包埋法共固定化糖化酶与酵母的研究

安玉红[1],阚建全[1,*],任廷远[1],闫跃文[2]
(1.西南大学食品学院,重庆 400716;
2.山西农业大学食品学院,山西太谷 030801)

摘 要:考察了以聚乙烯醇为包埋材料,采用吸附法共固定化糖化酶和酵母菌在酿酒中的应用。确定了固化剂的最优组合为:硼酸浓度4%、壳聚糖浓度1.0%、氯化钡浓度为2%、pH为5.0;共固定化糖化酶与酵母的最佳工艺条件为:加酶量60mg/mL,酵母添加量0.01g/mL,PVA浓度为8%。该共固定化颗粒的最佳发酵条件是:底物浓度20%、发酵温度32℃,此条件下发酵酒度达11%(V/V)。

关键词:聚乙烯醇,共固定化,包埋法

Study on the co-immobilization of glucoamylase and yeast by embedding method

AN Yu-hong[1], KAN Jian-quan[1,*], REN Ting-yuan[1], YAN Yue-wen[2]
(1.Food College of Southwest University, Chongqing 400716, China;
2.Food College of Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract: Glucoamylase and yeast were co-immobilized by embedding method with polyvinyl alcohol(PVA) as the embedding materials, and the application of this co-immobilized beads in brews alcohol was inspected in this article. The results showed that the most superior combination of solution for immobilization were H_3BO_3 concentration 4%, chitosan concentration 1.0%, $BaCl_2$ concentration 2%, pH 5.0. The optimum processing condition for co-immobilizing the glucoamylase and yeast were enzyme 60mg/mL, yeast 0.01g/mL, PVA 8%. The optimum fermentation condition of this co-immobilized beads were substrate concentration 20%, fermentation temperature 32℃. Under the above conditions, the alcohol content was up to 11%(V/V).

Key words: polyvinyl alcohol(PVA); co-immobilization; bedment method
中图分类号:TS261.1+1 **文献标识码**:A **文 章 编 号**:1002-0306(2010)11-0181-03

近年来,固定化技术的应用和研究日益广泛,对固定化细胞和固定化酶的发酵机理的研究也逐步深入。多种微生物、多种酶及酶与微生物的共固定化发酵体系也正陆续在生产中得到了应用。共固定化是将不同的酶与酶、细胞与细胞或细胞与酶同时固定与统一在体内形成共固定化系统的一种技术,综合了混合发酵和固定化技术的优点。这种系统稳定,可将几种不同功能的酶、细胞和细胞器在同一体系内进行协同作用。固定化技术是微生物发酵的有效手段,固定化微生物具有可进行高密度增殖培养,提高反应器单位体积的生物转化率,延长发酵细胞寿命,发酵周期短,可以反复利用,稳定性增加,利于产物分离等优点。固定化酶具有固定化微生物的绝大部分优点,同时与游离酶相比具有更优良的酶学性质,所以成为广泛研究的重点课题。共固定化后的颗粒可以回收,反复利用,实现连续化大规模生产。根据需要制成不同的形状,可以缩小反应器的体积,节省费用,减少反应器占地面积,提高产量,节省劳动力,充分利用资源等优点,固定化酶或细胞在生产和应用领域必将会不断扩大[1]。本文考察了用包埋法共固定化糖化酶制剂与酿酒酵母细胞生料发酵工艺的各种因素,确定了酵母菌与糖化酶共固定化颗粒的最佳工艺技术条件,以及该颗粒的一些性质。

1 材料与方法

1.1 实验材料

活性干酵母、糖化酶(50000u/g) 无锡杰能科生物工程有限公司;聚乙烯醇(PVA) 天津市天大化工实验厂;壳聚糖 上海伯奥生物科技有限公司;硼酸、无水氯化钡 天津市光复科技有限发展公司;冰醋酸 天津市天大化工实验厂;高粱粉 市售食用级;实验试剂 均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 固化剂的配制 称取一定量的壳聚糖于1%

收稿日期:2009-11-04 *通讯联系人
作者简介:安玉红(1982-),女,硕士研究生,研究方向:食品化学与营养。

醋酸溶液中保温溶解,随即加入所需硼酸和氯化钡一并保温溶解,备用。

1.2.2 酶液的制备 称取一定量的糖化酶酶粉,加少量 pH4.6 的醋酸-醋酸钠缓冲溶液溶解,并用玻璃棒反复捣研不溶物,将上清液倒入容量瓶中,残渣再用缓冲液冲洗,如此反复 3~4 次,最后全部倒入容量瓶,用缓冲溶液定容,摇匀,经 3000~4000r/min 的离心机离心后取上清液,备用。

1.2.3 酵母液的制备 称取一定量的活性干酵母于 2% 葡萄糖溶液中,在 38℃ 条件下活化 30min,备用。

1.2.4 糖化酶与酵母菌细胞共固定化 称取一定量的聚乙烯醇和海藻酸钠,加入 20mL 去离子水,浸泡过夜。经高压灭菌溶解后,趁热搅拌均匀,静置冷却备用。制备小球时,将该混合液在所需温度保温,将糖化酶液与酵母液一并加入混匀,用注射器吸取该混合液滴入含氯化钙和硼酸的固化液中,制成直径为 3mm 左右的固定化凝胶颗粒,固化一段时间后,滤出固定化凝胶颗粒,用去离子水洗涤三次,浸入无菌水中备用[2]。

1.2.5 固定化酵母细胞的增殖与发酵 将固定化酵母细胞凝胶颗粒用无菌水浸洗 5 次,加入同体积的由一定浓度的高粱粉水溶液组成的固定化酵母活化增殖培养基。于恒温摇床上通气振荡培养 24h 后,密闭发酵。

1.2.6 酒精度的测定 将三角瓶中的发酵成熟醪过滤后,将滤液置于 500mL 蒸馏瓶中,量取 100mL 的蒸馏水,清洗三角瓶,将清洗液倒入蒸馏烧瓶中,装上冷凝管,用 100mL 的量筒作接收器,收集馏出液 80mL,控制酒温度 20℃,用酒精计直接读数[3]。

2 结果与讨论

2.1 混合固化剂最佳水平的确定

酶的本质是蛋白质,对热、酸、碱的抵抗性差,而酵母活细胞对环境变化的抗性较强,因此在筛选固化液最佳条件时,以最大限度地保留糖化酶活力为目的,即以酶活力作为比较的指标,经单因素水平实验确定硼酸浓度、氯化钡浓度、pH、壳聚糖浓度对酒度的影响较大,因此将它们定为正交实验的四因素,取各因素的最佳水平为其中一水平,另三水平用等差法确定,做四因素四水平正交实验,各因素水平如表 1。

表 1 固化液正交实验设计水平表

水平	因素			
	A 硼酸浓度(%)	B 氯化钡浓度(%)	C pH	D 壳聚糖浓度(%)
1	3.0	1	4.6	0.50
2	3.5	2	4.8	0.75
3	4.0	3	5.0	1.00
4	4.5	4	5.2	1.25

结合表 1、表 2,从直观分析有:$R_A > R_C > R_D > R_B > R_E$,可见各因素对实验有影响且 A、C 为主要因素,按照各因素的最好水平选取 $A_3C_3D_3$,即硼酸浓度为 4%,pH 为 5.0,壳聚糖浓度为 1.0%,而氯化钡浓度为次要因素,选取小球成型好的 2% 即可。即最优组合为:硼酸浓度为 4%,壳聚糖浓度为 1.0%,pH 为 5.0,氯化钡浓度为 2%。

表 2 固化液正交实验结果

实验号	A	B	C	D	空列 E	指标酒度(%,v/v)
1	1	1	1	1	1	5.3
2	1	2	2	2	2	6.1
3	1	3	3	3	3	6.9
4	1	4	4	4	4	6.5
5	2	1	2	3	4	7.3
6	2	2	1	4	3	6.7
7	2	3	4	1	2	7.2
8	2	4	3	2	1	7.6
9	3	1	3	4	2	8.3
10	3	2	4	3	1	7.9
11	3	3	1	2	4	6.9
12	3	4	2	1	3	8.1
13	4	1	4	2	3	5.9
14	4	2	3	1	4	6.9
15	4	3	2	4	1	6.7
16	4	4	1	3	2	6.2
K_1	28.5	26.8	26.6	27.5	27.5	
K_2	28.8	27.6	28.2	26.5	27.8	
K_3	31.2	27.7	29.7	28.3	27.6	
K_4	25.7	28.4	27.5	28.2	27.6	
k_1	7.125	6.7	6.65	6.875	6.875	
k_2	7.2	6.9	7.05	6.625	6.95	
k_3	7.8	6.925	7.425	7.075	6.9	
k_4	6.425	7.1	6.875	7.05	6.9	
R	1.375	0.4	0.775	0.45	0.075	

2.2 共固定化最佳水平的确定

依据单因素实验的结果,做加酶量、酵母添加量、载体浓度的正交实验,采用设计固化剂正交实验的方法,得出其最佳组合,其因素水平表如表 3 所示。

表 3 因素水平表

水平	因素		
	A 加酶量(mg)	B PVA(%)	C 接种量(g)
1	40	8	0.15
2	80	9	0.2
3	120	10	0.25

表 4 共固定化正交实验结果

实验号	A	B	C	指标酒度(%,v/v)
1	1	1	1	9.0
2	1	2	2	8.5
3	1	3	3	7.0
4	2	1	2	10.0
5	2	2	3	7.0
6	2	3	1	8.5
7	3	1	3	9.4
8	3	2	1	9.0
9	3	3	2	9.5
K_1	24.50	28.40	26.50	
K_2	25.50	24.50	28.00	T=77.9
K_3	27.90	25.00	23.40	
k_1	8.17	9.47	8.83	
k_2	8.50	8.17	9.33	
k_3	9.30	8.33	7.80	
R	1.13	1.30	1.53	

方差分析的结果如表 5 所示。

由表 5 可以看出:B、C 为主要因素,A 为次要因

素。对 B、C 因素用 LSR 法进行多重比较,比较表如表 6~表 8 所示。

表 5 方差分析表

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	$F_{0.05}(2,2)$
A	2.0355	2	1.0178	15.0118	19.00
B	3.0022	2	1.5011	22.1401 *	
C	3.6689	2	1.8345	27.0568 *	
误差	0.1356	2			
总变异	8.8422	8			

表 6 多重比较用 SSR 及 LSR 值

秩次距 K	水平	2	3	4
SSR	0.05	6.09	6.09	6.09
	0.01	14	14	14
LSR	0.05	1.295	1.295	1.295
	0.01	2.976	2.976	2.976

表 7 B 因素各水平均值多重比较表

B 因素	B_1	B_3	B_2
$\bar{x}$	28.4	25.0	24.5
水平 0.05	a	b	b

表 8 C 因素各水平均值多重比较表

C 因素	C_2	C_1	C_3
$\bar{x}$	28	26.5	23.4
水平 0.05	a	b	c

多重比较结果以 $A_3B_1C_2$ 最好,即最优组合为:加酶量 120mg,载体 PVA 浓度为 8%,酵母添加量为 0.2g。

2.3 对固定化颗粒的研究

2.3.1 最适底物浓度的确定 分别取高粱粉的浓度为 10%、15%、20%、25%、30%,配制 200mL 的固定化酵母活化增殖培养基,接入制备好的固定化颗粒进行发酵实验,考察其对酒度的影响,结果如图 1 所示。

由图 1 可知,最适宜的底物浓度为 20%,随着底物浓度的增大,酒度先增大后又下降。其原因可能是:当淀粉浓度低时,酶与淀粉不能充分接触并分解为酵母所需的葡萄糖,导致酵母的发酵能力下降,而采用较高浓度的底物浓度,会使底物在被利用完之前,酒度就已经很高,从而抑制了发酵进程。

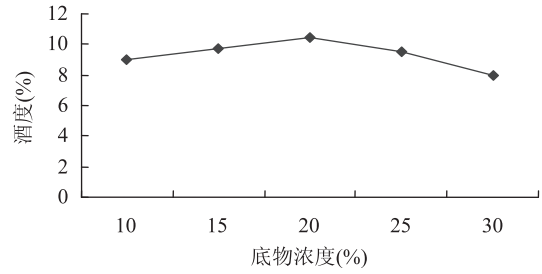

图 1 底物浓度对酒度的影响

2.3.2 最适发酵温度的确定 将制备好的固定化颗粒加入含高粱粉 20% 的发酵培养基中,采取不同温度:28、30、32、34、36、38℃,进行酒精发酵实验,考察发酵温度对酒度的影响,结果如图 2 所示。

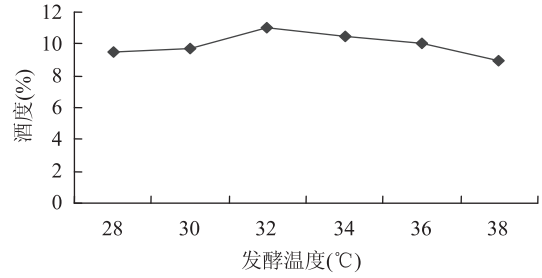

图 2 发酵温度对酒度的影响

由图 2 可知,低温、高温都不利于酒度的增加,该固定化颗粒的最适发酵温度为 32℃。提高温度能使糖化酶的活力有所增大,但不利于酵母发酵产酒,而且高温会导致酵母过早的衰老,被污染的可能性增大。

3 结论

固化剂的最优组合为:硼酸浓度为 4%,pH 为 5.0,壳聚糖浓度为 1.0%,氯化钡浓度为 2%;当固化剂的总体积为 20mL 时,共固定化的最佳组合为:加酶量 120mg,添加酵母量 0.2g,载体浓度为 8%。

参考文献

[1]何国庆.食品发酵与酿造工艺学[M].北京:中国农业出版社,2001:8-10.

[2]李魁.酵母菌与糖化酶共固定化木薯酒精连续发酵工艺研究[J].中国粮油学报,2005(1),22:36-39.

[3]Carl Lacha,马兆瑞.苹果酒酿造技术[M].北京:中国轻工业出社,2004.

(上接第 180 页)

[6] 查玉兵,陈美,王晓芳.高效液相色谱法测定猪肉中五种磺胺类药物残留量[J].分析仪器,2008(4):42-45.

[7] 张盅,兰耀志.鸡肉中磺胺喹恶啉残留的测定[J].当代畜牧,2003(5):38-39,42.

[8] 王积涛,张宝申,等.有机化学[M].第二版.天津:南开大学出版社,2006:490.

[9] 杨利国,胡少昶,魏平华.酶免疫检测技术[M].南京:南京大学出版社,1998:273,279-280.

[10] 郭尧君.蛋白质电泳实验技术[M].北京:科学出版社,2001:456-460.

[11] Tijssen P.Practice and theory of enzyme immunoassay[M].Amsterdam:Elsevier,1985:173-210.

[12] 覃雅丽,石德时,王桂枝,等.抗氯霉素单克隆抗体的制备与鉴定[J].中国兽医学报,2001,21(6):11.

[13] 陈新建.免疫学技术在植物科学中的应用[M].北京:中国农业大学出版社,1998:56-58.

[14] 北京大学生物系生物化学教研室.生物化学指导[M].北京:高等教育出版社,1979:75.

[15] 张龙翔,张庭芳,李令媛.生化实验方法和技术[M].北京:高等教育出版社,1981:60.

[16] Landsteiner K.The specificity of SEROLOGICAL reactions[M].Boston:Harvard University Press,1945:256-259.

[17] 李临生.戊二醛与蛋白质反应的特点[J].中国皮革,1997,26(5):12-14.

[18] 刘庆堂,职爱民,张改平,等.磺胺二甲基嘧啶人工抗原的合成及鉴定[J].河南农业科学,2008(2):94.