

海藻酸钠包埋法固定硝基还原假单胞菌的研究

骆叶姣, 丁 红, 帅玉英*

(浙江中医药大学药学院, 杭州 310053)

摘 要: **目的** 优化海藻酸钠和 CaCl_2 对硝基还原假单胞菌 SP.001 细胞的固定化条件。**方法** 以海藻酸钠为载体, 通过包埋法固定化谷氨酰胺酶, 通过单因素实验和正交实验对固定化细胞制备条件进行优化。**结果** 单因素实验中, 当海藻酸钠和 CaCl_2 的浓度分别为 4% 和 3%、酶液量与海藻酸钠的体积比为 1:2、固定化时间为 3 h 时, 包埋效果最好, 测得固定化细胞回收率较高, 可达 80.5%。通过正交实验得出最佳组合为: 酶液量与海藻酸钠体积比 1:3, 固定化时间 3 h, 海藻酸钠浓度 4%, CaCl_2 浓度 3%, 固定化细胞回收率达到 85.78%。**结论** 本研究优化了海藻酸钠包埋法固定硝基还原假单胞菌的条件, 并对固定化细胞的性质进行探讨, 为硝基还原假单胞菌所产的谷氨酰胺酶的固定化和应用提供参考。

关键词: 海藻酸钠; 硝基还原假单胞菌; 固定化

Study on immobilization of nitro-reducing *Pseudomonas* by sodium alginate embedding

LUO Ye-Jiao, DING Hong, SHUAI Yu-Ying*

(College of Pharmacy, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: Objective To optimize the immobilization conditions of sodium alginate and CaCl_2 on nitro-reduced *Pseudomonas* SP.001 cells. **Methods** Using sodium alginate as carrier, glutaminase was immobilized by embedding method, and the preparation conditions of immobilized cells were optimized by single factor experiment and orthogonal experiment. **Results** In the single factor experiment, when the concentration of sodium alginate and CaCl_2 were 4% and 3%, the volume ratio of enzyme liquid volume to sodium alginate was 1:2, and the immobilization time was 3 h, the embedding effect was the best, and the recovery rate of immobilized cells was high, reaching 80.5%. Through orthogonal test, the best combination was obtained as follows: the volume ratio of enzyme liquid volume to sodium alginate was 1:3, the immobilization time was 3 h, the concentration of sodium alginate was 4%, the concentration of CaCl_2 was 3%, and the recovery rate of immobilized cells reached 85.78%. **Conclusion** This study optimizes the conditions for the immobilization of nitroreductive pseudomonas by sodium alginate, and discusses the properties of the immobilized cells, in order to provide reference for the immobilization and application of glutaminase produced by nitroreductive *Pseudomonas*.

KEY WORDS: sodium alginate; *Pseudomonas nitroreducens*; immobilization

基金项目: 浙江省分析测试科研计划项目(2018C37044)、浙江中医药大学时珍青年项目(SZZ201809)

Fund: Supported by the Analysis and Test Research Program in Zhejiang Province (2018C37044), and the Shi Zhen Youth Project in Zhejiang Chinese Medical University (SZZ201809)

*通讯作者: 帅玉英, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品生物技术。E-mail: shuaiyuying@126.com

*Corresponding author: SHUAI Yu-Ying, Ph.D, Senior Engineer, Zhejiang Chinese Medical University, No. 260, Gaoke Road, Fuyang District, Hangzhou 310053, China. E-mail: shuaiyuying@126.com

1 引言

固定化细胞技术是将具有特定生理功能的生物细胞用一定的方法进行固定, 并以其作为生物催化剂加以利用的一门技术^[1,2], 由于游离酶存在着微生物易流失、热不稳定性以及难以回收利用等问题^[3,4], 导致利用率低、推广困难、不利于工业化, 使用固定化细胞可以在很大程度上弥补这种劣势^[5]。固定化细胞技术的关键在于所采用的固定化载体材料的性能, 海藻酸钠是一类天然的具有多糖结构的碳水化合物, 因其具有成本较低、材料易得、安全无毒、忍受生物分解性能好等优点而被广泛应用于固定化细胞技术^[6]。包埋法条件温和, 细胞容量高但成本低, 是细胞固定化最常用的方法, 如Chen等^[7]用纤维床生物反应器固定酿酒酵母进行乙醇生产, 固定化细胞表现出很强的工作稳定性。

目前, 固定化细胞技术应用在食品发酵工业、新食品加工、医药领域等方面, 已成为国内外研究热点, 如L-茶氨酸的合成、抑制肿瘤细胞的活性、新型蛋白质谷氨酰胺酶的开发生产等^[8-11], 其主要应用的酶制剂有谷氨酰转肽酶和谷氨酰胺酶^[12]。其中, 有关于硝基还原假单胞菌谷氨酰胺酶的应用, 国内已有较多报道, 主要有杨成等^[13]对硝基还原假单胞菌谷氨酰胺酶的分离纯化及酶学性质的研究, 贾晓鹤等^[14,15]利用硝基还原假单胞菌细胞进行生物合成和Shuai等^[12]自主筛选出的谷氨酰转肽酶高产菌株酶法合成谷氨酰胺酶来制备茶氨酸。但国内有关于利用固定化硝基还原假单胞菌来酶法合成谷氨酰胺酶的应用以及固定化细胞条件优化的报道却较为少见。

针对该问题, 本研究以海藻酸钠为载体, 通过单因素实验确定了合适的包埋条件, 并通过正交实验确定最佳细胞固定化条件, 为硝基还原假单胞杆菌的固定化和应用提供一定的参考。

2 材料与方法

2.1 材料

菌种: 硝基还原假单胞菌 SP.001, 实验室保存。

主要试剂: γ -GpNA(美国 Amersco 公司); 海藻酸钠、CaCl₂(化学纯, 国药集团化学试剂有限公司); 氯化钠(分析纯)、牛肉浸膏(生化试剂)、琼脂(生化试剂)(北京奥博生物技术有限公司); EDTA-Fe(分析纯, 天津市风船化学试剂科技有限公司); 磷酸氢二钾、磷酸二氢钾(分析纯, 西陇化工股份有限公司); 酵母浸膏(生化试剂, 广东环凯微生物科技有限公司); 甘油(分析纯, 上海化学试剂总厂); 硫酸镁(分析纯, 重庆北碚化学试剂厂)。

斜面培养基(g/L): 牛肉浸膏 3 g/L, 氯化钠 5 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 琼脂 15 g/L, 于 pH 为 7.0, 温度为 121 °C 的条

件下灭菌 20 min。

发酵培养基(g/L): Mg₂SO₄·7H₂O 0.7 g/L, 磷酸氢二钾 0.5 g/L, 蔗糖 5 g/L, EDTA-Fe 0.1 g/L, 磷酸二氢钾 0.5 g/L, 谷氨酸钠 6 g/L, 酵母浸膏 1 g/L, pH 7.0, 于 121 °C, 灭菌 20 min。

种子培养基(g/L): 蛋白胨 10 g/L, 氯化钠 5 g/L, 牛肉浸膏 3 g/L, 于 121 °C, pH 7.0, 灭菌 20 min。

2.2 实验仪器

W201B 数控恒温浴锅(上海申胜生物技术有限公司); UV-755 紫外可见分光光度计(上海昆拉仪器有限公司); Eppendorf Centrifuge 5804R 冷冻离心机(上海富众生物科学有限公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 菌体培养

种子活化培养: 用接种环取 2 环斜面菌体, 接种于种子培养液中, 于转速和温度分别为 200 r/min 和 30 °C 的摇床下培养 24 h 后。以 2%(V/V)接种量接种于发酵培养基中, 以相同条件培养 24 h。斜面培养基在接种后要先放入恒温培养箱(30 °C)培养 24 h, 然后储存于 4 °C 的冰箱内, 每隔 2 周传代 1 次^[13]。

2.3.2 细胞混悬液的制备

将发酵结束后的培养液在 4 °C, 4000 r/min, 离心 10 min 后得到湿菌体。然后用蒸馏水清洗 2 次后离心, 将菌体用适量 pH 8.0, 10 mmol/L 的磷酸氢二钾-磷酸二氢钾缓冲液重悬。

2.3.3 固定化细胞的制备

配制 4%的海藻酸钠溶液, 与细胞混悬液以 2:1(V/V)混合, 距离液面 10 cm 的高度滴入 3%的氯化钙溶液中, 制成表面光滑且大小均匀的凝胶小球, 用无菌水清洗 3 次, 干燥后备用^[16]。

2.3.4 谷氨酰胺酶活力测定方法

将 5 mmol/L γ -谷氨酰对硝基苯胺, 50 μ L 的菌液和 20 mmol/L 双甘二肽配制成 1.0 mL 的 100 mmol/L 咪唑-盐酸(pH=9.0)的反应体系, 并在 37 °C 水浴反应 30 min。反应结束后加入 0.1 mol/L 的三氯乙酸(TCA)终止反应, 并按一定倍数稀释后, 于 $\lambda=410$ nm 测定其吸光值 A, 根据生成的对硝基苯胺浓度来衡量谷氨酰胺酶活力^[17]。

2.3.5 标准曲线的建立

配制 100 mmol/L 咪唑-盐酸缓冲溶液, 将 0.25 mmol/L 的 C₆H₆N₂O₂ 标准样品稀释, 制成 0.125、0.0625、0.03125、0.015625 mmol/L 的 C₆H₆N₂O₂ 溶液, 在 $\lambda=410$ nm 处测吸光度 A^[18]。以不同浓度的对硝基苯胺为横坐标, 吸光值为纵坐标绘制标准曲线。

谷氨酰胺酶的酶活定义为: 以双甘二肽和 γ -谷氨酰对硝基苯胺为底物, 1 min 内转化生成的 1 μ mol 对硝基苯胺

所需要的酶量。

2.3.6 单因素实验

以固定化酶的相对酶活力为考察指标, 探讨海藻酸钠浓度、CaCl₂ 浓度、固定化时间及酶液量与海藻酸钠的体积比对固定化酶活性的影响。考察海藻酸钠浓度(2%、3%、4%、5%)、CaCl₂ 浓度(2%、3%、4%、5%)、固定化时间(1、2、3、4、5 h)、酶液量与海藻酸钠的体积比(1:1、1:2、1:3、1:4)对固定化酶活性的影响。确定最适固定化条件。

2.3.7 固定化细胞回收率的计算

固定化细胞总活性占游离酶总活性的百分数即为固定化细胞回收率。

2.3.8 正交实验

在单因素实验基础上, 选用 L₉(3⁴)正交实验对海藻酸钠浓度、CaCl₂ 浓度、固定化时间及酶液量与海藻酸钠的体积比 4 个因素进行优化, 以获得最佳固定条件参数。

3 结果与分析

3.1 标准曲线

如图 1 所示, 对硝基苯胺的浓度(μmol/L)为 15.625~250 μmol/L 区间内, 吸光度与对硝基苯胺的浓度呈线性关系, 对硝基苯胺的标准曲线为 $Y=0.0082X+0.009$, $r^2=0.9998$ 。说明趋势线的预测值与相对应的实际数据十分接近, 几乎达到重合。

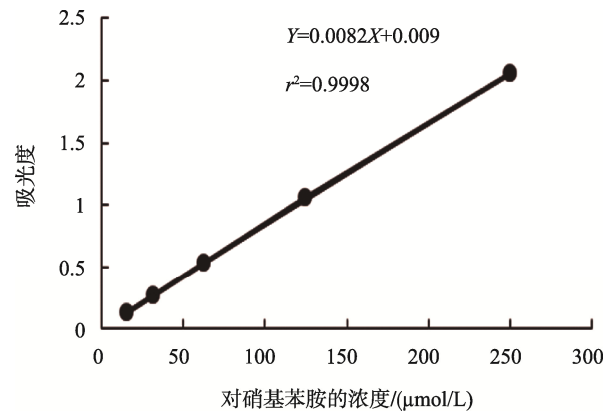


图 1 对硝基苯胺的标准曲线(n=3)
Fig.1 Standard curve of p-nitroaniline (n=3)

3.2 单因素实验

3.2.1 不同浓度的海藻酸钠对固定化细胞酶活力的影响

在 CaCl₂ 浓度 3%, 酶液量与海藻酸钠 1:1(V:V), 固定化时间 2 h 条件下, 设置浓度分别为 2%、3%、4%、5% 的海藻酸钠溶液, 测定其固定化酶的相对活力(以本组最高酶活力为 100%)。实验过程中固定化小球形态如图 2 所示。观察不同浓度下的海藻酸钠溶液对固定化酶活力的影响。结果如表 1、图 3 所示。

由表 1 可知, 海藻酸钠浓度越大, 粘度也会越大, 对

制备凝胶小球的操作会变的困难, 小球的形状也会由一开始的圆球状变成有拖尾的小球。根据图 3 可知: 海藻酸钠浓度从 2%增长到 4%时, 固定化酶的酶活力也随之增加; 当海藻酸钠浓度大于 4%时, 固定化酶活力不再升高反而开始下降。

表 1 海藻酸钠浓度与成球的状态(n=3)
Table 1 Concentration of sodium alginate and state of pelletization (n=3)

海藻酸钠浓度/%	溶液粘度	小球形状	成球难易程度
2	粘度低	呈圆球状	成球比较容易
3	粘度适中	呈圆球状	成球难度适中
4	粘度适中	部分有拖尾	成球操作较困难
5	粘度大	拖尾比较严重	成球操作很困难

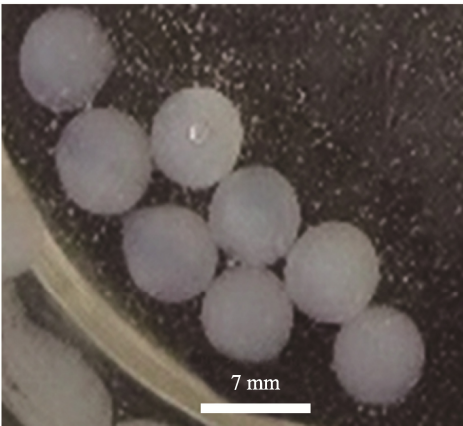


图 2 固定化小球
Fig.2 Immobilization pellets

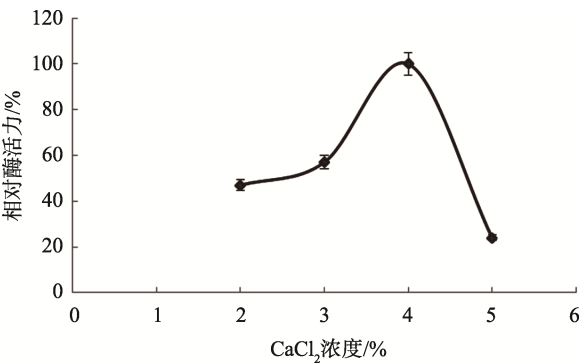


图 3 海藻酸钠浓度对固定化酶的影响(n=3)
Fig. 3 effect of sodium alginate concentration on immobilized enzyme (n=3)

3.2.2 不同浓度的 CaCl₂ 对固定化细胞酶活力的影响

在海藻酸钠浓度 4%, 酶液量与海藻酸钠的体积比 1:1, 固定化时间 2 h 条件下, 分别采用 2%、3%、4%、5% 的 CaCl₂ 溶液进行固定化, 分别测定固定化酶活力(以本组最高酶

活力为 100%)。结果如图 4 所示, CaCl_2 浓度为 3% 时最合适, 其最适 CaCl_2 浓度与管悦^[19]报道的 3% 一致。当 CaCl_2 浓度过低时, 固定化凝胶比较松散, 凝胶孔径比较大, 酶容易流失。而 CaCl_2 浓度过高时, 分布在凝胶表面的 Ca^{2+} 会增多, Ca^{2+} 会与酶反应, 也会降低固定化酶活力。其最适海藻酸钠浓度与魏杰等^[20]报道的 4% 一致。

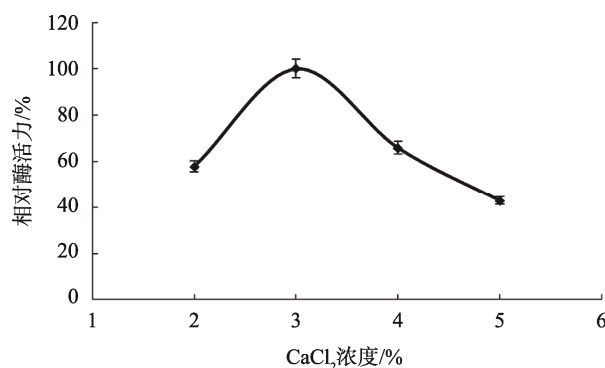


图 4 CaCl_2 浓度对固定化酶的影响 ($n=3$)

Fig. 4 Effect of CaCl_2 concentration on immobilized enzyme ($n=3$)

3.2.3 不同固定化酶液量与海藻酸钠体积比对固定化细胞酶活力的影响

在海藻酸钠浓度 4%, CaCl_2 浓度 3%, 固定化时间 2 h 条件下, 将酶液与 4% 的海藻酸钠按 1:1、1:2、1:3、1:4 的体积比进行固定化, 分别测定固定化酶活力(以本组最高酶活力为 100%)。

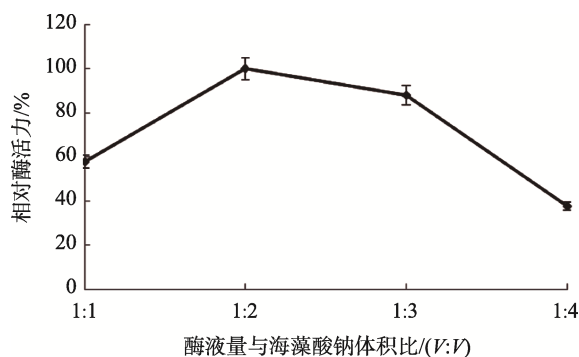


图 5 固定化酶液量与海藻酸钠体积比对固定化酶活力的影响 ($n=3$)

Fig. 5 effect of volume ratio of immobilized enzyme liquid volume to sodium alginate volume on immobilized enzyme activity ($n=3$)

由图 5 可知, 当酶液量与海藻酸钠为 1:2(V:V)时, 固定化酶的相对酶活力最高。当酶液量与海藻酸钠大于 1:2(V:V)时, 固定化酶相对酶活力都会有所下降。此外当体积比为 1:1 时, 配制的溶液会比较稀, 制成的小球较小, 还出现部分不成球的现象。当体积比为 1:3、1:4 时, 海藻酸钠溶液比较多, 配制的溶液粘度比较大, 在制备凝胶小球时比较困难, 且部分小球会出现拖尾现象等。因此当酶液

量与海藻酸钠的体积比为 1:2 时最适合, 其最适固定化酶液量与海藻酸钠体积比与朱磊^[21]报道相似。

3.2.4 不同的固定化时间对固定化细胞酶活力的影响

在海藻酸钠浓度 4%, CaCl_2 浓度 3%, 酶液量与海藻酸钠的体积比 1:1 条件下, 分别设置固定化时间 1、2、3、4、5 h, 分别测定固定化酶活力(以本组最高酶活力为 100%)。

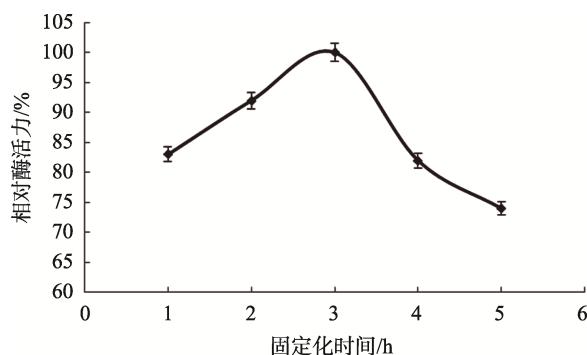


图 6 固定化时间对固定化酶活力的影响 ($n=3$)

Fig. 6 Effect of immobilization time on immobilized enzyme activity ($n=3$)

根据图 6 可知, 固定化时间太长或太短都会对固定化酶活力产生较大的影响。在实验中发现固定化酶活力在固定化时间为 1、2、3 h 时平稳递增, 但固定化时间一旦超过了 3 h, 固定化酶活力开始由急剧下降变成缓慢下降。由此可知, 固定化时间为 3 h 时, 固定化酶的相对酶活力最高。当固定化时间较短时, 小球固定化不充分, 导致 CaCl_2 中的 Ca^{2+} 没有充分的时间来置换海藻酸钠中的 Na^+ , 因此固定化酶活力会相对较低。而当小球固定化时间较长, 会导致小球的结构过于紧密, 底物的扩散阻力增大, 影响了酶促反应速率。因此, 固定化时间为 3 h 时最合适, 其最适固定化时间与管悦等^[19]报道一致。

3.2.5 固定化细胞回收率的计算

在单因素实验基础上, 以海藻酸钠浓度 4%、 CaCl_2 浓度 3%、酶液量与海藻酸钠的体积比为 1:2、固定化时间为 3 h 为反应条件, 测得此条件下固定化细胞回收率达 80.5%。

3.3 正交实验

在单因素实验基础上, 以海藻酸钠浓度、氯化钙浓度、固定化酶液量与海藻酸钠体积比、固定化时间为考察因素进行 $L_9(3^4)$ 正交实验, 以获得最佳固定条件, 设计方案与结果见表 2。由表 2 正交实验结果可知, 各因素的影响顺序大小依次为: 酶液量与海藻酸钠体积比 > 海藻酸钠浓度 > 固定化时间 > CaCl_2 浓度。最佳组合为: 酶液量与海藻酸钠为 1:3(V:V), 固定化时间 3 h, 海藻酸钠浓度 4%, CaCl_2 浓度 3%, 固定化细胞回收率达到 85.78%, 可见优化后的条件下固定化细胞回收率较高。

表 2 正交实验方案与结果
Table 2 Orthogonal test scheme and results

实验号	酶液量与海藻酸钠体积比	固定化时间/h	海藻酸钠浓度/%	CaCl ₂ 浓度/%	固定化细胞回收率/%
1	1:3	2	3	2	78.12
2	1:3	3	4	3	85.78
3	1:3	4	5	4	74.49
4	1:2	2	4	4	70.46
5	1:2	3	5	2	64.16
6	1:2	4	3	3	65.34
7	1:1	2	5	3	48.48
8	1:1	3	3	4	53.48
9	1:1	4	4	2	61.76
k1	79.46	65.69	65.65	68.01	
k2	66.65	67.81	72.67	66.53	
k2	54.57	67.20	62.38	66.14	
R	25.07	2.12	10.29	1.87	

4 结论与讨论

本实验以海藻酸钠为载体通过包埋法固定硝基还原假单胞菌 SP.001, 并通过单因素实验法分析得出固定化酶活力随海藻酸钠浓度越大, 呈现先上升后下降的趋势, 海藻酸钠浓度为 4% 时, 固定化酶活力达到最大。可能原因: 海藻酸钠浓度较大时, 粘度过大成球困难。海藻酸钠浓度较小时, 凝胶孔径较大, 会使细胞流失, 影响固定化细胞酶活。因此在海藻酸钠浓度 4% 时最适宜, 小球的凝胶孔径、机械强度最佳, 相对酶活力最高。根据所得实验数据显示: 固定化硝基还原假单胞菌所产的谷氨酰胺酶活力受多种因素影响, 单因素实验中海藻酸钠和 CaCl₂ 的浓度分别为 4% 和 3%、酶液量与海藻酸钠为 1:2(V:V)、固定化时间为 3 h 为最佳包埋条件。在上述条件下测得固定化细胞回收率较高, 可达 80.5%。通过正交实验得出最佳组合为: 酶液量与海藻酸钠为 1:3(V:V), 固定化时间 3 h, 海藻酸钠浓度 4%, CaCl₂ 浓度 3%, 固定化细胞回收率达到 85.78%。各因素的影响顺序大小依次为: 酶液量与海藻酸钠体积比 > 海藻酸钠浓度 > 固定化时间 > CaCl₂ 浓度。本实验通过单因素和正交实验研究了硝基还原假单胞菌的最佳固定化包埋条件, 今后还需要进一步对固定化细胞的稳定性、重复利用次数等进行研究, 为工业化生产固定化谷氨酰胺酶提供良好基础。

参考文献

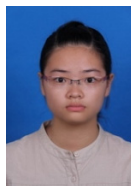
[1] 石小霞, 褚可成, 陈志梅. 固定化细胞技术及其应用[J]. 食品工业科技, 2010, 31(12): 380–382, 385.
Shi XX, Chu KC, Chen ZM. Immobilized cell technology and its

application [J]. Food Ind Sci Technol, 2010, 31(12): 380–382, 385.
[2] Matsuura S, Chiba M, Tomon E, *et al.* Synthesis of amino acid using a flow-type microreactor containing enzyme-mesoporous silica micros Phere composites [J]. Rsc Adv, 2014, 4: 9021–9030.
[3] Liu B, Li P, Zhang CL. Theanine synthesized by immobilizing *Pseudomonas nitroreducens* LY in nanofibrous membranes [J]. Process Biochem, 2010, 45: 1330–1333.
[4] Itoh T, Hoshikawa Y, Matsuura S, *et al.* Production of *L*-theanine using glutaminase encapsulated in carbon-coated mesoporous silica with high phstability [J]. Biochem Eng J, 2012, 68: 207–214.
[5] Lamboley L, Lacroix C, Champagne CP. Continuous mixed strain mesophilic lactic starter production in supplemented whey permeate medium using immobilized cell technology [J]. Biotechnol Bioeng, 2008, 56(5): 502–516.
[6] 蒋宇红, 黄霞, 俞毓馨. 几种固定化细胞载体的比较[J]. 环境科学, 1993, (2): 11–15, 92.
Jiang YH, Huang X, Yu YX. Comparison of several immobilized cell carriers [J]. Environ Sci, 1993, (2): 11–15, 92.
[7] Chen Y, Liu Q, Zhou T, *et al.* Ethanol production by repeated batch and continuous fermentations by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized in a fibrous bed bioreactor [J]. J Microbiol Biotech, 2013, 23(4): 511–517.
[8] Tachiki T, Yamada T, Mizuno K. Gamma-glutamyl transfer reactions by glutaminase from *Pseudomonas nitroreducens* IFO12694 and their application for the syntheses of theanine and gamma-glutamylmethyleamide [J]. Biosci Biotechnol Bioch, 1998, 62: 1279–1283.
[9] Binod P, Sindhu R, Madhavan A, *et al.* Recent developments in *L*-glutaminase production and applications an overview [J]. Bioresource Technol, 2017, 245: 1766–1774.
[10] Wanmeng M, Tao Z, Bo J. An overview of biological production of *L*-theanine [J]. Biotechnol Adv, 2015, 33(3-4): 335–342.

- [11] Chiyakuraishi, Katsutoshiyamazaki, Yasuyukisusa, *et al.* Its utilization in the food industry [J]. Food Revint, 2001, 17(2): 221–246.
- [12] Shuai YY, Zhang T, Jiang B, *et al.* Development of efficient enzymatic production of theanine by γ -glutamyl-transpeptidase from a newly isolated strain of *Bacillus subtilis* SK11. 004 [J]. J Sci Food Agric, 2010, 90(15): 2563–2567.
- [13] 杨成, 张涛, 江波, 等. 硝基还原假单胞菌谷氨酰胺酶的分离纯化及酶学性质[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(12): 16–21.
Yang C, Zhang T, Jiang B, *et al.* Purification and characterization of glutaminase from *Pseudomonas nitroreducens* [J]. Food Ferment Ind, 2012, 38(12): 16–21.
- [14] 贾晓鹤, 陈莉, 赵宁伟, 等. 生物转化法应用重组谷氨酰转肽酶合成L-茶氨酸[J]. 食品工业科技, 2008, 29(2): 166–169.
Jia XH, Chen L, Zhao NW, *et al.* Synthesis of L-theanine by biotransformation using recombinant *Glutamyltranspeptidase* [J]. Food Ind Sci Technol, 2008, 29(2): 166–169.
- [15] 王春晖. 茶氨酸生物合成研究[D]. 北京: 中国农业科学院茶叶研究所, 2005.
Wang CH. Study on theanine biosynthesis [D]. Beijing: Tea Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2005.
- [16] 酒卫敬, 汪苹, 李奥搏, 等. 海藻酸钠作为固定化细胞包埋剂的研究[J]. 科技创新导报, 2011, (2): 12–13.
Jiu WJ, Wang P, Li AB, *et al.* Study on sodium alginate as immobilized cell embedding agent [J]. Sci Technol Innov Herald, 2011, (2): 12–13.
- [17] Liu B, Li P, Zhang CL. Theanine synthesized by immobilizing *Pseudomonas nitroreducens* LY in nanofibrous membranes [J]. Process Biochem, 2010, 45: 1330–1333.
- [18] 张斌, 孙倩, 任延鹏, 等. 海藻酸钠固定化 β -葡萄糖醛酸苷酶的研究[J]. 中国食品添加剂, 2011, (1): 110–115.
Zhang B, Sun Q, Ren YP, *et al.* Study on the immobilization of β -glucuronidase by sodium alginate [J]. China Food Add, 2011, (1): 110–115.
- [19] 管悦. 固定化微生物转化药用植物黄芩的研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2014.
Guan Y. Study on transformation of medicinal plant *scutellaria baicalensis* georgi with immobilized microorganisms [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2014.
- [20] 魏杰, 石钟辉, 候潇, 等. 谷氨酰胺合成酶产生菌的固定化研究[J]. 微生物学杂志, 2007(03): 73–76.
Wei J, Shi ZH, Hou X, *et al.* Immobilization of *Glutamine Synthase* producing strain [J]. J Microbiol, 2007, (3): 73–76.
- [21] 朱磊. 产琼胶酶降解菌的筛选及酶的固定化研究[D]. 大连: 大连工业大学, 2016.
Zhu L. Screening of agarase-degrading bacteria and immobilization of agarase [D]. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2016.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



骆叶姣, 主要研究方向为食品科学与技术。
E-mail: 351911399@qq.com



帅玉英, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品生物技术。
E-mail: shuaiyuying@126.com