

果胶酶 CP-85211 菌株的选育及其 液体发酵条件的研究

崔福绵 刘 茜 张树政

(中国科学院微生物研究所, 北京)

黑曲霉 (*Aspergillus niger*) CP-831 经 0.03% 亚硝基胍在 40℃ 处理 30 分钟, 获得一株高产果胶酶突变株 CP-85211。该突变株发酵滤液, 当以果胶为底物时, 酶活力为 308u/ml; 当以多聚半乳糖醛酸为底物时, 酶活力为 842u/ml。产酶活力水平约为出发菌种的 5 倍。产酶最适培养基组成为: 8% 麦麸, 2% 桔皮粉和 2% 硫酸铵。最适培养条件为: 起始 pH 3.5, 30℃, 72 小时。

当以果胶为底物时, 酶作用最适条件为: pH 3.5, 50℃; 当以多聚半乳糖醛酸为底物时, 酶作用最适条件为: pH 4.8, 50℃。酶在 30℃ 保温 12 小时, pH 稳定范围为 3.5—5.5。热稳定性较差, 60℃ 保温 15 分钟后, 以果胶为底物者, 酶活力剩余 23%; 以多聚半乳糖醛酸为底物者, 酶活力完全丧失。

关键词 诱变; 果胶酶; 黑曲霉

食品工业的不断发展, 使得果胶酶的用量不断增加。国外曾采用诱变处理方法提高菌种的产酶能力^[1], 国内也曾进行过诱变处理试验, 但产酶能力没有取得令人满意的结果^[2]。我们以果胶酶生产菌黑曲霉 (*Aspergillus niger*) CP-831 为出发菌种, 用亚硝基胍诱变处理, 选育出一株高产果胶酶的突变株 CP-85211。本文报道该突变株的选育及其液体发酵条件的研究。

材 料 和 方 法

(一) 菌种

出发菌种: 黑曲霉 (*Aspergillus niger*) CP-831, 系由本研究室筛选并用于生产的菌种。

突变菌株: 黑曲霉 (*Aspergillus niger*) CP-85211。

(二) 培养基

1. 斜面培养基和菌的培养: 采用马铃薯葡萄糖琼脂培养基。在试管 (ϕ 1.2×14 cm) 斜面培养基上 28℃ 培养 5 天后使用。

2. 平板分离培养基: 采用查氏琼脂培养基。

3. 液体培养基和培养方法: 250ml 三角瓶装 50ml 含 2% 麦麸、2% 桔皮粉和 2% 硫酸铵的液体培养基(起始 pH 3.5), 15 磅灭菌 30 分钟后, 接种斜面孢子一环, 于 30℃ 摇床上振荡 (280 转/分) 培养 72 小时。

(三) 诱变处理方法

1. 分生孢子悬浮液的制备: 取 CP-831 试管斜面一支, 加 pH 6.0、0.05M 磷酸氢二钠-0.025M 柠檬酸缓冲液 10ml, 刮下孢子, 倒入装有玻璃珠的三角瓶中, 充分振荡后, 用同样缓冲液稀释至孢子浓度为 4×10^8 个/ml (采用平板计数法测定)。

2. N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(简称亚硝基胍)处理: 取 CP-831 分生孢子悬浮液 2ml 于装有一定量亚硝基胍的离心管中, 在一定温度下, 振荡处理一定时间后, 3000r/min 离心 5 分钟, 弃去上清液。用 5ml 上述缓冲液洗涤沉淀二次后, 用含 0.005% Tween 81 的无菌水悬浮并稀释至 10^{-4} 。取经过处理的分生孢子悬浮液 0.1 ml, 涂布于直径 9cm 的查氏培养基平板上, 28℃

本文于 1986 年 3 月 30 日收到。

培养 48 小时左右, 将各个孤立菌落转移到斜面上, 28℃ 培养 5 天后进行产酶菌种初筛。

(四) 突变株的筛选

1. 初筛: 采用 Mukherjee 和 Majumdar^[3] 修改的 Tuttobello 和 Mill 的透明带法。将在马铃薯葡萄糖琼脂斜面上生长典型的突变株接种在装有 9ml 含 5% (W/V) 果胶和 2% (V/V) 麦芽汁的液体培养基(起始 pH 4.5)的试管中, 30℃ 培养 2—5 天。选择透明带出现较早, 并且较宽的突变株进行产酶菌种复筛。

2. 复筛: 供试各菌株经液体培养后, 取培养物滤液, 以果胶为底物, 测定酶活力。

(五) 果胶酶活力的测定

取 0.25% 底物 (Sigma 产品, 由桔子提取) 溶液(果胶以 pH 3.5 上述缓冲液配制; 多聚半乳糖醛酸以 pH 4.8 上述缓冲液配制) 0.5ml 于试管中, 50℃ 水浴中平衡后, 加入适当稀释的酶液 0.2ml, 保温 30 分钟。采用 Somogyi^[4] 方法测定水解产生的还原糖。

在上述条件下, 由底物产生 1 毫克还原糖(以半乳糖醛酸计) 所需的酶量定义为一个酶活力单

位 (u)。

结 果

(一) 菌株的选育

在不同浓度 (0.02%—0.3%) 亚硝基胍, 不同处理温度 (25、30、35 和 40℃) 和时间 (15、30 和 60 分钟) 的条件下, 对出发菌种 CP-831 进行诱变处理。在 0.03% 亚硝基胍, 40℃ 30 分钟处理下, 获得一株高产果胶酶突变株, 编号为 CP-85211。由表 1 看出, 突变株 CP-85211 产酶能力显著高于出发菌种 CP-831 以及国内研究和应用较多的 AS 3.315 和 AS 3.316, 以果胶为底物时, 酶活力为 308u/ml; 以多聚半乳糖醛酸为底物时, 酶活力为 842u/ml。产酶活力水平约为出发菌种的 5 倍。

突变株 CP-85211 连续继代 29 次后使用与经过约二年保藏后继代使用, 均保持原高产果胶酶性能不变。

表 1 不同黑曲霉菌株产果胶酶能力的比较

Table 1 A Comparison of pectinase potency of some strains of *Aspergillus niger*

菌 种 Strain	透 明 带 宽* Width of clear zone (cm)*	酶 活 力 Enzyme activity (u/ml)	
		果 胶 On pectin	多聚半乳糖醛酸 On PG **
AS 3.315 (野生型) (Wild type)	0.9	66	167
AS 3.316 (野生型) (Wild type)	0.9	67	168
CP-831 (野生型) (Wild type)	0.9	68	172
CP-85211 (CP-831 的突变株) (Mutant of CP-831)	2.9	308	842

* 采用 Mukherjee 和 Majumdar^[3] 修改的 Tuttobello 和 Mill 的透明带法。菌在 30℃ 培养 4 天。

* The method of clear zone of Tuttobello and Mill modified by Mukherjee and Majumdar^[3] was adopted. Organisms were incubated at 30℃ for 4 days. ** PG: polygalacturonic acid

(二) 突变株 CP-85211 发酵条件

1. 碳源对产酶的影响: 在以 8% 麦麸为基础碳源的培养基中, 分别添加不同碳源, 进行产酶试验。由表 2 可见, 以桔皮

粉的效果最佳。

在不改变培养基中麦麸和桔皮粉的总含量 10% 的条件下, 变动麦麸和桔皮粉的用量, 进行产酶试验。表 3 表明, 桔皮粉用

表 2 碳源对产酶的影响

Table 2 Effect of various additional carbohydrates on pectinase production

附加碳源 Additional carbon source (1%)	酶 活 力 Enzyme activity (u/ml)		附加碳源 Additional carbon source (1%)	酶 活 力 Enzyme activity (u/ml)	
	果 胶 On pectin	多聚半乳糖醛酸 On PG		果 胶 On pectin	多聚半乳糖醛酸 On PG
纤 维 素 粉 Cellulose powder No. 123	209	434	阿拉伯糖 Arabinose	209	434
纤 维 二 糖 Cellobiose	209	435	半 乳 糖 Galactose	211	436
葡 萄 糖 Glucose	210	435	鼠 李 糖 Rhamnose	208	433
桔 皮 粉 Citrus peel powder (2%)	308	842	木 糖 Xylose	209	432
果 胶 Pectin	291	807	蔗 糖 Sucrose	210	436
多聚半乳糖醛酸 PG	294	810	对 照 Control	208	434

表 3 麦麸与桔皮粉的用量对产酶的影响

Table 3 Effect of different combinations of wheat bran and citrus peel powder on pectinase production

麦 麸 Wheat bran (%)		10	9	8	6	4	2
桔 皮 粉 Citrus peel powder (%)		0	1	2	4	6	8
酶 活 力 Enzyme activity (u/ml)	果 胶 On pectin	256	290	308	307	292	234
	多聚半乳糖醛酸 On PG	553	813	842	837	779	698

量在 2—4% 时酶活力最高。

2. 氮源对产酶的影响： 在含 8% 麦麸和 2% 桔皮粉的培养基中，分别添加不同氮源，进行产酶试验。表 4 可见，添加某些氮化合物能促进酶的形成，其中以硫酸铵的效果最显著，其次是磷酸氢二铵。尿素对酶的形成有抑制作用。

变动培养基中硫酸铵的含量，进行产酶试验，硫酸铵的最适用量为 2% (表 5)。

3. 培养基起始 pH 对产酶的影响： 培养基用硫酸调成不同 pH，进行产酶试验 (表 6)。突变株 CP-85211 产酶适宜起始 pH 为 3.2—4.0，最适起始 pH 为 3.5—

3.7。

4. 培养温度对产酶的影响： 在不同温度下进行培养，补加培养过程中失去的水量后，测定酶活力 (表 7)。产酶适宜温度范围 28—32℃，最适温度 30℃。

5. 通气量对产酶的影响： 250ml 三角瓶中装不同体积的培养基，试验通气量对产酶的影响。补加培养过程中失去的水量后，测定酶活力 (表 8)。加大通气量有利于产酶。

6. 接种量对产酶的影响： 250ml 三角瓶装 50ml 培养基，试验接种量对产酶的影响 (表 9)。在所试用量范围内，产酶活

表 4 氮源对产酶的影响

Table 4 Effect of various additional nitrogen compounds on pectinase production

附加氮源 Additional nitrogen source	酶 活 力 Enzyme activity (u/ml)		附加氮源 Additional nitrogen source	酶 活 力 Enzyme activity (u/ml)	
	果 胶 On pectin	多聚半乳糖醛酸 On PG		果 胶 On pectin	多聚半乳糖醛酸 On PG
NH ₄ Cl 1.5%	203	338	酵 母 膏 Yeast extract 0.5%	162	177
NH ₄ NO ₃ 1.0%	183	353	牛 肉 蛋 白 胨 Beef peptone 0.5%	167	177
(NH ₄) ₂ HPO ₄ 2.0%	259	595	酪 素 Casein 0.5%	183	241
(NH ₄) ₂ SO ₄ 2.0%	307	842	豆 饼 粉 Soy bean cake meal 2.0%	203	240
NaNO ₃ 2.0%	183	322	对 照 Control	158	177
尿素 CO(NH ₂) ₂ 1.0%	92	121			

表 5 硫酸铵量对产酶的影响

Table 5 Effect of concentration of ammonium sulfate on pectinase production

(NH ₄) ₂ SO ₄ (%)		0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
酶 活 力 Enzyme activity (u/ml)	果 胶 On pectin	155	226	258	275	308	308
	多聚半乳糖醛酸 On PG	174	322	522	751	842	841

表 6 培养基起始 pH 对产酶的影响

Table 6 Effect of initial pH of medium on pectinase production

培养基 起始 pH Initial pH of medium		2.5	3.0	3.2	3.5	3.7	4.0	4.5	5.0
酶 活 力 Enzyme activity (u/ml)	果 胶 On pectin	194	240	280	307	305	289	244	183
	多聚半乳糖醛酸 On PG	539	628	743	841	840	781	483	274

表 7 培养温度对产酶的影响

Table 7 Effect of cultivation temperature on pectinase production

培 养 温 度 Cultivation temperature (°C)		25	28	30	32	35	37
酶 活 力 Enzyme activity (u/ml)	果 胶 On pectin	240	277	283	259	209	168
	多聚半乳糖醛酸 On PG	549	724	728	698	418	217

表 8 通气量对产酶的影响

Table 8 Effect of aeration on pectinase production

培养基体积 Volume of medium (ml)		20	30	40	50	60	70
酶活力 Enzyme activity (u/ml)	果 胶 On pectin	332	319	295	281	210	173
	多聚半乳糖醛酸 On PG	840	798	755	727	654	499

表 9 接种量对产酶的影响

Table 9 Effect of inoculum volume on pectinase production

接 种 量 Inoculum volume (%)		孢子悬浮液 (2×10^8 个/ml) Spore suspension (2×10^8 spores/ml)						菌丝体悬浮液* Mycelial suspension*				1 环干孢子(2×10^8 个)/50ml 培养基 One loop of dry spore (2×10^8)/50 ml of medium
		0.2	0.5	1	2	4	8	2.5	5	7.5	10	
酶活力 Enzyme activity (u/ml)	果 胶 On pectin	298	304	306	302	300	293	306	303	301	296	307
	多聚半乳糖醛酸 On PG	835	838	840	841	836	831	841	840	837	834	843

* 取 8% 麦麸的浸出液 25ml 于 250ml 三角瓶中, 灭菌后接种干孢子一环, 30℃ 振荡 (280 转/分) 培养 30 小时, 作为种子。

* Twenty-five ml of extract of 8% wheat bran in 250 ml flask was sterilized and inoculated with 1 loop of dry spore and incubated at 30℃ for 30 h on rotary shaker (280 r/min). The culture was used as seed.

表 10 产酶时间过程

Table 10 The time course of pectinase production

培 养 时 间 Cultivation time (h)		24	36	48	60	72	84	96
酶活力 Enzyme activity (u/ml)	果 胶 On pectin	12	74	203	262	284	284	285
	多聚半乳糖醛酸 On PG	75	273	614	705	726	728	728

力水平差别不大。而且, 孢子悬浮液、菌丝体悬浮液和干孢子三种形式种子的接种效果相同。

7. 产酶时间过程: 用干孢子接种, 于不同培养时间取样, 补加培养过程中失去的水量后, 测定酶活力(表 10)。培养 72 小时产酶量最高。

(三) 突变株 CP-85211 果胶酶的性质

1. pH 对酶活力的影响: 在不同 pH 的上述缓冲系统中进行酶反应。结果(图

1) 表明: 当以果胶为底物时, 酶作用适宜 pH 为 3.2—3.7, 酶作用最适 pH 为 3.5; 当以多聚半乳糖醛酸为底物时, 适宜 pH 为 4.5—5.0, 最适 pH 为 4.8。

2. 温度对酶活力的影响: 图 2 表明, 无论以果胶为底物, 还是以多聚半乳糖醛酸为底物, 酶作用最适温度均为 50℃。

3. 酶的 pH 稳定性: 酶液用不同 pH 的上述缓冲液稀释 20 倍, 于 30℃ 水浴中保温 12 小时后, 分别以果胶和多聚半乳糖醛酸为底物, 测定酶活力(图 3)。两种底

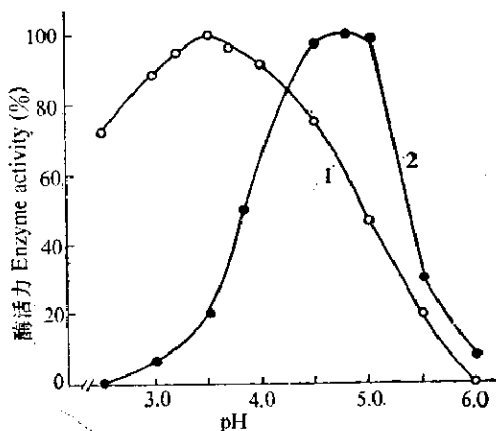


图1 pH 对酶活力的影响

Fig. 1 Effect of pH on enzyme activity

1. 果胶为底物 On pectin; 2. 多聚半乳糖醛酸为底物 On PG

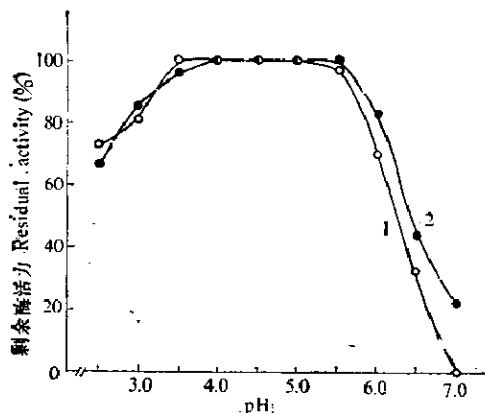


图3 酶的 pH 稳定性

Fig. 3 Stability of enzyme at different pH values

1. 果胶为底物 On pectin; 2. 多聚半乳糖醛酸为底物 On PG

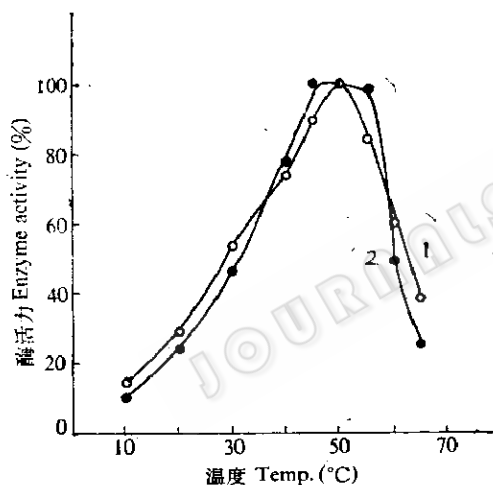


图2 温度对酶活力的影响

Fig. 2 Effect of temperature on enzyme activity

1. 果胶 On pectin; 2. 多聚半乳糖醛酸 On PG

物的酶均在 pH 3.5—5.5 之间比较稳定, 剩余酶活力均在 95% 以上。

4. 酶的热稳定性: 酶液用 pH 3.5 和 4.8 的上述缓冲液稀释 20 倍, 于不同温度水浴中保温 15 分钟后, pH 3.5 的酶液以果胶为底物, pH 4.8 的酶液以多聚半乳糖醛酸为底物, 测定酶活力。由图 4 看出, 酶的热稳定性较差, 60°C 保温 15 分钟后, 以果胶为底物者酶活力剩余 23%, 以多聚半

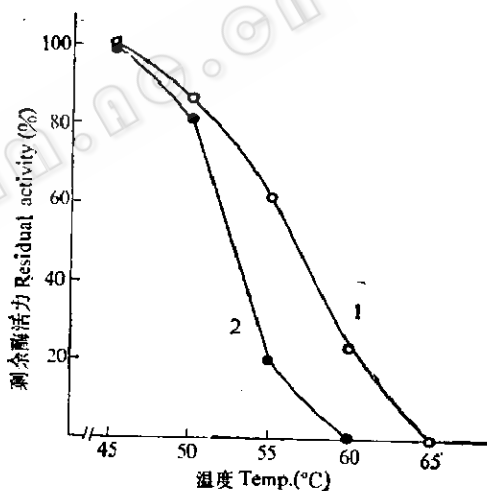


图4 酶的热稳定性

Fig. 4 Thermal stability of enzyme

1. 果胶为底物 On pectin; 2. 多聚半乳糖醛酸为底物 On PG

乳糖醛酸为底物者, 酶活力完全丧失。

讨 论

以亚硝基胍为诱变剂, 在 25—40°C 的温度范围内, 对黑曲霉 CP-831 进行诱变处理。在 40°C 处理, 获得一株高产果胶酶突变株 CP-85211。这表明, 提高诱变处理温度, 可以提高菌对诱变剂的敏感性, 获得

较满意的诱变效果。

我们在初筛中, 采用了 Mukherjee 和 Majumdar^[3] 修改的 Tuttobello 和 Mill 的透明带法。该方法仅通过试管培养, 便可以比较供试各菌对果胶的作用能力, 因此可以在短时间内测定大量的菌株。

据报道^[9], 果胶质(无论是果胶还是果胶酸)的彻底分解(糖苷键的破坏, 直至完全水解成半乳糖醛酸)必须有作用(水解和裂解)于果胶酸的果胶酶类(包括多聚半乳糖醛酸酶、寡聚半乳糖醛酸酶和果胶酸裂解酶)存在。此外, 果胶酶在它的主要应用(果汁和果酒澄清及某些果实皮层处理)中, 主要作用对象是果胶(起作用的酶包括果胶酯酶、果胶裂解酶、多聚半乳糖醛酸酶、寡聚半乳糖醛酸酶和果胶酸裂解酶)。基于这两种原因, 我们采用多聚半乳糖醛酸和果胶两种物质作为酶作用底物, 试验各种因素对果胶酶形成的影响和酶的性质。

研究结果表明, 各种因素对不同作用底物所反映的果胶酶复合物形成的影响没有差异, 只是作用底物种类不同, 果胶酶复合物的性质有所不同。当以果胶为底物时, 酶作用最适 pH 为 3.5, 热稳定性较强; 当以多聚半乳糖醛酸为底物时, 酶作用最适 pH 为 4.8, 热稳定性较差。

参 考 文 献

- [1] Zetelaki-Horváth, K. and I. Dobra-Seres: *Acta Alimentaria*, 1(1): 139, 1972.
- [2] 杨天波等: 微生物学通报, 12 (4): 162—165, 1985.
- [3] Mukherjee, S. K. and S. K. Majumdar: *Food Technol.*, 49(9): 759—770, 1971.
- [4] Somogyi, M.: *J. Biol. Chem.*, 195(1): 19—23, 1952.
- [5] Rombouts, F. M. and W. Pilnik: *Economic Microbiology, Microbial Enzyme and Bioconversions* (ed. Rose, A. H.), London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco 5: 228—272, 1980.

MUTATION AND SELECTION OF PECTINASE PRODUCTION STRAIN CP-85211 AND ITS LIQUID FERMENTATION CONDITIONS

Cui Fumian Liu Han Zhang Shuzheng

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

A mutant strain CP-85211 was obtained from *Aspergillus niger* CP-831 by treatment with 0.03% of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) at 40°C for 30 min. Enzyme activity of culture filtrate of the mutant strain was 308 u/ml on pectin and was 842 u/ml on polygalacturonic acid. Its enzyme activity was about 5 times of the parent strain. The optimal medium consisted of 8% wheat bran, 2% citrus peel powder and 2% ammonium sulfate. The optimal culture conditions are following: initial pH 3.5, temperature 30°C, and cultivation time 72 h.

The optimal pH and temperature for en-

zyme action on pectin and polygalacturonic acid were pH 3.5 and 50°C, pH 4.8 and 50°C, respectively. The enzyme was stable at pH 3.5—5.5, 30°C, for 12h. The enzyme complex has a weak thermal stability. After incubating the enzyme complex at 60°C for 15 min, 23% of enzyme activity remained on pectin and lost all enzyme activity on polygalacturonic acid.

Key words

Mutation; Pectinase; *Aspergillus niger*