

# 巨大芽孢杆菌 NCT-2 冻干菌剂的制备及冻干保护剂响应面优化

王大欣<sup>1</sup>, 张丹<sup>1,\*</sup>, 初少华<sup>1</sup>, 支月娥<sup>1,2</sup>, 周培<sup>1,2,3,\*</sup>

(1.上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240;

2.农业部都市农业(南方)重点实验室, 上海 200240;

3.上海交通大学陆伯勋食品安全研究中心, 上海 200240)

**摘要:**采用真空冷冻干燥法制备巨大芽孢杆菌 NCT-2 菌剂, 采用单因素实验并用响应面方法对冻干保护剂配方进行了优化。以巨大芽孢杆菌 NCT-2 冻干存活率为考察因素, 从离心浓缩条件、保护基质、保护剂筛选与复配、复水种类等方面探究影响。结果表明, 离心条件为 5000 r/min, 10 min, 选取新鲜培养基为保护基质时对巨大芽孢杆菌 NCT-2 冻干保护效果最佳。不同复水水质对菌体存活率无较大影响。当冻干保护剂浓度为: 蔗糖 4.51 mg/g、海藻糖 0.90 mg/g、葡萄糖 9.60 mg/g 时冻干存活率最高, 经验证存活率最高可达 91.8%。

**关键词:**巨大芽孢杆菌, 真空冷冻干燥, 保护剂, 响应面优化

## Preparation of *Bacillus megaterium* NCT-2 freeze-dried agent by using response surface methodology

WANG Da-xin<sup>1</sup>, ZHANG Dan<sup>1,\*</sup>, CHU Shao-hua<sup>1</sup>, ZHI Yue-e<sup>1,2</sup>, ZHOU Pei<sup>1,2,3,\*</sup>

(1.School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China;

2.Key laboratory of Urban Agriculture (South), Ministry of Agriculture, Shanghai 200240, China;

3.Bor.S.Luh Food Safety Research Center, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

**Abstract:** Vacuum freeze-drying method was used to prepare *B. megaterium* NCT-2 agents, cryoprotectants were optimized using response surface methodology after single factor experiment. Centrifugal conditions, suspension substrate, selection and formulation of cryoprotectants, rehydration water were studied on the impact of survival rate. The results showed that the optimal conditions were 5000 r/min, 10 min and fresh media was the better choice as the suspended substrate. Different kinds of water did not have obvious impact on the survival rate after rehydration. Results indicated the optimal amounts of cryoprotectants formula were sucrose 4.51 mg/g, trehalose 0.9 mg/g, glucose 9.60 mg/g. The proven survival rate was 91.8%.

**Key words:** *Bacillus megaterium* NCT-2; Vacuum freeze-drying; cryoprotectant; response surface methodology

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2016)11-0156-06

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2016.11.024

设施栽培中由于氮肥的大量施用, 导致土壤次生盐渍化, 使土壤盐分尤其是硝态氮含量增高, 硝态氮在土壤和水中积累给人类的生存带来巨大的危害。采用微生物法修复次生盐渍化土壤是极为有效的途径<sup>[1]</sup>。实验室自主从设施栽培次生盐渍化土壤中筛选出一株耐硝酸盐的巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) NCT-2, 该菌株可以有效降低土壤中硝态氮含量及土壤电导率值, 并提高土壤有机质含量及微生物数量<sup>[2]</sup>。该菌株已经作为生物肥料用于生产当中, 但是仍存在活菌数不高, 体积大携带不方便, 未优化配方等问题, 制约了生产进一步发展。

真空冷冻干燥技术是将物料在低温冻结后, 真空条件下将冰升华为水蒸气从而脱去物料中的水分使物料干燥的技术<sup>[3]</sup>, 具有可以避免物料热敏变质、理想的速溶与复水性、体积小方便储存等优点。但是, 真空冷冻干燥过程对菌体存活率具有一定的影响。研究表明, 冻干保护剂的应用是影响冻干存活率最为重要的因素<sup>[4]</sup>。因此, 优化保护剂配方是提高冻干菌体存活率的关键途径, 响应面作为一种高效统计方法, 可以用较少的实验次数去优化多种变量, 从而预测最佳的实验结果<sup>[5]</sup>。国内已有相关利用真空冷冻干燥技术制备菌粉的研究<sup>[6-7]</sup>, 保护剂经响应

收稿日期: 2015-09-25

作者简介: 王大欣(1992-), 女, 硕士, 研究方向: 环境微生物, E-mail: hellodaxin@163.com。

\* 通讯作者: 张丹(1988-), 女, 助理研究员, 研究方向: 土壤微生物修复, E-mail: zhangdannjut@163.com。

周培(1964-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 农业生境污染防治与生物修复, E-mail: peizhoujtu@163.com。

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)课题(2012AA101405)。

面优化后保证了较高的菌体存活率,可见对保护剂研究具有重要意义。

本研究以前期获得的具有良好次生盐渍化土壤修复特性的巨大芽孢杆菌(*B.megaterium*) NCT-2 为研究对象,应用真空冷冻干燥技术制备冻干菌剂,通过探究保护剂配方并对其进行响应面优化,获得了高活性巨大芽孢杆菌冻干菌剂,解决目前微生物菌剂普遍存在的活菌数不高,体积大不方便运输,无优化配方,生产效率低等问题,为我国土壤修复菌剂的生产提供了依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

巨大芽孢杆菌(*B.megaterium*) NCT-2,由实验室保藏。

种子培养基(LB):NaCl 10 g,蛋白胨 10 g,酵母膏 5 g,蒸馏水 1000 mL, pH7.0~7.5, 121 °C 灭菌 20 min。发酵培养基:酵母粉 3.0 g,蔗糖 15 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 g,  $\text{MnSO}_4$  0.05 g,水 1000 mL。新鲜培养基:KCl 1.0 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10.0 mg,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g,  $\text{CaCl}_2$  1.0 mg,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 g,葡萄糖 15.0 g,  $\text{KNO}_3$  1.5 g,蛋白胨 1.5 g,水 1000 mL, pH7.0~7.2。脱脂奶粉悬浮基质:脱脂奶粉 100 g/L,水 1000 mL。计数培养基:在 LB 培养基中加入 15~20 g/L 琼脂即可。

ZWYR-2112B 型双层恒温摇床 上海智城分析仪器制造有限公司;DELTA320 pH 计 梅特勒-托利多仪器上海有限公司;BLBIO-XGCA 型 5 L 发酵罐 上海百伦生物科技有限公司;M200PRO 多功能酶标仪 德国/瑞士 TECAN;CT/4RO 型离心机 天美(中国)科学仪器有限公司;icount10 型全自动菌落计数仪 杭州迅速科技有限公司;FD-1-50e 型真空冷冻干燥机 北京博医康实验仪器有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 巨大芽孢杆菌 NCT-2 冻干菌剂制备流程 菌种活化→制备菌液→生长曲线测定→离心收集菌体→制备菌悬液→添加保护剂→真空冷冻干燥→复水

1.2.2 巨大芽孢杆菌 NCT-2 的培养及生长曲线的测定 将巨大芽孢杆菌 NCT-2 接种至 100 mL LB 培养基中,35 °C,180 r/min 震荡培养 12 h 后接入装有 3 L 发酵培养基的 5 L 发酵罐中,初始 pH7.0,转速 300 r/min、通气量 2 vvm、培养 18 h 后获得发酵液。期间,每隔 4 h 用多功能酶标仪测定 OD(660 nm) 值。菌种计数采用平板稀释涂布法进行计数。

1.2.3 巨大芽孢杆菌 NCT-2 浓缩离心条件的确定 取菌液 25 mL 装于灭菌的离心管中,以 4000、5000、6000 r/min 转速分别配以 10、20 min 离心时间,考察不同离心参数对菌体存活能力的影响,检测在不同的离心条件下的离心损失率、离心存活率,从而选取最佳的离心条件,减少菌体的损伤。离心前称取管体总质量( $m_2$ )及离心去上清液后管体总质量( $m_1$ ),计算每管获得菌泥质量。计算公式如下:

$$\text{菌泥质量(g)} = m_2 - m_1$$

离心损失率(%) = 上清液活菌总数/发酵液活菌总数 × 100

离心存活率(%) = 菌泥活菌总数/(发酵液活菌总数 - 上清液活菌总数) × 100

1.2.4 悬浮基质对冷冻干燥保护效果的影响 冻干过程一般在一定的悬浮基质中进行,悬浮溶液的特性在整个冻干过程中对细胞活力有重要影响。以新鲜培养基及 10% 脱脂奶粉作为悬浮基质,与菌泥混合后加入 15.0 mg 保护剂/g 湿菌。蔗糖、葡萄糖、海藻糖、甘露醇作为冻干保护剂,进行冷冻干燥,测定冻干后菌体存活率,计算方法如下:

菌体存活率(%) = 冻干后活菌数(cfu)/冻干前活菌数(cfu) × 100

1.2.5 真空冷冻干燥方法 将巨大芽孢杆菌 NCT-2 菌悬液放入到低温冷冻冰箱中进行预冻,冻结完全和形成小冰晶后将预冻好的菌液放入冷阱温度为 -30 °C 的真空冷冻干燥机内冻干 22 h。

1.2.6 单一保护剂的选择 选取蔗糖、葡萄糖、山梨醇、淀粉、麦芽糊精、海藻糖、甘露醇、甘油作为单一冻干保护剂研究其在冻干过程中对巨大芽孢杆菌 NCT-2 的保护效果。其中,蔗糖、葡萄糖、山梨醇、淀粉、麦芽糊精的添加浓度分别为 0.9、4.8、9.6、14.4 mg 保护剂/g 湿菌;海藻糖、甘露醇、甘油的添加浓度分别为 0.9、2、3.9、9.6 mg 保护剂/g 湿菌。

1.2.7 响应面法优化冻干保护剂配方 为了确定最佳的保护剂配方,根据单因素筛选实验结果,选取蔗糖( $X_1$ )、海藻糖( $X_2$ )、葡萄糖( $X_3$ )三个主要因素为自变量,巨大芽孢杆菌 NCT-2 菌体存活率为相应指标,采用 Box-Behnken 方法设计响应面分析实验,具体设计数据见表 1,实验设计及结果见表 3。

表 1 NCT-2 菌体存活率响应面因素水平表

Table 1 Factors and levels of RSM of survival rate of NCT-2

因素	水平		
	-1	0	1
$X_1$ 蔗糖(mg/g)	0	4.8	9.6
$X_2$ 海藻糖(mg/g)	0	0.9	1.8
$X_3$ 葡萄糖(mg/g)	0	4.8	9.6

注:mg/g 指 mg 保护剂/g 湿菌。

1.2.8 巨大芽孢杆菌 NCT-2 菌剂的复水 取等量的冻干菌剂分别加入井水、河水、雨水稀释到冻干前原有体积后,放置 1 h,测定复苏后菌体存活率,实验重复三次取平均值。

### 1.3 数据统计分析

采用 Design Expert 8.0 软件完成响应面设计、数据分析、回归模型建立,应用 SAS 9.2 软件对数据进行差异性显著分析,Origin Pro 8.0 进行作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 巨大芽孢杆菌 NCT-2 生长曲线的绘制

以时间为横坐标,OD<sub>600</sub> 为纵坐标,绘制 NCT-2 生长曲线,结果如图 1 所示。

由图 1 可知,巨大芽孢杆菌 NCT-2 生长过程中,0~4 h 为延迟期,4~20 h 为对数期,其中 16~20 h 为对数末期,20~32 h 为稳定期。因此,选取对数末期

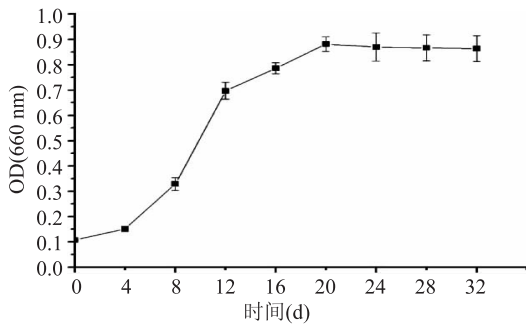


图1 巨大芽孢杆菌 NCT-2 生长曲线

Fig.1 The growth curve of *B.megaterium* NCT-2

18 h 作为收获期。

## 2.2 巨大芽孢杆菌 NCT-2 浓缩离心条件的确定

目前主要有离心、过滤、絮凝等方式进行生物质收获<sup>[8]</sup>,其中用于菌体浓缩的方法主要是离心分离法。在离心过程中,一方面要注意离心力等因素对菌体存活率的影响,另一方面要保证较高的活菌数量,活菌数会因离心工艺掌握不当而大大降低<sup>[9]</sup>。

如图2所示,相同转速下,随着离心时间的增加,离心损失率下降,离心存活率也随之下降,说明虽然增加离心时间可以减少菌体随上清液的流失,但是对菌体活性的活性也造成了相应的危害。相较离心损失率而言,不同离心时间对菌体存活率影响较大。从经济角度应选择较小离心力和较短离心时间,因此选取 5000 r/min,10 min 离心参数,来保证最佳的离心存活率,此时菌体存活率为 75.43%。每组实验设三个重复取平均值。同时经测三次定取平均值后得知,离心每 25 mL 发酵液获菌泥的平均质量为 2.10 g。

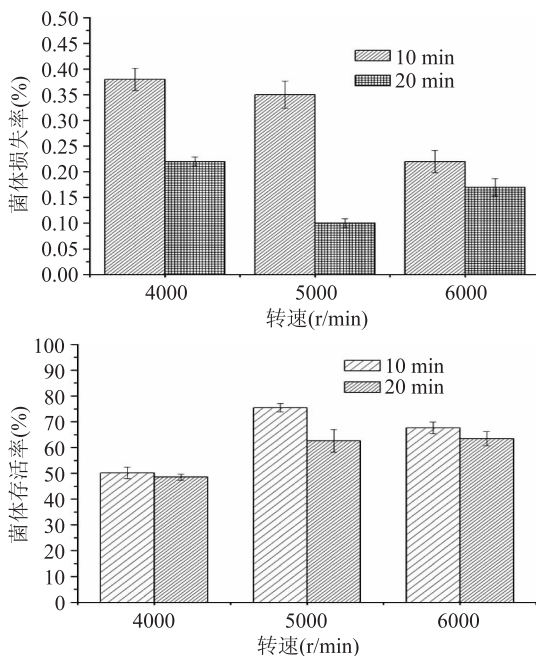


图2 不同转速和离心时间对菌体存活率的影响

Fig.2 Different rotational speed

and centrifugal effect on bacteria survival rate

## 2.3 不同悬浮基质对冷冻干燥保护效果的影响

冻干前一般将菌泥悬浮在一定基质中,基质不

但能给后续微生物生长提供营养,也可以在冻干过程中对微生物起到一定的保护作用<sup>[10]</sup>。如表2为不同冻干保护剂在新鲜培养基及10%脱脂奶粉中的冻干存活率。

表2 不同悬浮基质中 NCT-2 冻干存活率

Table 2 The freeze-dried survival rate of NCT-2 in two different suspended substrate

冻干保护剂	悬浮基质	
	新鲜培养基存活率(%)	10%脱脂奶粉存活率(%)
蔗糖	63.2 ± 3.54	36.0 ± 0.61
葡萄糖	88.3 ± 2.91	85.0 ± 4.85
海藻糖	85.0 ± 2.89	11.7 ± 0.23
甘露醇	3.20 ± 0.15	9.30 ± 0.47

由表2结果可以看出,在四种保护剂中,以新鲜培养基作为悬浮基质的菌体存活率均高于以10%脱脂奶粉为悬浮基质的存活率。有研究表明,虽然Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>等离子会使细胞的渗透压发生改变从而对细胞产生损伤,但是对于一些喜盐微生物来说,适当浓度的Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Mg<sup>2+</sup>可以保证最大程度的冻干菌体存活率<sup>[11]</sup>。因此选用新鲜培养基为悬浮基质进行单一冻干保护剂筛选实验。

## 2.4 单一冻干保护剂筛选

适宜的冻干保护剂可以显著的提高冻干后的菌体存活率,绝大多数细菌冷冻干燥成功的关键在于有效保护剂的使用<sup>[12-13]</sup>。不同的保护剂及其用量对细菌冻干时保护作用不同,因此需对冻干保护剂的种类及用量进行筛选。如图3所示,为加入不同种类和浓度的冻干保护剂后巨大芽孢杆菌 NCT-2 的冻干存活率。

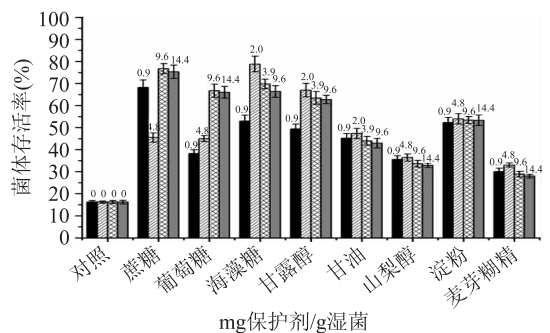


图3 加入不同种类浓度冻干保护剂后冻干菌体存活率

Fig.3 The survival rate of bacteria after

adding different cryoprotectants of different concentration

由图3的结果可以看出,巨大芽孢杆菌 NCT-2 的存活率在加入保护剂后均有不同程度的提高,保护剂均对巨大芽孢杆菌 NCT-2 有一定的保护作用。在众多的保护剂中,海藻糖保护效果最为显著,冻干保护率达 78.8%。蔗糖、葡萄糖、甘露醇等也对巨大芽孢杆菌 NCT-2 具有良好的保护效果。

有研究表明,海藻糖具有抗冻抗热的稳定性。海藻糖不仅可以通过与细胞外水分子形成氢键来提高细胞内蛋白质的稳定性<sup>[14]</sup>,而且它具有较高的晶体转换温度,可以在较高的冻干温度下保持很好的



稳定性<sup>[15]</sup>。甘露醇一般在冻干过程中作为填充剂使用,它可以产生晶体从而为组分提供物理支撑,且不会与其它成分发生反应<sup>[16]</sup>。蔗糖可以促进细胞在悬浮液中分散,还可以作为细胞今后生长用的碳源。在冷冻干燥保护剂选择过程中,要考虑其在冻干菌剂中的溶解性能,还要考虑到成本及后期微生物生长过程中的能源供给问题,额外碳源的添加可以显著提高微生物冷冻干燥的抗性<sup>[17]</sup>。

## 2.5 响应面法优化冻干保护剂配方

响应面法 RSM 是为了找寻多变量体系中最优的优化条件设计的实验方案,是一种高效的优化技术<sup>[18]</sup>。它主要分析研究因素和评价因素之前的相关性和他们之间的相互影响,并建立数学模型,获得最佳的优化组合,可以提高生产效率,减少支出,获得科学的结论。

根据单因素实验结果,选取蔗糖( $X_1$ )、海藻糖( $X_2$ )、葡萄糖( $X_3$ )三个效果最好的主要因素为自变量,菌体存活率为相应指标,采用 Box-Behnken 的中心组合实验原理,进行三因素三水平的响应面实验,共 27 个析因点和 15 个区域中心点,每组平行实验三次,具体设计及结果见表 3。

表 3 NCT-2 菌体存活率 BBD 实验设计与结果

Table 3 BBD experimental design and results of survival rate of NCT-2

实验号	蔗糖	海藻糖	葡萄糖	存活率(%)
1	-1	-1	-1	16.2 ± 0.73
2	-1	-1	0	45.3 ± 2.04
3	-1	-1	1	66.9 ± 4.68
4	-1	0	-1	53.4 ± 2.67
5	-1	0	0	78.7 ± 7.00
6	-1	0	1	80.0 ± 1.84
7	-1	1	-1	76.8 ± 4.61
8	-1	1	0	78.3 ± 5.25
9	-1	1	1	81.2 ± 7.15
10	0	-1	-1	45.5 ± 2.05
11	0	-1	0	78.8 ± 2.52
12	0	-1	1	81.7 ± 5.23
13	0	0	-1	82.3 ± 3.29
14	0	0	0	88.4 ± 8.66
15	0	0	1	89.6 ± 2.96
16	0	1	-1	91.3 ± 2.01
17	0	1	0	82.1 ± 6.57
18	0	1	1	80.5 ± 3.62
19	1	-1	-1	67.0 ± 4.22
20	1	-1	0	70.2 ± 1.54
21	1	-1	1	74.3 ± 3.34
22	1	0	-1	69.8 ± 3.14
23	1	0	0	80.6 ± 6.13
24	1	0	1	83.7 ± 4.19
25	1	1	-1	60.0 ± 2.70
26	1	1	0	63.2 ± 6.19
27	1	1	1	65.0 ± 2.93

软件分析得到目标响应值与各个因素关系的二阶经验模型:  $Y = 20.67500 + 13.83072917X_1 + 78.71296X_2 + 8.66753X_3 - 5.69444X_1X_2 - 0.45166X_1X_3 - 4.14931X_2X_3 - 1.24674X_1^2 - 29.12037X_2^2 - 0.35807X_3^2$ 。其中, Y 为冻干后的菌体存活率,  $X_1$  为蔗糖,  $X_2$  为海藻糖,  $X_3$  为葡萄糖。

该二次曲面的方差分析与回归系数显著性检验结果如表 4 所示,该模型在  $\alpha = 0.01$  的水平上回归显著( $p < 0.01$ ),  $X_2$  - 海藻糖、 $X_3$  - 葡萄糖、 $X_1X_2$  - 蔗糖 \* 海藻糖、 $X_1^2$  - 蔗糖<sup>2</sup> 影响最为显著,其它影响显著性:  $X_1^2 > X_3^2 > X_1X_3 > X_1$ 。模型决定系数  $R^2 = 0.9123$ , 调整决定系数  $R_{Adj}^2 = 0.8659$ , 表明模型可以解释 86.59% 的响应值变化,模型拟合良好,实验误差相对较小。因此,该模型可以分析和预测不同条件对冻干菌剂存活率的影响。

表 4 二次响应面回归模型的方差分析结果

Table 4 Variance analysis results of the quadratic response surface regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值
模型	6424.84	9	731.87	19.66	<0.0001 **
$X_1$ 蔗糖	180.50	1	180.50	4.97	0.0395 *
$X_2$ 海藻糖	975.35	1	975.35	26.68	<0.0001 **
$X_3$ 葡萄糖	1098.24	1	1098.24	30.25	<0.0001 **
$X_1X_2$	1434.45	1	1434.45	39.51	<0.0001 **
$X_1X_3$	256.69	1	256.69	7.07	0.0165 *
$X_2X_3$	761.61	1	761.61	20.98	0.0003 **
$X_1^2$	977.93	1	977.93	26.93	<0.0001 **
$X_2^2$	659.40	1	659.40	18.16	0.0005 **
$X_3^2$	80.67	1	80.67	2.22	0.1544
$R^2$					0.9123
调整 $R^2$					0.8659

注: \* 差异显著,  $p < 0.05$ , \*\* 差异极显著,  $p < 0.01$ 。

保持其中单一因素最优条件,其它两个因素与响应值的关系由 Design Expert 8.0 软件处理得到响应面图如下图 4 所示,可以直观呈现各因素相互作用影响,从响应面的最高点和等值线可以看出,各因素在所选范围内存在极值,即响应最高点,这与表 4 中 p 值结果一致。在交互项对菌体存活率影响中,蔗糖与海藻糖交互作用对菌体存活率影响极为显著( $p < 0.0001$ ),交互作用影响顺序为:  $X_1X_2 > X_2X_3 > X_1X_3$ 。

根据回归模型预测出菌体存活率的最高值,当蔗糖浓度为 4.51 mg/g,海藻糖浓度 0.90 mg/g,葡萄糖 9.60 mg/g,预测出的菌体存活率为 93.64%。为了检验响应面法的可行性,应用该预测配方,实验经过三次实验取平均值,测得菌体存活率为 91.8%,实际值比预测值误差为 1.96%。因此,响应面法对冻干保护剂的优化是可行的,得到的保护剂配方具有实际应用价值。

## 2.6 NCT-2 冻干菌剂的复水

复水是冻干细胞复苏重要的一个步骤,复苏所用的溶剂以及复苏条件都会影响最后的菌体存活

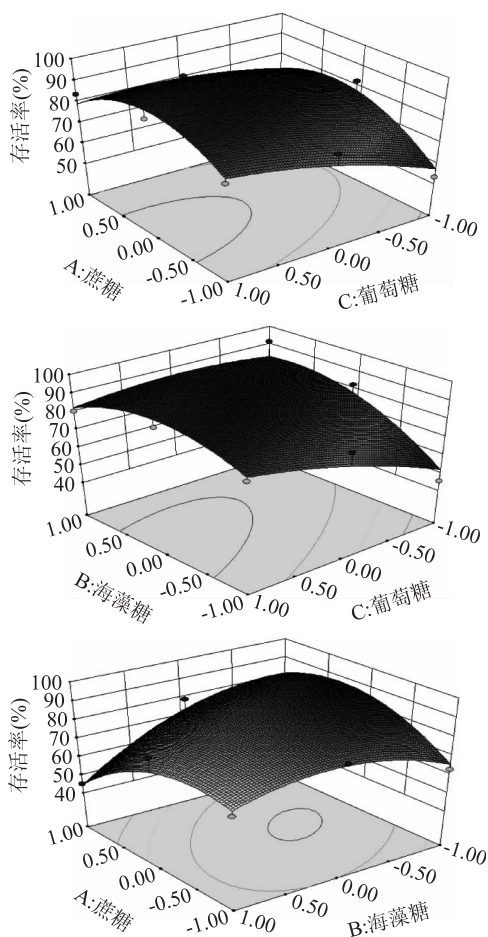


图4 三因子交互作用

对 NCT-2 冻干存活率影响的响应面图

Fig.4 Survival response surface figure of three factors on freeze-dried survival rate of NCT-2

率。一般采用最适合该菌生长的培养液或生理盐水作为复水介质进行复水<sup>[19]</sup>。由于用于一般灌溉用水中存在  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  等金属离子,可以满足细胞复水需要。

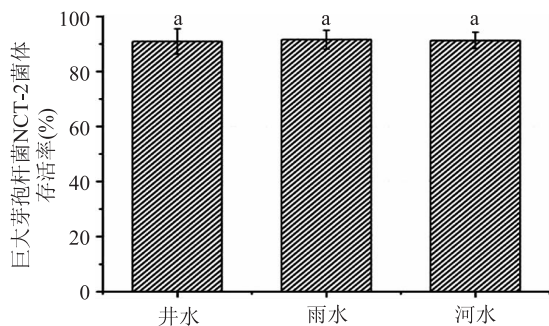


图5 不同复水水质对应的菌体存活率

Fig.5 The survival rate of bacteria influenced by water type

图5 结果显示,经复水后,在井水、雨水、河水中冻干菌剂的存活率分别为 90.90%、91.53%、91.27%。可见,不同水质用于冻干菌剂的复水,菌体存活率相差不多。

### 3 结论

本研究探究了巨大芽孢杆菌 NCT-2 冻干菌剂的制备方法,应用离心法收集菌泥,探究不同离心速率

及时间对菌体离心损失率及存活率的影响,最终确定了最佳离心条件为 5000 r/min, 10 min, 经探究选定新鲜培养基作为悬浮基质。本研究通过单因素筛选和响应面优化,实验数据得到的二次响应曲面模型具有较高的回归率,与实验结果吻合程度较高,确定了最佳保护剂配方为:蔗糖 4.51 mg/g、海藻糖 0.90 mg/g、葡萄糖 9.60 mg/g。经验证菌体存活率达 91.8%。研究分别采用井水、河水、雨水对制成的菌剂进行复水,结果表明不同类型灌溉水对菌体复水存活率影响不大。

### 参考文献

- [1] 张春华. 硝态氮转化菌的筛选鉴定及其转化效率研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2011.
- [2] 黄红艳. 次生盐渍化土壤的微生物多样性及微生物改良效应研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2012.
- [3] 王洁, 黄传伟, 安源, 等. 真空冷冻干燥的工艺流程[J]. 医疗卫生装备, 2012, 33(9): 90-91.
- [4] 常金梅, 芷荷, 吴清平, 等. 菌种冷冻干燥保藏的影响因素[J]. 微生物学通报, 2008, 06: 959-962.
- [5] Gouda M D, Thakur M S, Karanth N G. Optimization of the multienzyme system for sucrose biosensor by response surface methodology [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2001, 17: 595-600.
- [6] 南君勇. 真空冷冻干燥技术制备酵母菌菌粉的研究[D]. 天津: 天津大学, 2007.
- [7] 雷欣宇. 乳酸菌活性干燥菌剂制备工艺的研究[D]. 重庆: 西南大学, 2013.
- [8] Teresa M. Mata, António A. Martins, Nidia S. Caetano. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review, Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2010, 14 (1): 217-232.
- [9] 万红兵, 田洪涛, 马晓燕, 等. 直投式酸奶发酵剂制备过程中乳酸菌离心分离条件的研究[J]. 食品工业科技, 2006, 11: 69-71.
- [10] Willemer H. Fundamentals and Applications of Freeze-drying to Biological Materials, drugs, and Foodstuffs. Tokyo: International Institute of Refrigeration, Commission, C1, 1985: 201-201.
- [11] Cañavate J P, Lubian L M. Relationship between cooling rates, cryoprotectant concentrations and salinities in the cryopreservation of marine microalgae [J]. Marine Biology, 1995, 124(2): 325-334.
- [12] Berny J F, Hennebert G L. Viability and stability of yeast cells and filamentous fungus spores during freeze-drying: effects of protectants and cooling rates [J]. Mycologia, 1991: 805-815.
- [13] 张英华, 霍贵成, 郭鸽. 菌种冷冻干燥保护剂的筛选及加速储存稳定性实验[J]. 中国乳品工业, 2007, (2): 8-10.
- [14] Westh Peter, Ramloev Hans. Trehalose accumulation in the tardigrade Adorybiotus coronifer during anhydrobiosis. The Journal of Experimental Zoology, 1991, 258(3): 303-311.
- [15] Morgan C A, Herman N, White P A, et al. Preservation of

(下转第 164 页)

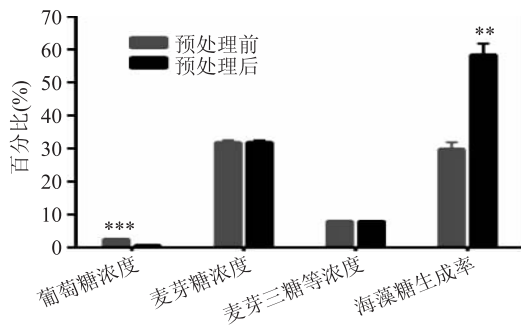


图5 麦芽糖浆预处理前后主要成分浓度变化及对海藻糖合成影响

Fig.5 Concentration changes of main components and effects on the yield of trehalose before and after malt syrup pretreatment

注:显著性差异  $p < 0.05$  (\*);  
 $p < 0.01$  (\*\*);  $p < 0.001$  (\*\*\*)。

芽糖浆体积分数 40%,产阮假丝酵母菌液接种量 4%,pH 为 5.5,温度 32 °C 条件下,经 6 h 发酵预处理,糖浆中葡萄糖浓度可降低至 0.06% 以下。有效降低了葡萄糖作为麦芽糖异构生产海藻糖反应副产物的反馈抑制作用,海藻糖产率也由初始 29.8% 提高至 58.4%,涨幅达 96.0%。该研究为工业化以麦芽糖浆为底物生产海藻糖提供了理论及数据支持。

### 参考文献

- [1] Colaco C, Kampinga J, Roser B. Amorphous stability and trehalose[J]. Science, 1995, 268(5212): 788.
- [2] Eleutherio E C, Araujo P S, Panek A D. Role of the trehalose carrier in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Biochim Biophys Acta, 1993, 1156(3): 263-266.
- [3] Wiemken A. Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 1990, 58(3): 209-217.
- [4] 孙常文,李发财,庞明利,等.海藻糖的特性分析及应用优势[J].发酵科技通讯,2013(3):37-41.
- [5] 靳文斌,李克文,胥九兵,等.海藻糖的特性、功能及应用[J].精细与专用化学品,2015(1):30-33.
- [6] 王乃强,张艳君,薛雅莺,等.海藻糖的性质及应用[J].精细与专用化学品,2014(1):35-37.
- [7] 麦锋,陆晓霞,汪振炯.海藻糖对中式糯米糕团品质影响研究[J].粮食与饲料工业,2014(3):22-25.
- [8] 荆晓艳,章银良,张陆燕,等.海藻糖涂膜保鲜草莓和辣椒的研究[J].河南工业大学学报:自然科学版,2014(2):

81-84.

- [9] 张晓燕,云雪艳,梁敏,等.含有海藻糖的生物可降解薄膜对冷鲜肉的保鲜与护色作用[J].食品工业科技,2015(8):298-304.
- [10] Wang T, Jia S, Dai K, et al. Cloning and expression of a trehalose synthase from *Pseudomonas putida* KT2440 for the scale-up production of trehalose from maltose [J]. Can J Microbiol, 2014, 60(9): 599-604.
- [11] 曲茂华,张凤英,何名芳,等.海藻糖生物合成及应用研究进展[J].食品工业科技,2014(16):358-362.
- [12] 谢定,张琼,朱婧,等.海藻糖生产方法及其合成酶研究进展[J].食品与机械,2013(2):223-226.
- [13] Eastmond P J, Van Dijken A J, Spielman M, et al. Trehalose-6-phosphate synthase 1, which catalyses the first step in trehalose synthesis, is essential for *Arabidopsis embryo* maturation [J]. Plant J, 2002, 29(2): 225-235.
- [14] 展现明,王念祥,闫锁,等.真菌酶和  $\beta$ -淀粉酶在麦芽糖浆生产中的应用[J].湖南农业科学,2010(15):97-99.
- [15] 易翠平,蔡吉祥,刘瑞兴.大米淀粉制备麦芽糖浆的工艺研究[J].食品科学,2010(24):24-27.
- [16] Pan Y T, Korothe E V, Jourdan W J, et al. Trehalose synthase of *Mycobacterium smegmatis*: purification, cloning, expression, and properties of the enzyme [J]. Eur J Biochem, 2004, 271(21): 4259-4269.
- [17] Kim K B, Kishihara S, Fujii S, et al. Simultaneously Continuous Separation of Glucose, Maltose, and Maltotriose Using a Simulated Moving-Bed Adsorber [J]. Bioscience Biotechnology & Biochemistry, 1992, 56(5): 801-802.
- [18] 李辉,曹龙奎.酵母发酵法去除玉米皮水解液中葡萄糖的研究[J].农产品加工:学刊,2011(5):36-38.
- [19] 王秀娟,王成福,秦庆阳,等.酵母发酵法去除木糖母液中葡萄糖的研究[J].中国食品添加剂,2010(2):115-118.
- [20] 王普,虞炳钧.木糖母液微生物脱除葡萄糖及回收木糖[J].食品科学,2002(7):73-76.
- [21] 赵伟,段莹莹,张曰辉,等.HPLC法检测海藻糖的研究[J].中国酿造,2014(10):148-150.
- [22] 罗锋,段绪果,宿玲恰,等.*Thermobifida fusca* 海藻糖合成酶基因的克隆表达及发酵优化[J].中国生物工程杂志,2013(8):93-99.
- [23] 何东东,张坤生.产阮假丝酵母生长条件的优化[J].食品科技,2010(2):14-17.
- [24] Lansing M. Prescott. Microbiology [M]. 北京:高等教育出版社(影印版),2002:121-125.

(上接第 160 页)

- micro-organisms by drying; a review [J]. Journal of microbiological methods, 2006, 66(2): 183-193.
- [16] Bakaltcheva I, O'Sullivan A M, Hmel P, et al. Freeze-dried whole plasma: evaluating sucrose, trehalose, sorbitol, mannitol and glycine as stabilizers [J]. Thrombosis research, 2007, 120(1): 105-116.
  - [17] Otero M C, Espeche M C, Nader-Macías M E. Optimization of the freeze-drying media and survival throughout storage of

freeze-dried *Lactobacillus gasserii* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* for veterinarian probiotic applications [J]. Process Biochemistry, 2007, 42(10): 1406-1411.

- [18] 黄新仁. 响应面法在生物过程优化中的应用 [D]. 长沙: 湖南大学, 2011.
- [19] 苏丽春,何天文,陈佐威,等.浅谈微生物菌种真空冷冻干燥的影响因素及其保藏形式[J].中国卫生检验杂志,2009, 09:2193-2195.