

文章编号:1009-038X(2003)02-0005-05

冰核活性细菌 *Xanthomonas ampelina* TS206 的 两种固定化方法的比较

刘健, 陈庆森

(天津商学院 生物工程系, 天津 300134)

摘要: 冰核活性细菌固定化在食品冷冻浓缩中具有重要意义, 冰核活性和抗渗漏能力是衡量其性能的两个重要技术指标. 研究采用共固定化和海藻酸盐直接固定化两种方法, 建立了冰核活性细菌 *Xanthomonas ampelina* TS206 的包埋技术. 结果表明包埋量对冰核活性有较大影响, 利用海藻酸盐直接固定化冰核活性较高, 但渗漏量较大; 利用共固定化冰核活性较低, 但渗漏量很低. 两种固定化方法的凝胶珠添加量与综合评分相关不大; 海藻酸盐固定化综合评分与固化时间正相关, 共固定化综合评分与固化时间略呈负相关.

关键词: *Xanthomonas ampelina* TS206; 聚乙烯醇; 海藻酸盐; 共固定化; 冰核活性

中图分类号: Q 935

文献标识码: A

Comparison of Two Immobilization Methods of INA Bacteria *Xanthomonas ampelina* TS206

LIU Jian, CHEN Qing-sen

(Department of Biological Engineering, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China)

Abstract: The ice nucleation activity and the anti-leaking capability are both important technical parameters in INA bacteria immobilization which can be used for freezing concentration of food. Both co-immobilization and direct immobilization by alginate gel are good ways for the immobilization of ice nucleation-active bacteria (*Xanthomonas ampelina* TS206). The results showed that the embedded quantity affects the ice nucleation activity greatly. A higher ice nucleation activity but a worse anti-leaking capability was achieved with the alginate gel method, whereas the co-immobilization method showed a completely opposite result. Comprehensive index has little correlation with the number of beads used in the two immobilization ways, whereas it has a positive correlation with the time of immobilization by alginate gel and a little negative correlation with the time of co-immobilization.

Key words: *Xanthomonas ampelina* TS206; PVA; alginate; immobilization; ice nucleation activity

冰核活性细菌(ice nucleation active bacteria, 简称 INA 细菌)是一类在 $-5 \sim -2$ °C 条件下催化诱

收稿日期:2002-08-06; 修回日期:2002-11-26.

基金项目:国家自然科学基金项目(No.39770580)资助课题.

作者简介:刘健(1978-),男,山东乐陵人,生物化工博士研究生.

发植物体内水分产生冰核而引起霜冻的细菌^[1]。*Xanthomonas ampelina* TS206 冰核活性细菌是一种黄单胞菌属微生物,具有生长速度快、冰核活性强等优点^[2]。根据日本厚生省鉴定,该菌属急性毒性很低,其中的某些菌株可以直接用于食品工业^[3]。因此,该菌株可能开发成一种很有前途的工业菌株。Watanabe 等^[4]对冰核活性细菌的固定化做了初步研究,并利用其获得了难以用传统工艺获得的高品质冷冻浓缩果汁,该技术的特点是节约能源和最大程度保持果汁的原有风味。他们用了两种方法,一种是将 INA 细胞悬液放入玻璃纸试管中,试管放入 -5 ℃ 的水中,冰晶体在管的四周生长,在半透膜中的固定化可以避免 INA 细胞进入周围的样品中;另一种是把海藻酸钙冰核胶放置到盛有待浓缩物质的圆形反应器的壁上,冰晶体只围绕凝胶形成,向圆形反应器的中心生长,别处没有冰的形成。但以上这些研究没有对固定化方法进行筛选比较,而国内在该方面的研究尚未见报道。

将冰核活性细菌应用到食品冷冻浓缩工业中需要性能优良的固定化介质。海藻酸盐凝胶是一种广泛应用的固定化介质,具有固定化温度低、强度高、化学稳定性好、无毒、包埋效率高、价格低廉等优点,但也具有强度较低、渗漏量较大、半衰期短等缺点。聚乙烯醇(PVA)是一种新型的固定化细胞介质,具有固定化温度低、强度高、化学稳定性好、无毒、包埋效率高且价格低廉等优点,但也具有与硬化剂反应速度慢、不易成球等缺点,而其与海藻酸盐进行共固定化基本可以克服这些缺点。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种 *Xanthomonas ampelina* TS206 冰核活性细菌,作者所在实验室分离鉴定^[2]。

1.1.2 培养基 种子培养基和发酵培养基的配制方法参见文献^[2]。

1.1.3 主要试剂 PVA:天津大学化工实验厂生产,聚合度 1750 ± 50 ;海藻酸钠:上海化学试剂站分装厂进口分装。

1.2 实验方法

1.2.1 培养方法 活化 *Xanthomonas ampelina* TS206 斜面接到种子培养基中,23 ℃ 培养 24 h,以 2% 的接种量接入发酵培养基中,23 ℃ 于 180 r/min 振荡发酵 72 h。

1.2.2 菌悬液的制备 发酵液用高速冷冻离心机(5 000 r/min,4 ℃,20 min)离心后用 pH 7.0 的磷

酸盐缓冲液彻底洗两遍,再用与湿菌体等体积的磷酸盐缓冲液重新悬浮,得到菌悬液,4 ℃ 冰箱中保存备用。通过对菌悬液进行平板计数,测定其活菌浓度为 $4.0 \times 10^{10} \sim 5.0 \times 10^{10}$ 个/mL。

1.2.3 包埋方法 采用文献^[5]介绍的方法制成大小均匀的固定化凝胶珠,直径最大差值小于(或等于)0.5 mm。海藻酸盐固定化法采取的载体物质是海藻酸钠,硬化剂是 CaCl_2 溶液,用量为海藻酸钠 4.0 g/dL, CaCl_2 2.2 g/dL;共固定化法的载体物质是海藻酸钠和 PVA,硬化剂是硼酸和 CaCl_2 混合溶液,用量为 PVA 8.0 g/dL,海藻酸钠 1 g/dL, CaCl_2 1.1 g/dL,硼酸 5 g/dL。

1.2.4 冰核活性的测定方法 将若干固定化好的凝胶珠放入一个专用塑料反应器内,加入 10 g/dL 的蔗糖溶液 15 mL,再放入 -8 ℃ 的恒温水槽内,用电子精密温度计测定成核温度 A。将添加了或曾添加海藻酸盐固定化凝胶珠的 15 mL 10 g/dL 蔗糖溶液这个体系称为体系 C (System C),添加了或曾添加共固定化凝胶珠的 15 mL 10 g/dL 蔗糖溶液这个体系称为体系 D (System D)。

1.2.5 渗漏量的检测方法 得到的冰晶体在室温下充分融解,取出固定化凝胶珠,用电子精密温度计测定融解后的蔗糖溶液的成核温度 B,成核温度 B 越高则说明渗漏量越大。

2 结果与分析

2.1 包埋量的考察

对菌体细胞进行固定化,根据菌悬液的添加量和菌体浓度算出每个固定化凝胶珠的平均包埋量。调整加入菌悬液的量,制备不同包埋量的样品。如图 1 所示,固定化凝胶珠包埋菌量越大,则表现出越高的冰核活性。这可能由于包埋量的增大提高了靠近固定化凝胶珠表面的菌体分布密度,所以在相对较高的过冷温度下凝胶珠表面出现冰核的概率增加。对于海藻酸盐固定化而言,包埋菌量越大,则成核温度 B 越高,也就是说渗漏量越大。过高的渗漏量可能造成冷冻浓缩样品的污染和固定化凝胶珠使用半衰期缩短,因此应当尽量防止。对于共固定化而言,渗漏量很低。在不同的包埋量的条件下,成核温度均较低(-8 ~ -7 ℃)。

不同的载体质量浓度和硬化剂质量浓度对固定化凝胶珠表面的高分子海藻酸钙的微观结构产生影响,交联固定化后形成不同的孔径,对水分子形成大型冰分子的难易程度产生影响。向 10 g/dL 的蔗糖溶液中添加已知浓度的游离冰核活性细菌

可以测定出细菌浓度与成核温度 B 的关系(见图2).如果渗落后蔗糖溶液中的细菌浓度大于(或等于) 10^5 个/mL,可以根据成核温度 B 估测出实际渗漏出的细胞数.

海藻酸盐固定化法的成核温度 B 较高,当包埋量为 1.5×10^8 个/凝胶珠时,成核温度 B 约 -4.7 °C,根据图2可推断出渗落后 15 mL 蔗糖溶液中的菌浓达到了约 1.0×10^6 个/mL,与其包埋量 1.5×10^8 个/凝胶珠相比,实验中的一次冻结操作使每个凝胶珠约渗漏出了 5.0×10^6 个细胞,即每次冻结操作的渗漏率约 3.3%,这个渗漏量显然较高.

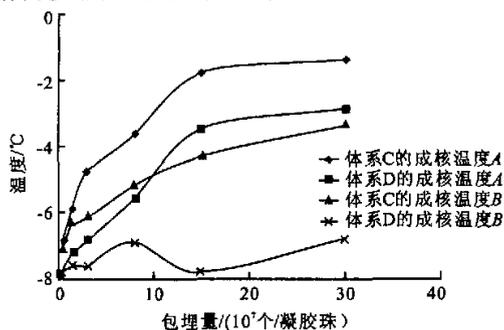


图1 包埋量—成核温度 A、B 关系图

Fig. 1 The relationship between the quantity and the nucleation temperature A and B

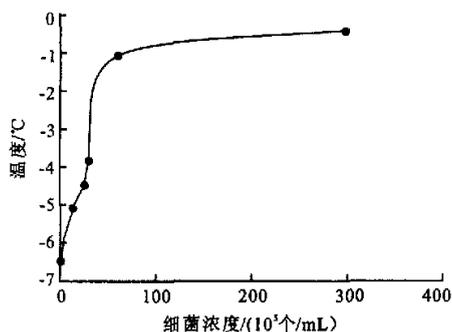


图2 细菌浓度—成核温度 B 关系图

Fig. 2 The relationship between the concentration of bacteria and the nucleation temperature B

为了综合评价体现冰核活性的成核温度 A (°C)和体现渗漏量的成核温度 B (°C),作者设计了一个综合评价冰核活性与抗渗漏能力的加权公式:

综合评分 = $10 + \text{成核温度 } A(\text{°C}) \times n - \text{成核温度 } B(\text{°C})$

这里 n 值根据实际需要取值,冰核活性相对于抗渗漏能力越重要, n 值越大,试验中 n 取 2.根据上式,

体系达到的成核温度 A 越高,成核温度 B 越低,综合评分越高.根据成核温度 A 和成核温度 B 可以得出综合评分与包埋量之间的关系(见图3).从图3可以看出,两种固定化方法在包埋量为 $1.5 \times 10^8 \sim 3.0 \times 10^8$ 个/凝胶珠时综合评分较高,考虑到菌体制造成本的因素,选取 1.5×10^8 个/凝胶珠的包埋量较佳.但当 n 取不同值时,即对冰核活性和抗渗漏能力有不同要求时,图3的曲线还可发生变化.如果在应用过程中要求成核温度在 -4 °C 以上,综合冰核活性和抗渗漏能力,海藻酸盐固定化的适宜包埋量为 $1.0 \times 10^8 \sim 2.5 \times 10^8$ 个/凝胶珠,共固定化的适宜包埋量为 $1.5 \times 10^8 \sim 2.5 \times 10^8$ 个/凝胶珠.

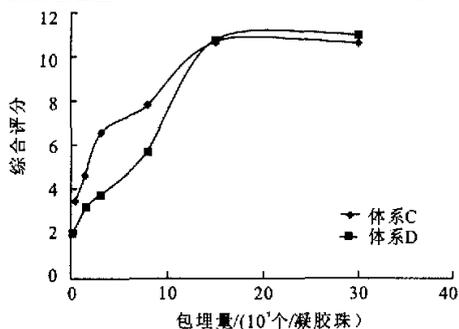


图3 包埋量—综合评分关系图

Fig. 3 The relationship between the embedded quantity and the comprehensive index

2.2 固定化凝胶珠的添加量对体系的影响

改变放入反应器内的固定化凝胶珠的数目,测定设定的两个体系中的成核温度 A 和 B .如图4所示,固定化凝胶珠的添加量与显示的冰核活性有一定关系,固定化凝胶珠数目增多,则两个体系的成核温度 A 均明显提高.这可能与固定化凝胶珠与水的总接触面积增大,造成成核的几率增大有关.从理论上讲,总渗漏量应该与凝胶珠的数目存在正相关.总的来看,体系 C 的成核温度 B 也确实体现这一规律.而体系 D 的成核温度 B 始终维持在一个较低的水平上.实验表明即使体系中添加 20 个凝胶珠,成核温度 B 仍然不高,说明共固定化方案的抗渗漏能力还是很强的.从图5可知,凝胶珠数目在 3 个以上时,两个体系的得分均在 10 分以上.从经济角度考虑,对于 15 mL 10 g/dL 蔗糖溶液体系而言,添加 3—5 个固定化凝胶珠仍是合适的.

2.3 固定化时间对体系的影响

固定化凝胶珠与硬化剂开始发生反应后,每隔 3 h 测定两体系中的成核温度 A 和 B .如图6所示,在体系 C 中,冰核活性随固化时间呈总体上升的趋

势;但在体系D中,冰核活性随固定化时间呈总体下降的趋势,但这些趋势都不是非常显著.在海藻酸盐固定化过程中,海藻酸钠与Ca²⁺之间发生了交联反应,这个反应速度较快,形成的高分子物质强度较小,网格空隙较大,同时,Ca²⁺易脱落,而造成凝胶珠机械强度降低,影响其应用.而在共固定化过程中,除上述反应起到凝胶珠的赋形作用外,还有PVA和硼酸之间的交联反应,这个反应速度较慢,形成的高分子物质强度较大,网格孔径较小,这个过小的孔径可能使细胞周围的空间变小,进而引起对冰核活性蛋白的微扰效应,影响到水分子以其为核形成巨型冰分子.

从渗透量来看,体系C中海藻酸钠与Ca²⁺之间的交联反应形成的网格孔径较大,发生细胞渗漏的可能性较大.体系D中在固化时间极短(1h)的情况下,渗透量稍大,但随着时间的推移而趋于平稳.这可能因为PVA与硼酸的反应是一个相对较慢的过程,在网孔结构尚未完全形成的情况下,发生了一定量的渗漏.

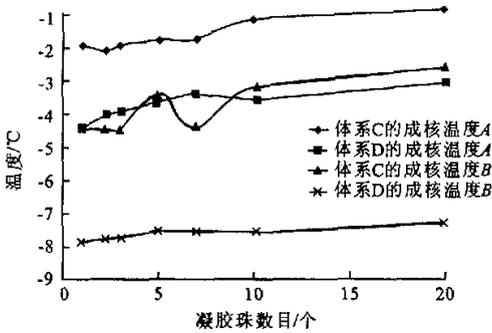


图4 固定化凝胶珠数目与成核温度A、B关系图
Fig.4 The relationship between the number of beads and the nucleation temperature A and B

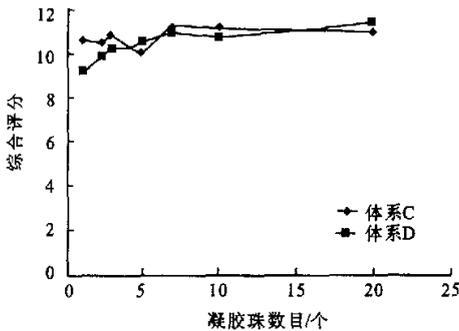


图5 固定化凝胶珠数目—综合评分关系图
Fig.5 The relationship between the number of beads and the comprehensive index

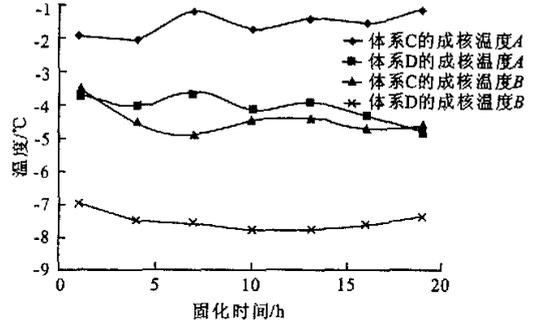


图6 固化时间—成核冷温度A、B关系图
Fig.6 The relationship between the time of immobilization and the nucleation temperature A and B

图7是两体系的综合评分随固化时间的变化关系,两体系均在7h左右达到较高评分,但总体趋势是体系C的综合评分与时间正相关,体系D的综合评分与时间负相关.另外,根据文献[6]的研究结论,延长固化时间有利于提高机械强度.因此综合考虑,仍应采取较长的固定化时间,但共固定化一般不宜超过15h.

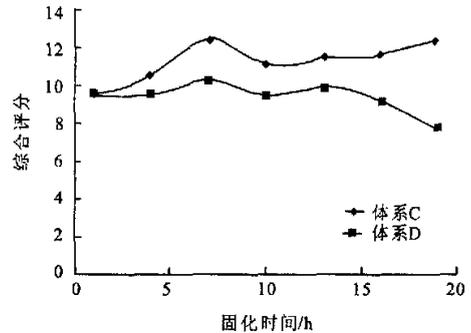


图7 固化时间—综合评分关系图
Fig.7 The relationship between the time of immobilization and the comprehensive index

3 结论

国内外的研究表明,冰核活性细菌的冰核活性及其在冷冻浓缩中的应用已成为冷冻浓缩技术领域新的研究热点.更突出的是,使用冰核活性蛋白进行冷冻浓缩可以更好地保持食品的原有风味,因此在食品冷冻浓缩领域具有广阔的开发前景^[7,8].将冰核活性细菌固定化从而加以重复利用是该领域发展的新方向.

作者对冰核活性细菌 *Xanthomonas ampelina* TS206 两种固定化方法的技术内容及评价方法进行了探讨,发现利用海藻酸盐直接固定化冰核活

性较高,但渗漏量较大,机械强度低,半衰期短,适合于较粗放的产品的冷冻浓缩.利用 PVA—海藻酸盐共固定化冰核活性较低,但渗漏量很低,机械强度高,半衰期长,适合于对产品中细菌量有严格控制的产品的冷冻浓缩.

平板计数法只能测活菌浓度,血球板计数法一般要求菌浓为 10^6 个/mL 以上,用于渗漏量的检测都不很合适.作者提出的成核温度 B 法测冰核活性细菌菌浓是一个新尝试,但一般要求菌浓为 10^5 个/mL 以上,所以检测渗漏量的方法还需不断探索.

参考文献:

- [1] Maki R L, Galyan E L, Chang M, *et al.* Ice-nucleating induced by *Pseudomonas syringae*[J]. *Applied Microbiology*, 1974, 28: 456 - 459.
- [2] 王素英,陈庆森.天津地区蔬菜叶表冰核活性细菌调查[J].食品科学,2000,21(11):54 - 56.
- [3] Watanabe M, Arai S. Bacterial ice-nucleation activity and its application to freeze concentration of fresh food for modification of their properties[J]. *Food Engineering*, 1994, 22: 453 - 473.
- [4] Watanabe M, Makino T, Kumeno K, *et al.* High-pressure sterilization of ice nucleation-active bacterial cells[J]. *Agriculture Biology Chemistry*, 1991, 55: 291 - 292.
- [5] 曹晖,彭珍荣.一种制备珠型固定化细胞颗粒的简易方法[J].微生物学通报,1998,24(4):254.
- [6] 朱柱,李和平,郑泽根.固定化细胞技术中的载体材料及其在环境治理中的应用[J].重庆建筑大学学报,2000,22(5):95 - 100.
- [7] 刘健,陈庆森.冰核活性细菌特有力学初探[J].食品科学,2002,23(5):21 - 25.
- [8] 陈庆森,阎亚丽,王素英.冰核活性细菌表达冰核蛋白特性的研究[J].微生物学通报,2000,27(6):421 - 424.

(责任编辑:李春丽)

《冷饮与速冻食品工业》杂志征集广告启事

《冷饮与速冻食品工业》杂志 是经国家新闻出版总署批准出版,国家教育部主管的面向国内外公开发行的(邮发代号 28-190)的国家级专业性技术指导类刊物,是冷饮与速冻食品行业广大基层决策者、科研人员、生产者、经营者研究开发新品、寻求商业机会、开拓产品市场的良师益友。

《冷饮与速冻食品工业》杂志 通过国家邮政在全国各地发行,影响广泛,及时报道国内外冷饮与速冻食品领域的科研成果、生产技术及市场动态,竭诚为我国冷饮与速冻食品行业的广大企业提供广告服务,内容涉及冷饮与速冻食品行业的新产品、机械设备、食品添加剂等。广告费用低廉,连续刊登优惠 10% - 20%,敬请来电商洽。

联系电话:0510 - 5512561,5517448;图文传真:0510 - 5512561;E-mail:csbfj@sytu.edu.cn