

果胶酶产生菌的选育

李强军 许佰康 张星元 陈舜祖

(发酵系) (食工系) (发酵系) (食工系)

摘要 本试验筛选到一株适于使苹果汁澄清的果胶酶产生黑曲菌No.07,应用物理因素及化学因素对No.07进行处理,从白色突变菌落中获得一高产株CL-8501,对CL-8501的培养基及发酵条件进行了优化,在优化的培养基及较适条件下,CL-8501产酶达631.6单位/毫升,产量比出发株No.07提高约105倍。

主题词 果胶酶;黑曲酶;苹果汁澄清;菌种选育

在食品工业中,果胶酶主要用于果汁、果酒的澄清、桔子脱囊衣及麻类脱胶等。自本世纪30年代, Kertesz Z.和Willaman J J及Mehlity发现果胶酶能澄清果汁以来^[1],对产果胶酶的菌种调查^[2,3],对某些菌产酶的条件^[4,5,6],酶的分离纯化及性质^[7,8,9],以及酶的作用机制^[10,11]进行了深入的研究。

本研究主要是筛选出适于使苹果汁澄清的果胶酶产生菌,应用诱变方法进行育种提高酶活,对获得的高产菌发酵条件进行优化。

关于CL-8501产生的果胶酶在苹果汁澄清中的应用将另文报告。

表1 平板筛选培养基成分(pH5.0)

成分	含量(%)
蔗糖	2
果胶	1
MgSO ₄	0.05
Kcl	0.05
FeSO ₄	0.001
K ₂ HPO ₄	0.1
NaNO ₃	0.3

1 材料和方法

1.1 菌种

中科院北微所菌种保藏中心及本院发酵系和食工系微生物教研室提供的霉菌斜面。

1.2 产果胶酶菌株的平板筛选

将试验菌株点接于表1所示的平板培养基,置于30℃培养3天,加入1%的十六烷基三甲基溴化铵(多糖沉淀剂),静置10分钟,产果胶酶的菌株,菌落周围的果胶被果胶酶水解形成透明圈,透明圈的大小与酶活有关。挑选形成透明圈的菌落进一步试验。

本文1988年3月21日收到。

1.3 苹果汁培养试验

将筛得的产果胶酶的菌株接种于盛有10毫升新鲜苹果汁的试管10×100毫米中,于30℃下静止培养,观察澄清度。

1.4 诱变

以生理盐水将孢子从斜面(麦芽汁培养基)上洗下,用玻璃珠打散、过滤,制成 10^6 个/毫升孢子悬浮液供诱变。诱变用EMS和 γ -射线交替进行。经诱变的孢子悬浮液适当稀释后涂布筛选平板(表1)于30℃下培养3天,计算透明圈大小与菌落直径之比值,挑选比值大的菌落转接麦芽汁斜面,供进一步筛选。

表2 摇瓶筛选培养基(pH5.0)

成分	含量(%)
蔗糖	2
果胶	2
NH_4NO_3	0.2
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.05
MgSO_4	0.5
KCl	0.05
FeSO_4	0.001
K_2HPO_4	0.1

1.5 摇瓶培养筛选

将筛得的产酶较高菌株接种于盛有30毫升培养基(表2)的250毫升三角瓶中,于30℃旋转式摇瓶机上(200转/分)培养3天,用粘度法测定各菌的相对活性,每株做一只。

根据测定结果,挑选产酶提高的菌株进行复筛,条件同前,每菌做3只摇瓶。

1.6 果胶酶相对活性的测定

以果胶溶液粘度下降百分率表示果胶酶相对活性,按斎藤方法测定^[12]。

1.7 果胶酶活力测定

按0.5%果胶溶液:0.5摩尔pH4.6醋酸缓冲液:蒸馏水=20:2:3配制底物溶液,取25毫升底物溶液加入1毫升适当稀释的酶液,混匀后,取10毫升加入奥氏粘度计中,于10分钟内连续4次测定液面通过上下刻度的时间,并记录反应开始至每次液面通过上刻度时间A(精确至0.1分),按下式计算相对流动度 F_r :

$$F_r = \frac{K_{pQ} - K_{H_2O}}{T - K_{H_2O}}$$

式中:

K_{pQ} ——果胶溶液空白流动时间(S)

K_{H_2O} ——水空白流动时间(S)

T——加酶后混和液流动时间(S)

用T除以120,将其0.1位上的值加到A值作为修正时间(T_A),以 F_r 与 T_A 作图,得一直线,在直线上任取两点,按下式求斜率M:

$$M = \frac{F_{r2} - F_{r1}}{T_{A2} - T_{A1}}$$

酶活力用下式计算:

酶活力 $M = \times 100 \times$ 稀释倍数 (U/ml)

在此条件下,1分钟内使20毫升0.5%的果胶粘度下降1%的酶为1单位。

1.8 果胶含量的测定

采用咔唑比色法^[13]。

1.9 蔗糖含量的测定

采用硫代硫酸钠滴定法^[14]。

1.10 果胶水解物纸层析^[15]

取果胶水解液5~20微升点样于3号新华滤纸,于室温下进行展开,展开剂为丁醇:醋酸:水=25:2:3,显色剂为苯胺——邻苯二甲酸。

1.11 主要试剂

果胶:Sigma公司产品

十六烷基二甲苯溴化铵:Serve公司产品

EMS:上海试剂一厂产品

Co⁶⁰:本院辐化实验室的钴源

其它试剂为分析纯试剂

2 结果与分析

2.1 产果胶酶菌株的筛选

2.1.1 产果胶酶菌株的平板筛选 按本文1.2方法。发现有7个菌落周围产生透明圈(如图1)表明产果胶酶,它们分别为No.01, No.02, No.03, No.04, No.05, No.06, No.07。其中No.01, No.02, No.04, No.06, No.07为黑曲霉(*A.niger*), No.03为黄曲霉(*A.flavue*), No.05为米曲霉(*A.orgzae*)。

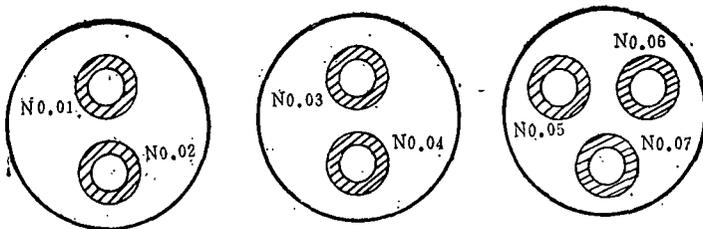


图1 No.01~No.07周围产生的透明圈

2.1.2 苹果汁培养试验 按本文1.3方法进行。每隔12小时观察一次苹果汁澄清度,结果如表3。

表3 不同菌种对国光苹果汁澄清效果

时间(h)	菌种	No.01	No.02	No.03	No.04	No.05	No.06	No.07	对照
12		-	-	-	-	-	-	-	-
24		++	+	+	+	-	-	+++	-
36		+++	++	++	+++	++	+	++++	-

注:“-”混浊;“+”微清;“++”中等清;“+++”较清;“++++”很清

由表3可知, No.01、No.04、No.07澄清效果好。

2.1.3 苹果汁澄清试验 为了进一步确定适于苹果汁澄清的果胶酶的菌株,将No.01、No.04、No.07接种摇瓶筛选培养基(表2)按本文1.5方法培养过滤,取1毫升滤液加入9毫升苹果汁中混匀,于室温下静置,每隔12小时于660纳米测一次透光率及相对粘度,结果如

图2、图3所示。36小时，粘度最低，澄清度最高，其中尤以No.07最佳，因而以No.07作为出发菌株，进行下列试验。

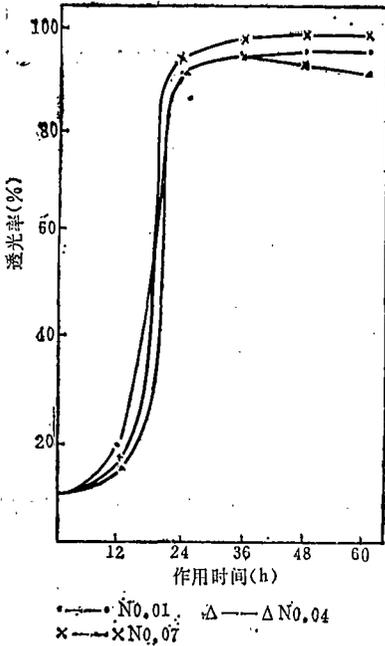


图2 苹果汁透光率与作用时间关系

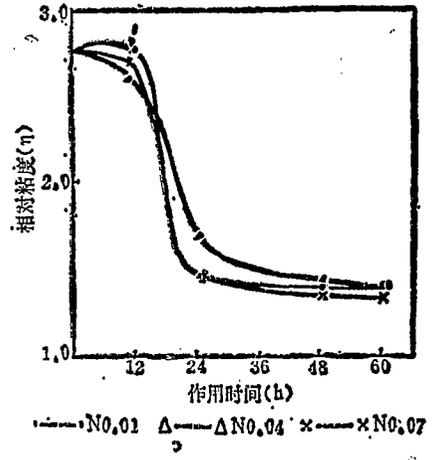


图3 苹果汁粘度与作用时间关系

2.1.4 果胶水解物纸层析 取No.07发酵液1毫升加入盛有4毫升1%果胶溶液(pH4.6, 0.05摩尔醋酸缓冲液)的试管中, 于30℃保温, 每隔一定时间取样一次, 沸水浴中热处理5分钟使酶失活, 按本文1.10方法做纸层析。计算比移值 R_f , 结果见图4, 果胶经水解后生成一系列低聚物。随着时间的延长, 低聚物进一步水解, 最后生成半乳糖醛酸, 说明No.07产生的酶对果胶有很强的水解能力。

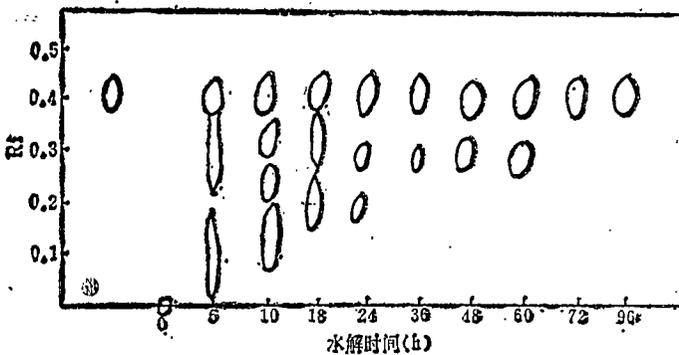


图4 No.07产生的果胶酶水解果胶产物层析结果

2.2 菌种的选育

2.2.1 不同诱变因素对产酶性状的影响 DES和紫外线对No.07的诱变效果都不理想, EMS、 Co^{60} 处理后所得的突变株产酶性状有很大提高。表4为初筛菌株的酶活分布。

在EMS处理的86个菌株中, 有30.2%与原种酶活相仿, 17.4%比原种酶活提高, 其中

最高者比原种提高1.55倍(酶活数据待发表)。

在 Co^{60} 处理的74株菌中, 77.1%比原种酶活提高, 最高者比原种提高8.77倍。(酶活数据待发表)

经过 Co^{60} 处理后菌落的生长, 孢子的疏密, 菌落形态及菌落颜色都发生了很大变化, 有的菌落发生龟裂, 生长的培养基表面液化, 菌落颜色发生变化。

表4 No.07经EMS、 Co^{60} 处理后初筛菌株的相对活力分布

相对活力% 诱变因素	0~20	20~30	30~40	40~50	50~60	60~70	70~80	80~90	90~100
EMS	0	8.1	18.6	11.6	14.0	30.2*	12.8	4.7	0
Co^{60}	54.1*	18.9	5.4	4.1	5.4	2.7	4.1	2.7	2.7

*出发菌相对酶活位于此范围

2.2.2 诱变后菌落形态变化与产酶性状的关系 将筛选平板上的菌落形态发生变异的菌株转接斜面, 进一步(按本文1.5方法)做摇瓶培养, 测定发酵液中酶活, 结果表明菌落龟裂与产酶无明显关系。菌落的颜色与产酶性状的关系见表5。原种在筛选平板上颜色为黄色, 经 Co^{60} 处理后其中有些变成白色。白色菌落中产酶性状的正突变率高, 约比黄色菌落高2倍, 酶活提高幅度亦变大。

表5 白色菌落和黄色菌落相对酶活分布

菌株产酶的相对活性 (%)	黄 色		白 色	
	菌 数	占比例(%)	菌 数	占比例(%)
0~10	6	18.2	1	10
10~20*	19	57.6	5	50
20~30	8	24.2	1	10
30~40	0	0	1	10
40~50	0	0	0	0
50~60	0	0	2	20

*出发菌相对酶活位于此范围

2.2.3 No.07的选育系谱 选择No.07为出发菌株, 用EMS处理, 从181株菌中获得正突变株86株, 其中L-1产酶能力比No.07提高1.55倍。L-1出发经 Co^{60} 处理(选白色菌落)获得一株白色突变株L-2, 其在平板及摇瓶培养中菌落及菌球都为白色, 摇瓶发酵液酶活比L-1提高约8倍左右。发酵液中长成的菌球细小而密, 直径约1.5毫米左右。由于菌球小而多, 表面积大, 利于培养液中的培养成分的扩散及产物的分泌。由L-2出发, 进一步用EMS及 Co^{60} 交替处理, 最后获得一株高产菌CL-8501, 其产酶能力比出发菌株提高约105倍。通过累积处理, 得到如下系谱:

No.07(<i>Aspergillus niger</i>)	6.06 单位/毫升
↓	1%EMS 温度28℃处理2小时
L-1	9.38 单位/毫升
↓	C ₆₀ 4万伦, 室温处理11分钟
L-2	82.37 单位/毫升
↓	2%EMS, 28℃ 处理2小时
L-3	94.77 单位/毫升
↓	C ₆₀ 5万伦, 室温处理13分钟
L-4	250.09 单位/毫升
↓	1%EMS, 28℃处理5小时
L-5	542.70 单位/毫升
↓	C ₆₀ 5.5万伦, 室温处理15分钟
L-8501	631.6 单位/毫升

注：EMS—磺酸甲基乙酯
C₆₀—钴-60产生的γ-射线

2.3 CL-8501发酵工艺条件的优化

CL-8501发酵工艺条件的优化包括培养基营养成分及培养条件两部分。培养基成分主要考虑碳源、氮源、酶底物及C/N比的影响；培养条件主要考虑孢子预培养、孢子浓度、pH值、通风量、产酶时间对产酶的影响。

2.3.1 培养基成分的优化 碳源的影响。试验了单糖、低聚糖及高聚糖等16种糖。分别用不同的糖代替发酵培养基中的蔗糖和果胶(浓度为4%)，30℃培养3天测酶活，结果见表6。

果胶酶是高分子果胶的水解酶，但表6表明，单糖木糖、半乳糖对CL-8501产酶有明显的促进作用，其机理待进一步研究。二聚糖中以蔗糖效果较好，高分子碳水化合物中以果胶效果最好，这说明果胶酶是诱导酶。

表6 CL-8501对各种碳源的利用

碳源	pH	W	A	碳源	pH	W	A
果胶	3.6	0.193	222	糊精	4.4	0.252	151
蔗糖	4.2	0.261	219	糖原	5.1	0.053	71
麦芽糖	4.3	0.151	115	可溶性淀粉	5.1	0.236	162
棉子糖	4.9	0.081	120	乳糖	2.8	0.130	150
半乳糖	4.5	0.231	255	树胶醛糖	3.4	0.232	121
鼠李糖	4.2	0.177	109	甘露糖	3.8	0.251	223
木糖	1.8	0.215	262	果糖	4.1	0.135	139
山梨糖	4.6	0.237	117	葡萄糖	2.5		203

注：PH—发酵液最终PH
W—菌丝重量(g/30ml发酵液)

A—果胶酶活力(U/ml)

2.3.2 氮源的影响 分有机氮源和无机氮源。本试验选用6种无机氮源及4种有机氮源,分别用不同的氮源代替发酵培养基中的硝酸铵,浓度为0.2%,结果见表7。

表7 CL—8501菌株对不同氮源的利用

氮源	pH	W	A	氮源	pH	W	A
NH ₄ NO ₃	2.5	0.186	671	干酪素	2.2	0.123	758
NaNO ₃	2.5	0.165	482	蛋白胨	2.7	0.161	422
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.9	0.179	288	明胶	3.3	0.132	374
NH ₄ Cl	2.2	0.07	183	尿素	3.5	0.272	376
酒石酸铵	2.48	0.08	172	玉米浆	3.8	0.208	493
(NH ₄) ₃ PO ₄	2.7	0.169	509	麸皮	2.0	0.132	155

注: 同表6

由表7可见,无机氮源中以硝酸铵效果最好,进一步展开试验,最佳浓度为0.2%。有机氮源中以干酪素最佳,因考虑到干酪素价格昂贵,故选用硝酸铵作氮源进一步试验。

表8 C/N对产酶的影响

编号	果胶* (%)	蔗糖 (%)	C (%)	NH ₄ NO ₃ (%)	N (%)	C/N	酶活 (U/ml)
1	2	0	0.589	0.2	0.07	8.41	50
2	2	1	1.029	0.2	0.07	14.70	200
3	2	1.5	1.249	0.2	0.07	17.80	390
4	2	2.0	1.469	0.2	0.07	20.98	650
5	2	2.5	1.689	0.2	0.07	24.12	410
6	2	3	1.909	0.2	0.07	27.27	380
7	0	2	0.880	0.2	0.07	12.57	55
8	1	2	1.174	0.2	0.07	16.77	203
9	1.5	2	1.322	0.2	0.07	18.88	298
10	2.5	2	1.618	0.2	0.07	22.94	450
11	3	2	1.763	0.2	0.07	25.18	380

*果胶中的C含量参照哥本哈根果胶厂产品说明书

2.3.3 C/N比的影响 本试验固定硝酸铵浓度,以蔗糖加果胶为C源,分别变化蔗糖及果胶浓度得到不同C/N,结果见表8。C/N以20.98为最佳。且以果胶和蔗糖混合的复合碳源比单一的碳源(蔗糖或果胶)效果更好。

2.3.4 果胶对产酶的影响 果胶对果胶酶有诱导作用。图5表明培养基中不同果胶浓度对产酶的影响,果胶浓度从1%增加到2%时,酶活从200单位/毫升增至500单位/毫升,但继续增加果胶浓度酶活开始下降。

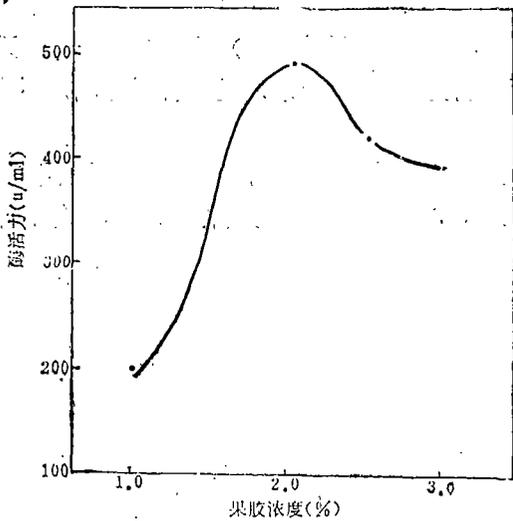


图5 果胶含量与CL—8501产酶的关系

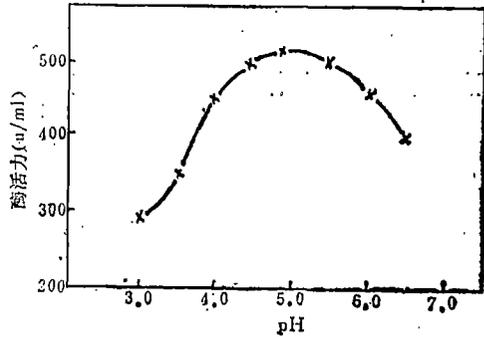
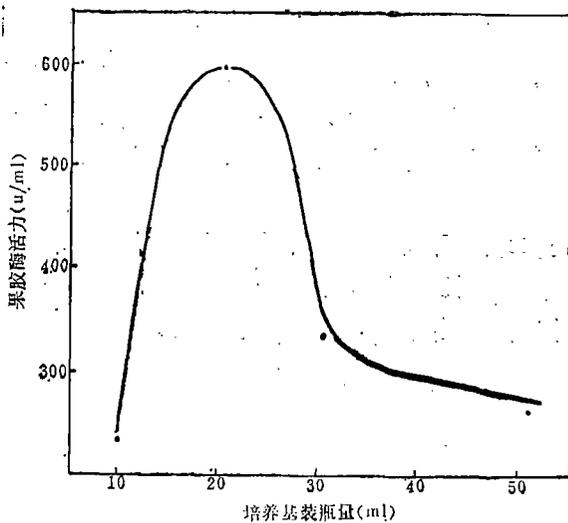


图6 培养基pH对产酶的影响

条件：250ml三角瓶中加入30ml培养基，培养基如表2所示。果胶浓度加1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%，30℃摇瓶4天，补足蒸发水，测定酶活。

2.3.5 pH的影响 由于对摇瓶发酵过程中pH的控制较困难，故本研究只探讨了发酵培养基的初始pH值对产酶的影响。图6所示，在较高pH和较低pH时对产酶都不利，以pH5.0为最好。

2.3.6 通风量的影响 采用250毫升三角瓶分别装入不同量的培养基进行试验，结果表明以20毫升装液量为佳(图7)。



条件：250ml三角瓶中分别加入表2培养基10ml、20ml、30ml、40ml、50ml，用预培养一天菌丝体接种(浓度 5×10^6 个/ml)，于30℃下，摇瓶培养4天，补足蒸发水

2.3.7 孢子预培养及接种量的影响 将孢子在不加果胶的发酵培养基(表2)中分别预培养0、24、48小时后接种发酵培养基(表2)摇瓶试验,结果表明(见图8),孢子预培养1天后接种,产酶量高于孢子直接接种和培养48小时后接种。这对生产来说是很有利的,在不改变任何条件下,就可以提高产量。

接种量的多少对产酶也有影响。在250毫升三角瓶中加入30毫升培养基,接种不同浓度的预培养24小时的菌丝体进行摇瓶试验,结果表明,30毫升培养基的接种量以 5×10^4 孢子/毫升浓度培养的菌丝体效果最好(图9)。

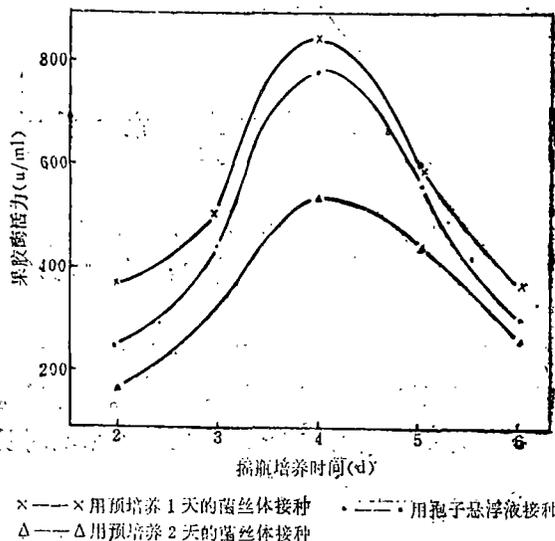


图8 孢子预培养对CL—8501菌株产酶的影响

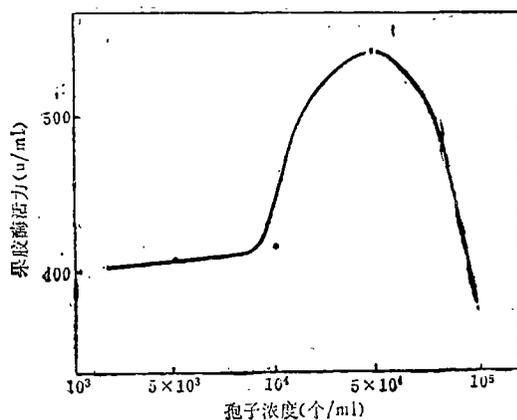


图9 孢子浓度对CL—8501菌株产酶的影响

2.3.8 发酵过程曲线 经过以上培养基成分及发酵条件的优化,获得较佳的培养基为:硝酸铵0.2%,蔗糖2%、果胶2%、硫酸铵0.05%、硫酸镁0.5%、氯化钾0.05%、硫酸铁0.001%、磷酸氢二钾0.1%,较适宜的发酵条件为pH5.0,装液量20毫升/250毫升三角瓶,预培养24小时,接种量 5×10^4 孢子/毫升。在此条件下试验了产酶、菌体生长、pH和残糖与时间关系曲线(图10)。

如图所示,培养开始时pH开始下降,菌体开始生长,残糖和果胶含量都急速下降,培养3天时,pH达最低值,菌体生长达峰值,此时产酶并未达到峰值,培养72小时,pH开始上升,菌体下降,培养96小时产酶达峰值,此时酶活达631.6单位/毫升。

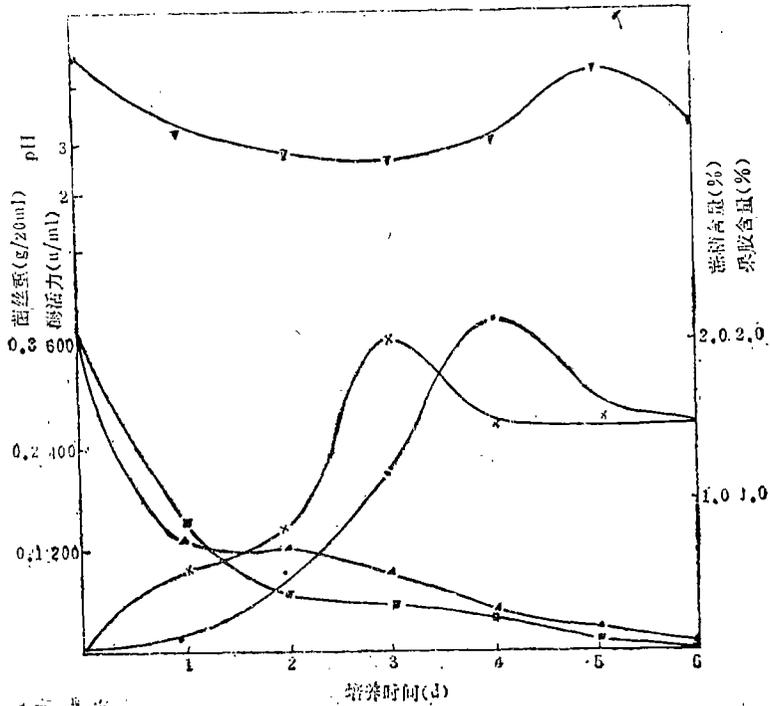


图10 CL-8501菌株发酵过程曲线

- 酶活力曲线
- ×—× 菌丝生长曲线
- △—△ 果胶含量变化曲线
- 蔗糖含量变化曲线
- ▽—▽ pH变化曲线

3 讨论

不同的菌种产的果胶酶的种类、数量、比例都不同，对苹果汁澄清效果也不同。

作者设计了一种有效的筛选程序，首先将待试验菌接种加果胶培养基(表1)试验，产果胶酶的菌落周围的培养基中的果胶被水解，在菌落周围产生透明圈。但是产生果胶酶的菌种并不一定适合苹果汁澄清，将平板筛选获得的菌株接种苹果汁试验。从图1可见，所得7株菌在平板上形成的透明圈都很大，然而在苹果汁澄清试验中效果相差很大，这种现象主要是不同菌种产生的酶的数量及种类不同之故。Endo^[1]对白腐盾壳霉(*C. diplaiella*)果胶酶系进行分离纯化，得到6种果胶酶然后将纯酶按不同比例做苹果汁澄清试验。结果表明，原来果胶酶系中各种酶之间比例不是最佳比例，可见筛选其适宜酶系微生物是很重要的。No.07表现出对苹果汁有很好的澄清效果(表3)，因此用作诱变的出发株。

微生物在诱变育种中，有时会发现一些菌落的形态突变与产量性状有关。这时可从某一形态的突变株中筛得高产菌。如金霉素链霉菌经紫外线处理后，有些菌株产生黄色素，从产黄色素菌落中筛选到四环素高产菌^[18]。又如Baole将黑曲霉孢子用紫外线照射，得一变异株，其菌落呈黄色具泥土气味，糖化酶活性提高3倍^[19]。在CL8501诱变过程中，选用了几种化学和物理因素进行试验，结果发现EMS、Co⁶⁰对No.07效果很好，经诱变后，菌落的形态

发生了很大变化,发现菌落白化与产酶性状有关,高产菌全部是白化菌落。对白化菌株进一步诱变,有相当数量发生黄化(回复突变),黄化菌落产酶下降。根据这一特性,结合透明圈,可以大大提高诱变筛选的效率。白化突变株液体发酵液无色,对酶的应用是有益的。

在工艺条件的优化过程中,发现经过预培养的菌丝接种对产酶有影响。预培养24小时的菌丝接种比孢子直接接种产酶提高,这可能是用菌丝接种,缩短了发酵阶段的适应期和诱导期,接种后,很快进入主发酵阶段之故。

在发酵过程曲线中,菌体生长曲线出现了两个峰值,这是因为培养基中含有两种碳源,一种为易于利用的蔗糖,另一种为难于利用的果胶,微生物首先利用蔗糖生长,1天后生长达第一个峰值,蔗糖残存30%,以后主要利用果胶,3天后生长达第二个峰值。前2天菌体生长缓慢,2天到3天为迅速生长期,随着菌体大量增殖,酶活迅速增加,4天时,产酶达峰值。

经过诱变育种,发酵条件优化酶产量由No.07的6.06单位/毫升,提高到631.6单位/毫升,提高约105倍。说明该菌有工业生产的潜力。

致 谢

在研究过程中,曾得到王璋老师的指导及杨方祺老师的帮助,在此表示感谢。

参 考 文 献

- 1 蔡斯勤,约斯林(美)著;顾季寅等译.果汁和蔬菜汁生产工艺学.轻工业出版社,1965: 40
- 2 Akira Endo and Yukichi Miura. *Agr Bio Chem*, 1951; 25(5): 383~388
- 3 石井茂孝. *化学と生物*, 1973; 11(6): 376~382
- 4 齋藤日向, 蓑田泰治、丸茂博大. *农化*, 昭和29; 28: 810
- 5 Tuttobello R and Mill P J. *Biochem J*, 1961; 79(51)
- 6 Korielia Zetelaki. *Process Biochemistry*, 1976; 7(8): 11~19
- 7 Mill P J. *Biochem J*, 1966; 99: 557~561
- 8 Mill P J. *Biochem J*, 1966; 99: 562~565
- 9 Rexova-Benkova L and Slezarik A. *Collection Czechoslov Chem Commun*, 1966; 31: 122~129
- 10 Makavi Yamasaki, Akira Kato, Shang-Young Chu And Kei Anima. *Agr Bio Chem*, 1967; 31(5): 552~560
- 11 Akira Endo. *Agr and Bio Chem*, 1965; 29(3): 229~233
- 12 齋藤素. *农化*, 1952; 28: 810
- 13 Robo E, Barrut R W and Tatum E L J. *bio Chem*, 1952; 195: 459
- 14 《罐头手册》编写组. *罐头手册4*. 轻工业出版社, 1980; 52
- 15 天津轻工业学院等. *工业发酵分析*. 轻工业出版社, 1980; 16

- 16 Makami, Yanasaki et al. Agr Bio Chem, 1966; 30(2): 142
- 17 Akira Endo. Agr Biol Chem, 1965; 29(2): 129~136
- 18 张筱玉等.微生物育种学术讨论会文集.科学出版社, 1975: 18
- 19 胡学智, 宋庆裴.酶制剂工业.科学出版社, 1984: 498

The Selection of Pectinase Producing Strain

Li Qiangjun Xu Liukang Zhang Xingyuan Chen Shunzu

Abstract: *Aspergillus niger* No.07, Which is suitable for clarification of apple juice, is screened, then treated with physical and chemical factors. A high yield strain CL-8501 is selected from white mutant colonies. The fermentation conditions and medium composition of CL-8501 are investigated. Under the favorable condition and in the suitable medium (sucrose 2%, pectin 2%, NH_4NO_3 0.2%), the activity of pectinase of CL-8501 reaches 631.6U/ml, 105 times higher than the starting strain No.07.

Subjectwords: Pectinase; *Aspergillus niger*; Apple juice clarification; Strain selection