

聚乙烯醇-海藻酸盐共固定化冰核活性细菌 ——黄单胞菌 TS206 的研究

陈庆森 刘 健

(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的应用具有重要意义,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 PVA 和海藻酸盐作为固定化载体,通过两者优良性能的互补而建立对冰核活性细菌 *Xanthomonas ampelina* TS206 的共固定化技术。结果表明,细胞投入量对冰核活性有较大影响,基础固定化条件对固定化技术指标的综合评分影响程度大小的顺序依次为:海藻酸钠浓度 > 硼酸浓度 > PVA 浓度 > CaCl_2 浓度,各因素的较优水平是:海藻酸钠浓度 1%,硼酸浓度 5%,PVA 浓度 8%, CaCl_2 浓度 1.1%。研究还发现冰核活性与固定化凝胶珠的添加量正相关,与固化时间相关性较小,渗漏量受固定化凝胶珠的添加量和固化时间影响不显著。

关键词 黄单胞菌 聚乙烯醇 海藻酸盐 共固定化 冰核活性

中图分类号:Q936 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2003)04-0492-06

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)是一类在 $-2^\circ\text{C} \sim -5^\circ\text{C}$ 条件下诱发植物体内水分产生冰核而引起霜冻的细菌^[1]。黄单胞菌(*Xanthomonas ampelina*)TS206 是本实验室分离得到的一种具有冰核活性的新菌属,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,该属菌急慢性毒性很低,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并最大程度保持了果汁的原有风味,但国内在这方面的研究尚未见相关报道。将冰核活性细菌应用在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、包埋效率高且价格低廉等优点,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可较好地弥补这些缺陷。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 黄单胞菌(*Xanthomonas ampelina*)TS206,本实验室从天津地区蔬菜表面分离

基金项目 国家自然科学基金资助项目(39770580)天津市自然科学基金资助项目(023803311)

作者简介 陈庆森(1957-),男,天津武清人,教授,学士,主要从事发酵生物技术及活性蛋白质的研究。Tel:86-22-26669569; Fax:86-22-27725382; E-mail:Chenqs1689@eyou.com

收稿日期 2002-09-27,修回日期 2003-04-15

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见文献 [2]。

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

1.2 菌种培养

活化 *X. ampelina* TS206 于斜面种子培养基, 23℃ 培养 24h; 以 2% 的接种量接入发酵培养基, 23℃ 180r/min 震荡发酵 72h。

1.3 菌悬液的制备

发酵液经高速冷冻离心机(5000r/min 4℃, 20min)离心后用 50mmol/M 磷酸盐缓冲液(pH 7.0)彻底洗两遍, 再用与湿菌体等体积的磷酸盐缓冲液悬浮, 4℃ 保存备用。通过对菌悬液进行平板计数, 测定其活菌浓度为 $4.0 \sim 5.0 \times 10^{10}$ cells/mL。

1.4 包埋方法

将一定量的 PVA 和海藻酸钠加蒸馏水煮沸溶解, 配成一定浓度混合物, 冷却后和一定量菌悬液混匀, 采用文献 [5] 介绍的方法并进行改进, 取长度适当的 4mm × 6mm 乳胶管, 在一端采用内径约 0.8mm ~ 1.0mm 的滴头。将乳胶管装入蠕动泵, 调节蠕动泵速度至 50drop/min。在搅拌条件下, 将混合液逐滴滴入一定浓度的硼酸和 CaCl₂ 混合溶液中, 形成大小均匀的固定化凝胶珠, 直径最大差值 ≤ 0.5mm, 固化一段时间后取出, 制得凝胶珠总质量约 50g, 4℃ 悬浮保存备用。在 2.1、2.2、2.3 和 2.5 节中, 固化时间均为 12h。

1.5 冰核活性的测定

将若干固定化好的凝胶珠放入一个专用反应器内, 加入 10% 的蔗糖溶液(果汁模拟体系)15mL, 把它放入 -8℃ 的恒温盐水槽内, 保证杯外的盐水液面高于杯内液体, 用电子精密温度计测定成核温度 A。在进行 2.1、2.2、2.4 和 2.5 节的研究时, 每个反应器内放入 3 个固定化凝胶珠。

1.6 渗漏量的检测

将 1.5 节中得到的冰晶体在室温下的充分熔解, 取出固定化凝胶珠, 用电子精密温度计测定熔解后的蔗糖溶液的成核温度 B。

1.7 正交实验

采用 L₉(3⁴) 正交表来对固定化条件进行分析, 并以此为依据用 9 种不同方案制造出固定化凝胶珠。4 种物质 3 个水平的浓度选自工业共固定化常用的浓度(表 1)。

表 1 正交设计固定化条件因素水平表

Table 1 Level of immobilization condition factor in orthogonal design

Number	α (PVA) %	α (Sodium alginate) %	α (CaCl ₂) %	α (Boric acid) %
	A	B	C	D
1	7	1	0.55	2
2	8	2	1.1	3
3	9	3	2.2	5

The levels are chosen from the concentrations usually adopted in industry. L₉(3⁴) orthogonal table is used in this experiment design.

2 结果

2.1 细胞投入量的考察

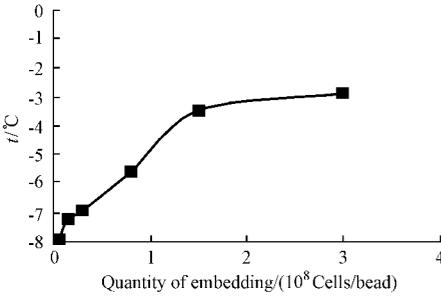


图 1 包埋量与成核温度 A 的关系图

Fig.1 The relationship between quantity of embedding and nucleation temperature A

细胞投入量为 1.5×10^8 cells。

本研究经固定化后的冰核活性的检测和平板活菌计数实验,在硼酸和 CaCl_2 的混合固定剂溶液中,其活菌计数 $< 1 \times 10^3$ 个/mL,未检测到冰核活性。结果表明,失落细胞量很小且细胞的包埋效率接近 100%。

2.2 基础固定化条件的综合考察

从固定化冰核活性细菌在食品冷冻浓缩中应用的角度考虑,较高的冰核活性和抗菌体渗漏能力都是期待的技术指标,但多数情况下冰核活性较抗渗漏能力更重要,其评价指标为体现冰核活性的成核温度 A ($^{\circ}\text{C}$) 和体现渗漏量的成核温度 B ($^{\circ}\text{C}$)。实验设计了一个综合评价冰核活性与抗渗漏能力的加权公式:

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

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,本文 n 取 2。对菌体渗漏有严格限制的应用领域, n 值可取得更小一些,同时还可以对成核温度 B 规定上限。根据上式,体系达到的成核温度 A 越高,成核温度 B 越低,综合评分则越高。

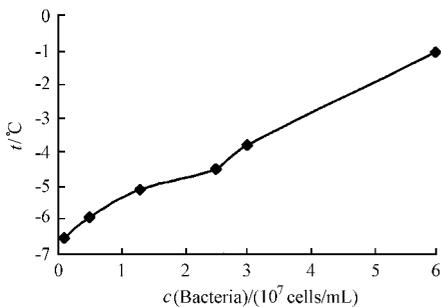


图 2 细菌浓度与成核温度 B 的关系图

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

按 1.4 节中的方法对菌体细胞进行固定化,根据菌悬液的添加量和菌体浓度可以算出每个固定化凝胶珠的平均细胞投入量。调整加入菌悬液的数量,使细胞投入量为 0.5×10^7 、 1.5×10^7 、 3×10^7 、 8×10^7 、 15×10^7 和 30×10^7 cells/bead。采用的固定化条件为 9% PVA、1% 海藻酸钠、2.2% CaCl_2 、5% 硼酸。图 1 所示,固定化凝胶珠包埋菌量越大,则冰核活性越高。这可能由于细胞投入量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出现冰核的概率增加。综合冰核活性和经济成本,初步确定每个凝胶珠的细

胞投入量为 1.5×10^8 cells。表 2 为正交实验结果。极差 MR 的大小可以得出各因素影响的显著性。极差最大的因素是 B (海藻酸钠浓度),依次分别是 D (硼酸浓度)、A (PVA 浓度)、C (CaCl_2 浓度)。对于制备共固定化凝胶珠,将冰核活性和渗漏量综合考虑,确定各因素的较优水平是海藻酸钠为 1%,硼酸为 5%,PVA 为 8%, CaCl_2 为 1.1%。不同浓度的海藻酸钠、硼酸、PVA 和 CaCl_2 影响固定化凝胶珠表面高分子海藻酸钙的微观结构,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%

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(图 2),如果渗漏后蔗糖溶液中的细菌浓度 $\geq 10^5$ cells/mL,可以根据成核温度 B 估测出实际渗漏出的细胞数。本实验中只有方案 1 的成核温度 B 较高,使渗漏后蔗糖溶液中的细菌浓度达到了约 5×10^5 cells/mL,与 1.5×10^8 cells/bead 其细胞投入量相比,一次冻结操作后每个凝胶珠渗漏量约为 2.5×10^6 个细胞,渗漏率约 1.67%。对于其它较优方案用这种方法几乎检测不到细胞渗漏。

表 2 不同基础固定化条件对冰核活性和渗透量的影响

Table 2 The ice nucleation activity and leakage influenced by fundamental immobilization conditions

Serial number	A	B	C	D	Nucleation temperature A/°C	Nucleation temperature B/°C	Comprehensive score
1	1(7)	1(1)	1(0.55)	1(2)	-3.8	-5.9	8.3
2	1	2(2)	2(1.1)	2(3)	-4.9	-6.9	7.1
3	1	3(3)	3(2.2)	3(5)	-4.7	-7.9	8.5
4	2(8)	1	2	3	-3.7	-7.8	10.4
5	2	2	3	1	-4.8	-7.9	8.3
6	2	3	1	2	-4.6	-6.9	7.7
7	3(9)	1	3	2	-3.9	-6.6	8.8
8	3	2	1	3	-4.7	-7.5	8.1
9	3	3	2	1	-4.8	-7.9	8.3
K ₁	23.9	27.5	24.1	24.9			
K ₂	26.4	23.5	25.8	23.6			
K ₃	25.2	24.5	25.6	27.0			
x ₁	8.0	9.2	8.0	8.3			
x ₂	8.8	7.8	8.6	7.9			
x ₃	8.4	8.2	8.5	9.0			
MR	0.8	1.4	0.3	1.1			
Optimized	A ₂	B ₁	C ₂	D ₃			

K_i means summation of corresponding comprehensive scores whose serial number is 'i'; $x_i = K_i/3$; MR is the maximum remainder of x_i.

2.3 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,测定该体系中的成核温度 A 和 B(图 3)。固定化凝胶珠数目增多,则体系的成核温度 A 有所提高。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。而成核温度 B 始终维持在一个较低的水平上,从理论上讲,总渗漏量应该与凝胶珠的数目存在正相关,然而实验表明即使体系中添加了 20 个凝胶珠,成核温度 B 仍然不高,说明优化的固定化方案的抗渗漏能力是很强的。从经济和减少体系的渗漏总量角度考虑,对于 15mL 10% 蔗糖溶液这个而言,添加 1~5 个固定化凝胶珠仍是合适的。

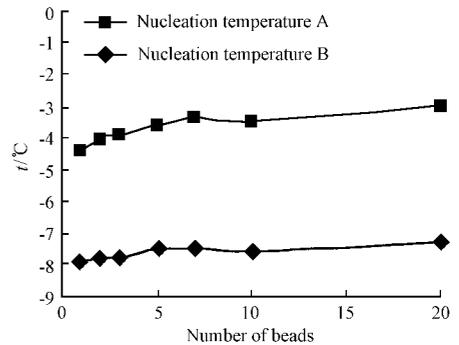


图 3 凝胶珠数目与成核温度 A、B 的关系图
Fig.3 The relationship between number of beads and nucleation temperature A and B

2.4 固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 3h 测定成核温度 A 和 B (图 4)。研究发现,冰核活性随固化时间呈略微下降的趋势,但并不很明显。加长固化时间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,减小了载体与 Ca^{2+} 交联所形成的孔径,但对水分子形成大型冰晶分子的难易基本不造成影响,即基本不会改变水分子与固定化凝胶珠中冰核活性细菌的接触状况,所以成核温度 A、B 变化很小。从渗漏量来看,固化时间极短(1h)的情况下,渗漏量稍大,成核温度 B 约 -7°C ,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

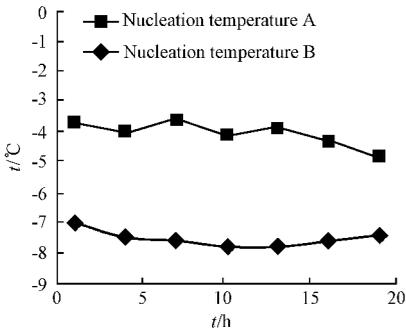


图 4 固化时间与成核温度 A、B 的关系图

Fig.4 The relationship between time of immobilization and nucleation temperature A and B

高分子网格结构尚未完全形成的情况下,发生了一定量的渗漏。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,仍应采取较长的固化时间,但一般不宜超过 15h。

2.5 固定化冰核活性细胞的稳定性实验

固定化后的凝胶珠反复冻融条件下的操作稳定性是决定固定化冰核活性细胞的凝胶珠能否在实践中应用的重要指标和影响因素。在 10% 蔗糖溶液中,于 -8°C 进行反复冻融实验。结果说明,以 PVA 和海藻酸钠为载体进行冰核活性细菌的固定化其机械性能优良,在 -8°C 反复冻融 20 次以上,其固定化的凝胶珠的机械强度和固定化细胞的冰核活性均未发生变化。结果显示,PVA 和海藻酸钠共固定化冰核活性细菌使用寿命长,在食品及生物物质的冷冻浓缩工艺中具有很大的应用潜力。

3 讨论

本文对冰核活性细菌 *X. ampelina* TS206 共固定化的技术内容及评价方法进行了探讨,发现海藻酸钠浓度对综合评分影响程度较大,硼酸和 PVA 的浓度对其也有一定影响,优化的固定化方案为:1% 海藻酸钠,5% 硼酸,8% PVA,1.1% CaCl_2 ,其冰核活性和抗渗漏能力都能达到较高的水平,增加固定化凝胶珠的添加量可以一定程度上提高冰核活性,延长固定化时间冰核活性稍有降低,抗渗透能力的变化不很显著。以上结论为冰核活性细菌在冷冻浓缩中的应用提供了一定依据。此外,在储存、固定化和冷冻过程中,冰核活性细菌菌悬液存在着活菌比例下降、死菌比例升高的现象,但经实验证明其冰核活性基本不受影响^[7,8]。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 cells/mL 以上,用于渗漏量的检测都不很合适。本文提出的成核温度 B 法检测固定化冰核活性细菌渗漏量是一个新尝试,但一般也要求菌浓为 10^5 cells/mL 以上,所以检测渗漏量的方法还需不断探讨。另外,研究者对该固定化方法与其他方法进行了比较,研究结果将另文发表。

参 考 文 献

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. 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. *Food Engineering*, 1994, 22: 453 ~ 473.
- [4] Watanabe M, Makino T, Kumeno K, et al. High-pressure sterilization of ice nucleation-active bacterial cells. *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. 微生物学通报, 1997, 24(4): 254 ~ 256.
- [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. 重庆建筑大学学报, 2000, 22(5): 95 ~ 100.
- [7] 刘 健, 陈庆森. 冰核活性细菌特有动力学初探. 食品科学, 2002, 23(5): 21 ~ 25.
- [8] 陈庆森, 阎亚丽, 王素英. 冰核细菌表达冰核蛋白特性的研究. 微生物学通报, 2000, 27(6): 421 ~ 424.

Study on PVA-alginate Co-immobilization of *Xanthomonas ampelina* TS206

Chen Qingsen* Liu Jian

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

Abstract : Ice nucleation activity and anti-leaking capability are both important technical parameters in INA (Ice nucleation active bacteria) bacteria immobilization which can be adopted on freezing concentrate. Both PVA and alginate are good medium for immobilization. They can be used on co-immobilization of ice nucleation-active bacteria (*Xanthomonas ampelina* TS206). The results showed that quantity of embedding affects ice nucleation activity greatly. The order of importance to comprehensive scores of technical standard should be concentration of Sodium alginate > Boric acid > PVA > CaCl₂. The optimized concentration are PVA 8% ,sodium alginate 1% ,CaCl₂ 1.1% and boric acid 5%. A conclusion can be draw that ice nucleation activity increases with the number of beads and shows little pertinency with the time of immobilization, whereas anti-leaking capability can be influenced faintly by the number of beads and the time of immobilization.

Key words : *Xanthomonas ampelina*, PVA, Alginate, Immobilization, Ice nucleation activity