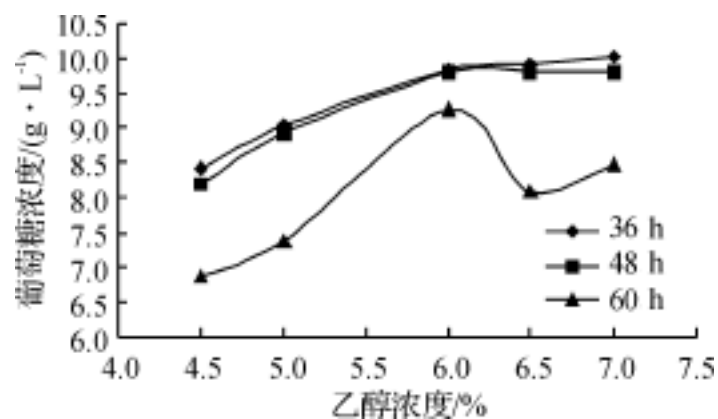


图 7 葡萄糖浓度随乙醇初始浓度的变化

**Fig 7** Glucose concentration changes with the initial concentration of ethanol

醇的含量越高则葡萄糖的消耗就越少。之所以出现这样的规律,是因为葡萄糖的消耗和乙醇的消耗是相关的。在 0 ~ 72 h,为醋酸菌提供碳源的主要是乙醇,葡萄糖的作用处于次要地位,当 72 h 以后,乙醇消耗殆尽,这时作为碳源的就只能是葡萄糖了。

## 2.7 乙醇初始含量不同时醋酸产率随时间的变化规律

以 12 h 时间间隔,分别测量乙醇含量(体积分数)为 4.5 %、5.0 %、6.0 %,培养条件为 180  $r/\text{min}$ 、30, 在不同时间点的醋酸生成量如图 8、9 所示。

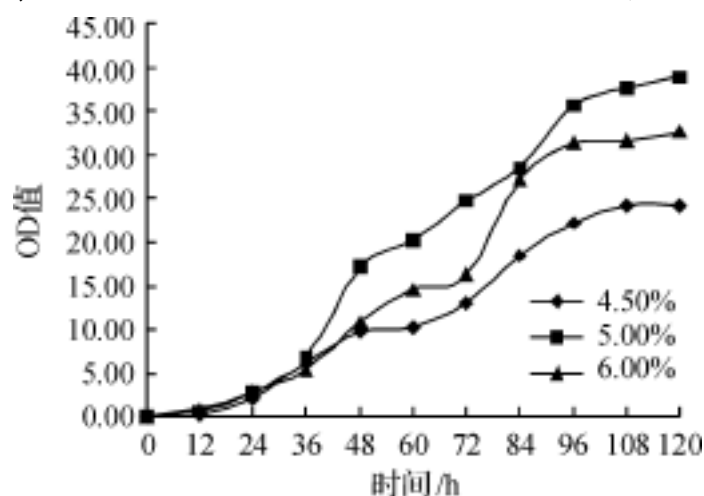


图 8 不同乙醇体积分数下醋酸产量随时间的变化

**Fig 8** Different ethanol concentration of acetic acid production changes over time

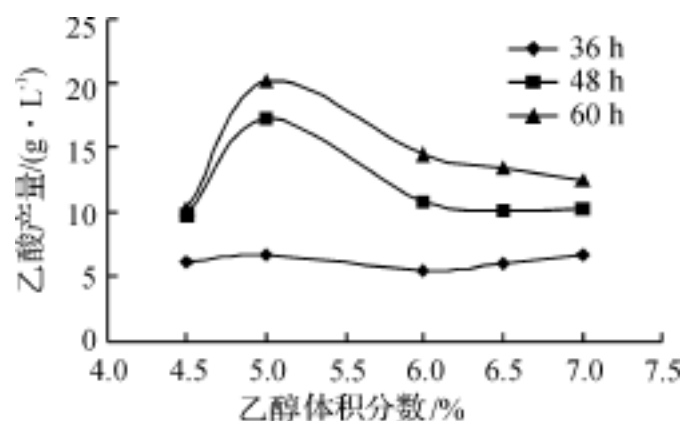


图 9 醋酸产量随乙醇初始含量的变化

**Fig 9** Acid production changes with the initial concentration of ethanol

由图 9 可知,不同乙醇初始含量下,醋酸产量随时间的变化呈增加趋势。总的来看,可以把醋酸的产率分为 4 个时间段:0~48 h,醋酸产量随时间变化呈现上升状态;48~72 h,醋酸菌处于平缓期,醋酸产量随时间变化不明显;72~96 h,醋酸产量随时间变化呈现上升状态;96~120 h,醋酸菌处于平缓期,醋酸产量随时间变化不明显。

由图 9 可知:乙醇体积分数为 5% 时的发酵液醋酸产率高于其他初始乙醇时的乙醇产率,说明该乙醇含量下的乙醇转化率最高,最适合乙醇发酵。从时间段来看,可见在 96 h 的时间点,醋酸已经出现平缓的状态,醋酸的增加量趋向于平缓。

从乙醇随时间的消耗量来看,在 72 h 的时间点,乙醇已经消耗完毕。那么为什么 72~96 h 时间段中醋酸还是继续生成呢?这是因为:第一,乙醇转化为醋酸尚存在中间产物——乙醛,当乙醇消耗完毕,乙醛继续反应生成醋酸,故使产率继续提高。第二,无论是有氧、无氧,葡萄糖都可以在酶的作用下代谢形成醋酸,从葡萄糖随时间的变化图可知:葡萄糖正是在 72~96 h 之间大量消耗。一部分的葡萄糖必将转化为醋酸。

结论:从实际工业生产情况考虑,通常发酵时间保持在 72 h,初始乙醇含量为 5.0%。

## 2.8 乙醇初始含量不同时菌体个数随时间的变化规律

图 10 以 12 h 时间间隔,分别测量乙醇含量(体积分数)为 4.5%、5.0%、6.5%、7.0%,培养条件为 180 r/min、30℃,在不同时间点的菌数变化,菌数单位为  $10^7$  个/mL。从图 10 可以看到,各乙醇浓度随时间变化菌体个数呈现增长的趋势,0~24 h 时间段菌种基本没生长,处于生长延迟期,不同的乙醇

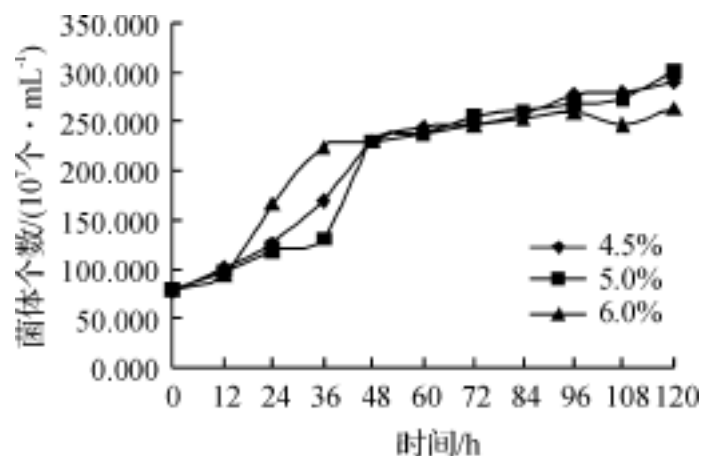


图 10 不同乙醇初始含量下菌体个数随时间的变化

Fig. 10 Different initial concentrations of ethanol cell number changes over time

含量对菌种的抑制作用相同;在 24~48 h 时间段中,菌体个数增长速度最快,呈直线上升,处于对数生长期;在 48 h 之后乙醇发酵液的菌体个数生长趋向去平缓。同时还可以看出:不同乙醇初始含量下,随着反应的进行,菌种的数量逐渐接近,表明乙醇的抑制作用逐渐消失。

## 3 结 论

通过对固定化细胞法生产醋酸的优化以及过程动力学研究,获得了以下结论:

1) 优化接种数为 15 环、培养时间为 36~48 h,发酵液菌体个数最多;

2) 在各乙醇含量中,5.0% 乙醇浓度的发酵液醋酸转化率最高,最佳培养时间为 72 h。在 72 h 时间点,加入适量葡萄糖和其他培养基成分,可使细胞继续生长,延长细胞发酵周期;若加入适量乙醇,可使乙醇继续向乙醛转化,生产出醋酸,可以提高产量。

## 参考文献:

- [1] 吴天容,曹伯兴,徐莉.国外化学融雪除冰剂的开发与进展[J].无机盐工业,1989(5):28-33.
- [2] 肖进兵,邢军,孙永正.醋酸钙镁冰雪融化剂的制备及融冰效果小试[J].大连大学学报,2003,24(4):32-34.
- [3] 宝民,王立久,任铮钺.新型环保除冰剂研究[J].低温建筑技术,2002(3):31-32.
- [4] SANTAGATA MC, COLLEPARDI M. The effect of CMA deicers on concrete properties[J]. Cement and Concrete Research, 2000, 30(9):1389-1394.
- [5] ROBIDOUX P Y, DELISLE C E. Ecotoxicological Evaluation of Three Deicers (NaCl, NaFo, CMA) - Effect on Terrestrial [J]. Effect on Terrestrial Organisms Ecotoxicology and Environmental Safety, 2001, 48(2):128-139.
- [6] TAO Guoliang, ZHUO Renxi, CHEN Zhenhua. Study On Immobilized Thermolysin With Cellulose as Carrier[J]. Chinese Journal of Reactive Polymers, 1996, 5(1-2):19-25.
- [7] 陈建滨,董红星.环保型道路融雪剂的研究[J].化学工程师,2004,10(2):1002-1124.
- [8] 朱新宝.新型无污染融雪/冰剂的合成及应用评价[J].化学工业与工程技术,2002,23(1):6-8.
- [9] 李冀新,张超,高虹.固定化细胞技术应用研究进展[J].化学与生物工程,2006,23(6):5-7.