

高大毛霉制取果胶酶发酵条件实验

顾红燕, 齐鸿雁, 张洪勋

(中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085)

摘要:对高大毛霉(*Mucor mucedo*)制取果胶酶的发酵条件和酶的基本性质进行了研究. 发酵培养基组成为(g/L):小麦麸皮 50, 葵盘粉 30, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 30, KH_2PO_4 2.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, NaNO_3 0.2, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01. 在培养温度 30°C、初始 pH 5.7、转速 240 r/min 条件下摇瓶培养 3 d, 酶活力达到 275 U/ml. 该酶最适 pH 为 5.0, 最适作用温度为 40°C, 在 pH 为 3.0~7.0 范围内稳定.

关键词:高大毛霉; 果胶酶; 发酵条件

中图分类号: TQ925⁺3

文献标识码: A

文章编号: 1009-606X(2002)03-0252-05

1 前言

果胶酶是降解果胶物质酶的总称, 具有很多用途. 在果汁制造、果酒酿造中, 使用果胶酶有助于提高生产效率和产品质量; 在桔子罐头制造中, 果胶酶可用于桔子脱囊衣. 此外, 果胶酶在木材防腐和麻类脱胶方面也有应用^[1]. 近年来, 随着植物病理学研究的深入, 果胶酶及其水解物应用于植物诱导抗病的研究报道日渐增多^[2, 3], 显示了诱人的应用前景. 因此, 寻找新特性、高活力的产果胶酶菌种具有重要的经济和环境价值.

自然界产果胶酶的菌种很多, 主要有曲霉属、青霉属、镰孢属及克鲁维氏酵母等. 目前国外仍多以黑曲霉、根霉和盾壳霉发酵法制取果胶酶^[4-7], 国内也以黑曲霉的报道为多^[8]. 然而, 迄今为止尚未见关于高大毛霉产果胶酶的报道. 为开发微生物新资源, 比较不同菌种果胶酶特性, 本文采用液态发酵法实验了高大毛霉合成果胶酶的条件, 并对该酶的基本性质进行了研究.

2 材料和方法

菌种:高大毛霉(*Mucor mucedo* No.3.15), 由中国科学院微生物研究所提供.

活化斜面:PDA 培养基加 5 g/L 葵盘粉, 115°C 灭菌, 转接原种后 30°C 恒温培养 5 d, 于 4°C 冰箱保存备用.

液体发酵培养基(g/L):小麦麸皮 50(过 10 目筛) 葵盘粉 30(过 40 目筛) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 30, KH_2PO_4 2.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, NaNO_3 0.2, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, 121°C 灭菌. **液体培养:**将活化好的斜面菌种接种于液体发酵培养基, 每个 500 ml 三角瓶分装 50 ml, 于 30°C 下 240 r/min 摇床培养 3 d.

发酵原料处理:甜菜渣、葵花盘、香蕉皮、苹果皮和橘皮等含果胶的废渣烘干后粉碎过 40 目筛备用, 小麦麸皮过 10 目筛备用.

果胶酶活力测定:采用改进的苹果果胶脱胶法(AJDA)^[4], 操作步骤如下:取 3 ml 新配制的 1%果胶(Sigma 公司产品)溶液并移入大试管中, 加入 pH=5 的柠檬酸/柠檬酸钠缓冲溶液 6 ml, 置于 40°C 恒温水浴中平衡 5 min; 然后加入 3 ml 稀释到一定浓度的酶液, 立即开始计时; 间隔 2 min

收稿日期: 2001-12-03, 修回日期: 2002-01-30

基金项目: 中国科学院生态环境研究中心知识创新课题资助项目(编号: RCEES-9904)

作者简介: 顾红燕(1969-), 女, 北京市人, 硕士研究生, 生物化工专业.

左右取样 1 ml 放入备用试管,立即加入 2 滴 1% 的 I_2/KI 溶液,摇匀,再加入 2 ml 异丙醇,转动试管,观察沉淀是否消失,准确记录脱胶时间.酶活力测定控制在 15 min 内完成.

酶活力单位:在上述操作条件下,30 min 使 1 mg 果胶脱胶所需的酶量定义为 1 个活力单位(U).

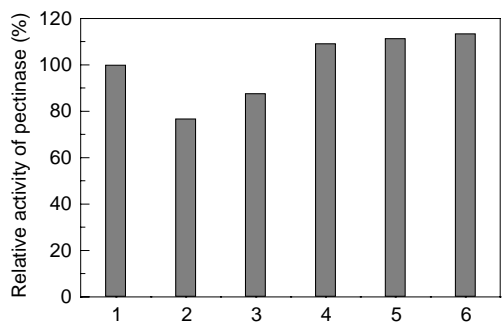
3 结果与讨论

3.1 高大毛霉的产酶条件

实验验证^[9]高大毛霉制取果胶酶的较佳发酵温度范围和初始培养基 pH 与溜曲霉相似,即温度 30℃,初始培养基 pH 为 5.7.此外,作为培养基主要成份之一的小麦麸皮对发酵产酶是必要的,小麦麸皮既可以作为碳源也可以作为氮源,还可以对菌丝的统一分散起到良好的作用.

3.1.1 不同果胶碳源对产酶的影响

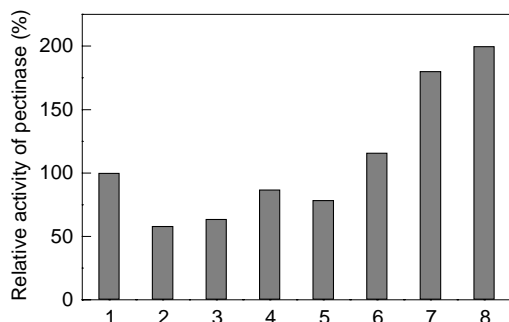
一般说来,微生物产果胶酶是在底物诱导下产生的,在缺乏其它碳源的情况下,为了维持生存,微生物只有通过自身的调控分泌所需的酶,进而降解底物获取生存营养和能源.因此,果胶是产果胶酶的诱导碳源.考虑到纯果胶价格昂贵,实验以含果胶的植物残渣—甜菜渣、葵花盘、橘皮、苹果皮和香蕉皮替代纯果胶.培养基中加入的残渣量依残渣中果胶含量而定,但以果胶量计算则相同,都是 9 g/L.图 1 结果表明,甜菜渣、葵花盘、橘皮等作为碳源产酶较高,超过了纯果胶,以葵花盘为原料时果胶酶的产率最高.



1. Purified pectin 2. Apple peel 3. Banana peel 4. Orange peel
5. Sugar beet pulp 6. Sunflower calathide powder

图 1 不同果胶对产果胶酶的影响

Fig.1 Effect of different pectic substances on the production of pectinase



1. Wheat bran 2. Beef peptone 3. Yeast extract powder 4. Soya peptone
5. $(NH_4)_2HPO_4$ 6. NH_4NO_3 7. NH_4Cl 8. $(NH_4)_2SO_4$

图 2 补充不同氮源对产果胶酶的影响

Fig.2 Effect of different additional nitrogen sources on production of pectinase

3.1.2 不同氮源对产酶的影响

实验中发现,在培养基中添加小麦麸皮作为唯一氮源,菌体生长缓慢,产酶也少.为了增加产酶率,分别补充有机氮源牛肉蛋白胨、酵母浸粉、大豆蛋白胨和无机氮源 $(NH_4)_2HPO_4$ 、 NH_4NO_3 、 NH_4Cl 、 $(NH_4)_2SO_4$ 到培养基中,补充的氮源以氮含量计算相同,为 6.36 g/L.结果表明(图 2),补充有机氮源对产酶明显不利,而无机氮源产酶效果较好,其中又以 $(NH_4)_2SO_4$ 产酶最高.

3.1.3 产酶培养基的正交实验

在无机盐溶液组成为(g/L) KH_2PO_4 2.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5, $NaNO_3$ 0.2, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 的条件下,对培养液中的另外 3 种主要成份小麦麸皮(A)、 $(NH_4)_2SO_4$ (B)和葵花盘(C)采用四因素三水平 [$L_9(3^4)$]正交设计进行实验,结果见表 1.结果表明,各因素对产酶的影响次序为 $B > A > C$, $A_2B_2C_3$

最好, 即小麦麸皮 50 g/L、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 30 g/L、葵盘粉 30 g/L 时, 酶活力最高, 可达 275 U/ml.

表 1 正交实验设计和结果 [$L_9(3^4)$]

Table 1 Orthogonal design of experiment and results [$L_9(3^4)$]

No.	Orthogonal test			Pectinase activity (U/ml)
	Wheat bran, A (g/L)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, B (g/L)	Sunflower calathide powder, C (g/L)	
1	1 (40)	1 (20)	1 (10)	255.04
2	1 (40)	2 (30)	2 (20)	245.86
3	1 (40)	3 (40)	3 (30)	241.31
4	2 (50)	1 (20)	2 (20)	247.85
5	2 (50)	2 (30)	3 (30)	274.66
6	2 (50)	3 (40)	1 (10)	246.54
7	3 (60)	1 (20)	3 (30)	251.12
8	3 (60)	2 (30)	1 (10)	251.77
9	3 (60)	3 (40)	2 (20)	248.50
X_1	247.40	251.34	251.12	
X_2	256.35	257.43	247.40	
X_3	250.46	245.45	255.70	
Range	8.95	11.98	8.30	

3.1.4 产酶曲线和生长曲线

在 500 ml 三角瓶装入 50 ml 产果胶酶较佳发酵培养基, 在 30°C 及转速为 240 r/min 条件下振荡培养, 分别在不同时间取样, 样品以 4000 r/min 离心 30 min, 取上清液测定酶活力, 该菌株的产酶曲线见图 3. 同产酶培养相平行的样品分别在不同时间取样, 抽滤收集菌体, 蒸馏水洗涤 3 次, 于 75°C 温度下烘干 15 h, 称生物量干重, 该菌株的生长曲线也示于图 3. 结果表明, 产酶与菌丝的生长不完全同步, 高大毛霉生长到第 4 d 生物量达到峰值, 而酶活力在第 3 d 达到峰值, 之后开始下降, 因此发酵产酶周期选择为 3 d.

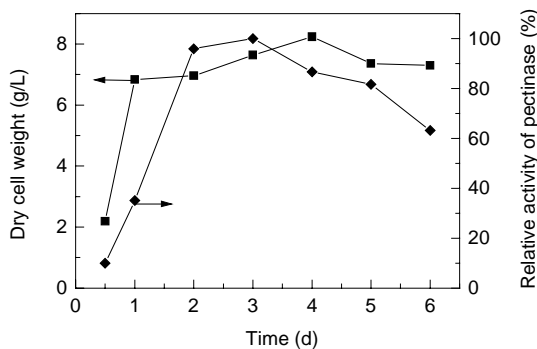


图 3 菌株的生长曲线和产酶曲线

Fig.3 Biomass growth and pectinase production

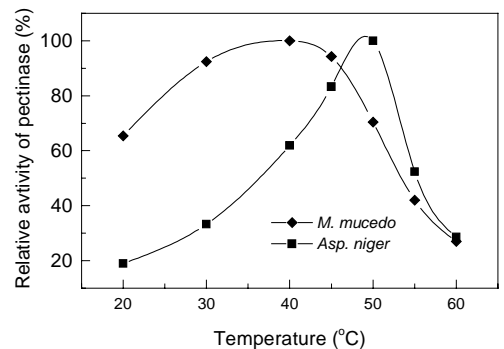


图 4 高大毛霉和黑曲霉果胶酶最适温度曲线

Fig.4 The optimal temperature of pectinase from *M. mucedo* and *Asp. niger*

3.2 高大毛霉果胶酶的性质

3.2.1 温度效应

取高大毛霉果胶酶液在不同温度下直接测酶活力, 温度效应曲线见图 4. 同时给出了另一条自制的黑曲霉果胶酶温度效应曲线^[9], 以比较温度对高大毛霉果胶酶的效应特点. 比较图中 2 条曲线

可以看出,高大毛霉果胶酶的最适温度为 40℃,其温度效应“钟型”曲线发展比较平稳,特别是在 20~40℃ 区间;而黑曲霉果胶酶的最适温度为 50℃,其温度效应“钟型”曲线变化幅度较大。高大毛霉果胶酶在近室温条件下(20~40℃)活力表现强于黑曲霉果胶酶。

3.2.2 热稳定性

为比较高大毛霉果胶酶和黑曲霉果胶酶的热稳定性,取在 40℃ 具有相等活力的两种酶液分别置于 40℃ 以上不同温度的恒温水浴中处理 20 min,取出后立即放入冰浴中备用,再于 40℃ 下测定残留酶活力,结果(图 5)表明,在上述实验条件下,高大毛霉果胶酶热稳定性比黑曲霉果胶酶差。

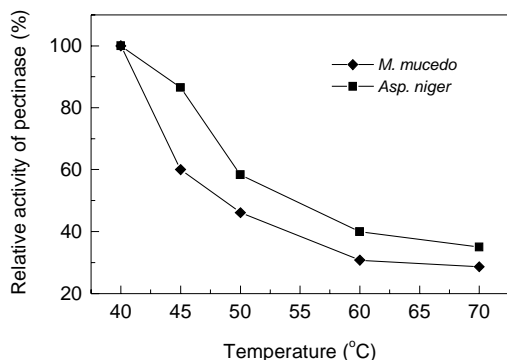


图 5 高大毛霉和黑曲霉果胶酶最适温度曲线
Fig.5 The thermal stability of pectinase from *M. mucedo* and *Asp. niger*

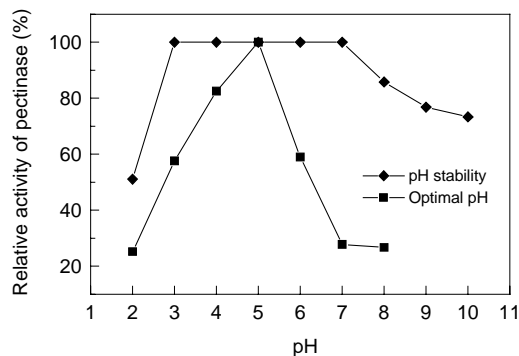


图 6 高大毛霉果胶酶最适 pH 和 pH 稳定性曲线
Fig.6 The pH stability and optimal pH of pectinase from *M. mucedo*

3.2.3 酶作用的最适 pH 和在不同 pH 下的稳定性

在 40℃ 条件下测定高大毛霉果胶酶在不同 pH 值的缓冲体系中的活性,结果见图 6,表明该酶的最适作用 pH 值为 5.0。酶液在 pH 为 2.0~10.0 的各种缓冲溶液中于 4℃ 保温 24 h,然后调节 pH 至 5.0,测定残留酶活力(图 6),结果表明,该酶在 pH 值为 3.0~7.0 范围内较稳定,说明此酶具有一定耐酸性。

4 结论

(1) 高大毛霉制取果胶酶的培养基较佳配方为(g/L):小麦麸皮 50, 葵盘粉 30, (NH₄)₂SO₄ 30, KH₂PO₄ 2.5, MgSO₄·7H₂O 0.5, NaNO₃ 0.2, FeSO₄·7H₂O 0.01。

(2) 较佳发酵条件为:培养基初始 pH=5.7, 发酵温度 30℃, 240 r/min 转速下摇瓶培养 3 d。

(3) 高大毛霉果胶酶的最适反应温度为 40℃, 最适 pH 为 5.0, 在 pH=3.0~7.0 范围内较稳定, 热稳定性差, 但在近于常温(20~30℃)下高大毛霉果胶酶的活力强于黑曲霉果胶酶。

参考文献:

- [1] Kashyap D R, Vohra P K, Chopra S, et al. Applications of Pectinases in the Commercial Sector: A Review [J]. *Bioresource Technology*, 2001, 77: 215-227.
- [2] Roco A, Castaneda P, Perez L M. Oligosaccharides Released by Pectinase Treatment of Citrus Limon Seedlings are Elicitors of the Plant Response [J]. *Phytochemistry*, 1993, (6): 1301-1306.
- [3] Moerschbacher B M, Mierau M, Graebner B, et al. Small Oligomers of Galacturonic Acid are Endogenous Suppressors of Disease Resistance Reactions in Wheat Leaves [J]. *Journal of Experimental Botany*, 1999, 50(334): 605-612.
- [4] Friedrich J, Cimerman A, Steiner W. Submerged Production of Pectolytic Enzymes by *Aspergillus niger*: Effect of Different

- Aeration/Agitation Regimes [J]. Applied Microbiology Biotechnology, 1989, 31: 490–494.
- [5] Huerta S, Favela E, Fonseca A, et al. Absorbed Substrate Fermentation for Pectinase Production with *Aspergillus niger* [J]. Biotechnology Techniques, 1994, 8(11): 837–842.
- [6] Fonseca M J V, Said S. The Pectinase Produced by *Tubercularia vulgaris* in Submerged Culture Using Pectin or Orange Pulp Pellets as Inducer [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1994, 42(1): 32–35.
- [7] Maldonado M C, Strasser De Saad A M. Production of Pectinesterase and Polygalacturonase by *Aspergillus niger* in Submerged and Solid State Systems [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 1998, 20(1): 34–38.
- [8] 崔福绵, 刘茵, 张树政. 果胶酶 CP-85211 菌株的选育及其液体发酵条件的研究 [J]. 微生物学报, 1987, 27(1): 37–44.
- [9] ZHANG H X, LIU D M, QI H Y, et al. Solid State Fermentation of Sugar Beet Pulp with *Asperillus tanarii* 827 for Pectinase Production [A]. XIE Y S, MAO M H, XIA G. Selected Papers of EC&M'99 [C]. Beijing & New York: Science Press, 2000. 21–26.

Fermentation Conditions of Pectinase by *Mucor mucedo*

GU Hong-yan, QI Hong-yan, ZHANG Hong-xun

(Research Center for Eco-environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

Abstract: The fermentation conditions of pectinase by *Mucor mucedo* and its enzymic properties were studied. The composition of fermentation medium was (g/L): wheat bran 50, sunflower calathide powders 30, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 30, KH_2PO_4 2.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, NaNO_3 0.2, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01. The pectinase activity can reach 275 U/ml after 3 d shaker culture under the conditions of 240 r/min, 30°C and initial pH 5.7. The optimum temperature and pH for the pectinase activity were 40°C and 5.0 respectively. The pectinase was stable in the pH range from 3.0 to 7.0.

Key words: *Mucor mucedo*; pectinase; fermentation conditions