

曲霉液体发酵产原果胶酶的条件优化研究*

尤 华 陆兆新** 冯红霞

(南京农业大学食品科技学院 南京 210095)

摘要:研究了碳源、氮源、金属离子及表面活性剂等对菌株 (*Aspergillus* sp.) XZ-131 产原果胶酶的影响。果胶类物质是该菌株产原果胶酶所必需的诱导物。以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 作为氮源时, 产酶较高, 达到 300 U/mL。钙离子及 Tween-20 均能促进该酶的产生。通过正交试验优化得出该菌株产酶的最佳培养基配方为: 桔皮粉 1g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2g, CaCl_2 0.015g, Tween-20 0.2mL, KH_2PO_4 3.8g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.2g, 水 100mL, pH 6.5。

关键词: 曲霉, 原果胶酶, 发酵条件

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 01-0026-05

STUDY ON THE OPTIMUM FERMENTATION CONDITION FOR PRODUCTION OF PROTOPECTINASE BY *ASPERGILLUS* SP.

YOU Hua LU Zhao-Xin FENG Hong-Xia

(Department of food science & technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract: Effects of carbon resource, nitrogen resource, metal ions and surface detergents on the production of protopectinase by strain *Aspergillus* sp. XZ-131 were studied. The results showed that pectin substances were essential for the strain to produce protopectinase. The enzyme activity reached to 300 U/mL, when $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ were used as nitrogen resource. Ca^{2+} and Tween-20 were able to enhance the production of the enzyme. The optimum composition of the medium was citrus peel powder 1g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2g, CaCl_2 0.015g, Tween-20 0.2mL, KH_2PO_4 3.8g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.2g, H_2O 100mL, pH 6.5.

Key words: *Aspergillus* sp., Protopectinase, Fermentation condition

* 江苏省省委组织部“333 人才培养工程”课题资助项目

** 联系人

收稿日期: 2001-11-12, 修回日期: 2002-02-27

果胶在食品, 化妆品以及医药中用途广泛, 它是一种重要的工业产品。传统的工业化生产果胶主要是酸提取法。然而这一加工过程存在一些不足: 残渣分离困难, 设备易被腐蚀, 能源消耗很大, 同时还产生大量酸性废弃物对环境造成污染^[1]。1978 年日本学者 Sakai 等发现帚状丝孢酵母 (*Trichosporon penicillatum*) 能产生一类使植物组织中的原果胶水解生成果胶物质的酶, 并称该酶为原果胶酶 (Protopectinase)^[2]。利用微生物原果胶酶酶法生产果胶, 不仅可以避免传统工业生产果胶的一些不足, 而且能得到分子量较大, 质量稳定的产品^[3]。

目前我国的果胶生产仍是酸提取法, 而且国内市场所需的优质果胶主要依赖于进口, 应用微生物原果胶酶酶法生产果胶具有重要的经济意义。本实验室已从土壤中分离纯化得到微生物原果胶酶生产菌株 XZ-131 (*Aspergillus* sp.) (论文另发)。本实验旨在对其产酶条件进行较为系统的研究, 为进一步工业化生产该酶提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

- 1.1.1 菌种: *Aspergillus* sp. XZ-131, 由本实验室从土壤中分离纯化得到。
- 1.1.2 底物: 由本实验室参照 Sakai 等人的方法^[4]自制。具体步骤: 柑橘皮内白色层→粉碎→pH4.0, 2% 的六偏磷酸钠溶液反复浸洗至洗脱液中不含有与吡唑硫酸反应的物质止→白色沉淀→真空冷冻干燥→白色粉末 (底物)。
- 1.1.3 培养基: 斜面培养基——察氏培养基; 产酶基础培养基: 豆粕粉 1g, KH₂PO₄ 3.8g, K₂HPO₄·3H₂O 0.2g, 水 100mL, pH 5.0。

1.2 方法

- 1.2.1 粗酶液的提取: 将发酵液在 4℃, 8,000 r/min 离心 10min 后取上清液作为粗酶液, 供酶活测定用。
- 1.2.2 酶活力的测定方法: 参照 Sakai 等人报道的方法^[5]。10mg 底物中加入 1,000 μL pH 5.0 的醋酸缓冲液及 5μL 经过适当稀释的酶液, 37℃ 水浴 1h 后入冰浴, 迅速过滤。取 250μL 滤液, 加入 3mL 浓硫酸以及 250μL 0.2% 的吡唑乙醇溶液, 于 80℃ 水浴 30min, 冷却后于 530nm 处测定其吸光值。同时以经过煮沸 10min 的酶液, 按同样的处理作空白。规定在上述反应体系中, 生成果胶物质的量相当于 1μmol 的 D-半乳糖醛酸即为一个酶活力单位 (U)。

- 1.2.3 正交试验: 见表 1。

表 1 正交试验的因素水平表

水平	因 素			
	桔皮粉 (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	Ca ²⁺ (g/L)	Tween 20 (mL/L)
1	10	10	0.05	2
2	20	20	0.10	4
3	30	30	0.15	6

2 结果与讨论

2.1 不同接种量对产酶的影响

将曲霉菌孢子配成 1 × 10⁶ 的孢子悬液, 分别以 1%、3%、5%、7%、9%、11% 的接种量添加到产酶基础培养基中, 结果 (图 1) 表明, 以 3% 接种时酶活力最高, 因此以下试验均以 3% 接种量进行研究。

2.2 不同碳源对产酶的影响

因为豆粕粉成分复杂, 在发酵过程中既充当碳源又用作氮源, 不利于进一步研究。

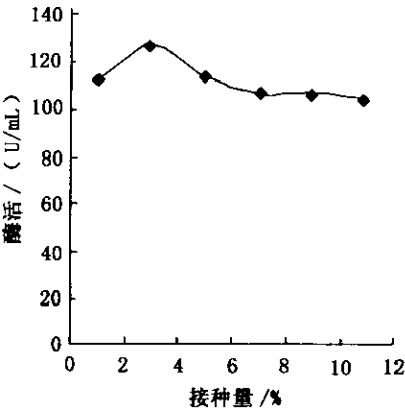


图 1 不同接种量对产酶的影响

表 2 不同碳源对产酶的影响

碳源	酶活 (U/mL)
葡萄糖	-
乳糖	-
蔗糖	-
甘油	-
果糖	-
麦芽糖	-
淀粉	-
滤纸	-
桔皮粉	150.2
D-半乳糖醛酸	65.5
果胶	102.2
0.8% 葡萄糖 + 0.2% 果胶	84.5
0.8% 蔗糖 + 0.2% 果胶	64.8
豆粕粉	128.3

表 3 不同氮源对产酶的影响

氮源	酶活 (U/mL)
(NH ₄) ₂ SO ₄	308.6
(NH ₄) ₂ HPO ₄	299.2
KNO ₃	282
NaNO ₃	273.6
NH ₄ NO ₃	273.1
尿素	271.2
NH ₄ Cl	262.2
蛋白胨	247.4
酵母膏	136.4

因此在研究不同碳源的影响时,采用 1% 的酵母膏作为氮源,试验了浓度为 1% 的 15 种碳源对产酶的影响,结果见表 2。

从表 1 可以看出以桔皮粉、果胶、D-半乳糖醛酸等作碳源时,发酵液中的酶活较高,而以葡萄糖等不含果胶的物质作为单一的碳源时不产酶,这说明在液体发酵条件下,该酶必须有果胶物质的诱导才能产生。当在 0.8% 的葡萄糖与 0.8% 的蔗糖中分别添加 0.2% 果胶的条件下,该菌株就能产生原果胶酶,这进一步说明了微生物原果胶酶是一种受果胶物质的诱导而产生的酶。而以豆粕粉为原料时,因为豆粕粉中含有少量的果胶物质故能诱导该酶的产生。

2.3 不同氮源对产酶的影响

以 1% 桔皮粉为碳源,研究了添加 1% 的不同氮源对产酶的影响,实验结果如表 3。从表 3 可看出,无机氮源比有机氮源酵母膏、蛋白胨更有利于产酶,硫酸铵与磷酸氢二铵为氮源时酶活最高,达到 300 U/mL。

2.4 发酵液初始 pH 对产酶的影响

在最佳的碳、氮源的条件,研究了不同初始 pH 的发酵培养基对产酶的影响,其结果如图 2 所示。从图中可以看出,当发酵液的初始 pH 偏酸 (pH < 5) 或偏碱性 (pH > 7) 时,菌株产酶不高,而在微酸性 pH (pH = 6.5) 环境下菌株的产酶量相对较多,这说明该菌株液体发酵需要在微酸性的初始 pH 条件下进行。

2.5 金属离子对产酶的影响

金属离子能促进或抑制许多酶的产生,在确定上述各最佳发酵条件后,研究了不同浓度的 Mn²⁺、Fe²⁺、Cu²⁺、Mg²⁺ 和 Ca²⁺ 对产酶的影响,结果如表 4。Ca²⁺ 对产酶有一定的促进作用, Mg²⁺、Cu²⁺ 对产酶有明显的抑制作用,而 Mn²⁺、Fe²⁺ 对产酶基本没有什么影响。

2.6 不同表面活性剂对产酶的影响

微生物原果胶酶是微生物产生的一种胞外酶,表面活性剂能改变细胞膜的通透性有助于菌体将酶分泌到胞外,从而提高产酶。本实验试验了 0.4% 的 Tween 20、Tween 40、Tween 80 以及洗衣粉等对产酶的影响。实验结果表明, Tween 20 对产酶有明显的促进作用,产酶达到 463.0U/mL。而洗衣粉、Tween 40、Tween 80 对产酶均有一定的抑制作用。

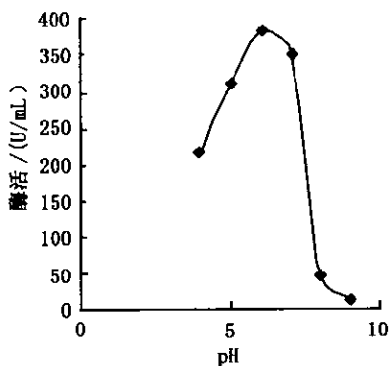


图 2 不同初始 pH 对产酶的影响

表 4 不同金属离子对产酶的影响

金属离子	浓度 (g/L)	酶活 (U/mL)
Mn ²⁺	0.05	383.6
	0.10	381.5
Fe ²⁺	0.05	368.7
	0.10	380.1
Cu ²⁺	0.05	318.3
	0.10	327.6
Mg ²⁺	0.05	337.5
	0.10	321.2
Ca ²⁺	0.05	407.4
	0.10	416.2
对照		385.0

2.7 微生物原果胶酶最佳产酶的营养条件的研究

从以上实验条件的研究发现碳源、氮源、金属离子和表面活性剂 4 个因素对该菌株的产酶影响较大，因此在单因子实验基础上，用正交实验方法对桔皮粉、(NH₄)₂SO₄、Ca²⁺ 和 Tween 20 的浓度进行优化。试验结果及分析计算见表 5。

表 5 正交试验结果计算与分析表

样品	A	B	C	D	酶活 (U/mL)		
	碳源 (g/L)	氮源 (g/L)	Ca ²⁺ (g/L)	Tween 20 (mL/L)	重复 I	重复 II	Ti
1	1 (10)	1 (10)	1 (0.05)	1 (2)	596.4	690.7	1287.1
2	1 (10)	2 (20)	2 (0.10)	2 (4)	678.7	638.2	1316.9
3	1 (10)	3 (30)	3 (0.15)	3 (6)	641.1	659.5	1300.6
4	2 (20)	1 (10)	2 (0.10)	3 (6)	346.7	302.7	649.4
5	2 (20)	2 (20)	3 (0.15)	1 (2)	473.0	447.5	1020.5
6	2 (20)	3 (30)	1 (0.05)	2 (4)	288.6	297.8	586.4
7	3 (30)	1 (10)	3 (0.15)	2 (4)	219.7	197.8	417.5
8	3 (30)	2 (20)	1 (0.05)	3 (6)	142.4	150.2	292.6
9	3 (30)	3 (30)	2 (0.10)	1 (2)	140.3	146.0	286.3
T ₁	3904.6	2354	2166.1	2493.9	3526.9	3530.4	7057.3
T ₂	2156.3	2530	2252.6	2320.8			
T ₃	996.4	2173.3	2638.6	2242.6			
X ₁	650.8	392.3	361.0	415.7			
X ₂	359.4	421.7	375.4	386.8			
X ₃	166.1	362.2	439.8	373.8			
F	404.9**	6.01*	11.9**	3.12			

注：F_{0.05} (2, 8) = 4.46, F_{0.01} (2, 8) = 8.65

表 5 的分析可以看出，桔皮粉与 Ca²⁺ 对产酶有极显著的影响，(NH₄)₂SO₄ 对产酶影响显著，而 Tween 20 的浓度对产酶没有太大的影响。其中桔皮粉对产酶的影响极大，这可能与桔皮粉既是碳源又是该菌株产原果胶酶的诱导物有密切关系。为了直观地反应桔皮粉、硫酸铵以及钙离子浓度对产酶的影响，作出因子和实验指标关系图，见图 3。从图 3 中可以确定各物质的最佳浓度分别为：桔皮粉 10g/L，硫酸铵 20g/L，钙离子 0.15g/L。由于 Tween 20 对于产酶影响不大，故从经济的角度考虑，应采用 2mL/L 的浓度。

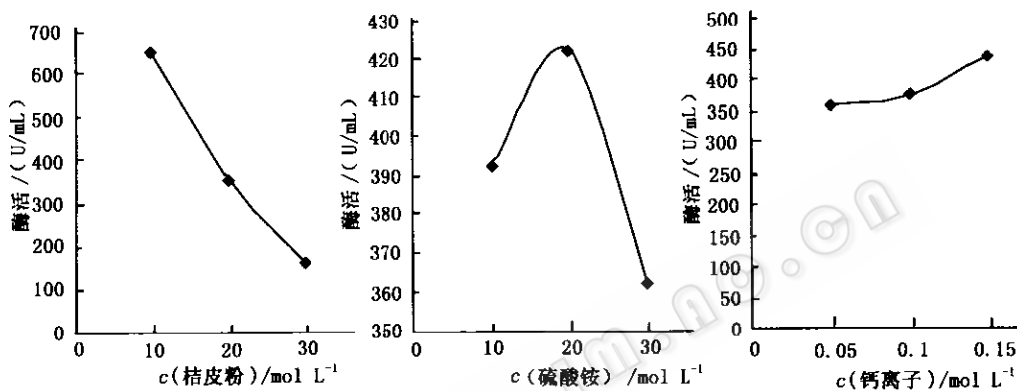


图3 桔皮粉、硫酸铵以及钙离子浓度对产酶的影响

3 结论

通过本研究发现该菌株必须有果胶物质的诱导才能产生原果胶酶, 无机氮源比有机氮源更有利于产酶, 钙离子与 Tween-20 对产酶有促进作用。

参考文献

- [1] Miyazaki H, Terada K. Shokuhin Kogyo, 1974, 17: 81 ~ 87.
- [2] Sakai T, Okushima M. Agric Biol Chem, 1978, 42: 2427 ~ 2429.
- [3] Sakai T, Okushima M. Appl Environ Microbiol, 1980, 39: 908 ~ 912.
- [4] Sakamoto T, Hours R A. Biosci Biotech Biochem, 1994, 58 (2): 353 ~ 358.
- [5] Sakai T, Sakamoto T. Adv Appl Microbiol, 1993, 39: 213 ~ 294.