

doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2017.02.043

基于生物催化法的食品熏蒸剂环氧乙烷制备

徐宁^{1,2} 辛嘉英¹ 王艳¹ 窦博鑫¹ 夏春谷³

(1. 哈尔滨商业大学食品科学与工程重点实验室, 哈尔滨 150076; 2. 东北农业大学食品学院, 哈尔滨 150030;
3. 中国科学院兰州化学物理研究院羰基合成与选择氧化国家重点实验室, 兰州 730030)

摘要: 为了探索一种反应条件温和、方法简单的食品熏蒸剂环氧乙烷制备方法, 采用甲基弯菌 IMV 3011 (*Methylosinus trichosporium* IMV 3011) 细胞作为生物催化剂, 催化乙烯的环氧化反应生成环氧乙烷, 确定了反应条件。结果表明: 反应器中气相的组成为氧气 50%、乙烯 20%、氮气 30% (体积分数), 30℃、150 r/min 振荡反应 8 h, 采用固定化形式催化剂, 环氧乙烷生成量为 34 $\mu\text{mol}/\text{mg}$, 利用甲烷培养对其循环再生, 再生 8 次催化剂中甲烷单加氧酶 (MMO) 活力仍保留 89%, 环氧乙烷物质的量为 3.4 nmol。

关键词: 食品熏蒸剂; 环氧乙烷; 甲烷氧化菌; 生物催化剂; 环氧化反应

中图分类号: TS255.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2017)02-0322-05

Producing Epoxyethane as Food Fumigant Based on Biocatalysis

XU Ning^{1,2} XIN Jiaying¹ WANG Yan¹ DOU Boxin¹ XIA Chungu³

(1. Key Laboratory for Food Science and Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

2. College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

3. State Key Laboratory for Oxo Synthesis and Selective Oxidation, Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730030, China)

Abstract: In addition to application in chemical manufacturing processes, epoxyethane is widely used in processes of food fumigating sterilization, particularly of grains and dried fruits. During the last decades, many research works have been focused on epoxidation reactions of ethylene by supported catalysts such as transition metal complexes and metal nanoparticles. In contrast with chemical synthetic methods, the biocatalytic reaction appears to be a mild and simple method. One biocatalytic method for producing epoxyethane is using methane monooxygenase (MMO) to insert oxygen across the carbon double bonds of ethylene. Epoxyethane synthesis by *Methylosinus trichosporium* IMV 3011 whole cells which contains the MMO has significant application potential as it is performed at normal temperature and pressure and causes no pollution. The process for producing epoxyethane was described. The effect of initial ethylene concentration on production of epoxyethane was studied. Initial concentrations of oxygen, ethylene and nitrogen were 50%, 20% and 30%, respectively. The amount of epoxyethane formed by free biocatalyst was 29 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ in approximately 6 h. Moreover, the amount of epoxyethane formed by immobilized biocatalyst was 34 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ in approximately 8 h. In a batch reaction system, the regenerated immobilized biocatalyst can be repeatedly used for 8 times and 89% of initial MMO activity was retained, and the amount of epoxyethane formed was 3.4 nmol.

Key words: food fumigant; epoxyethane; methanotrophic bacteria; biocatalyst; epoxidation

引言

环氧乙烷可用作熏蒸剂使用^[1], 环氧乙烷熏蒸

无气体残留且不对金属产生腐蚀, 可杀灭内孢子类细菌和大多数真菌^[2], 现在被广泛用于不能进行高温处理的食品灭菌^[3]。

收稿日期: 2016-09-29 修回日期: 2016-11-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(21073050、21573055)

作者简介: 徐宁(1981—), 女, 博士生, 东北农业大学讲师, 主要从事食品生物技术研究, E-mail: xuningneau@163.com

通信作者: 辛嘉英(1966—), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事生物催化研究, E-mail: xinjiayingvip@163.com

目前,环氧乙烷的制备采用过渡金属或纳米金为催化剂将乙烯直接氧化,为了将乙烯和环氧乙烷的易燃性降到最低,制备过程中需要控制原料乙烯的浓度以及充入甲烷、氩气、氮气等惰性气体,这导致产物不易分离^[4]。此外,由于反应温度高达 200℃ 以上,乙烯易被彻底氧化生成二氧化碳,会对环境造成危害,而且原料乙烯向二氧化碳的转化也会造成经济损失^[5]。生物催化剂参与的反应条件温和、专一性强、方法简单^[6],为解决化学催化法制备环氧乙烷产生的问题提供了一种新思路。

甲烷单加氧酶(MMO)是甲烷氧化菌代谢途径中最重要的一种酶,可以催化烯烃环氧化,且具有较高的产物专一性和光学立体选择性^[7-8]。由于纯 MMO 酶稳定性差、催化反应时还需要辅酶参与,因此,甲烷氧化菌细胞能更好、更有效地催化烯烃的环氧化反应。以前的研究工作一般以催化丙烯环氧化反应为主^[9-17],同时借助固定化、半连续化、连续化等手段,确定其在实际生产上应用的可能性。然而,未见利用生物催化剂催化乙烯环氧化制备环氧乙烷的研究报道。不过,生物催化剂催化乙烯环氧化与催化丙烯环氧化具有相同的化学机制。为此,在课题组前期研究的基础上,本文以甲基弯菌 IMV 3011 (*Methylosinus trichosporium* IMV 3011)细胞为生物催化剂,催化乙烯环氧化制备环氧乙烷,探索生物法制备环氧乙烷的新途径。

1 制备原理

利用乙烯的环氧化反应生成环氧乙烷。在 MMO 的催化下,氧原子插入至乙烯的 C=C 双键中,生成环氧乙烷,此反应消耗辅酶 NADH,为反应提供能量。乙烯的环氧化反应如图 1 所示。

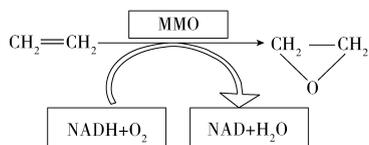


图 1 生物法制备环氧乙烷的原理

Fig. 1 Schematic of biocatalytic method for producing epoxyethane

2 材料与方法

2.1 材料与仪器

甲基弯菌 IMV 3011 (*Methylosinus trichosporium* IMV 3011)由俄罗斯科学院催化研究所提供;发酵培养基采用 NMS 培养基,按文献^[18]配制。

甲烷、乙烯、丙烯气体(纯度 99.99%,哈尔滨卿华气体有限公司);环氧乙烷标样(色谱纯,

AccuStandard 公司);40 目活性炭,哈尔滨天赐活性炭有限公司;实验所用试剂均为分析纯。

LDZX-50KB 型立式压力蒸汽灭菌锅,上海申安医疗器械公司;恒温振荡器,哈尔滨东联电子技术开发公司;GC7890 型气相色谱仪,上海天美有限公司。

2.2 生物催化剂的制备

2.2.1 游离形式

将 100 mL 的 NMS 液体培养基置于 250 mL 三角瓶中,灭菌冷却后接入甲基弯菌 IMV 3011,接种量为 10% (体积分数),密封后抽真空,置换甲烷与空气的混合气体(体积比例 1:1),间隔 24 h 换一次气。30℃、180 r/min 摇床培养 96 h 后,8 000 r 离心 15 min 收集细胞。用 4℃、20 mmol/L、pH 值 7.0 的磷酸盐缓冲液(含 5 mmol/L MgCl₂)洗涤 2 次,再悬浮于同样的缓冲液中,4℃ 贮存备用。

2.2.2 固定化形式

采用 1 mol/L HCl 溶液浸泡活性炭颗粒,于 50℃ 搅拌 1 h,取出后再用去离子水反复洗涤,直至洗液的 pH 值为 7.0,加热干燥备用。

将活性炭置于活性炭甲基弯菌 IMV 3011 细胞悬液中,二者的体积比例为 1:10,室温(20℃)下间歇搅拌 20 h,滤出活性炭,用 4℃、20 mmol/L、pH 值 7.0 的磷酸盐缓冲液(含 5 mmol/L MgCl₂)洗涤 2 次,自然晾干得到固定化形式的生物催化剂。

2.3 环氧乙烷的制备

乙烯的环氧化反应在密封的反应器中进行(图 2),用 250 mL 磷酸盐缓冲液(20 mmol/L、pH 值 7.0,含 5 mmol/L MgCl₂)将一定量的生物催化剂(固定化形式 5 g,吸附的干重细胞共 12.5 mg;游离形式 12.5 mL,其干重细胞为 12.5 mg)悬浮于 3 L 反应器中,反应器密封后抽真空,置换一定比例的乙烯与氧气的混合气体,30℃、150 r/min 振荡反应,反应一段时间取样,测定样品中环氧乙烷的含量。

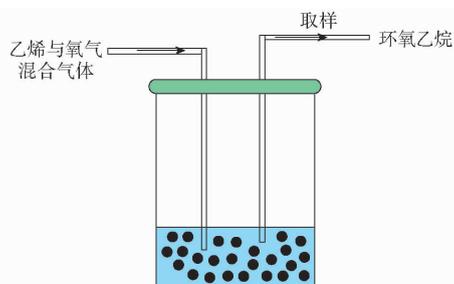


图 2 乙烯环氧化的反应器示意图

Fig. 2 Schematic diagram of lab-scale ethylene-epoxidizing reactor

2.4 生物催化剂循环再生

环氧化反应结束,将生物催化剂取出(固定化

形式采用滤出;游离形式采用离心),加入 100 mL 的 NMS 液体培养基置于 250 mL 三角瓶中,抽真空后置换甲烷与空气的混合气体(体积比例 1:1),30℃、180 r/min 振荡 8 h,进行再生。再生后的催化剂重新制备环氧乙烷,反应结束后再生,如此循环。

2.5 测定指标与方法

2.5.1 环氧乙烷含量

采用气相色谱法。测定条件为:SE-54 型毛细管柱($\Phi 0.23\text{ mm} \times 30\text{ m}$),FID 检测器,载气(氮气)流速为 75 mL/min,检测器、进样室、色谱柱的温度分别为 180、180、60℃,进样量为 1 μL 。

2.5.2 催化剂活力

催化剂活力即 MMO 活力,MMO 活力用每 1 mg 干重细胞、每 1 min 催化丙烯环氧化产生的环氧丙烷物质的量表示。将 1 mL 细胞悬液置于 10 mL 密封的玻璃瓶中,抽真空后充入丙烯和氧气(体积比例 1:1),30℃、180 r/min 摇床振荡 30 min 后,8 000 r 离心 15 min,迅速冷却至 4℃,进样量 1 μL 进行气相色谱分析,分析条件同 2.5.1 节。

2.6 数据处理

所有实验重复 3 次,结果取平均值,数据处理和分析采用 SPSS 13.0 软件,统计显著性 $P < 0.05$ 。

3 结果与分析

3.1 时间对环氧乙烷生成量的影响

采用游离形式和固定化形式的催化剂制备环氧乙烷,环氧乙烷的生成量与时间的关系如图 3 所示。

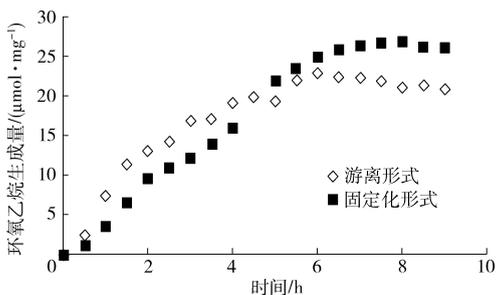


图 3 环氧乙烷生成量随时间的变化

Fig. 3 Time course of epoxyethane formation

反应初期(0~4.5 h)环氧乙烷生成量不断增加,采用游离形式催化剂时环氧乙烷生成量大于固定化形式;4.5~6 h 采用 2 种形式催化剂时环氧乙烷生成量接近;6~9 h 采用游离形式催化剂时环氧乙烷生成量不再增加,采用固定化形式催化剂时环氧乙烷生成量继续增加直至 9 h 达到稳定。

游离形式催化剂直接与反应器液相中的乙烯接触,反应初期(0~4.5 h)环氧乙烷生成量大,可能是

由于辅酶 NADH 的耗尽和产物的抑制作用^[19],导致 6 h 后环氧乙烷生成量不再增加;反应器液相中的乙烯先扩散至固定化催化剂周围的液膜,再扩散至固定化形式催化剂上的细胞表面^[20],因此,反应初期(0~4.5 h)环氧乙烷生成量小于采用游离形式催化剂,固定化催化剂以活性炭为载体,活性炭对非极性的乙烯有良好的吸附作用^[21],使得活性炭吸附的细胞周围微环境中聚集乙烯气体,因而 4.5 h 后环氧乙烷生成量继续增加。

从图 3 可以看出,采用游离形式和固定化形式催化剂制备环氧乙烷,适宜反应时间分别为 6 h 和 8 h,环氧乙烷生成量分别为 23 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 和 27 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 。

3.2 乙烯初始体积分数对环氧乙烷生成量的影响

为研究乙烯初始体积分数对环氧乙烷生成量的影响,环氧乙烷反应器中充入的气体成分为氧气、乙烯、氮气,其中氧气体积分数 50%,通过氮气调整乙烯的初始体积分数为 0~30%,反应 8 h 后测定样品中的环氧乙烷生成量,结果如图 4 所示。

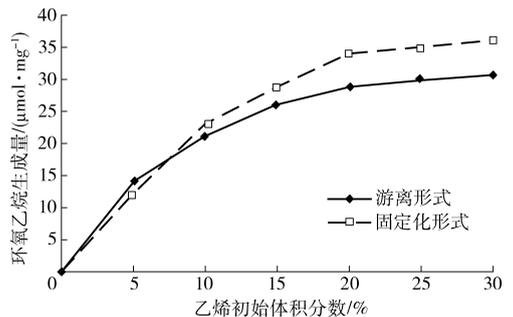


图 4 乙烯体积分数对环氧乙烷生成量的影响

Fig. 4 Effect of ethylene concentration on formation of epoxyethane

环氧乙烷生成量与乙烯在液相的溶解度有关,乙烯初始体积分数增加,产生的环氧乙烷量也增加,当液相中溶解的乙烯达到饱和,气相中乙烯的体积分数增加,环氧乙烷生成量也不会增加。由于活性炭对非极性气体乙烯有良好的吸附能力^[21],且气体易扩散至细胞周围的微环境中,因此,固定化形式催化剂所在的液相能聚集更多的乙烯。

从图 4 可以看出,制备环氧乙烷,采用游离形式和固定化催化剂,乙烯适宜的初始体积分数为 20%,环氧乙烷生成量为 29 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 和 34 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 。

3.3 生物催化剂的再生

提供还原能量的辅酶 NADH 再生可以推动乙烯环氧化反应的持续进行^[22]。直接加入外源物质可以再生辅酶 NADH。向反应器中加入甲烷(氧气 50%、乙烯 20%、甲烷 10%、氮气 20%)、3 mmol/L 甲醇、20 mmol/L 甲酸钠,2 种形式催化剂的 MMO 活力如表 1 所示。

表 1 辅因子对生物催化剂 MMO 活力的影响

Tab.1 Effect of cofactors on MMO activity of free and immobilized biocatalysts nmol/(min·mg)

| 催化剂形式 | 空白 | 甲烷 | 甲醇 | 甲酸钠 |
|-------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 游离形式 | 3.80 ± 0.20 ^a | 5.20 ± 0.26 ^b | 6.23 ± 0.40 ^b | 24.33 ± 0.71 ^c |
| 固定化形式 | 2.97 ± 0.31 ^a | 3.27 ± 0.32 ^a | 4.40 ± 0.30 ^b | 17.23 ± 0.55 ^c |

注:不同字母表示差异显著。

不同的辅因子与酶的亲和能力不同,导致再生辅酶的能力不同^[23]。甲烷、甲醇和甲酸钠的加入提高了游离形式催化剂的 MMO 活力,分别为空白组的 1.4 倍、1.6 倍、6.4 倍。

甲醇和甲酸钠的水溶性好,能克服活性炭所产生的传质限制,固定化形式催化剂的 MMO 活力分别为空白组的 1.5 倍和 5.8 倍。物理吸附的吸附力主要是范德华力,气体的相对分子量越大,则范德华力越大,吸附能力越强,反应器中活性炭对乙烯的吸附力大于甲烷,因此,甲烷对固定化形式催化剂的再生效果不明显。

外源物质的一次性加入不能满足日后连续化工业生产需要。因此,循环再生是有益的尝试。每次循环再生后生物催化剂的 MMO 活力结果如图 5 所示。

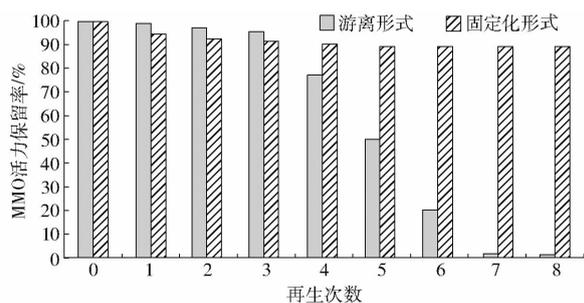


图 5 循环再生催化剂的 MMO 活力保留率

Fig.5 Percent of initial MMO activity retained of free and immobilized biocatalysts in repeated regeneration

MMO 在再生的过程中产生辅酶 NADH,为制备环氧乙烷提供了还原能量,由于其自身的不稳定性,游离形式催化剂循环再生 4 次后其 MMO 活力不断降低,循环再生到第 8 次,其活力基本为零。

对固定化形式催化剂的再生,由于其上吸附不牢固的细胞部分脱落^[10],导致前 2 次再生 MMO 活力下降,但下降程度较小,之后的循环再生 MMO 活力基本不变,再生 8 次后 MMO 活力仍保留 89%,这体现了再生处理的作用以及固定化形式催化剂良好的操作稳定性。

CHEN 等^[11]采用硅酸钠溶胶包埋甲基单胞菌 GYJ3 催化丙烯环氧化反应,25 批次再生-催化实验中,MMO 的活力基本不变,而游离细胞在第 4 次再生-催化实验中,MMO 活力保留率小于 30%; KOVALENKO 等^[10]研究了甲基弯菌 IMV 3011 游离

细胞催化丙烯环氧化反应的操作稳定性,结果表明连续催化 7 次后 MMO 的酶活力接近初始酶活力的 10%。

3.4 不同形式催化剂对环氧乙烷生成量的影响

甲烷氧化菌细胞作为催化剂制备环氧乙烷,其参与反应有 2 种形式:游离形式、固定化形式。按照 2.3 节的方法,反应器中气相的组成为氧气 50%、乙烯 20%、氮气 30%,采用游离形式和固定化催化剂,循环再生 8 次后,环氧乙烷物质的量为 2.2 nmol 和 3.4 nmol。

图 6 反映了环氧乙烷对不同形式生物催化剂的产物抑制作用。

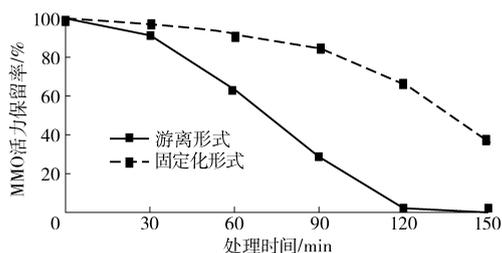


图 6 环氧乙烷对 MMO 活力的影响

Fig.6 Effect of epoxyethane on MMO activity of free and immobilized biocatalysts

1.0 nmol/L 环氧乙烷直接作用游离形式和固定化形式催化剂 120 min, MMO 活力保留率分别为 2%、67%,可以看出,环氧乙烷对 MMO 活力有抑制作用。之前的研究证明:环氧丙烷对 MMO 活力有抑制作用,它可以结合 MMO 的催化位点,特别是 MMOH^[24]。环氧乙烷与环氧丙烷的结构相似,环氧乙烷环状结构中氧的拉伸使碳原子更具有亲电性,更易与 MMO 活性部位中的亲核氨基酸残基结合,这可能是环氧乙烷对 MMO 活力有抑制作用的原因。

固定化形式催化剂的载体活性炭对环氧乙烷的吸附能力较弱,环氧乙烷可以远离固定化细胞周围的微环境,能降低环氧乙烷对细胞 MMO 活力的抑制作用,同时结合环氧乙烷生成量,确定制备环氧乙烷的生物催化剂采用固定化形式。

4 结论

以 *Methylosinus trichosporium* IMV 3011 细胞为生物催化剂,催化乙烯环氧化反应制备环氧乙烷。

(1) 反应条件为:反应器中气相的组成为氧气

50%、乙烯 20%、氮气 30% ,30℃、150 r/min 振荡反应 8 h,采用游离形式和固定化形式催化剂,环氧乙烷生成量分别为 29 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 和 34 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 。

(2)生物催化剂的 MMO 活力需要再生,可采用甲烷培养实现循环再生,固定化形式催化剂再生 8 次 MMO 活力仍保留 89% ,环氧乙烷物质的量为 3.4 nmol。

(3)生物催化剂采用固定化形式,以活性炭为

载体,通过对乙烯的吸附作用提高细胞周围的底物浓度,再生后可以持续催化环氧化反应,细胞的 MMO 活力稳定,具有良好的操作稳定性,不易吸附环氧乙烷,使环氧乙烷远离细胞进而降低产物对细胞活性的抑制作用。与传统的化学催化方法相比,本方法在常温常压下进行且反应条件温和,一步生成环氧乙烷,反应工序少,副产物仅有水,无污染,腐蚀性小,具有工业上实际应用的潜力。

参 考 文 献

- 1 COTTON R T, ROARK R C. Ethylene oxide as a fumigant [J]. *Industrial and Engineering Chemistry*, 1928, 20: 805.
- 2 KHISHEN S A E. Determination of ethylene oxide and methods of its recovery from fumigated substances [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1950, 1(3): 71 - 77.
- 3 BONONI M, QUAGLIA G, TATEO F. Identification of ethylene oxide in herbs, spices and other dried vegetables imported into Italy [J]. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 2014, 31(2): 271 - 275.
- 4 LU Xinqing, ZHOU Wenjuan, WU Haihong, et al. Selective synthesis of ethylene oxide through liquid-phase epoxidation of ethylene with titanosilicate/ H_2O_2 catalytic systems [J]. *Applied Catalysis A: General*, 2016, 515: 51 - 59.
- 5 GHANTA M, SUBRAMANIAM B, LEE H J, et al. Highly selective homogeneous ethylene epoxidation in gas (ethylene)-expanded liquid: transport and kinetic studies [J]. *AIChE Journal*, 2013, 59(1): 180 - 187.
- 6 CARLIN D A, BERTOLANI S J, SIEGEL J B. Biocatalytic conversion of ethylene to ethylene oxide using an engineered toluene monooxygenase [J]. *Chemical Communications*, 2015, 51(12): 2283 - 2285.
- 7 ONO M, OKURA I. On the reaction mechanism of alkene epoxidation with *Methylosinus trichosporium* (OB3b) [J]. *Journal of Molecular Catalysis*, 1990, 61(1): 113 - 122.
- 8 AONO S, ONO M, OKURA I. Substrate specificity and stereoselectivity of epoxidation of alkenes with *Methylosinus trichosporium* (OB3b) [J]. *Journal of Molecular Catalysis*, 1989, 49(3): 65 - 67.
- 9 HOU C T. Propylene oxide production from propylene by immobilized whole cells of *Methylosinus* sp. CRL 31 in a gas-solid bioreactor [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1984, 19(1): 1 - 4.
- 10 KOVALENKO G A, SOKOLOVSKI V D. Epoxidation of propene by microbial cells immobilized on inorganic supports [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1992, 39(5): 522 - 528.
- 11 CHEN Jinbo, XU Yi, XIN Jiaying, et al. Efficient immobilization of whole cells of *Methylomonas* sp. strain GYJ3 by sol-gel entrapment [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2004, 30(3 - 4): 167 - 172.
- 12 LEE Eun-hee, CHOI Sun-ah, YI Taewoo, et al. Effects of granular activated carbon on methane removal performance and methanotrophic community of a lab-scale bioreactor [J]. *Journal of Environment Science and Health, Part A*, 2015, 50(2): 193 - 200.
- 13 HABETS-CRUTZEN A Q H, BRINK L E S, GINKEL C G, et al. Production of epoxides from gaseous alkenes by resting-cell suspensions and immobilized cells of alkene-utilizing bacteria [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1984, 20(4): 245 - 250.
- 14 高灿柱,李树本,宁治中,等. 丙烯酶催化氧化制取环氧丙烷——活细胞包埋法制备、再生固定化生物催化剂 [J]. *分子催化*, 1990, 4(4): 291 - 296.
GAO Canzhu, LI Shuben, NING Zhizhong, et al. Propylene oxide production from propylene by immobilized living gells and biocatalyst regeneration by the mixture of methane and air [J]. *Journal of Molecular Catalysis*, 1990, 4(4): 291 - 296. (in Chinese)
- 15 陆仕灿,陶坚铭,邱蔚然,等. 固定化甲烷氧化菌 Z201 催化丙烯合成环氧丙烷 [J]. *华东理工大学学报*, 1994, 20(1): 21 - 26.
LU Shican, TAO Jianming, QIU Weiran, et al. Propylene oxide production from propylene by immobilized whole cell of methanotroph Z201 [J]. *Journal of East China University of Science and Technology*, 1994, 20(1): 21 - 26. (in Chinese)
- 16 辛嘉英,崔俊儒,陈建波,等. 甲基单胞菌整细胞催化环氧丙烷的连续生物合成 [J]. *催化学报*, 2001, 22(5): 457 - 460.
XIN Jiaying, CUI Junru, CHEN Jianbo, et al. Continuous biosynthesis of epoxypropane using whole cells of *Methylomonas* sp. GYJ3 [J]. *Chinese Journal of Catalysis*, 2001, 22(5): 457 - 460. (in Chinese)
- 17 苏涛,韩冰,杨程,等. *Methylosinus trichosporium* OB3b 整细胞催化丙烯制备环氧丙烷的工艺条件 [J]. *化工学报*, 2009, 60(7): 1767 - 1772.
SU Tao, HAN Bing, YANG Cheng, et al. Production of epoxypropane from propene catalyzed by whole cells of *Methylosinus trichosporium* OB3b [J]. *CIESC Journal*, 2009, 60(7): 1767 - 1772. (in Chinese)
- 18 XIN J, ZHANG Y, DONG J, et al. Epoxypropane biosynthesis by whole cell suspension of methanol-growth *Methylosinus trichosporium* IMV 3011 [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 26(4): 701 - 708.
- 19 XIN J Y, CUI J R, ZHU L M, et al. Epoxypropane biosynthesis by *Methylomonas* sp. GYJ3: batch and continuous studies [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2002, 18(7): 609 - 614.

参 考 文 献

- 1 LU Lixin, ZHENG Weizhou, LV Zhiye, et al. Development and application of time-temperature indicators used on food during the cold chain logistics[J]. *Packaging Technology and Science*, 2013, 26(Supp.1):80-90.
- 2 陈晓宇, 朱志强, 张小栓, 等. 食品货架期预测研究进展与趋势[J/OL]. *农业机械学报*, 2015, 46(8):192-199. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?flag=1&file_no=20150826&journal_id=jcsam. DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2015.08.026.
CHEN Xiaoyu, ZHU Zhiqiang, ZHANG Xiaoshuan, et al. Research progress and trend of food shelf life prediction [J/OL]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2015, 46(8):192-199. (in Chinese)
- 3 LAGUERRE O, HOANG H M, FLICK D. Experimental investigation and modelling in the food cold chain: thermal and quality evolution[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2013, 29(2):87-97.
- 4 TSIRONI T, RONNOW P, GIANNOGLOU M, et al. Developing suitable smart TTI labels to match specific monitoring requirements: the case of *Vibrio* spp. growth during transportation of oysters[J]. *Food Control*, 2017, 73(Part A):51-56.
- 5 TAOUKIS P S, LABUZA T P. Applicability of time-temperature indicators as shelf life monitors of food products[J]. *Journal of Food Science*, 1989, 54(4):783-788.
- 6 ZHANG X, SUN G, XIAO X, et al. Application of microbial TTIs as smart label for food quality: response mechanism, application and research trends[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2016, 51:12-23.
- 7 MA C, XIAO X, ZHU Z, et al. Contour diagram-based evaluation on logistics stability of table grapes under variable temperature [J]. *Journal of Food Process Engineering*, 2016, 39(4):391-399.
- 8 GIANNOGLOU M, TSIRONI T, GOGOU E, et al. Development of enzymatic time temperature integrators (TTI) as cold chain monitoring systems[C]// *International Conference on Food and Biosystems Engineering*, 2013:511-513.
- 9 王卫, 张佳敏, 张崑, 等. 一种新型冷链管理 TTI 系统的应用[J]. *食品与发酵科技*, 2013(2):89-93.
- 10 TSIRONI T, GIANNOGLOU M, PLATAKOU E, et al. Evaluation of time temperature integrators for shelf-life monitoring of frozen seafood under real cold chain conditions[J]. *Food Packaging and Shelf Life*, 2016, 10:46-53.
- 11 TAOUKIS K, KOUTSOUMANIS K, NYCHAS G J E. Use of time-temperature integrators and predictive modelling for shelf life control of chilled fish under dynamic storage conditions[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1999, 53(1):21-31.
- 12 马常阳, 傅泽田, 姚萌萌, 等. 时间温度指示器等量线匹配适应性评估方法[J/OL]. *农业机械学报*, 2014, 45(7):183-188. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?file_no=20140729&flag=1. DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2014.07.029.
MA Changyang, FU Zetian, YAO Mengmeng, et al. Selection method of the time temperature indicator based on the contour lines [J/OL]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2014, 45(7):183-188. (in Chinese)
- 13 KWOLEK W F, BOOKWALTER G N. Predicting storage stability from time temperature data[J]. *Food Technology*, 1971, 25(10):51-63.
- 14 NUNES M C N, EMOND J P, RAUTH M, et al. Environmental conditions encountered during typical consumer retail display affect fruit and vegetable quality and waste[J]. *Postharvest Biology & Technology*, 2009, 51(2):232-241.
- 15 施丽珍, 朱泗红. 浙江缙云县果蔬生产基地现状与质量监管措施[J]. *农业环境与发展*, 2010(6):65-67.
- 16 张小栓, 孙格格, 肖新清, 等. 面向农产品冷链物流的时间温度指示器校准方法及装置: 中国, 105096081A[P]. 2015-11-25.
- 17 LABUZA T P, SHAPERO M. Prediction of nutrient losses[J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 1978, 2(2):91-99.
- 18 LING B, TANG J, KONG F, et al. Kinetics of food quality changes during thermal processing: a review[J]. *Food & Bioprocess Technology*, 2015, 8(2):343-358.
- 19 LABUZA T P. Enthalpy/entropy compensation in food reaction[J]. *Food Technol.*, 1980, 34(2):67-77.
- 20 马常阳. 鲜食葡萄物流稳定性评价方法研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2014.

(上接第 326 页)

- 20 BRINK L E S, TRAMPER J. Optimization of organic solvent in multiphase biocatalysis [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1985, 27(8):1258-1269.
- 21 YE Pengcheng, FANG Zhaohua, SU Baogen, et al. Adsorption of propylene and ethylene on 15 activated carbons [J]. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 2010, 55(12):5669-5672.
- 22 XIN J, CUI J, CHEN J, et al. Continuous biocatalytic synthesis of epoxypropane using a biofilm reactor [J]. *Process Biochemistry*, 2003, 38(12):1739-1746.
- 23 GREEN J, DALTON H. Steady-state kinetic analysis of soluble methane mono-oxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath) [J]. *Biochemical Journal*, 1986, 236(1):155-162.
- 24 SMITH T J. Monooxygenases, bacterial: oxidation of alkenes [M] // FLICKINGER M C. *Encyclopedia of industrial biotechnology*. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2009:1-13.