

## 产果胶酶的菌种选育及发酵条件\*

刘海森 丁雨辰 周剑平 邵威平

(甘肃省科学院生物研究所, 兰州 730000)

炭黑曲霉 (*Aspergillus carbonarius*) AS 3.396 经亚硝基胍和  $\text{Co}^{60}\gamma$ - 射线诱变, 获得一株高产果胶酶突变株 G5512。该菌株的发酵滤液, 以高酯果胶为底物的酶活力为 860u/ml; 以低酯果胶为底物的酶活力为 1227u/ml。产酶活力水平约为原出发菌株的 2—6 倍。产酶最适培养条件为: 起始 pH4.0—4.5, 30 °C, 72—90 小时。

酶作用最适条件为: 高酯果胶为底物时, pH3.5, 50 °C; 低酯果胶为底物时, pH4.5, 50 °C。pH 稳定范围为 2.0—6.5(高酯果胶) 和 4.5—5.0(低酯果胶)。酶在 60 °C 保温 15 分钟, 高酯果胶为底物的酶剩余活力 71%, 低酯果胶为底物的酶活力仅剩余 1%。

**关键词** 诱变; 果胶酶; 炭黑曲霉

果胶酶主要用于食品工业的果汁加工和果汁果酒澄清及麻类的脱胶。为了促进果品资源和亚麻资源的开发利用, 我们进行了果胶酶制备和应用的研究工作。以炭黑曲霉 (*Aspergillus carbonarius*) AS 3.396 为出发菌株, 经用化学方法和物理方法诱变筛选, 获得了一株果胶酶高产的突变株 G5512。本文报道该菌株的选育和液体发酵条件的研究。

### 材 料 和 方 法

#### (一) 菌种

出发菌株: 炭黑曲霉 (*Aspergillus carbonarius*) AS 3.396, 中国科学院微生物研究所提供。

突变菌株: 炭黑曲霉 (*Aspergillus carbonarius*) G2306 和 G5512。

#### (二) 试剂

高酯果胶: Sigma 公司产品, 从柑桔中提取。甲氧基含量 9.3%, 半乳糖醛酸含量 84%。

低酯果胶: 临河果胶厂产, 葵花果胶, 食用级, 符合美国 FCC 标准<sup>[1]</sup>, 酯化度 27%, 半乳糖醛酸含量 90%。

N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍 (简称亚硝基胍或 MNNG), AR 级, Fluka 产品。

#### (三) 培养基

1. 试管斜面培养基: 查氏琼脂、马铃薯葡萄糖琼脂、麦芽汁琼脂。

2. 平板分离培养基: 查氏琼脂。

3. 液体种子培养基 (%): 蔗糖 5.0, 果胶 0.5,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.0,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0.1, KCl 0.05,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01。pH 4.0。

本文于 1991 年 7 月 22 日收到。

\* 甘肃省重大科技攻关项目中的一部分。

4. 发酵培养基 (%): 麦麸 5.0, 甜菜渣粉 5.0, 蔗糖 3.0,  $\text{NaNO}_3$  0.75,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0.1,  $\text{KCl}$  0.05,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01。pH 4.0。

#### (四) 诱变处理方法

1. MNNG 诱变: 参照崔福绵方法<sup>[2]</sup>。

2.  $\text{Co}^{60}\gamma$ -射线辐照处理: (1) 分生孢子悬液的制备: 取待处理菌斜面菌种一支, 加含 0.005% 吐温 80、pH6.0 的 0.05mol/L 磷酸氢二钠和 0.025mol/L 柠檬酸缓冲液 10ml, 刮下孢子, 倒入已灭菌的装有玻璃珠的小三角瓶中, 充分振荡, 制成  $3.6 \times 10^7$  个/ml 的孢子悬液。(2) 辐照处理: 照射剂量率 0.198kGy/h, 吸收剂量 0.5—15kGy, 辐照室温度 9℃。

#### (五) 突变株的分离筛选

1. 菌株分离: 将诱变处理的孢子悬液适当稀释, 取 0.1 ml 涂布于查氏琼脂平板上, 30℃ 培养 48 小时左右, 将各个孤立菌落转移到斜面培养基上, 置 30℃ 温箱, 培养 5—15 天。

2. 初筛: 将待测菌株的斜面培养物接种在装有发酵培养基的三角瓶中, 置 30℃ 摇床 (90r/min) 培养 72 小时, 过滤, 测定酶活力。

3. 复筛: 取待复筛菌斜面菌种一支, 刮下全部斜面培养物于研钵中研碎, 悬浮于 100ml 液体种子培养基中, 摇床振荡培养 24 小时, 按培养基量的 10% 接入装有 40ml 发酵培养基的 500ml 三角瓶中, 摇床发酵 (条件同初筛) 后测定酶活力。

#### (六) 果胶酶活力的测定

在 pH3.5 (高酯果胶) 或 pH4.5 (低酯果胶) 的 0.05mol/L 磷酸氢二钠和 0.025mol/L 柠檬酸缓冲液配制的 0.25% 的果胶溶液 0.5ml 中, 加入适当稀释的酶液 0.2ml, 50℃ 水浴保温 1 小时, 用 Somogyi 比色法<sup>[3]</sup> 测定水解产生的还原糖。1 小时产生 1mg 还原糖 (以半乳糖醛酸计) 的酶量为一个酶活力单位。

## 结 果

### (一) 菌种选育

1. 在 0.1% 亚硝基胍、40℃、40 分钟条件下, 获得了突变株 G2306。该菌株最初在查氏琼脂和马铃薯葡萄糖琼脂上不生长分生孢子, 后经复壮培养, 逐渐恢复产孢能力。该菌株液体发酵产酶能力较出发菌株 AS 3.396 略有提高 (表 1)。

表 1 G5512 菌株与 G2306 和 AS3.396 产果胶酶能力的比较

Table 1 A comparison of pectinase activities between G5512, G2306 and AS 3.396.

菌株 Strain	酶活力 Enzyme activity (u/ml)	
	高酯果胶为底物 For high-ester pectin	低酯果胶为底物 For low-ester pectin
AS 3.396 (野生株) Wild type	415	181
G 2306 (AS3.396 的突变株) Mutant of AS 3.396	468	211
G 5512 (G 2306 的突变株) Mutant of G2306	860	1227

2. G2306 菌株用  $\text{Co}^{60}\gamma$ -射线以不同吸收剂量进行诱变处理, 在吸收剂量 0.5kGy 条件下, 致死率 99.45%, 获得一株果胶酶高产的突变株 G5512。该菌株以甜菜渣粉和麦麸为主要基质的发酵滤液, 以高酯果胶为底物时, 酶活力为 860u/ml, 以低酯果胶为底物时酶活力为 1227u/ml, 产酶能力水平分别约为原出发菌株的 2—6 倍 (表 1)。

## (二) 突变株 G5512 产酶条件

1. 碳源: 果胶酶系诱导酶<sup>[4]</sup>。用含果胶较多的桔皮粉、甜菜渣粉<sup>[5]</sup>与麦麸以不同配比组成的培养基进行产酶试验 (表 2), 以麦麸和甜菜渣粉各含 5% 的发酵培养基培养, 果胶酶活力最高。加入 3% 的蔗糖对菌体生长和产酶均有促进作用。

表 2 麦麸与甜菜渣粉和桔皮粉的配比对产酶的影响

Table 2 Effect of different combination of wheat bran, beet residue powder and tangerine skin powder on pectinase production

麦 麸 Wheat bran (%)		2	3	4	5	6	7	8	5	6	7	8	9	10
甜菜渣粉 Beet residue powder (%)		8	7	6	5	4	3	2						
桔皮粉 Tangerine skin powder (%)									5	4	3	2	1	
酶活力 Enzyme activity (u/ml)	高酯果胶为底物 For high-ester pectin	664	822	843	878	865	804	724	735	780	793	802	767	702
	低酯果胶为底物 For low-ester pectin	472	822	1144	1139	1046	905	837	751	682	684	961	924	875

2. 氮源: 在麦麸和甜菜渣粉各为 5% 的发酵培养基中, 分别添加不同附加氮源进行产酶试验 (表 3), 以硝酸钠 0.75% 或豆饼水解液 15% 作为附加氮源, 酶活力稍高。

表 3 氮源对产酶的影响

Table 3 Effect of various nitrogen compounds on pectinase production

附加氮源 Nitrogen source	酶活力 Enzyme activity (u/ml)	
	高酯果胶为底物 For high-ester pectin	低酯果胶为底物 For low-ester pectin
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.5%	800	879
$\text{NH}_4\text{NO}_3$ 1.0%	871	1035
$\text{NaNO}_3$ 0.75%	939	1252
$\text{NH}_4\text{Cl}$ 1.5%	836	1092
$\text{NH}_4\text{CO}_3$ 1.5%	882	892
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1.25 %	838	941
尿素 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 1.0%	746	542
豆饼水解液 Bean cake hydrolyzate 15%	883	1215
对照 Control	763	791

3. 培养基起始 pH 对产酶的影响: 将培养基用硫酸和氢氧化钾调成不同 pH (灭菌前) 进行产酶试验, 该菌株产酶适宜 pH 为 3.5—4.5, 最适 pH 为 4.0。

4. 培养温度对产酶的影响: 在不同温度下培养后补加培养过程中失去的水量, 测定酶活力, 产酶适宜温度范围为 30—32 °C, 以 30 °C 为最佳。

5. 通气量对产酶的影响：500ml 三角瓶中装不同体积的培养基。发酵后补加培养过程中失去的水量，测定酶活力。结果表明，加大通气量有利于产酶。500ml 三角瓶中装入培养基量不大于 40ml 酶活力均较高，以 20ml 为最高。

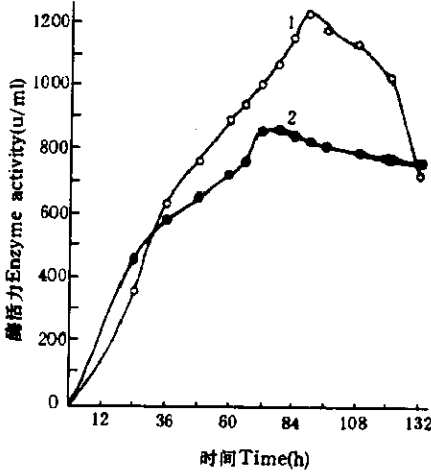


图 1 G5512 菌株产酶时间过程

Fig. 1 The time course of pectinase production

- 1. 高酯果胶为底物 High-ester pectin as substrate;
- 2. 低酯果胶为底物 Low-ester pectin as substrate

6. 接种量对产酶的影响：于 40ml 发酵培养基中以不同量 G5512 菌悬液接种，试验产酶效果。以高酯果胶为底物的酶活力以接种 10% 为最高；以低酯果胶为底物的酶活力以接种 5% 为最高。

7. 种龄对产酶的影响：菌悬液在摇床振荡培养，分别于不同时间接种入发酵培养基，发酵后测定酶活力。以培养 24 小时的菌悬液接种发酵酶活力最高。

8. G5512 菌株产酶时间过程：用 24 小时种龄的菌悬液接种进行发酵培养。于不同时间取样并补加培养中失去的水量后，测定酶活力 (图 1)。高酯果胶为底物的酶活力在 72 小时最高；低酯果胶为底物的酶活力在 90 小时最高。

(三) 突变株 G5512 果胶酶的性质

1. 酶活力与 pH 的关系：结果 (图 2) 表明，以高酯果胶为底物酶最适 pH 为 3.5；低酯果胶为底物酶最适 pH 为 4.5。

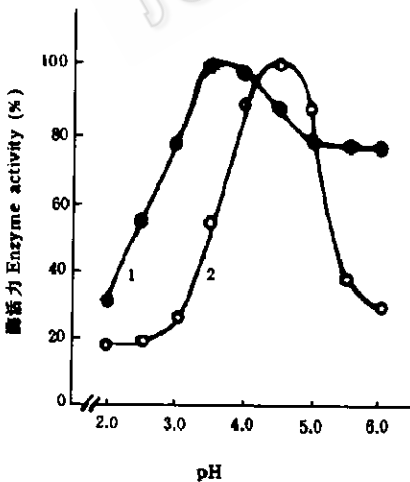


图 2 pH 对酶活力的影响

Fig. 2 Effect of pH on enzyme activity

- 1. 高酯果胶为底物 High-ester pectin as substrate;
- 2. 低酯果胶为底物 Low-ester pectin as substrate

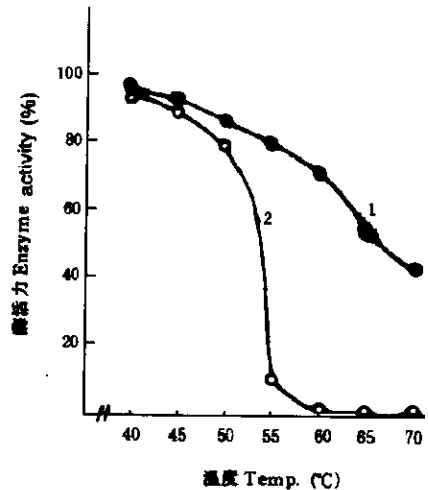


图 3 酶的热稳定性

Fig. 3 Thermal stability of enzyme

- 1. 高酯果胶为底物 High-ester pectin as substrate
- 2. 低酯果胶为底物 Low-ester pectin as substrate

2. 酶活力与温度的关系: 试验结果, 酶反应的最适温度为 50 °C。

3. 酶的 pH 稳定性: 酶液用不同 pH 缓冲液稀释 20 倍, 30 °C 保温 12 小时后测定酶活力。结果, 高酯果胶为底物酶活力在 pH2.0—6.5 范围内稳定。而低酯果胶为底物的酶活力则在 pH4.5—5.0 范围内较稳定。

4. 酶的热稳定性: 酶液用 pH3.5 和 4.5 的缓冲液稀释 20 倍, 不同温度保温 15 分钟后, 此两组酶液分别以高酯果胶和低酯果胶为底物测定酶活力。结果 (图 3) 表明, 以高酯果胶为底物的酶活力比低酯果胶为底物的酶活力稳定。

### 参 考 文 献

- [1] Committee on Codex Specification Food and Nutrition Board Division of Biological Sciences Assembly of Life Sciences Nation Research Council: Food Chemicals Codex, 3rd ed. p. 215—217. National Academy Press, 1981.
- [2] 崔福绵等, 微生物学报, 27(1):37—44, 1987。
- [3] 北京大学生物系生物化学教研室: 生物化学实验指导, 第 36—39 页, 人民教育出版社, 北京, 1983 年。
- [4] 朱庆裴, 酶制剂工业 (张树政主编), 第 625—654 页, 科学出版社, 北京, 1984 年。
- [5] Deman, J. M.: Principles of Food Chemistry, p. 162—163, The AVI Pup. CO. Inc., 1976.

## STUDIES ON SCREENING OF PECTINASE-PRODUCING STRAIN AND FERMENTATION CONDITIONS

Liu Haisen Ding Yuchen Zhou Jianping Shao Weiping  
(Institute of Biology, Gansu Academy of Sciences, Lanzhou 730000)

A mutant strain G5512 with high yield of pectinase was obtained from *Aspergillus carbonarius* AS 3.396 by chemical mutation using N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) and treatment with Co<sup>60</sup> radiation. The enzyme activities of fermentation broth were 860u/ml for high-ester pectin and 1227u/ml for low-ester pectin. The activities were about 2—6 times of the original strain's. The optimal culture conditions were found: initial pH 4.0—4.5 at 30 °C for 72—90h.

The optimal conditions for enzyme catalysis were pH 3.5 at 50 °C for high-ester pectin and pH 4.5 at 50 °C for low-ester pectin respectively. The enzyme showed a wide stability between pH 2.0 and 6.5 at 30 °C for 12h. (high-ester pectin) and a narrow pH stability between 4.5 and 5.0 at 30 °C for 12h (low-ester pectin). After incubation at 60 °C for 15 min, enzyme kept 71% activity for high-ester pectin, and only 1% activity for low-ester pectin.

**Key words** Mutation; Pectinase; *Aspergillus carbonarius*