

## 超声波促进高纤椰果发酵的研究

邓毛程<sup>1</sup>, 吴亚丽<sup>1</sup>, 梁世中<sup>2</sup>

1(广东轻工职业技术学院, 广东 广州, 510300) 2(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东 广州, 510640)

**摘 要** 为了提高高纤椰果发酵产量, 在浅层静态发酵过程中尝试加载超声波, 研究了超声波处理条件对高纤椰果发酵的影响。结果表明, 适宜的超声波处理条件对高纤椰果发酵有促进作用, 利用超声波(400 W, 28 kHz)从发酵 48h 开始进行处理, 每次处理时间为 180 s, 每隔 1.5 h 处理 1 次, 发酵 240 h, 纤维素干重可达到 1.88 g, 比空白实验提高了 20.5%。

**关键词** 高纤椰果, 超声波, 细菌纤维素, 静态发酵

高纤椰果的英文名称为“nata de coco”, 是一种优良的高纤维食品, 具有减肥、清肠胃、防便秘等保健功能。它是以椰子水为主要原料的培养液经产膜醋酸菌静态发酵, 在液体表面形成富含细菌纤维素的凝胶膜状物<sup>[1]</sup>。关于高纤椰果和细菌纤维素的发酵机理及条件, 国内外许多研究人员已进行了大量研究<sup>[2~5]</sup>, 其中醋酸菌属的木醋杆菌是目前研究最多、产量最高的细菌。现已发现, 木醋杆菌细胞侧有 1 列 50~80 个轴向排列小孔, 在适宜条件下每个细胞在 1 s 内能够聚合 200 000 个葡萄糖分子形成葡聚糖, 从小孔分泌出来并形成纤维素微纤丝, 随着分泌量的持续增加, 微纤丝之间通过氢键连接形成带状纤维素<sup>[6,7]</sup>。

近年来, 声学技术积极向生命科学领域渗透<sup>[8]</sup>, 众多研究者开展了超声波在生物工程中的应用研究, 研究表明, 超声波的空化作用和机械作用可增加细胞膜的通透性, 改善细胞内外的传质过程, 应用于微生物发酵中可提高代谢产物产量<sup>[9~13]</sup>。细菌纤维素合成是一个极其复杂的生化过程, 受到诸多因素的调控, 为了促进带状纤维素在细胞外的积累, 文中尝试采用超声波处理发酵过程中的木醋杆菌, 并研究了超声波处理条件对高纤椰果发酵的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与设备

菌种: *Acetobacter xylinum* YD0705, 由海南亿德食品有限公司提供。

椰子水: 成熟椰子(海南文昌产)破壳取水; 蔗糖、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4$ 、 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{FeSO}_4$ 、 $\text{NaAC}$ 、

$\text{NaOH}$ 、玉米浆、营养琼脂等; 市售。

DNP-9162 电热恒温培养箱: 上海精宏实验设备有限公司; HWY211 恒温振荡培养箱: 上海致诚分析仪器有限公司; DHG9140 电热恒温干燥箱: 上海基玮试验仪器设备公司; KQ-400KDE 超声波清洗器: 江苏省昆山市超声波仪器有限公司。

### 1.2 培养基

#### 1.2.1 固体培养基

营养琼脂 33 g, 椰子水 500 mL, 自来水 500 mL, 自然 pH 值, 121℃ 灭菌 20 min。

#### 1.2.2 液体培养基<sup>[2]</sup>

蔗糖 70 g/L,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  4 g/L,  $\text{MgSO}_4$  0.2 g/L,  $\text{CaCl}_2$  0.2 g/L,  $\text{FeSO}_4$  0.005 g/L,  $\text{NaAC}$  0.1 g/L, 酵母膏 0.5 g/L, 椰子水 500 mL, 自来水 500 mL, 调节 pH 5.5, 121℃ 灭菌 20 min。

### 1.3 高纤椰果发酵

#### 1.3.1 发酵工艺流程

斜面培养→1000 mL 三角瓶振荡培养→250 mL 烧杯静态发酵。

#### 1.3.2 菌种扩大培养

试管斜面接种后, 置于培养箱恒温 30℃ 培养 48~60 h, 至斜面上长出较薄菌苔即可; 取 1000 mL 三角瓶装入 200 mL 液体培养基, 8 层纱布包扎瓶口, 灭菌, 冷却后接入 1 环斜面菌种, 恒温 30℃、150 r/min 振荡培养 12 h, 备用。

#### 1.3.3 浅层静态发酵

取 250 mL 烧杯装入 120 mL 液体培养基, 8 层纱布包扎烧杯口, 灭菌, 冷却后接入 1.3.2 所得摇瓶培养液 30 mL, 置于培养箱恒温 30℃ 静止发酵 240 h。

### 1.4 超声波处理

#### 1.4.1 细胞存活率试验

第一作者: 硕士, 高级工程师。

收稿日期: 2007-09-13, 改回日期: 2007-10-25

高纤椰果静止发酵 24 h 后,将 250 mL 烧杯置于冰水浴中,用超声波处理发酵液,其作用参数为:功率为 400 W,频率为 28 kHz,作用时间为 0~480 s。处理后,立即吸取发酵液进行稀释,涂布平板,将平板置于培养箱内恒温培养 72 h,然后进行菌落计数。以空白为对照,计算不同处理时间下的细胞存活率:

$$\text{存活率}/\% = \frac{\text{处理样品的平板菌落数}}{\text{对照样品的平板菌落数}} \times 100$$

#### 1.4.2 不同处理剂量的产量对比试验

从发酵 24 h 开始,按 1.4.1 方法用超声波处理高纤椰果发酵液,根据细胞存活率试验结果,选择存活率为 100% 的一系列处理时间分别作为不同处理剂量,每隔 2 h 处理 1 次,至发酵 240 h 结束,然后取出各种剂量处理后的纤维素膜测定纤维素干重,以空白为对照,比较各处理剂量的高纤椰果产量。

#### 1.4.3 不同发酵阶段进行处理的产量对比试验

分别从发酵 0、12、24、36、48、60、72 h 开始,按 1.4.1 方法用超声波处理发酵液,采用 1.4.2 中高纤椰果产量最高的处理时间,每隔 2 h 处理 1 次,至发酵 240 h 结束,测定各种起始处理时间的纤维素干重。

#### 1.4.4 不同间隔时间进行处理的产量对比试验

选择 1.4.3 中起始处理的最佳发酵阶段,采用 1.4.2 中最佳的处理时间,按 1.4.1 方法用超声波处理发酵液,分别每隔 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h 处理 1 次,至发酵 240 h 结束,测定各间隔时间处理所得纤维素干重。

### 1.5 纤维素干重的测定

高纤椰果持水性极强,以湿重衡量其产量误差较大,需以纤维素干重进行比较。测定时,取出浮于液面的高纤椰果,用大量水冲洗,去除表面的培养基等杂质,再将其浸泡于 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液中,100℃ 煮沸 20 min,去除残留在内部的菌体和培养基<sup>[14]</sup>;然后,用蒸馏水洗涤、浸泡,使浸泡水 pH 值达 7.0~7.2,置于 105℃ 干燥至恒重,称重可得纤维素干重<sup>[15]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 细胞存活率试验结果

细胞存活率试验结果如图 1 所示。超声波处理时间直接影响到细胞存活率,超声波处理 0~210 s 时的细胞存活率为 100%,处理超过 210 s,细胞存活率随处理时间延长而逐渐下降。这说明,适宜的超声

波处理剂量不会使细胞致死,故可选择 0~210 s 作为进一步试验的处理时间。

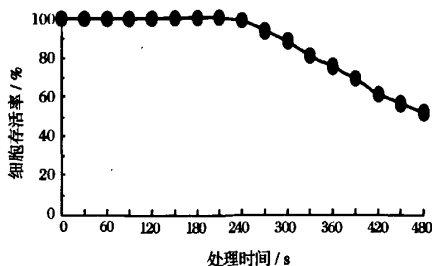


图1 超声波处理的细胞存活率

### 2.2 不同超声波处理剂量对高纤椰果产量的影响

超声波从多方面影响高纤椰果发酵:第1,超声波的空化作用可破坏细胞膜结构,从而提高细胞膜的通透性,有利于细胞对氧和营养物质的吸收,也有利于代谢物质分泌于胞外;第2,超声波的振动作用可增强液态介质的质点运动,这对于反应物进入酶生物催化的活性部位及其产物进入介质中的传质作用有利<sup>[9]</sup>;第3,高纤椰果发酵是好氧性发酵,浅层静态发酵中的气液接触面积、装液高度、纤维素膜厚度等都影响到溶氧,而采用超声波处理可以使纤维素膜疏松和菌体分散,有利于纤维素膜表面的氧气传递以及菌体对溶氧的吸收,从而有利于纤维素合成量。

从发酵 24 h 开始,采用超声波对发酵液进行处理,处理时间选择在 0~210 s,每次处理间隔时间为 2 h,在各种处理剂量下的发酵结果如图 2 所示。

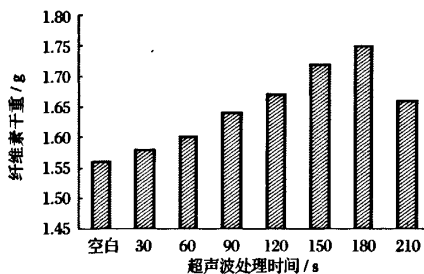


图2 各种处理剂量下的纤维素干重

图 2 表明,在 0~180 s 处理时间范围内,纤维素干重随处理时间增加而增加,将处理时间增加至 210 s,纤维素干重反而下降。这说明超声波处理时间会影响高纤椰果产量,若超声波处理时间过短,促进高纤椰果发酵的效果不明显;若超声波处理时间过长,虽然没有达到致死剂量,但对细胞膜损伤程度严重时,会导致高纤椰果产量下降。本试验中,处理时间为 180 s 时的纤维素干重最高,宜选为进一步试验的

超声波处理剂量。

### 2.3 不同发酵阶段开始超声波处理对高纤维素椰果产量的影响

从不同发酵阶段开始进行超声波处理,每次处理时间为 180 s,每次处理间隔时间为 2 h,其发酵结果如图 3 所示。细菌纤维素发酵属于部分生长偶联型<sup>[14]</sup>,在细胞生长期基本无产物形成,在产物生成期产物高速形成。因此,采用超声波对不同发酵阶段的发酵液处理,其效果是不一样的,起始处理时间过早会影响细胞生长,起始处理时间过迟会延误促进作用,适宜选择处理时间在纤维素高速形成初期。从图 3 可以看出,高纤维椰果产量较高的起始处理时间为发酵 36~60 h,其中,起始处理时间为发酵 48 h 的高纤维椰果产量最高,可达 1.84 g,故可选择发酵 48 h 作为进一步试验的起始处理时间。

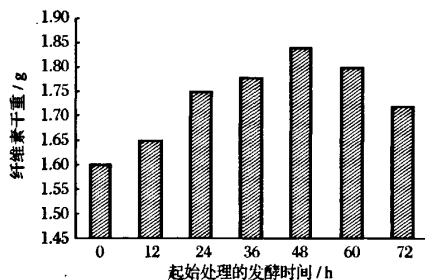


图 3 不同起始处理时间下的纤维素干重

### 2.4 不同间隔时间对高纤维素椰果产量的影响

从发酵 48 h 开始,采用超声波对发酵液进行处理,每次处理时间为 180 s,处理间隔时间分别为 0.5、1.0、1.5、2.0 和 2.5 h,其发酵结果如图 4 所示。

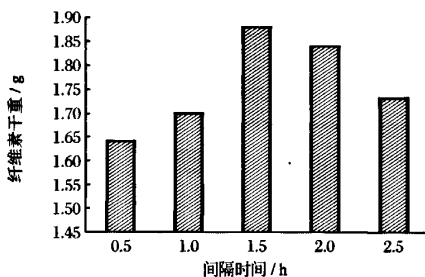


图 4 不同间隔时间下的纤维素干重

采用不致死剂量的超声波处理发酵液时,解除超声波后,细胞具有细胞膜修复能力,但需要一定的时间,故处理间隔会影响高纤维椰果产量。从图 4 可以看出,超声波处理间隔时间为 1.5 h 时的高纤维椰果产量最大,其纤维素干重达到 1.88 g,比不经超声波处理的发酵提高了 20.5%;若处理间隔小于 1.5 h,间隔

愈短,高纤维椰果产量愈小,说明了间隔过短会影响细胞的正常生理活动;若处理间隔大于 1.5 h,超声波的促进效应随处理间隔时间增大而减弱,说明了间隔过长不利于保持细胞膜的良好通透性。因此,间隔 1.5 h 适宜。

## 3 结 论

采用超声波对高纤维椰果浅层静态发酵过程中的发酵液进行处理,处理时的发酵期、处理时间以及间隔时间对高纤维椰果产量均有影响。在本文的实验条件下,从发酵 48 h 开始,采用超声波(400 W, 28 kHz)间歇处理高纤维椰果发酵液,每次处理 180 s,处理间隔时间为 1.5 h,使高纤维椰果产量提高了 20.5%。结果表明,适宜的超声波处理条件对高纤维椰果发酵有促进作用,但应用于工业生产仍需解决许多问题,这是进一步研究的方向。

## 参 考 文 献

- 黄 艳,李从发,汪全伟,等. 红曲椰果液态发酵工艺条件的优化[J]. 食品研究与开发,2006,27(8):120~123
- 刘四新,李枚秋,方仲根. 椰子纳塔发酵条件研究[J]. 食品与发酵工业,1999,25(1):36~39
- 齐香君,荷金霞,辛俊亮,等. 细菌纤维素合成菌株发酵条件的考察[J]. 食品与发酵工业,2004,30(7):90~93
- 杨礼富. 细菌纤维素研究新进展[J]. 微生物学通报,2003,30(4):95~98
- 马 霞,王瑞明,关凤梅,等. 发酵生产细菌纤维素的研究进展[J]. 中国酿造,2002,122(6):5~6
- 施庆珊. 细菌纤维素的研究进展[J]. 生物学杂志,2004,21(5):12~15
- 马 霞,王瑞明,关凤梅,等. 细菌纤维素生物合成的酶系统及其调控体系[J]. 食品研究与开发,2005,26(5):75~77
- Garuin L. US universities create bridges between physics and biology[J]. Nature, 1999, 397: 3
- 时兰春,王伯初,杨艳红,等. 低强度超声波在生物技术中应用的研究进展[J]. 重庆大学学报,2002,25(10):139~142
- 卢 群,刘晓艳,丘泰球,等. 超声对酵母细胞膜通透性的影响[J]. 食品与发酵工业,2005,31(9):14~17
- 于淑娟,高大维,李国基,等. 超声波催化米曲霉发酵酱油的研究[J]. 中国调味品,1999,11:18~20
- 杨胜利,王金宇,杨海麟,等. 超声波处理对红曲色素产量的影响[J]. 无锡轻工大学学报,2003,22(1):99~101
- 戴传云,王伯初. 低功率超声波对微生物发酵的影响[J]. 重庆大学学报,2003,26(2):15~21
- 马 霞,蔡可文,王瑞明,等. 木醋杆菌 M12 静态发酵生产细菌纤维素的动力学模型的建立[J]. 氨基酸与生物资源,2004,26(4):27~29
- 熊 泽,邵 伟,吴 炜. 细菌纤维素合成动力学模型的构建[J]. 三峡大学学报(自然科学版),2005,27(3):267~269

## Study on Ultrasonic Waves Promoted Fermentation of Nata de Coco

Deng Maocheng<sup>1</sup>, Wu Yali<sup>1</sup>, Liang Shizhong<sup>2</sup>

1(Guangdong Industry Technical College, Guangzhou 510300, China)

2(College of Bioscience and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**ABSTRACT** The effects of ultrasonic waves on nata de coco fermentation process was studied and different parameters were evaluated during shallow static fermentation of nata de coco. The results indicated that ultrasonic waves could promote the fermentation production of nata de coco under appropriate conditions. When ultrasonic waves (400 w, 28 kHz) was employed, the most appropriate conditions were determined: the first fermentation undergone 48h, the ultrasonic waves is employed 180s at every 1.5 hours. Under the above mentioned conditions, the dry bacterial cellulose of fermentation 240h was up to 1.88 g, which was improved by 20.5 % compared with the control.

**Key words** nata de coco, ultrasonic waves, bacterial cellulose, static fermentation

信息窗

## “仪器厂商售后服务满意度”网上调查正式展开

由仪器信息网 [www.instrument.com.cn](http://www.instrument.com.cn) 主办,中国分析测试协会、中国仪器仪表学会分析仪器学会协办的“仪器厂商售后服务满意度”网上调查于2007年11月29日全面展开,将于2008年2月20日结束投票。本次调查是配合“仪器信息网2007年度评选活动”而进行的,旨在全面了解中国仪器市场上仪器厂商售后服务的情况,以促进更多的仪器厂商提升售后服务水平,进而带动和引导仪器行业持续、稳定、和谐地发展。

本次调查涉及的近100家候选仪器厂商均为业界佼佼者,是仪器信息网年度评选委员会根据“仪器厂商2007年网上受关注程度”(根据留言数、点击量、搜索率等加权计算),经过层层筛选最终得出的。调查采取网上投票的方式,将从仪器厂商的服务响应速度、服务态度、服务水平、服务价格及耗材配件的价格等几方面对仪器厂商的售后服务进行评价,调查结束后,本网将根据投票结果分别评出售后服务满意度较高的国外厂商和国内厂商,作为“仪器信息网2007年度评选活动”的结果之一,并将在2008年3月11日的颁奖典礼上颁发相应奖项。

另外,调查结束时还将从投票人中抽取:一等奖1名,奖励价值1000元奖品;二等奖5名,奖励价值500元奖品;三等奖30名,奖励价值100元奖品;纪念奖100名,赠送价值20元的本网小礼品。仪器信息网注册VIP用户的有效投票都将获得50积分的奖励。届时将在仪器信息网和相关媒体上公布获奖者名单。

欢迎广大仪器用户积极参与本次调查,捍卫您的权益,共同推动仪器行业的健康发展,同时可能还有一份幸运等着您!

参与调查请访问: <http://serviceDC.instrument.com.cn>。仪器信息网年度评选委员会热线服务电话:010-51654077

Email: [editor@instrument.com.cn](mailto:editor@instrument.com.cn) (仪器信息网 [www.instrument.com.cn](http://www.instrument.com.cn) 供稿)

信息窗

## 苦瓜降糖研究取得重大进展

中国科学院上海药物研究所与澳大利亚加尔文(Garvan)医学研究所合作,日前从苦瓜中发现了数个具有治疗糖尿病应用前景的活性化合物成分。双方共同的研究结果发表在最新一期的国际知名学术期刊《化学与生物学》杂志上。

近代对苦瓜化学成分及其药理活性研究颇多,但是其中主要的降糖活性化学物质及其作用机理一直未明确。中科院上海药物研究所叶阳研究员课题组认真总结文献和前人研究结果,通过多年探索,从苦瓜中分离和鉴定了一系列新的天然化学成分,并与加尔文研究所合作,在细胞和动物水平上首次明确了植物中的这些天然成分具有降低血糖的活性。

对化合物的降糖作用机制研究表明,这些化合物能激活体内与能量代谢相关的一个重要蛋白——单磷酸腺苷活化蛋白激酶(AMPK),该蛋白具有调控人体能量代谢和促进葡萄糖摄取的作用。采取有效措施激活单磷酸腺苷活化蛋白激酶(AMPK),是2型糖尿病治疗的一个重要途径。