

共固定化技术研究进展

薄 涛,侯红萍

(山西农业大学食品科学与工程学院,山西 太谷 030801)

摘 要: 对近几年来共固定化技术的研究进展进行了综述,包括细胞与细胞、细胞与酶以及酶与酶共固定化 3 个方面,并对共固定化技术进行了展望。

关键词: 微生物; 共固定化; 连续发酵; 研究进展

中图分类号: Q814; TQ920; Q93-3

文献标识码: B

文章编号: 1001-9286(2010)07-0077-03

Research Progress in Co-immobilization Technology

BO Tao and HOU Hong-ping

(College of Food Science and engineering, Shanxi Agricultural University, Taigu Shanxi 030801, China)

Abstract: The research progress in co-immobilization technology in recent years was reviewed in three aspects including co-immobilization of different cells, co-immobilization of different enzymes and different cells, and co-immobilization of different enzymes. In addition, co-immobilization technology was also predicted.

Key words: microbe; co-immobilization; continuous fermentation; research progress

近年来,固定化生物催化剂的研究发展迅速,在固定化细胞技术的基础上人们又进一步提出了共固定化技术的新概念。共固定化就是将不同的酶与酶、细胞与细胞或细胞与酶同时共固定于同一载体内形成共固定化系统的一种技术,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系统内进行协同作用,能使各组分之间互补催化活性,可以平衡两个不同细胞或酶之间相应的酶活性获得高产率或用该系统处理某种成分,或得到某种有效成分。混合发酵往往采用生长条件相近的菌种,差异性较大,则很难实现同步生长,共固定化技术可以避免这一矛盾,先将菌种各自培养,然后再进行共固定^[1]。

1 细胞与细胞共固定化

在多菌种固定化体系中,多种微生物在生长过程中相互依赖、相互促进,形成了丰富的酶系和多样化产物体系,它们交错作用形成大量的营养成分和有益的风味物质。细胞共固定化技术很好地控制了多种微生物之间的配比量,使发酵能长期稳定的进行,从而保证了产品质量,避免了各菌种量随发酵的进行而发生改变,造成产品质量的波动。

王克明(2008)^[2]以苦瓜为原料,采用固定化多元混菌发酵技术生产苦瓜醋酸饮料,研究结果表明,根霉·酿酒酵

母:产香酵母:醋酸菌的接种比例为 4:2:2:1,固定化凝胶粒接种量为 10%,发酵温度为 25℃,发酵时间为 35 d 时发酵效果最好,产品风味最佳。

吴敏等(2007)^[3]将微囊藻毒素降解菌 S3 和椭圆小球藻 L1 共固定化后,对微囊藻毒素(MC-LR)进行降解。结果表明,共固定化藻菌体系比单独固定化菌 MC-LR 有更好的降解效果,可促进降解菌 S3 的生长。且对毒素的降解能力较稳定,受环境温度和变化的影响较小,重复使用仍可维持较高的降解活性。

贺江等(2008)^[4]以海藻酸钠作为固定化材料,研究了多菌种共固定化技术在苹果醋酿造中的应用。结果表明,其最适工艺条件为:酒精发酵阶段,接种量 15%,发酵温度 30℃,自然 pH;醋酸发酵阶段,接种量 10%,底物浓度 5%,温度 30℃,摇床转速 180 r/min,装液量 80 mL (250 mL 三角瓶)。采用多菌种共固定化技术酿造苹果醋具有很好的稳定性。

沈雪亮等(2007)^[5]将富含纤维二糖酶的黑曲霉孢子和德氏乳酸杆菌一起包埋固定在海藻酸钙凝胶珠中,利用共固定化细胞转化纤维素水解液生产乳酸。结果表明,共固定化细胞中的纤维二糖酶可以将纤维素水解液中存在的纤维二糖迅速水解成葡萄糖,而固定化乳酸杆菌又

基金项目 山西省科技攻关项目 (041030)。

收稿日期:2010-04-12

作者简介:薄涛(1986-),男,汉族,山西太原人,在读硕士研究生,主要从事固定化技术的研究。

通讯作者:侯红萍,女,教授,E-mail:sphping@126.com。

能将葡萄糖迅速转化成乳酸。共固定化细胞的最适作用温度为 48 ℃,在纤维素水解液(总还原糖质量浓度为 49.40 g/L)中协同反应 48 h,生成的乳酸质量浓度为 41.71 g/L。在反复分批协同反应工艺中,共固定化细胞性能稳定,可重复利用 12 批以上。

潘辉等(2006)^[6]以 PVA 为主要包埋材料,将活性污泥和蛋白核小球藻共固定化,用气升式反应器连续处理模拟生活污水,结果表明,共固定化菌藻共生系统适于处理高有机负荷、低氮磷浓度的市政污水, $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 的最高去除率可接近 100 %, P 的最高去除率可达到 93.6 %。24 h 无光照对 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 、P 的去除没有影响,但缺少光照多于 36 h,则影响较大。

T. Lebeau(1998)^[7]等以一种复合琼脂为载体,将酿酒酵母和休哈塔假丝酵母共固定化,并以葡萄糖(35 g/dm³)和木糖(15 g/dm³)混合糖浆为原料进行连续发酵研究。在稀释率为 0.02 h⁻¹ 时,获得最佳发酵结果,即 100 % 的葡萄糖被消耗,73 % 的木糖被消耗,酒精生产率为 0.48 g/g 总糖。

2 细胞与酶共固定化

单一固定化酶或固定化细胞有时很难实现对某一底物的作用,而共固定技术则可以发挥酶和细胞的协同作用。李雪雁(2008)^[8]利用凹凸棒土的强吸附作用,先将乳糖酶吸附,再用壳聚糖包埋乳糖酶与酿酒酵母细胞,对乳糖进行转化。实验结果表明,凹凸棒土与壳聚糖的比例为 5:1,加酶量为 300 U/g 凹凸棒土,室温吸附 4 h; pH 值和温度分别为 6.0 和 32 ℃,以 20 % 的乳清(乳糖含量为 13.42 %)为底物发酵 30 h 时,酒精浓度达 8.3 % vol,乳糖转化率达 93.2 %。

Bandaru VVR(2006)^[9]等以海藻酸钙为包埋材料,壳聚糖为吸附剂,将淀粉葡萄糖苷酶和运动发酵单胞菌 MTCC92 共固定化,以浓度为 150 g/L 的西米淀粉为原料进行发酵,得到最大酒精浓度为 55.3 g/L。最佳发酵温度为 32.4 ℃, pH 4.92, 发酵时间 17.24 h。

王梦琴等(2009)^[10]以海藻酸铝为载体,用包埋法共固定酵母菌和糖化酶,探讨了此双酶体系的储存稳定性和操作稳定性,结果表明,酵母菌和糖化酶的最佳加入量分别为 2.5 g 和 300 U/g; 固定化酶重复使用 10 次后,残余活力仍能保持最初活力的 83.47 %; 共固定化酶的半衰期可达 205.1 d; pH 为 4.0~4.5、温度为 37 ℃ 时,其活性可达最高。

侯红萍、闫跃文(2009)^[11]以聚乙烯醇和海藻酸钠为包埋材料,以硅藻土为吸附剂,采用吸附-包埋结合法共固定化糖化酶和酵母菌。结果表明,聚乙烯醇和

海藻酸钠的最佳配比是 9:1,硅藻土为吸附剂,添加量为 0.6 g/20 mL; 其最佳发酵条件是底物浓度 25 %、发酵温度 30 ℃、起始 pH 为 5.0、糖化发酵时间为 7 d,在此条件下发酵,酒度达 11 % vol。

3 酶与酶共固定化

将具有协同作用的酶共同固定可以更有效地发挥各酶的作用。苏二正等(2006)^[12]比较了海藻酸钠和壳聚糖两种载体及不同固定化方法对单宁酶和 β -葡萄糖苷酶的共同固定化效果,结果表明,以海藻酸钠为载体,采用交联-包埋-交联固定化方法的效果最佳。对共固定化条件进行了优化,可使单宁酶和 β -葡萄糖苷酶的活力回收率分别达 67.3 % 和 46.0 %。

高明侠等(2008)^[13]以海藻酸钠为载体,戊二醛为交联剂共固定木瓜蛋白酶和中性蛋白酶,研究其水解芝麻粕蛋白的最佳优化条件和稳定性。结果表明,当海藻酸钠为 3 g/dL、戊二醛 25 g/L、氯化钙 0.2 g/dL 时,酶活力回收率最高为 51.28 %。用此共固定化酶水解芝麻粕蛋白的最佳条件为固液比 1:25, pH 6.0, 温度 60 ℃, 时间 7 h, 加酶量 5 g/dL, 氨基氮含量最高为 20.65 mg/g, 共固定化酶重复使用 6 次,酶活力仍保持 50 % 以上。

顾旭炯等(2006)^[14]以糖化酶和 α -淀粉酶为双酶体系,硅藻土为载体,用吸附法同时固定了这两种酶,得到的最适的共固定化条件为硅藻土(g):糖化酶(U):淀粉(U)=1:100:160, pH 值 4.5~5.0, 温度 5~15 ℃, 缓冲液为柠檬酸缓冲液。共固定化酶的性质为:最适 pH 值为 5.0; 最适温度为 55 ℃; 米氏常数 $K_m=16.830$ mg/mL; 最大反应速率 $V_{max}=1.500$ mg/mL·min, 其稳定性良好。

刘芳等(2008)^[15]研究了明胶-戊二醛法在共固定化乳糖酶和葡萄糖异构酶中的应用,并与开孔明胶法、卡拉胶包埋法进行了比较。进一步研究 pH、明胶质量浓度、前交联中戊二醛的体积分数和二次交联的时间对明胶-戊二醛法共固定乳糖酶和葡萄糖异构酶的影响。结果表明,共固定化的最佳条件为: pH 8.6, 明胶浓度 27 % (w/w), 前交联戊二醛体积分数 0.15 % 和二次交联时间 10 min。在此条件下共固定化,乳糖酶的活力回收率为 30.85 %, 葡萄糖异构酶的活力回收率为 83.48 %。共固定化乳糖酶和葡萄糖异构酶用于制备乳果糖, 间歇操作 6 批次后酶活力仍然保持在初始活力的 75 % 以上。

Raquel L. C. Giordano(2008)^[16]等先以二氧化硅为载体将葡糖淀粉酶固定,而后用果胶为载体将葡糖淀粉酶与酿酒酵母共固定,并以木薯淀粉液化液为原料进行同步水解发酵(SSF)。结果表明,初始总糖浓度为 166.0 g/L, 酒精生产率为 8.3 g/L·h, 底物的理论转化率为 91 %; 在

连续发酵过程中添加浓度为 163.0 g/L 的总糖,在相同条件下,酒精生产率为 5.9 g/L·h,底物转化率为 97%,酒精理论产率为 81%。

4 展望

采用共固定化技术连续糖化发酵具有投资少、耗能低、反应时间短、可以连续自动化生产等优点,很大程度上可降低生产成本,提高利润,更适于工业化的生产。近几年,多酶共固定技术已引起国内外酶工程专家的极大兴趣,并正处于迅速发展阶段。目前,虽然由于种种原因使其在工业生产中的应用不是很广泛,但随着酶工程技术的不断发展,共固定化技术也将进一步完善,并应用于工业化生产。今后,对新的理想载体材料的不断研究开发是固定化技术的发展方向。相信共固定化技术的应用前景将更加广阔,更加美好。

参考文献:

- [1] 闫跃文,侯红萍.共固定化技术的发展现状[J].畜牧兽医科技信息,2006,(3):91-92.
- [2] 王克明.共固定化多元混菌发酵苦瓜保健醋饮料的研究[J].中国酿造,2008,(7):59-61.
- [3] 吴敏,陈明,宦海琳,等.菌藻共固定化降解微囊藻毒素[J].湖泊科学,2007,19(6):627-631.
- [4] 贺江,樊明涛,包飞.多菌种共固定化技术酿造苹果醋研究[J].中国食物与营养,2008,(11):35-38.
- [5] 沈雪亮,夏黎明.共固定化细胞发酵纤维素水解液产乳酸的研究[J].浙江大学学报(工学版),2007,41(5):823-826.
- [6] 潘辉,熊振湖,孙伟.共固定化菌藻对市政污水中氮磷去除的研究[J].环境科学与技术,2006,29(1):14-15.
- [7] Lebeau T, Jouenne T, Junter GA. Continuous alcoholic fermentation of glucose/xylose mixtures by co-immobilized *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida shehatae*[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1998,(50):309-313.
- [8] 李雪雁,弋凌云.乳糖酶和酿酒酵母的共固定化及其在乳清发酵中的应用[J].中国酿造,2008,(3):54-57.
- [9] Bandaru VVR, Somalanka SR, Mendu DR, et al. Optimization of fermentation conditions for the production of ethanol from sago starch by co-immobilized amyloglucosidase and cells of *Zymomonas mobilis* using response surface methodology[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006,(38):209-214.
- [10] 王梦琴,周志明,尹成志.酵母菌与糖化酶的共固定化研究[J].应用化工,2009,38(11):1599-1605.
- [11] 侯红萍,闫跃文.吸附-包埋结合法共固定化糖化酶和酵母菌的研究[J].食品科学,2009,30(5):201-204.
- [12] 苏二正,夏涛,宛晓春,等.单宁酶和 β -葡萄糖苷酶的共固定化[J].食品与生物技术学报,2006,25(1):40-44.
- [13] 高明侠,苗敬芝,曹泽虹,等.共固定化双酶水解芝麻粕蛋白制备复合氨基酸研究[J].扬州大学学报,2008,29(4):95-98.
- [14] 顾旭炯,刘磷,楼坚,等.硅藻土共固定化淀粉酶和糖化酶的研究[J].饲料工业,2006,27(18):24-28.
- [15] 刘芳,杨瑞金,张文斌,等.共固定化乳糖酶和葡萄糖异构酶的研究[J].食品工业科技,2008,29(7):82-87.
- [16] Giordano RLC, T Joubert, Schmidell W. Continuous production of ethanol from starch using glucoamylase and yeast co-immobilized in Pectin Gel[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2008,(147):47-61.

(上接第 76 页)

3 结论

用樱桃做原料,通过正交试验得出最佳生产工艺参数,生产全汁樱桃酒。最佳酿造条件为,主发酵温度 22℃,糖度 16%,pH3.2。将生产出来的樱桃酒与枸杞浸提液进行勾兑,最佳全汁保健樱桃酒酒度为 25%vol,得到清亮透明、口味纯正、酒体完整、丰满柔和、余味悠长的高纯度全汁保健樱桃酒。

这种保健酒兼具樱桃和枸杞的保健功能,既能促进

血液生成又能滋肾补髓、养颜驻容,是气血双补型的上好酒品。

参考文献:

- [1] 闫明奎.一种全汁保健樱桃酒的生产工艺研究[J].中国调味品,2009,(8):87-90.
- [2] 华京君.发酵型樱桃酒的研制[J].山东省农业管理干部学院学报,2005,(5):165-166.
- [3] 吴华昌,邓静,程驰,马钦元.配制型蜂花保健酒的研制[J].酿酒科技,2008,(5):68-70.

郎酒新品紫砂郎上市

本刊讯 近日,郎酒新品“传世酱香·紫砂郎”全面上市。据了解,紫砂郎定位为中档,是郎酒集团继红花郎之后倾力打造的又一支战略核心品牌。

“紫砂郎”酒属酱香型白酒,沿用老郎酒系列的古法酿制,要经过 9 次蒸煮、8 次加曲、8 次堆积发酵、8 次入池发酵、7 次取酒,历时整整一年,酒体醇厚、回味悠长,具有酱香突出、优雅细腻、酒体丰满、色泽微黄、空杯留香的特质。(小)小