

网络出版时间:2014-07-30 16:13

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.09.006

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.09.006.html>

# 固定化失活酵母去除苹果汁中 展青霉素工艺的优化

伍小红<sup>1</sup>,袁亚宏<sup>2</sup>,岳田利<sup>2</sup>

(1 西北政法大学 经济管理学院,陕西 西安 710063;2 西北农林科技大学 食品科学与工程学院,陕西 杨凌 712100)

**【摘要】**【目的】优化固定化失活酵母细胞去除苹果汁中展青霉素的工艺条件,以实现苹果汁中展青霉素的有效去除。【方法】以固定化失活酵母为吸附材料,采用单因素试验分析展青霉素初始质量浓度、固定化失活酵母剂量、吸附时间及苹果汁 pH 值等对展青霉素去除效果的影响,然后采用 Box-Behnken 试验和响应曲面法,优化苹果汁中展青霉素去除的工艺条件。【结果】各因素对苹果汁中展青霉素去除率的影响由大到小顺序为苹果汁 pH 值>吸附时间>固定化失活酵母剂量>展青霉素初始质量浓度。通过 Box-Behnken 试验和响应曲面法优化获得固定化失活酵母去除苹果汁中展青霉素的最佳工艺为:展青霉素初始质量浓度 90.52  $\mu\text{g/L}$ ,苹果汁 pH 4.46,固定化失活酵母剂量 15.13 g/L,吸附时间 18.16 h。在此条件下,展青霉素的去除率为 71.36%。【结论】固定化失活酵母对苹果汁中展青霉素具有明显的吸附去除效果。

**【关键词】** 展青霉素;苹果汁;固定化失活酵母;吸附去除

**【中图分类号】** TS275.5

**【文献标志码】** A

**【文章编号】** 1671-9387(2014)09-0163-08

## Optimization adsorption removal of patulin from apple juice using immobilized inactive yeast

WU Xiao-hong<sup>1</sup>,YUAN Ya-hong<sup>2</sup>,YUE Tian-li<sup>2</sup>

(1 College of Economics and Management, Northwest University of Politics & Law, Xi'an, Shaanxi 710063, China;

2 College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** 【Objective】 This study aimed to obtain optimal conditions for adsorption removal of patulin from apple juice using immobilized inactive yeast. 【Method】 Using immobilized inactive yeast as adsorbent, the effects of initial concentration of patulin, adsorbent dosage, adsorption time and pH of apple juice on the adsorption removal of patulin from apple juice were studied, and the adsorption removal process was optimized by Box-Behnken experiment and response surface method. 【Result】 The influences of various factors on the adsorption removal of patulin from apple juice were ranked as: pH of apple juice>adsorption time>adsorbent dosage>initial concentration of patulin. The optimum conditions evaluated by Box-Behnken experimental design and response surface methodology analysis showed that: the initial concentration of patulin was 90.52  $\mu\text{g/L}$ , pH of apple juice was 4.46, adsorbent dosage of immobilized inactive yeast was 15.13 g/L and adsorption time was 18.16 h. Under the optimal conditions, adsorption removal rate of patulin from apple juice was 71.36%. 【Conclusion】 The immobilized inactive yeast could be used for adsorption re-

**【收稿日期】** 2014-04-04

**【基金项目】** 国家“十二五”科技支撑计划项目(2012BAK17B06;2012BAD31B01);国家自然科学基金项目(31371814,31711721)

**【作者简介】** 伍小红(1971—),女,陕西汉中,讲师,硕士,主要从事食品工程研究。E-mail: wuxiaohong@163.com

**【通信作者】** 袁亚宏(1970—),女,甘肃天水人,教授,硕士生导师,主要从事食品生物技术及食品安全控制研究。

E-mail: yuan324@msn.com

moval of patulin from apple juice.

**Key words:** patulin; apple juice; immobilized inactive yeast; adsorption removal

展青霉素(Patulin)是青霉属、曲霉属、裸囊菌属和丝衣霉属中某些真菌的次生代谢产物<sup>[1]</sup>,具有致畸、致癌和致突变作用<sup>[2]</sup>。展青霉素在霉烂的果蔬及其制品中均有发现,且在苹果汁、葡萄汁中表现很稳定<sup>[3]</sup>。目前,展青霉素的控制方法主要有物理吸附、辐照处理、微波处理、添加食品添加剂处理、生物处理等方法<sup>[4-5]</sup>。简单的物理吸附法对溶液中的展青霉素具有一定的吸附去除作用,活性炭和膨润土可作为良好的结合剂来吸附溶液中存在的毒素。有研究证明,使用 3~5 g/L 活性炭对含有展青霉素的苹果汁处理 5 min,即可有效降低展青霉素的污染水平<sup>[6]</sup>; Huebner 等<sup>[7]</sup>开展了基于复合碳-固定床吸附器的苹果汁中展青霉素的控制研究; Kadakal 等<sup>[8]</sup>研究发现,使用活性炭可以将苹果酒中质量浓度为 30 μg/mL 的展青霉素完全去除。但是上述研究也显示,利用活性炭吸附展青霉素的同时会明显影响果汁本身的品质。在其余控制方法中,辐照处理法局限性较大<sup>[9]</sup>,微波处理工业化应用难度较大,添加食品添加剂的方法则不适合天然果汁的生产。因此,寻求建立一种高效安全的生物吸附法以实现展青霉素的有效控制是目前国内外研究的热点。

生物吸附是指以酵母、乳酸菌等生物体细胞及其衍生物为吸附剂,实现环境及样品中污染物去除与控制的处理方法<sup>[10-11]</sup>。酿酒酵母是食品工业中广泛使用的一种微生物,其失活菌体对果汁中的展青霉素具有良好的吸附效果,这一结论在之前的研究中已经得到了充分的验证<sup>[12-13]</sup>。但是由于失活酵母细胞个体微小,在处理展青霉素之后对其进行分离时存在一定困难,这就限制了失活酵母在果汁生产中的实际应用。而基于材料学与生物学相结合的酵母固定化技术可使失活酵母快速分离与聚集,耐毒害能力增强,特别是使其反应更加稳定,并且减少了微生物的流失,产物更易分离,为基于生物吸附法的展青霉素的有效控制提供了新思路<sup>[14-16]</sup>。但目前通过固定化技术改良微生物细胞进行污染物去除的研究,主要集中在水体中重金属去除控制方面<sup>[17-18]</sup>。为此,本试验以固定化失活酵母为吸附剂进行苹果汁中展青霉素的去除研究,通过对去除工艺条件的系统优化,以期为苹果汁中展青霉素的有效控制提供新的思路和方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料与试剂

酿酒酵母,来源于西北农林科技大学食品科学与工程学院发酵动力学实验室;浓缩苹果汁,由陕西恒兴果汁饮料有限公司提供;展青霉素标准品,纯度≥99%,购买于上海贝基生物科技有限公司。

主要试剂有乙腈(色谱纯,纯度 99.5%以上)、乙酸乙酯(分析纯,纯度 99.5%以上)、乙酸(分析纯,纯度约 98%)、乙醇(分析纯,纯度 99.7%以上)、碳酸钠(分析纯)、海藻酸钠、无水氯化钙等。

### 1.2 主要仪器与设备

SHB-Ⅲ型循环水式多用真空泵,郑州长城科工贸有限公司;HSQ-3 型恒温水浴锅,上海福玛实验设备有限公司;UV-2550 型双光束紫外可见光分光光度计、LC-2010A 型高效液相色谱仪,日本岛津公司。

### 1.3 展青霉素贮备液的制备

称取 5.0 mg 展青霉素标准品,用乙酸乙酯充分溶解,定容至 20.00 mL。将配好的展青霉素贮备液转至棕色磨口试剂瓶中,冷藏备用。

### 1.4 酵母菌的培养

1.4.1 酵母菌的活化 取保存的菌种于 YPD 平板培养基上进行划线培养,培养温度为 28 ℃,培养时间为 24 h。

1.4.2 一级培养 将经过 24 h 活化的酵母菌接种到 80 mL 苹果汁培养基中,28 ℃、120 r/min 条件下培养 24 h。

1.4.3 二级培养 将一级培养获得的种子液接种(接种量 5%)到 100 mL 苹果汁培养基中,于 28 ℃、120 r/min 条件下扩大培养 24 h。

### 1.5 固定化失活酵母的制备

1.5.1 失活酵母的制备 对扩增获得的酵母菌培养液离心、洗涤,得到酵母泥。然后在 80 ℃条件下对酵母菌灭活处理 45 min,得到失活的酵母菌体。

1.5.2 酵母细胞活性的鉴定 为了避免酵母对果汁产生发酵反应并保证完全是失活酵母细胞在果汁中起作用,通过美兰染色法鉴定灭活处理后酵母细胞的活性。具体操作步骤如下<sup>[15]</sup>:在载玻片中央加 1 滴质量分数 0.1%的美兰染色液,取少许酵母粉放在染液中,混合均匀,用镊子取一块盖玻片,先将一

边与菌液接触,然后慢慢将盖玻片放下使其盖在菌液上,将制品放置约 3 min 后镜检,分别用低倍镜和高倍镜观察酵母的细胞形态、出芽及染色情况,染色 0.5 h 后再次观察,如果细胞无色表示是活细胞,如果细胞不褪色表示其已完全失活<sup>[19]</sup>。

1.5.3 失活酵母的固定化 采用海藻酸钠包埋法进行失活酵母的固定化<sup>[20]</sup>。具体操作步骤如下:称取 1.66 g 无水 CaCl<sub>2</sub>,加入 300 mL 蒸馏水溶解,制备获得 0.05 mol/L CaCl<sub>2</sub> 溶液。同时,将 3 g 海藻酸钠加入 100 mL 蒸馏水中,用电磁炉缓慢加热并搅拌,将其完全溶化。将溶化好的海藻酸钠溶液冷却至室温,加入 30 g 酵母泥,充分搅拌使其混合均匀,形成海藻酸钠-酵母菌悬液,转移至配有 22-G1 型号针头的注射器中。以恒定的速度缓慢将注射器中的溶液滴加到配制好的 CaCl<sub>2</sub> 溶液中,形成凝胶珠,静置 1 h,使其完全固定化。无菌去离子水洗涤固定化的失活酵母细胞,并重新加入 0.05 mol/L CaCl<sub>2</sub> 溶液,4 ℃ 下平衡备用。本试验中获得的凝胶颗粒直径为 1.5~2 mm,经过 5 000 r/min 离心试验测试,证明该酵母颗粒机械强度较高,具备稳定的物理性能,可满足试验的要求。

1.6 试验设计与数据处理

1.6.1 单因素试验设计 (1)固定化失活酵母剂量的影响。精确称取固定化失活酵母 0,0.3,0.5,0.7,0.9 g,分别加入到 30 mL 加标果汁样品中,使固定化失活酵母的剂量分别为 3.3,10.0,16.7,

23.3和 30.0 g/L,室温条件下振荡吸附,振动频率为 120 r/min,吸附时间为 24 h,评价固定化失活酵母剂量对展青霉素去除率的影响。(2)吸附时间的影 响。分别将 0.5 g 固定化失活酵母加入到不同加标果汁样品中(30 mL),于室温条件下振荡(120 r/min)吸附,分别在吸附开始的 6,12,18,24 h 取样,测定吸附时间对展青霉素去除率的影响。(3)展青霉素初始质量浓度的影响。分别取 30 mL 质量浓度分别为 50,100,300,500 μg/L 的加标苹果汁,加入0.5 g 固定化失活酵母于室温条件下振荡(120 r/min)吸附,吸附时间为 24 h,评价展青霉素初始质量浓度对苹果汁中展青霉素去除率的影响。(4)苹果汁 pH 的影响。以 pH 缓冲液调节苹果汁的 pH 分别为 3.0,4.0,5.0,加入 0.5 g 固定化失活酵母,于室温条件下振荡(120 r/min)吸附,吸附时间为 24 h,评价苹果汁 pH 对展青霉素去除率的影响。

每次吸附完成后将固定化失活酵母颗粒与果汁分离,采用 HPLC 法测定果汁中的展青霉素含量,每个处理设 3 次重复。同时,以未添加固定化失活酵母的苹果汁为空白对照。

1.6.2 Box-Behnken 试验设计 通过单因素试验,确定去除展青霉素的 最佳固定化失活酵母剂量、吸附时间、展青霉素初始质量浓度和苹果汁 pH 值,分别以 X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub>表示,并以 1、0、-1 分别代表自变量的高、中、低 3 个不同的编码水平。然后进行 Box-Behnken 试验设计,其因素和水平见表 1。

表 1 固定化失活酵母去除苹果汁中展青霉素工艺的 Box-Behnken 试验的因素及水平  
Table 1 Levels of experimental factors of Box-Behnken experiment for removal of patulin from apple juice using immobilized inactive yeast

| 水平<br>Level | 因素 Factor                                                 |                               |                                                    |                           |
|-------------|-----------------------------------------------------------|-------------------------------|----------------------------------------------------|---------------------------|
|             | X <sub>1</sub>                                            | X <sub>2</sub>                | X <sub>3</sub>                                     | X <sub>4</sub>            |
|             | 展青霉素初始质量浓度/(μg·L <sup>-1</sup> )<br>Initial concentration | 苹果汁 pH 值<br>pH of apple juice | 固定化失活酵母剂量/(g·L <sup>-1</sup> )<br>Adsorbent dosage | 吸附时间/h<br>Adsorption time |
| -1          | 50.0                                                      | 3.0                           | 10.0                                               | 12                        |
| 0           | 100.0                                                     | 4.0                           | 16.7                                               | 18                        |
| 1           | 150.0                                                     | 5.0                           | 23.3                                               | 24                        |

1.6.3 去除率计算 各处理样品中展青霉素去除率的计算公式为: $q=(C_0-C_i)/C_0\times 100\%$ 。式中,q 为固定化失活酵母对展青霉素的去除率,%;C<sub>0</sub> 为吸附前样品中展青霉素的质量浓度,μg/L;C<sub>i</sub> 为吸附后样品中展青霉素的质量浓度,μg/L。

2 结果与分析

2.1 苹果汁中展青霉素去除率的影响因素

不同因素对苹果汁中展青霉素去除率的影响见图 1~图 4。

2.1.1 固定化失活酵母剂量 由图 1 可知,当固定化失活酵母剂量依次为 3.3,10.0,16.7,23.3 和 30.0 g/L 时,果汁中展青霉素的质量浓度明显下降,固定化失活酵母对果汁中展青霉素的去除率依次为 43.2%,64.8%,68.8%,68.8%,68.8%。由此判断,剂量为 3.3~30.0 g/L 的固定化失活酵母对果汁中的展青霉素均有吸附作用,吸附效果取决于酵母剂量大小,但当固定化失活酵母剂量为 16.7 g/L 时,其对果汁中展青霉素的吸附达到最大,继续增加其用量不会使展青霉素的去除率进一步升高。

由此确定固定化失活酵母的最佳剂量为 16.7 g/L。

2.1.2 固定化失活酵母吸附时间 由图 2 可知,对展青霉素初始质量浓度为 96.97  $\mu\text{g/L}$  的苹果汁样品,用固定化失活酵母吸附 6 h 时,展青霉素质量浓度下降至 78.64  $\mu\text{g/L}$ ,去除率为 18.9%;吸附 12 h 后,展青霉素的质量浓度下降至 39.08  $\mu\text{g/L}$ ,去除率为 59.7%;当吸附时间为 18 h 时,展青霉素质量

浓度下降至 25.80  $\mu\text{g/L}$ ,去除率为 73.39%;当吸附时间延长至 24 h 时,展青霉素的质量浓度为 24.08  $\mu\text{g/L}$ ,去除率为 75.17%,此时,展青霉素的吸附去除基本达到平衡,继续延长吸附时间对展青霉素去除率影响不大。因此综合考虑,确定固定化失活酵母的最佳吸附时间为 18 h。

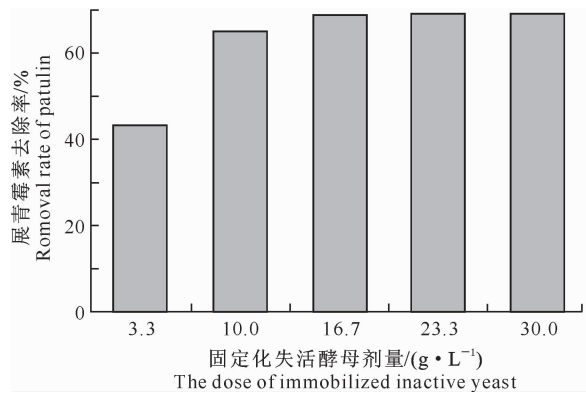


图 1 固定化失活酵母剂量对苹果汁中展青霉素去除率的影响

Fig. 1 Effects of yeast dose on removal rate of patulin from apple juice by immobilized inactive yeast

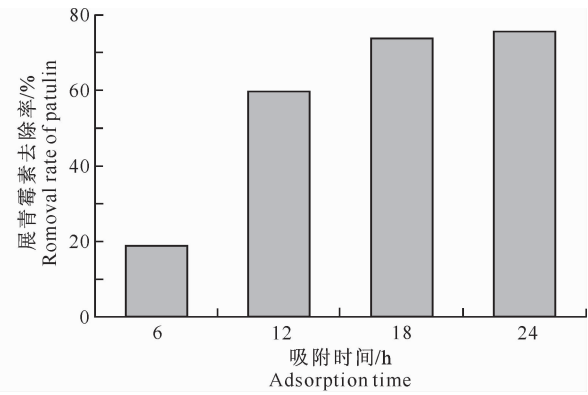


图 2 固定化失活酵母吸附时间对苹果汁中展青霉素去除率的影响

Fig. 2 Effects of adsorption time on removal rate of patulin from apple juice by immobilized inactive yeast

2.1.3 苹果汁中展青霉素初始质量浓度 如图 3 所示,按照 30 mL 样品中加入 0.5 g 固定化失活酵母,对展青霉素初始质量浓度为 50  $\mu\text{g/L}$  的苹果汁加标样品进行 24 h 吸附处理,展青霉素去除率达到

79.12%;随着加标果汁样品中展青霉素初始质量浓度的增大,固定化失活酵母对展青霉素的去除率呈下降趋势,当展青霉素初始质量浓度为 500  $\mu\text{g/L}$  时,其去除率为 27.38%。

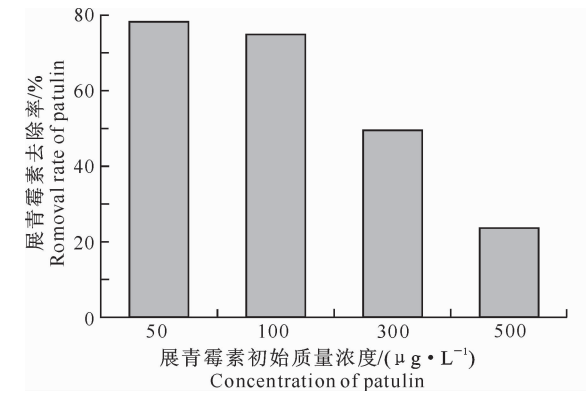


图 3 苹果汁中展青霉素初始质量浓度对固定化失活酵母去除展青霉素的影响

Fig. 3 Effect of initial concentration on removal rate of patulin from apple juice by immobilized inactive yeast

由此得出,展青霉素初始质量浓度为 50~500  $\mu\text{g/L}$  时,固定化失活酵母对其均有去除作用,但是去除效果随着展青霉素初始质量浓度的不同而变化较大。随着加标样品中展青霉素初始质量浓度的升高,固定化失活酵母对展青霉素的吸附去除率呈现

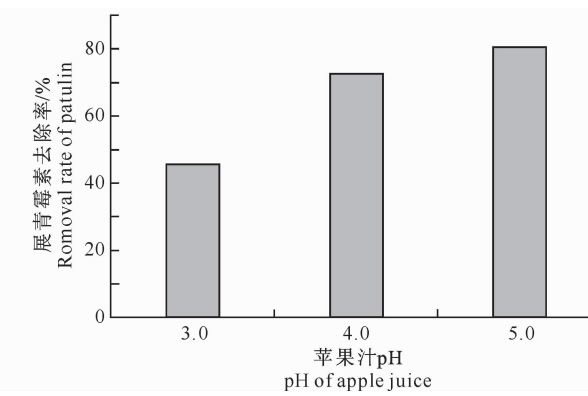


图 4 苹果汁 pH 值对固定化失活酵母去除展青霉素的影响

Fig. 4 Effects of pH on removal rate of patulin from apple juice by immobilized inactive yeast

下降趋势,并最终达到吸附平衡。这是因为对于一定量的固定化酵母,其可以吸附展青霉素的结合位点总量是一定的,当展青霉素质量浓度逐渐增大时,固定化失活酵母吸附到的目标物增多,当展青霉素初始质量浓度增大到一定程度时,固定化失活酵母

的吸附位点基本被完全结合,即使继续增大加标果汁中展青霉素的质量浓度,固定化酵母细胞对其的吸附总量也不会有太大改变。因此,本试验确定的展青霉素的<sup>最佳初始质量浓度为 100 μg/L</sup>,在此条件下展青霉素去除率可以达到75.16%。

2.1.4 苹果汁 pH 值 由图 4 可知,在展青霉素初始质量浓度为 96.97 μg/L 的加标样品中,当苹果汁 pH 值为 3.0,4.0 和 5.0 时,去除率分别为 46.1%,73.7%和 80.8%。可见,展青霉素的去除率随着 pH 的增大而增加。据文献报道<sup>[16]</sup>,展青霉素在酸

性条件下比较稳定,不易分解,所以苹果汁本身的酸度对固定化失活酵母去除展青霉素起着至关重要的影响。固定化失活酵母可以用于不同酸度苹果汁样品中展青霉素的吸附去除,在苹果汁 pH 值为 5.0 时具有最佳的效果。

2.2 苹果汁中展青霉素去除工艺条件的优化

2.2.1 Box-Behnken 试验 在单因素试验基础上,进行 4 因素 3 水平的 Box-Behnken 试验设计,对苹果汁中展青霉素去除工艺进行优化,结果见表 2。

表 2 固定化失活酵母去除苹果汁中展青霉素工艺的 Box-Behnken 试验结果

Table 2 Experimental design and results for the removal of patulin from apple juice by immobilized inactive yeast

| 试验号<br>No. | 因素水平 Factor level                                     |                                        |                                                 |                                           | 展青霉素<br>去除率(Y)/%<br>Removal rate<br>of patulin |
|------------|-------------------------------------------------------|----------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------|------------------------------------------------|
|            | X <sub>1</sub><br>展青霉素初始质量浓度<br>Initial concentration | X <sub>2</sub><br>苹果汁 pH 值<br>pH value | X <sub>3</sub><br>固定化失活酵母剂量<br>Adsorbent dosage | X <sub>4</sub><br>吸附时间<br>Adsorption time |                                                |
| 1          | 1                                                     | 1                                      | 0                                               | 0                                         | 28.37                                          |
| 2          | 0                                                     | —1                                     | 0                                               | 1                                         | 40.79                                          |
| 3          | 0                                                     | —1                                     | 0                                               | —1                                        | 29.82                                          |
| 4          | —1                                                    | 1                                      | 0                                               | 0                                         | 70.00                                          |
| 5          | 0                                                     | 1                                      | 0                                               | —1                                        | 42.37                                          |
| 6          | 1                                                     | 0                                      | 1                                               | 0                                         | 67.60                                          |
| 7          | 1                                                     | 0                                      | —1                                              | 0                                         | 61.00                                          |
| 8          | 0                                                     | 0                                      | —1                                              | 1                                         | 45.06                                          |
| 9          | —1                                                    | —1                                     | 0                                               | 0                                         | 4.25                                           |
| 10         | —1                                                    | 0                                      | —1                                              | 0                                         | 49.01                                          |
| 11         | 0                                                     | 1                                      | —1                                              | 0                                         | 72.10                                          |
| 12         | 0                                                     | 0                                      | 1                                               | 1                                         | 70.98                                          |
| 13         | 0                                                     | 0                                      | —1                                              | —1                                        | 52.00                                          |
| 14         | —1                                                    | 0                                      | 0                                               | 1                                         | 37.95                                          |
| 15         | 0                                                     | 1                                      | 0                                               | 1                                         | 43.25                                          |
| 16         | 0                                                     | 0                                      | 0                                               | 0                                         | 71.99                                          |
| 17         | 0                                                     | —1                                     | 1                                               | 0                                         | 71.50                                          |
| 18         | 0                                                     | 0                                      | 0                                               | 0                                         | 71.96                                          |
| 19         | 0                                                     | 0                                      | 0                                               | 0                                         | 71.98                                          |
| 20         | 1                                                     | 0                                      | 0                                               | 1                                         | 49.10                                          |
| 21         | 1                                                     | 0                                      | 0                                               | —1                                        | 32.77                                          |
| 22         | —1                                                    | 0                                      | 0                                               | —1                                        | 33.00                                          |
| 23         | 0                                                     | 1                                      | 1                                               | 0                                         | 71.80                                          |
| 24         | —1                                                    | 0                                      | 1                                               | 0                                         | 52.50                                          |
| 25         | 0                                                     | —1                                     | —1                                              | 0                                         | 50.21                                          |
| 26         | 0                                                     | 0                                      | 1                                               | —1                                        | 42.09                                          |
| 27         | 1                                                     | —1                                     | 0                                               | 0                                         | 49.00                                          |

利用 Desingn-Expert 7.0 软件对表 2 试验数据进行多元回归拟合,得到的二次多项回归模型方程为:

Y=71.977+3.428X<sub>1</sub>+6.86X<sub>2</sub>+3.924X<sub>3</sub>+4.59X<sub>4</sub>—17.775X<sub>1</sub><sup>2</sup>—21.595X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>+0.778X<sub>1</sub>X<sub>3</sub>+2.845X<sub>1</sub>X<sub>4</sub>—12.911X<sub>2</sub><sup>2</sup>—5.398X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>—2.523X<sub>2</sub>X<sub>4</sub>+3.638X<sub>3</sub><sup>2</sup>+8.958X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>—19.696X<sub>4</sub><sup>2</sup>。

式中:Y 为固定化失活酵母对苹果汁中展青霉素去除率的预测值,X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub> 分别为展青霉素初始质量浓度、苹果汁 pH 值、固定化失活酵母剂量和吸附时间的编码值。该模型的方差分析结果见表 3。由表 3 可以看出,回归模型的 P<0.000 1,且模型预测值与试验值之间有较好的相关性(R<sup>2</sup>=0.946 7),说明采用响应曲面法进行固定化失活酵母去除苹果汁中展青霉素试验所得回归模型是有效

的。对回归方程系数的显著性进行检验,结果表明,模型一次项中, $X_2(P=0.0019)$ 、 $X_3(P=0.0426)$ 和 $X_4(P=0.0211)$ 有显著或极显著的影响;二次项中, $X_1^2(P<0.0001)$ 、 $X_2^2(P=0.0003)$ 和 $X_4^2(P<0.0001)$ 均有极显著影响;交互项中, $X_1X_2(P<$

$0.0001)$ 有极显著影响, $X_3X_4(P=0.0113)$ 有显著影响。各因素对展青霉素去除率影响由小到大顺序为展青霉素初始质量浓度<固定化失活酵母剂量<吸附时间<苹果汁 pH 值。

表 3 苹果汁中展青霉素去除率与其影响因素回归模型的方差分析结果

Table 3 Variance of quadratic model for the adsorption removal of patulin from apple juice and its factors

| 变异来源<br>Source of variation | 平方和<br>Sum of squares | 自由度<br>Degree of freedom | 均方<br>Mean square | F 值<br>F value | P 值<br>P value | 显著性<br>Significance |
|-----------------------------|-----------------------|--------------------------|-------------------|----------------|----------------|---------------------|
| 模型 Model                    | 7 663.429             | 14                       | 547.388           | 15.233         | <0.000 1       | * *                 |
| $X_1$                       | 140.973               | 1                        | 140.973           | 3.923          | 0.071 0        |                     |
| $X_2$                       | 564.715               | 1                        | 564.715           | 15.716         | 0.001 9        | * *                 |
| $X_3$                       | 184.789               | 1                        | 184.789           | 5.143          | 0.042 6        | *                   |
| $X_4$                       | 252.817               | 1                        | 252.817           | 7.036          | 0.021 1        | *                   |
| $X_1X_2$                    | 1 865.376             | 1                        | 1 865.376         | 51.912         | <0.000 1       | * *                 |
| $X_1X_3$                    | 2.418                 | 1                        | 2.418             | 0.067          | 0.799 7        |                     |
| $X_1X_4$                    | 32.376                | 1                        | 32.376            | 0.901          | 0.361 2        |                     |
| $X_2X_3$                    | 116.532               | 1                        | 116.532           | 3.243          | 0.096 9        |                     |
| $X_2X_4$                    | 25.452                | 1                        | 25.452            | 0.708          | 0.416 5        |                     |
| $X_3X_4$                    | 320.947               | 1                        | 320.947           | 8.932          | 0.011 3        | *                   |
| $X_1^2$                     | 1 684.991             | 1                        | 1 684.991         | 46.892         | <0.000 1       | * *                 |
| $X_2^2$                     | 889.011               | 1                        | 889.011           | 24.741         | 0.000 3        | * *                 |
| $X_3^2$                     | 70.584                | 1                        | 70.584            | 1.964          | 0.1864         |                     |
| $X_4^2$                     | 2 068.938             | 1                        | 2 068.938         | 57.577         | <0.000 1       | * *                 |
| 残差 Residual                 | 164.43                | 12                       | 13.70             |                | <0.000 1       |                     |
| 失拟项 Lack of fit             | 431.199 6             | 10                       | 43.119            | 184 799.6      | 0.086          |                     |
| 总回归 Cor Total               | 8 094.629 0           | 26                       |                   |                |                |                     |

注: \* 表示差异显著( $P<0.05$ ), \* \* 表示差异极显著( $P<0.01$ )。

Note: \* means significant difference ( $P<0.05$ ), \* \* means highly significant difference ( $P<0.01$ ).

2.2.2 各因素交互作用对展青霉素去除的影响

固定 2 个因素水平,分别考察其余 2 个因素对展青霉素去除率的影响,得到展青霉素初始质量浓度( $X_1$ )和苹果汁 pH 值( $X_2$ )、吸附时间( $X_4$ )和固定化失活酵母剂量( $X_3$ )对展青霉素去除率( $Y$ )的影响如下式所示:

$$Y=71.977+3.428X_1+6.86X_2-17.775X_1^2-21.595X_1X_2-12.911X_2^2,$$

$$Y=71.977+3.924X_3+4.59X_4+3.638X_3^2+8.958X_3X_4-19.696X_4^2。$$

图 5 和图 6 分别为固定化失活酵母吸附去除苹果汁中展青霉素的过程中,展青霉素初始质量浓度与苹果汁 pH 值、吸附时间与固定化失活酵母剂量之间交互作用对展青霉素去除率影响的响应面曲线。由图 5 可知,当固定化失活酵母剂量为 16.7 g/L、吸附时间为 18 h 时,等高曲线沿  $X_2$ (苹果汁 pH 值)方向变化较快,呈抛物线形式变化,而沿  $X_1$

(展青霉素初始质量浓度)方向变化较慢,表明在本试验水平下,苹果汁 pH 值对去除率的影响较展青霉素初始质量浓度明显。由图 6 可知,当苹果汁 pH 值和展青霉素初始质量浓度分别为 4.0 和 100.0  $\mu\text{g/L}$  时,等高曲线沿  $X_4$ (吸附时间)方向变化较快,呈抛物线形式变化,而沿  $X_3$ (固定化失活酵母剂量)方向变化较慢,提示在试验水平下,吸附时间对去除率的影响较固定化失活酵母剂量明显。

2.2.3 展青霉素的最佳去除工艺 利用 SAS 9.1 软件分析得到固定化失活酵母去除苹果汁中展青霉素的最佳工艺条件为:展青霉素初始质量浓度 90.52  $\mu\text{g/L}$ ,苹果汁 pH=4.46,固定化失活酵母剂量 15.13 g/L,吸附时间 18.16 h,在此条件下,固定化失活酵母对苹果汁中展青霉素的去除率为 72.89%。对上述优化条件进行试验验证,可知展青霉素的去除率为 71.36%。

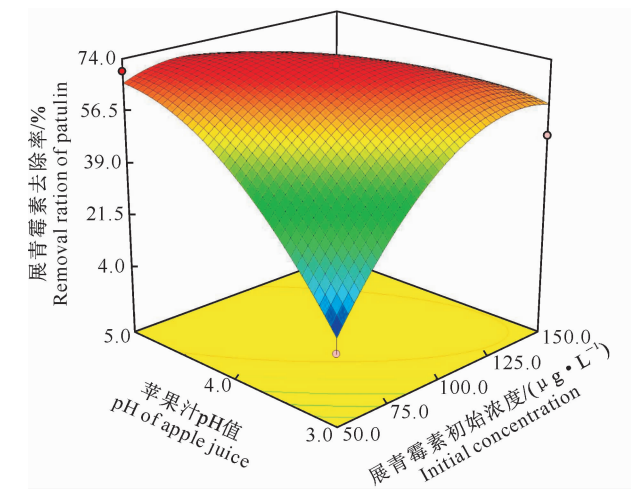


图 5 展青霉素初始质量浓度、苹果汁 pH 及其交互作用对固定化失活酵母去除苹果汁中展青霉素的影响  
Fig. 5 Effects of initial concentration and pH on adsorption removal of patulin from apple juice by immobilized inactive yeast

3 结 论

1)以单因素试验为基础,利用响应曲面法对影响固定化失活酵母去除苹果汁中展青霉素的关键因子及其交互作用进行分析,结果表明,各因素对展青霉素去除率的影响由小到大顺序为展青霉素初始质量浓度<固定化失活酵母剂量<吸附时间<苹果汁 pH 值。优化获得的固定化失活酵母去除苹果汁中展青霉素的最佳工艺条件为:展青霉素初始质量浓度 90.52 μg/L,苹果汁 pH=4.46,固定化失活酵母剂量 15.13 g/L,吸附时间 18.16 h。在此条件下,展青霉素的去除率为 71.36%。

2)与传统展青霉素去除方法相比,采用固定化失活酵母去除苹果汁中展青霉素时,该方法具有高效快捷、成本低廉的特点,且极大提高了苹果汁的安全性,因此该方法具有很强的实用价值,其产业化应用前景极为广阔。

[参考文献]

[1] 吴永宁. 现代食品安全科学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2000.  
Wu Y N. Present knowledge in food safety [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2000. (in Chinese)  
[2] 乌日娜, 尚洁. 水果及其制品中展青霉素的残留分析进展 [J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2007, 30(3): 188-190.  
Wu R N, Shang J. Review on analysis residual in fruit and its products [J]. Chinese Journal of Frontier Health and Quarantine, 2007, 30(3): 188-190. (in Chinese)

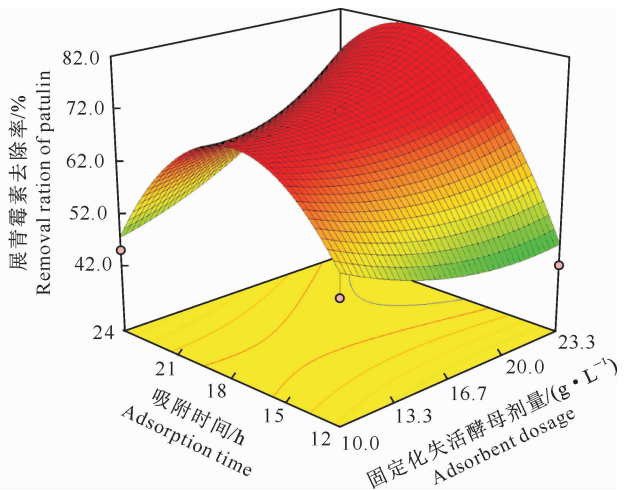


图 6 吸附时间、固定化失活酵母剂量及其交互作用对固定化失活酵母去除苹果汁中展青霉素的影响  
Fig. 6 Effects of adsorption time and adsorbent dosage on adsorption removal of patulin from apple juice by immobilized inactive yeast

[3] 王莹, 岳田利, 王丽. 展青霉素控制技术及检测方法研究进展 [J]. 农产品加工, 2007(3): 48-51.  
Wang Y, Yue T L, Wang L. Review on the controlling and determination methods of patulin [J]. Farm Products Processing, 2007(3): 48-51. (in Chinese)  
[4] 范春辉, 孟庆娟, 张颖. 以废菌体为填料的连续流反应器对 Pb<sup>2+</sup> 的吸附特性 [J]. 环境科学研究, 2008, 21(1): 188-191.  
Fan C H, Meng Q J, Zhang Y. Study on the characteristics of dynamic biosorption on Pb<sup>2+</sup> by discarded *Saccharomyces cerevisiae* filled in continuous-up flow reactor [J]. Research of Environmental Sciences, 2008, 21(1): 188-191. (in Chinese)  
[5] 王建龙. 生物固定化技术与水污染控制 [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 233-247.  
Wang J L. Biological immobilized technology and pollution control [M]. Beijing: Science Press, 2002: 233-247. (in Chinese)  
[6] Artik N, Cemeroglu B, Aydar G, et al. Use of activated carbon for patulin control in apple juice concentrate [J]. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 1995, 19(4): 259-265.  
[7] Huebner H J, Mayura K, Pallaroni L, et al. Development and characterization of a carbon-based composite material for reducing patulin levels in apple juice [J]. Journal of Food Protection, 2000, 63: 106-110.  
[8] Kadakal C, Nas S. Effect of heat treatment and evaporation on patulin and some other properties of apple juice [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2006, 83: 987-990.  
[9] Keyser M, Muller I A, Cilliers F P, et al. Ultraviolet radiation as a non-thermal treatment for the inactivation of microorganisms in fruit juice [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2008, 9: 348-354.  
[10] 叶锦韶, 尹华, 彭辉, 等. 重金属的生物吸附研究进展 [J]. 城市环境与城市生态, 2001, 14(3): 30-32.  
Ye J S, Yin H, Peng H, et al. Research advances in heavy met-

al removal by biosorption [J]. Urban Environment and Urban Ecology, 2001, 14(3): 30-32. (in Chinese)

[11] 陈 灿, 王建龙. 酿酒酵母吸附重金属离子的研究进展 [J]. 中国生物工程杂志, 2006, 26(1): 69-76.  
Chen C, Wang J L. Review on biosorption of heavy metal by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Journal of Chinese Biotechnology, 2006, 26(1): 69-76. (in Chinese)

[12] Llovera M, Viladrich R, Torres M, et al. Analysis of underivatized patulin by a GC-MS technique [J]. Journal of Food Protection, 1999, 62(2): 202-205.

[13] Yue T L, Dong Q F, Guo C X, et al. Reducing patulin contamination in apple juice using inactive yeast [J]. Journal of Food Protection, 2011, 74(1): 149-153.

[14] Dong Q F, Yue T L, Worobo R W. Reduction of patulin in apple cider by UV radiation [J]. Journal of Food Protection, 2010, 73(1): 69-74.

[15] Wiliams C J, Aderhold D, Edyvean R G J. Comparison between biosorbents for the removal of metal ions from aqueous solutions [J]. Water Res, 1998, 32(1): 216-224.

[16] Beretta B, Gaiaschi A, Galli C L, et al. Patulin in apple-based foods; Occurrence and safety evaluation [J]. Food Addit Contam, 2000, 17(5): 399-406.

[17] 武 运, 杨海燕, 朱建雯, 等. 固定化啤酒酵母菌体吸附  $\text{Cu}^{2+}$  的研究 [J]. 新疆农业大学学报, 2007, 30(4): 102-105.  
Wu Y, Yang H Y, Zhu J W, et al. Study on biosorption of  $\text{Cu}^{2+}$  by the immobilized *Saccharomyces cerevisiae* waste biomass [J]. Journal of Xinjiang Agricultural University, 2007, 30(4): 102-105. (in Chinese)

[18] 武 运, 杨海燕, 任 娟, 等. 固定化啤酒酵母菌体吸附  $\text{Pb}^{2+}$  的研究 [J]. 新疆农业大学学报, 2008, 31(3): 78-81.  
Wu Y, Yang H Y, Ren J, et al. Study on biosorption of  $\text{Pb}^{2+}$  by the immobilized *Saccharomyces cerevisiae* waste biomass [J]. Journal of Xinjiang Agricultural University, 2008, 31(3): 78-81. (in Chinese)

[19] 沈 萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验 [M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 1999: 70-71.  
Shen P, Fan X R, Li G W. Microbiology experiment [M]. 3rd ed. Beijing: Higher Education Press, 1999: 70-71. (in Chinese)

[20] 杜双奎, 张 茜. 酿酒酵母细胞固定化研究 [J]. 中国酿造, 2006, 15(3): 208-211.  
Du S K, Zhang H. Study on immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. China Brewing, 2006, 15(3): 208-211. (in Chinese)

中国科技核心期刊、中国农业核心期刊、  
全国中文核心期刊、全国优秀农业期刊

# 《植物遗传资源学报》征订启事

《植物遗传资源学报》是中国农业科学院作物科学研究所和中国农学会主办的学术期刊, 为中国科技论文统计源期刊、中国科学引文数据库来源期刊(核心期刊)、中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊、中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊, 又被《中国生物学文摘》和中国生物学文献数据库、中文科技期刊数据库收录。据中信所 2014 年期刊学术影响因子年报统计, 《植物遗传资源学报》影响因子为 1.146(综合影响因子 1.396), 在全国农艺和园艺类期刊中排名第 5, 在全国 1998 种科技核心期刊中排名第 157 位。

报道内容为大田、园艺作物, 观赏、药用植物, 林用植物、草类植物及其一切经济植物的有关植物遗传资源基础理论研究、应用研究方面的研究成果、创新性学术论文和高水平综述或评论。诸如, 种质资源的考察、收集、保存、评价、利用、创新, 信息学、管理学等; 起源、演化、分类等系统学; 基因发掘、鉴定、克隆、基因文库建立、遗传多样性研究。

双月刊, 大 16 开本, 196 页。定价 20 元, 全年 120 元。各地邮局发行。  
邮发代号: 82-643, 国内刊号: CN11-4996/S, 国际统一刊号: ISSN1672-1810。  
本刊编辑部常年办理订阅手续, 如需邮挂每期另加 3 元。  
地 址: 北京市中关村南大街 12 号 中国农业科学院《植物遗传资源学报》编辑部  
邮 编: 100081  
电 话: 010-82105794, 010-82105796(兼传真)  
网 址: www.zwyczy.cn  
E-mail: zwyczyxb2003@163.com, zwyczyxb2003@sina.com