

## 海藻酸钙固定化对 *Xanthomonas campestris* 206 冰核活性的影响\*

刘 健 陈庆森

(天津商学院生物工程系, 天津, 300134)

**摘 要** 应用正交法研究了海藻酸钙固定化对 *Xanthomonas campestris* 206 冰核活性的影响。结果表明, 对固定化小球冰核活性影响程度大小的顺序依次为: 菌悬液用量 > 海藻酸钠用量 >  $\text{CaCl}_2$  浓度 > 固化时间, 而对渗漏量影响程度大小的顺序依次为: 菌悬液用量 > 固化时间 >  $\text{CaCl}_2$  浓度 > 海藻酸钠用量。研究中还发现, 将冰核活性细菌固定化在热稳定性方面实际意义不大。

**关键词** *Xanthomonas campestris*, 海藻酸钙, 固定化, 冰核活性

冰核活性细菌(ice nucleation active bacteria, 简称 INA 细菌)广泛附生于植物表面(尤其是叶表面), 它是一类在  $-2^\circ\text{C} \sim -5^\circ\text{C}$  条件下催化诱发植物体内水分产生冰核而引起霜冻的细菌<sup>[1]</sup>。*Xanthomonas campestris* 206 冰核活性细菌作为我们实验室分离的新菌株, 是具有冰核活性的黄单胞菌属微生物, 具有生长速度快、冰核活性强等优点。根据日本厚生省鉴定, 该属菌急慢性毒性很低, 可以用于食品工业<sup>[2]</sup>。因此, 该菌株可能开发成一种很有前途的工业用菌株。

Watanabe 等(1989)对冰核活性细菌的固定化做了初步研究。他们试用了 2 种方法, 1 种是将 INA 细胞悬液放入玻璃纸试管中, 试管放入  $-5^\circ\text{C}$  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 1 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<sup>[3]</sup>。但以上这些研究没有探讨制备海藻酸钙凝胶的最佳反应条件。我们通过对冰核活性黄单胞菌用海藻酸钙包埋的技术进行初步探讨, 以期为

冰核活性细菌在冷冻浓缩中的应用提供依据。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材 料

##### 1.1.1 菌 种

*Xanthomonas campestris* 206 冰核活性细菌(本实验室从天津地区蔬菜表面分离)。

##### 1.1.2 磷酸缓冲液

配制 pH 7.0 的磷酸缓冲液。配制方法见参考文献[4]。

##### 1.1.3 培养基

NAG 培养基: 牛肉浸膏 3.0 g/L, 蛋白胨 5.0 g/L, 甘油 25.0 g/L, pH 7。

#### 1.2 实验方法

##### 1.2.1 培养方法

活化 206 斜面接 NAG 种子液中某温度下培养 24 h, 以 2% 的接种量接入 NAG 发酵液中,  $23^\circ\text{C}$  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,  $4^\circ\text{C}$ , 20 min)离心后用磷酸缓冲液(pH 7.0)彻底洗 2 遍, 再用与湿菌体等重的磷酸缓冲

第一作者 硕士研究生。

\* 国家自然科学基金资助项目(No.39770580)

收稿时间 2002-05-11

液(pH 7.0)重新悬浮,得到菌悬液,4℃冰箱中保存备用。

### 1.2.3 包埋方法

将菌悬液和海藻酸钠加蒸馏水配成 50 mL 一定浓度混合物,混匀,逐滴滴入一定浓度的  $\text{CaCl}_2$  溶液中,形成大小均匀的固定化小球,固化一段时间后取出,总质量约 50 g,4℃冰箱中悬浮保存备用。

### 1.2.4 冰核活性的测定方法

游离冰核活性细菌的冰核活性测定方法见参考文献[5,6]。

固定化冰核活性细菌的冰核活性测定方法为:将 3 个固定化好的小球放入 250 mL 锥形瓶内,加入 10% 的蔗糖溶液 30 mL,然后放入 -3℃ 的恒温冰柜内,通过测定锥形瓶内未冻的液体的量来判断产生的冰的质量。

### 1.2.5 渗漏量的检测方法

将 3 个固定化小球放在 300 mL 蒸馏水中,用磁力搅拌装置以 180 r/min 的速度搅拌 1 h 后,测定该蒸馏水的冻滴率。

### 1.2.6 热稳定性检测方法

将固定化小球分别在 32、35、38、41 和 44℃ 的环境中水浴 5 min,然后用 1.2.4 的方法测定冰核活性。

### 1.3 对不同反应条件的影响进行的实验设计

采用  $L_9(3^4)$  正交表对固定化条件进行分析,并以此为依据用 9 种不同方法制造出固定化小球。

表 1 正交实验设计固定化条件因素水平表

水平	菌悬液用量 /mL A	海藻酸钠 用量/g B	$\text{CaCl}_2$ 浓度 /mol·L <sup>-1</sup> C	反应时间 /h D
1	0.3	1	0.1	0.5
2	0.5	2	0.2	1
3	1.0	3	0.3	2

## 2 实验结果与分析

### 2.1 对冰核活性的考察

用 Vali 法测定获得的菌悬液的活性,为 -3℃ 下 1 min 的冻滴率为 86.7%。

表 2 不同固定化条件对冰核活性的影响

序号	菌悬液用量/mL	海藻酸钠用量/g	$\text{CaCl}_2$ 浓度/mol·L <sup>-1</sup>	固化时间/h	2 h 产生的冰的质量/g
1	I(0.3)	I(1)	I(0.1)	I(0.5)	13.2
2	1	Ⅱ(2)	Ⅱ(0.2)	Ⅱ(1)	14.5
3	1	Ⅲ(3)	Ⅲ(0.3)	Ⅲ(2)	12.1
4	Ⅱ(0.5)	1	2	3	15.0
5	2	2	3	1	14.1
6	2	3	1	2	14.5
7	Ⅲ(1.0)	1	3	2	15.4
8	3	2	1	3	16.0
9	3	3	2	1	14.9
I	39.8	43.6	43.7	42.2	
Ⅱ	43.6	44.6	44.4	44.4	
Ⅲ	46.3	41.5	41.6	43.1	
R	6.5	3.1	2.8	2.2	

从表 2 中极差 R 的大小可以得出各因素影响的显著性。极差最大的因素是 A,依次分别是 B、C 和 D,即对固定化小球冰核活性影响程度大小的顺序依次为菌悬液用量 > 海藻酸钠用量 >  $\text{CaCl}_2$  浓度 > 固化时间。对于制备 50 g 固定化小球,从冰核活性角度考

虑,各因素的较优水平是菌悬液用量 1 mL,海藻酸钠用量 2 g, $\text{CaCl}_2$  浓度 0.1 mol/L,固定化时间 2 h。菌悬液用量较大,使每个小球包埋菌量增大,表现出较高的冰核活性。不同的海藻酸钠用量、 $\text{CaCl}_2$  浓度和固化时间对固定化小球表面的高分子海藻酸钙的微观

结构产生影响,形成不同的分子间隙,从而对水分子形成大型冰分子的难易产生影响。

## 2.2 对渗漏量的考察

依表 3 所示,极差最大的因素是 A,依次分别是 D、C 和 B,即对固定化小球渗漏量影响程度大小的顺序依次为菌悬液用量>固化时间>CaCl<sub>2</sub> 浓度>海藻酸钠用量。对于制备 50 g 固定化小球,从减少渗漏角度考虑,

各因素的较优水平是菌悬液用量 0.3 mL,海藻酸钠用量 3 g, CaCl<sub>2</sub> 浓度 0.3 mol/L,固化时间 2.0 h。菌悬液用量较大,使每个小球包埋菌量增大,渗漏出菌体的概率也增加。增大海藻酸钠用量、CaCl<sub>2</sub> 浓度和固化时间可以使固定化小球表面的高分子海藻酸钙的微观结构变得致密,形成较小的分子间隙,从而限制菌体的渗出,延长固定化小球的使用半衰期。

表 3 不同固定化条件对渗漏量的影响

序 号	菌悬液用量/mL	海藻酸钠用量/g	CaCl <sub>2</sub> 浓度/mol·L <sup>-1</sup>	固化时间/h	上清液的冻滴率/%
1	I(0.3)	I(1)	I(0.1)	I(0.5)	63.3
2	1	Ⅱ(2)	Ⅱ(0.2)	Ⅱ(1)	76.7
3	1	Ⅲ(3)	Ⅲ(0.3)	Ⅲ(2)	50.0
4	Ⅱ(0.5)	1	2	3	66.7
5	2	2	3	1	70.0
6	2	3	1	2	80.0
7	Ⅲ(1.0)	1	3	2	76.7
8	3	2	1	3	80.0
9	3	3	2	1	76.7
I	190.0	206.7	223.3	210.0	
Ⅱ	216.7	226.7	220.1	233.4	
Ⅲ	233.4	206.7	196.7	196.7	
R	43.4	20	26.6	36.7	

## 2.3 对热稳定性的考察

从图 1 可以看出,冰核活性细菌固定化以后,热稳定性只提高了 5℃ 左右(游离冰核活性细菌最高耐受温度一般为 30~33℃),因此固定化冰核活性细菌在热稳定性方面实际意义不大。对于制备 50 g 固定化小球,从热稳定性角度考虑,各因素的较优水平是菌悬液用量 1 mL,海藻酸钠用量 4 g, CaCl<sub>2</sub> 浓度 0.2 mol/L,固化时间 0.5 h。经 44℃ 处理后所有样品全部失去冰核活性,故未在图 1 列出。

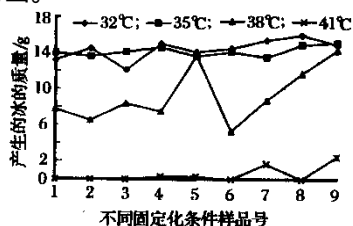


图 1 经过不同温度处理以后冰核活性的变化

## 3 讨论与小结

冰核活性细菌的冰核活性及其在冷冻浓缩中的可能应用已成为冷冻浓缩技术领域一个新的研究热点。更突出的是,使用冰核蛋白进行冷冻浓缩可以更好的保持食品原有风味,因此在食品冷冻浓缩领域具有广阔的开发前景<sup>[7,8]</sup>。利用海藻酸钙固定化技术将冰核活性细菌包埋,从而加以重复利用是该领域发展的新方向。本文对冰核活性黄单胞菌 *Xanthomonas campestris* 206 用海藻酸钙包埋的技术细节进行了初步的探讨,为冰核活性细菌在冷冻浓缩中的应用提供了依据。

对固定化小球冰核活性影响程度大小的顺序依次为菌悬液用量>海藻酸钠用量>CaCl<sub>2</sub> 浓度>固化时间,而对渗漏量影响程度大小的顺序依次为菌悬液用量>固化时间>CaCl<sub>2</sub> 浓度>海藻酸钠用量。研究中还发现,与一般的细胞固定化不同,将冰核活性细

菌固定化在热稳定性方面实际意义不大。实验结果所得到的冰核活性还有待提高,渗漏量还有待控制,因此冰核活性细菌的固定化方法还需要有较大改进。

### 参 考 文 献

- 1 Maki R L, Galyan E L. Appl. Microbiol. ,1994 , 28 :456~459
- 2 Watanabe M, Watanabe J. Biosci. Biotech. Biochem. ,1994 58(1) 64~66

- 3 Watanabe M, Arai E, Kumeno K et al. Agric. Biol. Chem. ,1991 58 2 175~2 176
- 4 诸葛健,王正祥. 工业微生物实验技术手册,北京:中国轻工出版社,1997. 684
- 5 Vali G J. Atmos. Sci. ,1971 28 402~409
- 6 Lindow S E. Phytopathology ,1978 ,68 :5 213 ~ 5217
- 7 Michiko Watanabe, Soichi Arai. Journal of Food Engineering ,1994 22 453~473
- 8 Michiko Watanabe Jun Watanabe, Keiko Kumeno et al. Agric. Biol. Chem. ,1989 53(10) 2 731~2 735

## Effect of Calcium Alginate Immobilization on Ice Nucleation Activity of *Xanthomonas campestris* 206

Liu Jian Chen Qingsen

(Department of Biological Engineering, Tianjin University of Commerce, Tianjin, 300400)

**ABSTRACT** The effect of calcium alginate immobilization on ice nucleation activity of *Xanthomonas campestris* 206 was studied by orthogonal method. The results showed that the order of importance to ice nucleation activity should be dosage of bacterium>dosage of sodium alginate>concentration of  $\text{CaCl}_2$ >time of immobilization. However, the order of importance to leakage should be dosage of bacterium>time of immobilization>concentration of  $\text{CaCl}_2$ >dosage of sodium alginate. It also found little practical significance in thermal stability by immobilization.

**Key words** *Xanthomonas campestris*, calcium alginate, immobilization, ice nucleation activity

## 世界 12 大啤酒酿造、麦芽制造公司

据 Malteurop 报道,截至 2002 年 3 月底,世界 12 大啤酒酿造公司及 12 大麦芽制造公司(麦芽公司和啤酒公司的麦芽厂)排名依次如表 1 表 2。

表 1 世界 12 大啤酒酿造公司

啤酒公司	产量 $\times 10^{-8}/\text{L}$	发展区域
Anheuser-Busch(美国)	155	欧洲、南美洲、中国
Interbrew(比利时)	90	世界
Heineken(荷兰)	88	世界
AmBev(巴西)	63	南美洲
S. A. B.(英国)	60	非洲、中欧、中国、中美洲
Carlsberg(丹麦)	54	西欧和中欧
Miller(美国)	52	美国
Scottish&Newcastle(英国)	37	西欧和中欧
Model(墨西哥)	36	墨西哥
Kirin(日本)	35	亚太地区
Foster's(澳大利亚)	29	—
Guinness(爱尔兰)	27	—

表 2 世界 12 大麦芽制造公司

麦芽公司	2000~2001 年产量 (估计数) $\times 10^4$
Souffle(法国)	1 273 000
Cargill(美国)	1 250 000
Conagra(美国)	1 240 000
Malteurop(法国)	946 000
IMC(法国)	750 000
Greencore(爱尔兰)	660 000
Rahr(美国)	530 000
Weissheimer(德国)	510 000
Heineken(荷兰)	450 000
AmBev(巴西)	410 000
Anheuser-Busch(美国)	400 000
GMC/Ningbo(中国)	400 000