

黑曲霉果胶酶液体发酵及酶作用条件

马建华 那安 崔福绵 张树政

(中国科学院微生物研究所,北京)

果胶酶用于提高果汁出率及果汁果酒澄清,早在三十年代国外就有这方面的报道^[1],目前许多国家都已将其广泛应用于果汁果酒工业^[2]。国内此方面的研究甚少,六十年代虽然做过一些探讨,但是未能用于生产,至今生产上使用的果胶酶仍然是从国外进口的。随着我国人民生活水平的提高,对外贸易的发展,迫切要求提高果汁果酒质量,故对果胶酶的要求日益迫切,为此我们进行了果胶酶液体发酵条件及酶作用条件的研究。

材 料 和 方 法

(一) 菌种

黑曲霉 (*Aspergillus niger*) AS 3.316 从本所菌种保藏室保存菌株中筛选得到。

(二) 试剂

1. 果胶: 桔子果胶,上海试剂二厂生产。
2. 半乳糖醛酸: Light 公司产品。

(三) 果胶酶液体曲的制备

250ml 三角瓶装 50ml 含 5% 麸皮, 1% 硫酸铵, 0.3% 果胶, 起始 pH2.0 的培养基, 15 磅灭菌 30 分钟, 接孢子悬浮液 1.0ml (孢子数 55×10^7) 在 30℃ 下以 190 转/分振荡培养 5 天, 过滤即得果胶酶液。

(四) 果胶酶活力的测定

取 0.2ml 稀释适当倍数的酶液, 加 0.25% 果胶液 (用 0.1M 醋酸-醋酸钠 pH4.0 缓冲液配制) 0.5ml, 于 50℃ 水浴保温 1 小时, 按 Somogyi 法^[3]测还原糖, 以在实验条件下水解出 1mg 还原糖 (以半乳糖醛酸作标准) 所需的酶量定为 1 个酶活力单位 (u)。

结 果

(一) 酶的产生条件

1. 培养基的组成对产酶的影响: 以不同配比的 15 种培养基进行比较试验, 结果表明 (表 1), 培养基组成对产酶影响很大, 其中 12, 14 号培养基较好。

2. 硫酸铵浓度对产酶的影响: 在培养基中分别加入 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0% 的硫酸铵, 进行产酶试验, 其结果为加入 1% 硫酸铵产酶最高。

3. 诱导物对产酶的影响: 在培养基中加入不同量果胶, 进行产酶试验, 结果 (表 2) 表明, 果胶对产酶影响较大, 加入 0.3% 果胶即可达到较好的效果。

4. 起始 pH 对产酶的影响: 用 1N HCl 将培养基 pH 调至不同值, 进行振荡培养, 结果 (图 1) 表明, 产酶最适起始 pH 为 2.0—2.5。

5. 培养温度对产酶的影响: 在不同温度下振荡培养, 试验结果表明产酶最适温度为 30℃

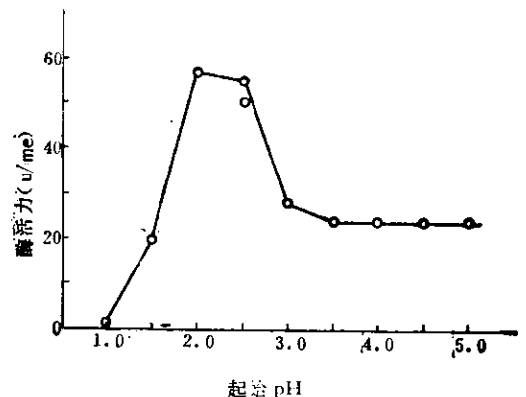


图 1 起始 pH 对产酶的影响

表 1 培养基成份对产酶的影响

No.	固形物(%)	麸皮	米糖	黄豆粉	玉米粉	硫酸铵	果胶	起始 pH	酶活力 (u)
1	5	—	—	—	—	—	—	2.0	12
2	4	1	—	—	—	—	—	2.0	7.8
3	4	—	1	—	—	—	—	2.0	11.3
4	4	—	—	1	—	—	—	2.0	9.8
5	5	—	—	—	1	—	—	2.0	27.8
6	5	—	—	—	—	—	0.3	2.0	38
7	3	1	1	—	—	—	—	2.0	23.5
8	3	1	—	1	—	—	—	2.0	18.5
9	3	—	1	1	—	—	—	2.0	19.5
10	2	1	1	1	—	—	—	2.0	16.5
11	2	1	1	1	1	—	—	2.0	31.5
12	5	—	—	—	—	1	0.3	2.0	57.8
13	4	1	—	—	—	1	0.3	2.0	51.8
14	4	—	1	—	—	1	0.3	2.0	56
15	4	—	—	—	1	1	0.3	2.0	52

表 2 果胶浓度对产酶的影响

果胶浓度(%)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
酶活力 (u/ml)	34	39	57	58	48

基于 30℃ 下振荡培养不同时间。结果表明(图 3), 酶产量 1—5 天内增长迅速, 5 天后增加不明显。

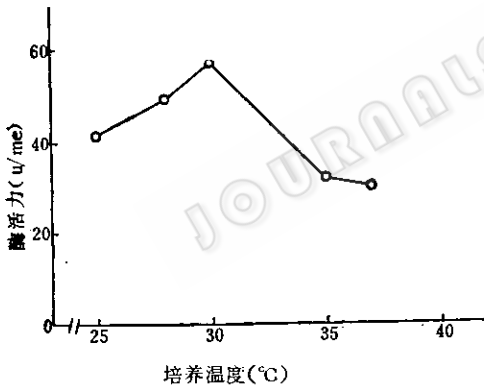


图 2 温度对产酶的影响

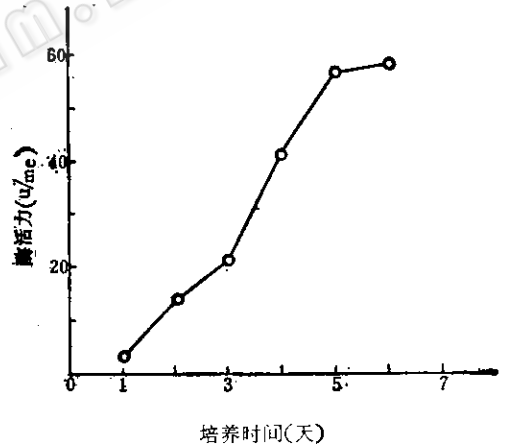


图 3 培养时间对产酶的影响

表 3 通气量对产酶的影响

培养基体积 (ml)	20	30	40	50	60
酶活力 (u/ml)	50	55.5	56.3	57.7	51.8

(图 2)。

6. 通气量对产酶的影响: 在 250ml 三角瓶中装入不同体积的培养基, 进行振荡培养。

由表 3 可见, 该菌产酶对通气量不十分敏感, 250ml 三角瓶装 30—50ml 培养基较为适宜。

7. 培养时间对产酶的影响: 将接种的培养

(二) 酶的作用条件

1. 酶作用的最适 pH: 用不同 pH 的 0.2M 醋酸-醋酸钠缓冲液配制一系列底物, 进行酶促反应。结果表明(图 4), 酶作用的最适 pH 为 4.0。

2. 酶作用最适温度: 酶与底物于不同温度下进行酶促反应, 其最适温度为 50℃, 当温度低于 45℃ 或高于 60℃ 时酶活力迅速下降(图 5)。

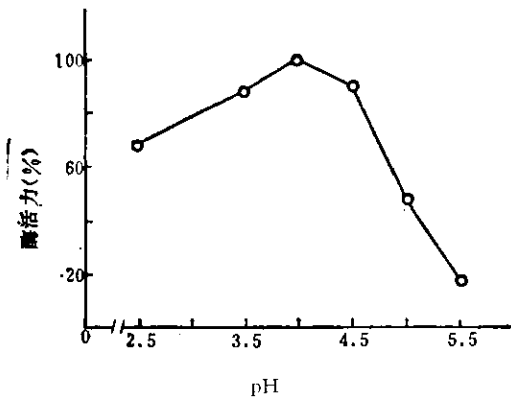


图4 pH对酶活力的影响

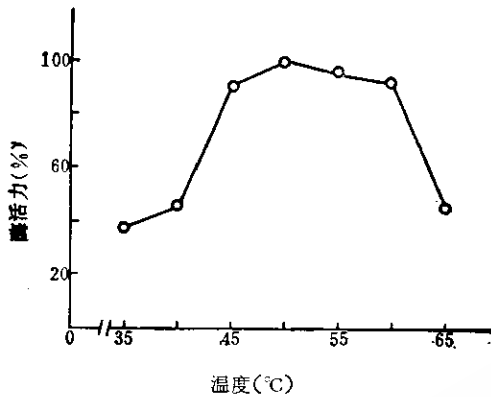


图5 温度对酶活力的影响

3. 酶的热稳定性: 将酶稀释 100 倍, 置于不同温度下保温不同时间, 测定残余酶活力。结果表明, 该酶热稳定性较差, 60°C 放置 1 小时, 其酶活力仅残存 37%, 放置 3 小时其酶活力几乎完全丧失(图 6)。

4. 存放时间对酶活力的影响: 将加 0.05%

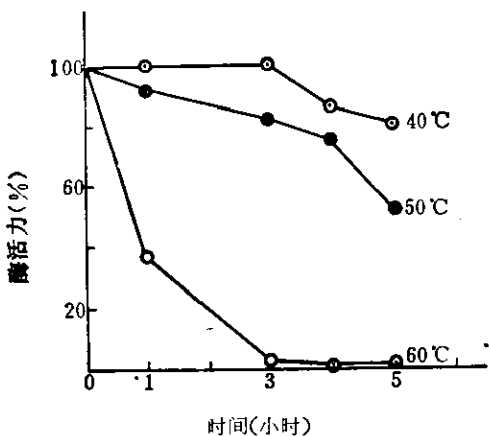


图6 酶的热稳定性

防腐剂(苯甲酸钠)和未加防腐剂的酶液于 28°C 下存放, 于不同时间测其酶活力。由表 4 可看出, 加防腐剂者存放 11 天酶活力损失不明显, 20 天酶活力损失 12%, 未加防腐剂者, 存放 7 天酶活力损失 10%, 20 天损失 21%。

表 4 存放时间对酶活力的影响

酶液	存放时间(天)					
	1	3	7	11	13	20
未加防腐剂	100	95	90	88	88	79
加 0.05% 防腐剂	100	100	100	93	96	85

上述试验表明, 黑曲霉 As 3.316 液体发酵生产果胶酶, 培养基成分为 5% 麸皮, 1% 硫酸铵, 0.3% 果胶, 起始 pH2.0, 培养温度 30°C, 振荡培养 5 天 (190 转/分), 发酵液中果胶酶活力可达 57u/ml, 该果胶酶的最适作用 pH 为 4.0, 最适作用温度为 50°C。

讨 论

虽然许多微生物都具有产生果胶酶的能力, 但研究和应用较多的是真菌果胶酶, 使用的产酶菌有酱油曲霉 (*Aspergillus sojae*), 日本曲霉 (*Asp. japonicus*), 金黄曲霉 (*Asp. aureus*), 丰塞卡曲霉 (*Asp. fonsecacus*), 黑曲霉 (*Asp. niger*), 白腐盾壳霉 (*Cccriothyrium diplodiella*) 等。黑曲霉 As 3.316 菌株属国际公认用于食品上的安全微生物^[4]。其液体培养基成分简单, 起始 pH 较低, 因而不易染菌。该菌所产果胶酶作用最适 pH 为 4.0, 这与一般果汁的自然 pH (3.0—4.0) 一致。用该酶进行果汁澄清, 取得了较好的效果。该酶酶活力 (1100u/g 原料) 略低于固体曲霉活力 (1500u/g 原料)。

参 考 文 献

- [1] Newbeck, C. E.: *Enzymes in Food Processing*, p. 397—438, 1975.
- [2] 胡学智: 应用微生物, 1982 年, 第一期。
- [3] Somogyi, M. J.: *Biol. Chem.*, **195**:19, 1952.
- [4] Taylor, M. J. et al.: *Advances in Applied Microbiology*, **25**:7, 1979.