

海藻酸钠包埋法固定化绿色木霉的研究

刘颖, 高晗, 范婷婷

(哈尔滨商业大学食品工程学院, 黑龙江 哈尔滨

150076)

摘要: 本实验以海藻酸钠包埋法固定化绿色木霉, 研究了海藻酸钠固定化的最佳条件和固定化细胞理化性质。3% 海藻酸钠包埋 $1.0 \times 10^9/\text{ml}$ 的绿色木霉的孢子溶液, 用 8 号针头滴入 3% CaCl_2 溶液中固化 5h, 缓冲液冲洗抽滤后。取 10g 固定化菌放入 50ml/250ml pH 为 4.5 的产酶发酵培养基的三角瓶中, 在 31°C 、180r/min 的条件下培养 96h 可达到最佳固定化效果, 菌体经固定化后其耐高温性和耐热稳定性得到较大提高; 重复使用六次后产酶率保持在 80% 左右。

关键词: 绿色木霉; 固定化; 海藻酸钠

Study on *Trichoderma viride* Immobilization in Sodium Alginate

LIU Ying, GAO Han, FAN Ting-ting

(College of Food Engineering, Harbin Commercial University, Harbin

150076, China)

Abstract: The immobilization of *Trichoderma viride* in sodium alginate, we optimized the best immobilized conditions as

收稿日期: 2007-08-21

作者简介: 刘颖(1968-), 女, 副教授, 主要从事天然植物中功能因子的提取与功能活性等领域的食品生物技术研究。

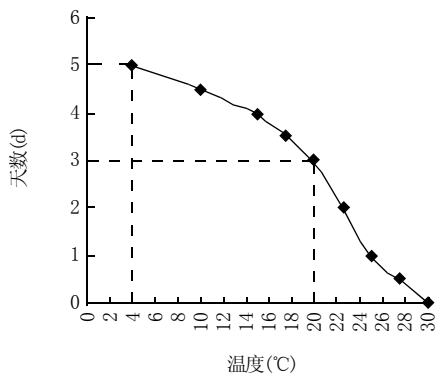


图4 牛乳的 TTT 曲线

Fig.4 Curve of TTT on milk

度下牛乳品质变化实验可以得到如表 2 所示数据。根据表 2 数值和线性插值, 可以得到 TTT 曲线, 如图 4 所示。

3 结论

通过对不同时间温度牛乳恒温实验可以得到, Gompertz 方程对菌落总数的拟合效果较好。在 4、10、15、20、25 $^\circ\text{C}$ 下, 菌落总数超过 30000 个/ml 的大约时间分别为 5、4.5、4、3、1d, 新鲜度分别在 5、4.5、4.5、3、1d 内超过 20°T 。获得的 TTT 曲线符合电子

式时间温度指示器的使用和运行要求。

参考文献:

- [1] 华泽钊, 李云飞, 刘宝林. 食品冷冻冷藏原理与设备[M]. 北京: 机械工业出版社, 1999: 116-118.
- [2] 谷雪莲, 刘宝林, 华泽钊, 等. 电子式时间-温度指示器监测牛乳货架期的实验研究[J]. 农业工程学报, 2006(10): 508-510.
- [3] VIAJAYALAKSHIMI R, MURUGESAN T. Shelf life and microbiological quality of selected dairy products[J]. Journal of Food Science and Technology-Mysore, 2001, 38(4): 385-386.
- [4] RATKOIVSKY D A, OLLEY J, MCMEEKIN T A, et al. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures[J]. J Bacteriol, 1982, 149(1): 1-5.
- [5] RIVA M, FRANZETTI L, GALLI A. Effect of storage temperature on microbiological quality and shelf-life of ready to use salads[J]. Annals of Microbiology, 2001, 51(1): 39-51.
- [6] SURTI T, TAYLOR K D A, MARUF F. The effect of storage at tropical ambient temperature on the quality and shelf life of grouper (*Plectropomus maculatus*) [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2001, 36(5): 517-522.
- [7] 张意静. 食品分析技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2003: 650-700.
- [8] 黄伟坤. 食品检验与分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1997: 418.
- [9] RIVA M, FESSAS D, SCHIRALDI A. Isothermal calorimetry approach to evaluate shelf life of foods[J]. Thermochimica Acta, 2001, 370: 73-81.
- [10] 苏世彦. 食品微生物检验手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998: 400-424.

follows: The concentration of inoculation spore suspension in 3.0%, alginate sodium was 1.0×10^9 spores/ml. It was poured into 3.0% of CaCl_2 solution. After solidification in the solution for 5 hours. pH 4.5 and span 96 hours for shaking flask culture at 31°C , 180 r/min.

Key words *Trichoderma viride*; immobilization; sodium alginate

中图分类号: Q814.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)12-0319-05

绿色木霉是产纤维素酶活性最高的菌株之一^[1], 在工业、农业和环境科学等方面有着广泛用途。纤维素酶可广泛应用于食品、饲料、医药和纺织业中, 经济效益可观^[2]。目前由于绿色木霉产纤维素酶的量 and 活性都较低, 绿色木霉所产生酶的生物转化尚未扩展到工业规模。本研究探讨绿色木霉固定化产酶, 并使酶处于天然环境中, 稳定性高能提高、并可以连续发酵、反复使用, 从而有效的降低成本、极大的提高了经济效益。

1 材料与方法

1.1 材料

pNPG Sigma 公司; 绿色木霉 *Trichoderma viride* AS3.3711 中科院微生物研究所; 其他试剂和药品均为国产分析纯。

1.2 培养基

活化培养基: 马铃薯(去皮切块) 200 g、葡萄糖 20g、蛋白胨 10g、蒸馏水 1000ml、 121°C 灭菌 20min。

种子培养基: 马铃薯(去皮切块) 200 g、葡萄糖 20g、琼脂 20g、蒸馏水 1000ml、 121°C 灭菌 20min。

发酵培养基: 缩合玉米浆料 6%, 豆饼粉 6%, 麸皮 1%, KH_2PO_4 0.02%, CaCl_2 0.05%, MgSO_4 0.02%, 尿素 0.5%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.05%, 吐温 80 0.1%、pH 4.5。

缩合玉米浆料制备: 4% 盐酸 100ml 与 30g 80 目去脂玉米粉 125°C 下反应 2h^[3]。

1.3 菌悬液的制备

将干菌接入 50ml/250ml 活化培养基的三角瓶 30°C 、150r/min 摇床培养 48h, 然后转接到种子培养基上 30°C 培养 48h, 用无菌水洗脱孢子, 倒入带有玻璃珠的三角瓶中, 充分振荡使孢子悬液均匀, 然后用血球计数板计数得孢子悬液浓度为 2.4×10^9 个/ml, 待用。

1.4 菌种固定

用无菌水配制一定量海藻酸钠溶液, 加入菌悬液, 振荡混匀后, 用注射器滴到 CaCl_2 溶液中, 4°C 冰箱中硬化后, 取出用无菌水洗脱抽滤待用^[4]。

1.5 β -葡萄糖苷酶活力测定

采用 p-NPG 法测定 β -葡萄糖苷酶活性。以每 min 水解产生 $0.01 \mu\text{mol}$ 对硝基苯酚的酶量定义为一个酶活力单位(U/g)^[5-6]。

2 结果与分析

2.1 β -葡萄糖苷酶活力测定及计算公式

实验结果显示, 对硝基苯酚在 405nm 处的吸光值标准曲线的线性回归方程 $y=0.013x+0.0041$, x 为对硝基苯酚的浓度($\mu\text{mol/L}$), y 为 405nm 处的 OD 值。

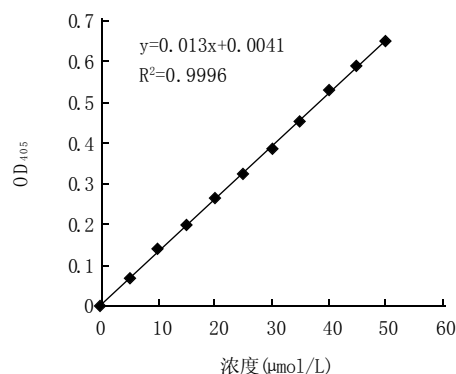


图1 对硝基苯酚的标准曲线
Fig.1 Standard curve of pNP

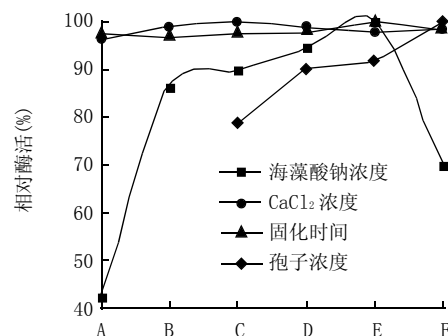


图2 菌体固定化条件的确定
Fig.2 Determination of immobilization

2.2 海藻酸钠浓度对固定化菌体产 β -葡萄糖苷酶活力的影响

制备 1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5% 浓度海藻酸钠溶液包埋 1.0×10^8 个/ml 的绿色木霉菌悬液, 滴入 2% CaCl_2 的溶液中, 固化 3h 后, 取 10g 固定化菌在 50ml/250ml 培养基的三角瓶中, 30°C 、150r/min 摇床培养, 72h 后取出样品, 测定发酵液的酶活, 实测 OD 值为纵坐标作图。实验结果显示海藻酸钠浓度在 1.5%~3% 范围内所制备固定化菌体产 β -葡萄糖苷酶活力较

高, 当浓度为 3% 时酶活最高, 且凝珠机械强度很好。而海藻酸钠浓度在 1% 时凝胶机械强度弱并且菌体易泄漏。浓度大于 3% 时, 凝胶难以成珠, 拖尾现象严重。

2.3 CaCl_2 浓度对固定化菌体产 β -葡萄糖苷酶活力的影响

其它参数不变, 分别用 1% (A)、2% (B)、3% (C)、4% (D)、5% (E)、6% (F) CaCl_2 溶液制备海藻酸钠凝胶小球, 找出最适 CaCl_2 浓度。试验显示 CaCl_2 浓度在 6% 以下对固定化菌体产 β -葡萄糖苷酶活力影响很小, 且不呈规律性变化。但 CaCl_2 对凝胶的机械强度和表面强度影响较大, 1% 浓度 CaCl_2 溶液制得的凝珠机械强度不够大, 从而在重复发酵中易破碎; 3% 以上的 CaCl_2 溶液制得的凝胶壁厚, 空心小, 传质阻力大, 氧气难易供给, 所以选用 2% 的 CaCl_2 溶液制备凝胶, 机械强度与表面强度适中, 空心适中。

2.4 固化时间对固定化菌体产 β -葡萄糖苷酶活力的影响

其他参数不变, 分别在 CaCl_2 溶液中固化 1h (A)、2h (B)、3h (C)、4h (D)、5h (E)、6h (F)。实验显示, 固化时间在 6h 内对固定化菌体产 β -葡萄糖苷酶活力无显著影响, 且不呈规律性变化。

2.5 孢子浓度对固定化菌体产 β -葡萄糖苷酶活力的影响

其他参数不变, 用血球计数板计数分别制备 C (1.0×10^6 个/ml)、D (1.0×10^7 个/ml)、E (1.0×10^8 个/ml)、F (1.0×10^9 个/ml) 的孢子菌悬液, 用于海藻酸钠包埋, 找出最适菌悬液浓度。试验结果显示, 随着菌悬液浓度增大固定化细胞产 β -葡萄糖苷酶产量越高, 这是因为海藻酸钠凝胶小球内部的孢子由于存在传质阻力是无法萌发生长的, 故只有凝胶小球表层的孢子有充足的营养和氧气供给。

2.6 温度对固定化菌体产 β -葡萄糖苷酶活力的影响

菌体经固定化后最适温度较游离菌有所升高, 且在

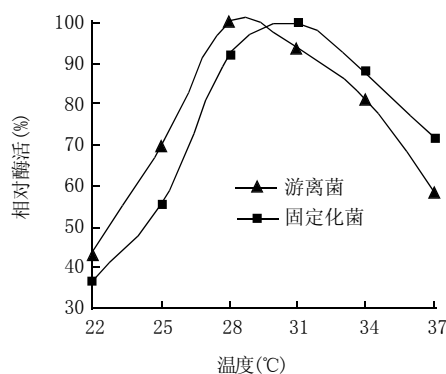


图3 温度对固定化菌体产 β -葡萄糖苷酶活力的影响
Fig.3 Effects of different temperature on β -glucosidase producing of immobilized *Trichoderma viride*

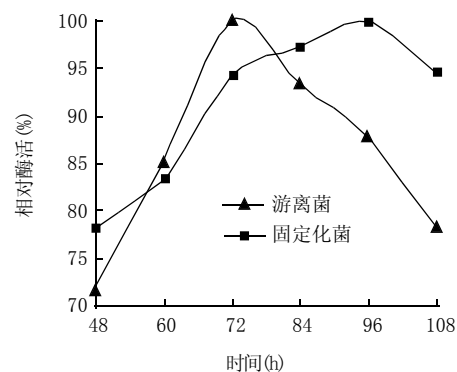


图4 发酵时间对固定化菌体产 β -葡萄糖苷酶活力的影响
Fig.4 Effects of different fermentation time on β -glucosidase producing of immobilized *Trichoderma viride*

温度较高时有比游离菌更高的酶活。说明载体在防止细胞中酶蛋白在高温下失活中起积极保护作用, 且固定化菌的结果增加了细胞中酶的稳定性。

2.7 发酵时间对固定化菌体产 β -葡萄糖苷酶活力的影响

发酵不同时间, 实验结果表现固定化菌比游离菌平衡期更长。这有助于提高 β -葡萄糖苷酶的产量, 这是由于海藻酸钠凝胶珠为固定化绿色木霉产 β -葡萄糖苷酶过程提供了稳定的基质和良好的生长环境。

2.8 培养基初期 pH 值对固定化菌体产 β -葡萄糖苷酶活力的影响

用盐酸调节培养基 pH 值, 其中 6 份每份加入 10g 海藻酸钠小球, 另外 6 份加入与固定量相同的菌悬液, 于 30°C、150r/min 摇床培养, 72h 后取出样品, 测定发酵液的酶活。实验表明固定化菌比游离菌表现出对培养基 pH 更高的适应性。

2.9 载体量对固定化菌体产 β -葡萄糖苷酶活力影响

取 6 份接种的发酵培养基, 加入不同质量海藻酸钠小球, 于 30°C、150r/min 摇床培养, 72h 后取出样品, 测定发酵液的酶活。固定化菌接入过多会导致发酵液黏

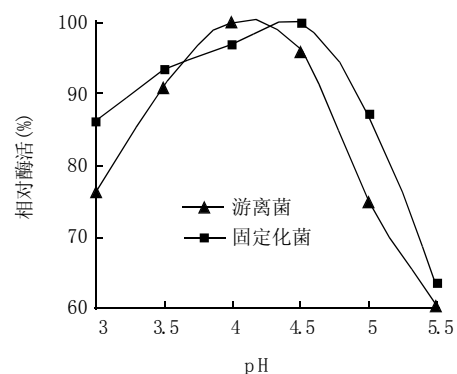


图5 pH 值对固定化菌体产 β -葡萄糖苷酶活力的影响
Fig.5 Effects of different pH on β -glucosidase producing of immobilized *Trichoderma viride*

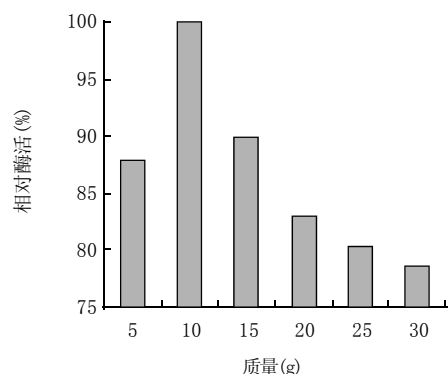


图6 载体量对固定化菌体产 β -葡萄糖苷酶活力的影响
Fig.6 Effects of different carrier quantity on β -glucosidase producing of immobilized *Trichoderma viride*

稠, 从而造成溶氧量下降和凝胶内传质阻力增大, 导致菌丝生长的平衡期提前, 相应地酶活力降低。

2.10 摇床速度对固定化菌体产 β -葡萄糖苷酶活力影响

取12份接种的发酵培养基, 其中6份每份加入10g海藻酸钠小球, 另外6份加入与固定量相同的菌悬液, 于30℃、不同速度摇床培养, 72h后取出样品, 测定发酵液的酶活。实验结果显示, 当摇床转速达到180r/min时固定化菌产 β -葡萄糖苷酶活力达到最高。而转速较低时, 固定化绿色木霉菌产酶的酶活则低于游离绿色木霉菌产酶酶活。这可能是由于绿色木霉是好氧菌, 在固定化的同时, 菌与空气的接触面积变小, 使酶活降低, 而较高的转速则可以在一定程度上弥补这点不足。

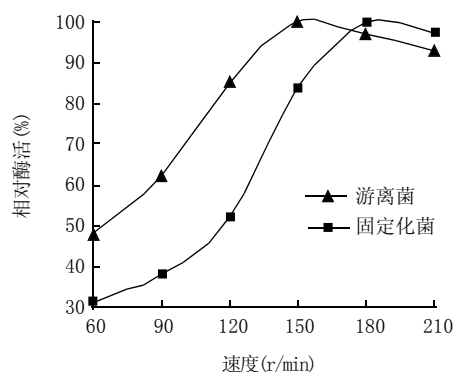


图7 摇床速度对固定化菌体产 β -葡萄糖苷酶活力的影响
Fig.7 Effects of different agitation rate on β -glucosidase producing of immobilized *Trichoderma viride*

2.11 固定化菌体的性质研究

2.11.1 固定化菌体的热稳定性

使用以上确立的最佳固定化条件制备固定化菌体然后在45℃下分别处理0h(A)、1h(B)、2h(C)、3h(D)、4h(E)、5h(F)后, 采用上述最佳发酵条件培养。试验结果显示, 固定化菌的热稳定性比游离菌好, 相同温度下, 固定化菌的酶活随时间变化不明显, 而游离菌的

酶活则在反应2h后急速下降。这是由于细胞的固定化减少了细胞酶的构型柔韧性, 所以固定化细胞比自由细胞具有较高的热稳定性。

2.11.2 固定化菌体的耐高温性

采用最佳固定化条件固定菌种, 分别在30℃(A)、35℃(B)、40℃(C)、45℃(D)、50℃(E)、55℃(F)下处理30min后, 采用上述最佳发酵条件培养。实验结果表明, 固定化细胞的最适温度高于游离细胞。固定化细胞比游离细胞更耐高温。当温度大于35℃时, 随温度升高, 游离细胞和固定化细胞的活性都有所降低, 但游离菌随温度升高, 活力急速下降, 而固定化细胞的最适温度范围则明显变宽, 说明将细胞固定在海藻酸钠凝胶中保护了细胞酶的结构, 使细胞酶免于因为环境因素产生构型变化。

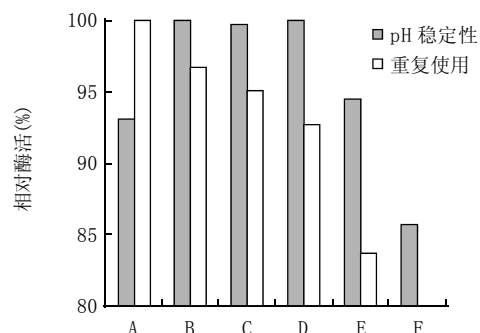


图8 固定化菌 pH 稳定性和重复使用
Fig.8 pH-stability and reusability of immobilized fungus

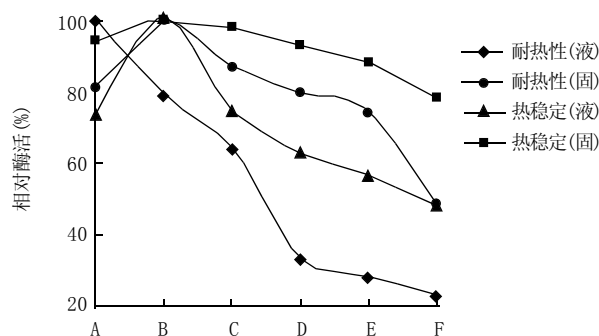


图9 固定化菌的耐热性和热稳定性
Fig.9 Heat-durability and thermal stability of immobilized fungus

2.11.3 固定化菌体的 pH 稳定性

其中5份10g海藻酸钠小球, 于30℃、150r/min摇床培养96h, 50ml/250ml接种的发酵培养基的三角瓶, 然后在不同pH下处理1h后, 发酵培养基中培养96h, 测定发酵液酶活。

2.11.4 海藻酸钠凝胶重复使用对固定化菌体产 β -葡萄糖

蜂蜜·乳酸发酵过程中相关酶活力的研究

周先汉, 李皖光, 许贵强
(合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽 合肥 230009)

摘 要: 乳酸菌能以蜂蜜为碳源、脱脂乳粉为氮源进行发酵, 产生对人体有益的乳酸, 而保留了蜂蜜中其他的营养成分和特殊风味。本实验通过测定发酵过程中蔗糖转化酶、葡萄糖氧化酶、 β -半乳糖苷酶的活力, 研究了其对还原糖转化率的影响。实验表明, 在发酵时间为 4.0 h, 蜂蜜添加量为 8%, 接种量为 3% 时, 相应的蔗糖转化酶活力为 23.845 mg/g·h, 葡萄糖氧化酶活力为 10.621 μ g/g·0.5h, β -半乳糖苷酶活力为 1.211 μ g/ μ mol·min, 该条件下的还原糖转化率为 44.34%, 产品品质最佳。

关键词: 蜂蜜; 乳酸; 蔗糖转化酶; 葡萄糖氧化酶; β -半乳糖苷酶

Study on Activity of Enzymes Effecting on Honey Fermentation

ZHOU Xian-han, LI Wan-guang, XU Gui-qiang
(School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract: Honey and milk powder could be used by lactobacillus to make honey fermentation sour milk which reserve the nutrition components and flavor of honey. Meanwhile, it was also a new path to exploit the honey. The experiment studied the activity of invertase, glucose oxidase and β -galactosidase and the influence of enzymatic activity on the reducing sugar conversion rate. We got the optimal conditions: the time is 4.0h, the honey was 8% and the inoculation was 3%. Accordingly, the activity of invertase was 23.845 mg/g·h; the activity of glucose oxidase was 10.621 μ g/g·0.5h and the activity of β -galactosidase was 1.211 μ g/ μ mol·min; the reducing sugar conversion rate was 44.34%. In this condition, we got the best product.

Key words honey; lactic acid; invertase; glucose oxidase; β -galactosidase

中图分类号: TS252.54

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)12-0323-05

收稿日期: 2007-08-26

作者简介: 周先汉(1959-), 男, 副教授, 研究方向为蜂产品深加工。

糖苷酶活力影响

前 4 批的产酶发酵中固定化绿色木霉产 β -葡萄糖苷酶活力略显下降趋势, 但还是保持很高的水平。此后的发酵培养中, 酶活力明显下降, 但保持在 75% 以上。这是由于发酵次数增多, 凝胶小球受发酵液中离子腐蚀效应增加, 机械强度下降, 菌体泄漏, 使产酶能力衰退。所以固定化绿色木霉产 β -葡萄糖苷酶发酵次数应控制在 5 次内。

3 结 论

综上所述, 对于海藻酸钠包埋绿色木霉方法简便, 成本低廉, 操作简单。固定化细胞机械性能好, 更加耐热和耐酸, 其稳定性显著提高能满足工业应用要求。

参考文献:

- [1] 王建荣, 张曼夫, 黄涛. 绿色木霉纤维素酶CBH II基因的结构研究[J]. 遗传学报, 1995, 22(1): 74-80.
- [2] 曾家豫, 冯克宽, 刘国安, 等. 纤维素酶制备工艺的研究[J]. 甘肃农业科技, 2000(4): 46-47.
- [3] 林开江, 阮丽娟, 王龙英. 用玉米粉生产纤维素酶的发酵工艺探讨[J]. 生物技术, 1998, 8(2): 31-34.
- [4] 汪龙飞, 沈群. 海藻酸钠凝胶包埋乳酸乳球菌沉淀绿豆淀粉的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(1): 147-150.
- [5] SPAGNA G, BARBAGALLO R N, PIFFERI P G, et al. Stabilization of a β -glucosidase from *Aspergillus niger* by binding to an amine agarose gel[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2000(11): 63-69.
- [6] GARGOURI M, SMAALI I, MAUGARD T, et al. Fungus β -glycosidases: immobilization and use in alkyl- β -glycoside synthesis[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2004, 29: 89-94.