

⑬ 53-56

产果胶酶芽孢杆菌 x_g-01 的分离、筛选
及发酵条件的研究郭爱莲 王少辉[✓] 刘忠

(西北大学生物学系, 710069, 西安; 第一作者 50 岁, 女, 副教授)

TQ925.3

摘要 从污物中分离出一株产果胶酶的兼性厌氧芽孢杆菌 x_g-01 , 该菌株的 pH 适应范围广, 最适 pH 值为中性, 最适生长温度为 37°C, 生活力强, 生长快。在以桔皮粉、硫酸铵为碳、氮源添加无机盐的发酵培养基中, 果胶酶活力达 9.48 U/mL。

关键词 果胶酶; 芽孢杆菌; 兼性厌氧

分类号 Q939.9

分离, 筛选, 发酵

果胶酶是一种分解果胶物质的酶系总称^[1], 果胶是植物细胞壁的组成成分, 填充在植物的细胞壁之间, 具有使细胞粘合在一起的作用^[2], 胞间层中的果胶质一经分解, 细胞便分离, 随之组织解体。自然界的植物纤维中, 总是伴生着大量的果胶物质。近几年来, 纤维素伴生物果胶质的生物降解日益引起学者们的重视。果胶酶除在食品工业上有许多用途外, 在环境保护、污物软化处理中也起着重要作用。过去在果胶酶的研究中, 对酶活性较高的霉菌研究较多^[3], 细菌研究得很少, 因霉菌是好气性微生物, 在氧气少时生长受到影响。在污物软化、饲料发酵上的应用应转向一些需氧量少、兼性厌氧、厌氧的细菌。本文研究了产果胶酶的兼性厌氧菌 x_g-01 , 并对它的特性及发酵条件进行了初步探讨。

1 材料和方法

1.1 材料

果胶粉(进口分装), 桔皮粉, 纤维素粉, 豆饼粉等。

1.2 菌种

由腐烂水果、腐烂蔬菜、污泥、污水等 30 多个样品分离所得。

1.3 所用主要培养基

1.3.1 K. R. Sreekee Kantiah 培养基^[4](%) (用于分离菌种) 蔗糖 2 g, KH_2PO_4 0.1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.002 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.001 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.002 g, 酵母膏 0.01 g, NH_4NO_3 0.2 g, 琼脂 2 g, 1 g 桔皮粉, 自来水 100 mL, pH7。

1.3.2 牛肉膏桔皮粉平板培养基(%) 牛肉膏 0.3 g, 蛋白胨 1 g, NaCl 0.5 g, K_2HPO_4 0.1 g, KH_2PO_4 0.03 g, 桔皮粉 0.6 g, 琼脂 2 g, pH7, 蒸馏水 100 mL。

1.3.3 菌种保藏培养基(%) 牛肉膏 0.3 g, 蛋白胨 1 g, NaCl 0.5 g, 琼脂 2 g, pH7, 水 100 mL。

1.3.4 测定培养基(%) 以无机盐溶液为其基础配方。 K_2HPO_4 0.2 g, MgSO_4 0.2 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.25 mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.75 mg, NaCl 0.03 g, 琼脂 2~2.5 g, 自来水 100 mL。

1.3.5 发酵培养基(%) 桔皮粉 1 g, NH_4SO_4 0.2 g, 酵母膏 0.5 g, K_2HPO_4 0.2 g, MgSO_4 0.2 g,

MnSO₄ · H₂O 0.25 mg, FeSO₄ · 7H₂O 0.75 mg, NaCl 0.03 g, pH7 以上培养基均按常规灭菌。

1.4 摇瓶产酶发酵

将斜面菌种刮到 10 mL 的无菌生理盐水中,(里面装有 5~6 粒玻璃珠),振荡 20 min,使菌体充分摇匀,用血球计数板计数,每 mL 含菌约(2.5~2.6)×10⁷ 个,共计数 3 次。把上述菌液分别吸取 2 mL 接入到装有液体发酵培养的三角瓶中,300 mL 三角瓶装 50 mL 培养液,150 r/min。

1.5 果胶酶活力的测定^[9]

果胶酶水解果胶,生成半乳糖醛酸,它具有还原性醛基,可用次亚碘酸法进行定量测定,所生成半乳糖醛酸的量可以表示果胶酶的活力。

发酵液经 10⁴r/min 离心 5 min,收集上清液,即为测定酶液。测定酶活分为静置和摇瓶两种。按照规定的时间进行酶活测定。

取 1%果胶溶液 10 mL,加入 5 mL 酶液和 5 mL 水,调 pH 至 3.5,在 50℃水浴中保温 2 h,取出加热煮沸。冷却后,取 5 mL 反应液移入碘量瓶中,加 1 mol/L 碳酸钠溶液 1 mL,0.05 mol/L 碘液 5 mL,摇匀,加塞,于室温下放置 20 min,加 1 mol/L 硫酸 2 mL,用 0.05 mol/L 硫代硫酸钠滴定至淡黄色,加 0.5%淀粉指示剂 1 mL,继续滴定至蓝色消失为止。记录所消耗的硫代硫酸钠 mL 数(A),空白试验用 10 mL 果胶溶液,10 mL 水,不加酶液,取直接混合液 5 mL 滴定,记录所消耗的硫代硫酸钠的 mL 数(B)。根据公式计算出酶活。

果胶酶活力单位 = $\frac{(B-A)C \times 0.51 \times 20}{5 \times 2 \times 5}$ 其中 C 为硫代硫酸钠的摩尔浓度。

1.6 菌种的分离

将采集来的污物,如腐烂水果、蔬菜、污泥、污水等 30 多个样品经加富培养(在 25℃恒温箱里培养 10 d),将培养过的样品用接种针挑取少许,在 K. R. Sreekee Kantiah 培养基平板上划线分离,30℃培养 24~48 h,观察生长情况,将长出的单菌落斜面保存、备用(划线分离经反复多次)。

1.7 菌种的筛选

将分离出的单菌落在牛肉膏桔皮粉培养基上进行 3 点种植,30℃ 24 h 培养,观察透明圈生成情况,试验重复 3 次,选出透明圈较大的菌株 2 个,再 30℃摇瓶发酵(150 r/min)。

1.8 需氧试验

采用黄磷燃烧法^[6],把接种的斜面和点种的培养基平板放入厚壁玻璃缸或干燥器内,用点燃的酒精棉球或美兰指示剂作测定,示氧气存在的情况,用凡士林将盖密封。

2 结果和讨论

2.1 菌种的分离

从所采 30 多个腐烂果、蔬、污物样品中经反复划线分离纯化,分出 13 株细菌单菌落,接入斜面。

2.2 菌种的筛选

将分离出的菌株经过 3 点种植,30℃ 24 h 培养,它们能在平板上产生不同大小的透明圈,每个菌株均经过 3 次重复试验,通过对比,选出 H/C 比值较大的菌株(H/C 为透明圈直径 H 和菌落直径 C 之比)两个,接种到摇瓶,30℃,150 r/min,选出酶活最高的菌株(4.79 U/mL),定名为 x₁-01。

2.3 x₁-01 菌株特性

G⁺、杆菌,0.7~0.8×2.9~3.2 μm,芽孢 0.6~0.8×2 μm,中生或次端生,芽孢椭圆,芽孢囊不膨大,单个。菌落白色、干皱,培养 12 h 原生质均匀,未产生芽孢。培养近 30 h,已产生芽孢,培养 43 h,芽孢已大部分脱落。培养 52 h 以上芽孢已全部脱落。

2.4 生长条件的选择

利用透明圈法,测定不同条件对产酶活力的影响。

2.4.1 最佳 C·N 源的选择 以测定培养基为基础,碳源选择葡萄糖、鼠李糖、蔗糖、纤维素粉、桔皮

粉、果胶粉,用量为 1%。氮源选择尿素、蛋白胨、酵母膏、酒石酸铵、豆饼粉、硫酸铵、硝酸铵。将 x_2-01 在平板上点植,30℃培养 48 h,测量透明圈与菌落大小,每种 C·N 源 3 个重复,求出平均值。

表 1 不同 C 源对透明圈及菌落大小的影响(N 源用 0.5% 的酵母膏)

Tab. 1 Effect of the Differ Carbon Source on the Clear Zones and Colonial Growth (the Nitrogen Source with 0.5% Yeast Eztract)

碳 源	透明圈直径 (cm)	菌落直径 (cm)	H/C 比值
果胶粉	2.05	0.60	3.42
桔皮粉	2.10	0.65	3.23
纤维素粉	1.90	0.75	2.53
蔗 糖	1.95	1.40	1.39
鼠李糖	2.05	1.55	1.32
葡萄糖	1.95	0.70	2.79

表 2 N 源对透明圈和菌落大小的影响

Tab. 2 Effect of the Nitrogen Source on the Clear Zones and Colonial Growth

氮 源	透明圈直径 (cm)	菌落直径 (cm)	H/C 比值
尿 素	1.50	0.60	2.50
蛋白胨	1.60	0.55	2.91
酵母膏	1.83	0.57	3.21
酒石酸铵	1.55	0.60	2.58
豆饼粉	1.30	0.70	1.86
硫酸铵	1.85	0.55	3.36
硝酸铵	1.90	0.60	3.17

注: C 源用 1% 桔皮粉,氮源用量为 0.2%

从表 1 看出,果胶粉和桔皮粉作碳源为好,它们一方面可作诱导剂,一方面可作碳源,但果胶粉价格过高,因此选用桔皮粉比较合适。从表 2 可以看出,硫酸铵、酵母膏、硝酸铵作 N 源较合适。

2.4.2 最适生长温度的选择 将上表中选择出的合适碳源、氮源加入到测定培养基中制成平板,将点接后的平板放入不同温度的恒温培养箱中,培养 24 h,观察菌落与透明圈生长情况,选出最适生长温度。

表 3 培养温度对透明圈和菌落大小的影响

Tab. 3 Effect of the Cultural Temperature on Clear Zones and Colonial Growth

培养温度	透明圈直径 (cm)	菌落直径 (cm)	H/C 比值
30℃	1.10	0.40	2.75
37℃	1.60	0.50	3.20
44℃	1.40	0.45	3.11
50℃	1.25	0.40	3.13
55℃	不生长		

表 4 pH 对透明圈和菌落大小的影响

Tab. 4 Effect of pH Values on Clear Zones and Colonial Growth

培养基 pH	透明圈直径 (cm)	菌落直径 (cm)	H/C 比值
4.6	0.95	0.35	2.71
5.5	1.10	0.40	2.75
6.0	1.25	0.45	2.77
6.5	1.80	0.65	2.77
7.0	1.95	0.65	3.00
7.5	1.90	0.67	2.85
8.0	1.85	0.65	2.85
9.0	1.70	0.63	2.70
10.0	1.30	0.55	2.36

通过表 3 得出 x_2-01 的最适生长温度为 37℃,在 44℃ 和 50℃ 生长较好,55℃ 不能生长。

2.4.3 pH 值的选择 将不同 pH 值的培养基平板,在点接 x_2-01 后放入 37℃ 培养。

从表 4 可以看出,此菌适应的 pH 值范围较广,pH 7~8 时透明圈直径、菌落直径、H/C 值都较高,最适 pH 值为 7.0。

2.5 需氧性测试结果

将接有菌种的平板放入玻璃缸中,通过黄磷燃烧后,用燃着的酒精棉球迅速扔入缸中,点燃的棉球立刻熄灭,而菌生长良好,经过多次试验,结果相同,证明该菌为兼性厌氧菌。

2.6 菌株在液体发酵条件下果胶酶的活力

因 x_2-01 为兼性厌氧菌,酶活测定为静置培养和摇瓶培养。

表 5 不同培养条件下的果胶酶活性(37℃, pH 7.0)
Tab. 5 The Pectinase Activity of the Differ Cultural Condition

条 件	静置培养							摇瓶培养							
	9	16	23	29	38	46	52	7	12	17	22	31	36	41	46
发酵时间(h)	9	16	23	29	38	46	52	7	12	17	22	31	36	41	46
酶活力 (U/mL)	1.83	5.28	9.38	8.55	7.04	4.79	2.33	2.97	6.37	9.48	8.64	6.47	5.74	4.23	2.43

注:该值为 3 次实验平均值。

另外,还测定静置培养条件下起始 pH6.5 和 pH8.0 时,培养 30 h 的酶活。pH6.5 为 7.80, pH8.0 为 8.00,说明起始 pH 值和酶活有关。

从静置培养和摇瓶培养的酶活来看,在同等条件下,摇瓶培养 17 h 达到最高酶活 9.48 U/mL,而在静置培养时 23 h 达到最高酶活 9.38 U/mL,说明此菌在兼性厌氧条件下(有氧、无氧)都能生长,并都可产生果胶酶,但达酶活最高值时,摇瓶培养比静置培养约快 6 h。

在产酶菌株的筛选和研究中,由于工作量较大,可通过测量 H/C 值,反映其产酶情况,再进一步根据需要进行酶活测定。

对于果胶酶的研究,过去多用霉菌,但霉菌是好氧微生物其利用就受到限制,对于一些氧气量较少时,如在环境保护中一些污物软化处理,水果、蔬菜、粪便等形成的污物中,纤维素、果胶的分解占有重要的位置,靠微生物所产生的酶来分解具有重要意义。果胶酶可分解植物细胞壁中的果胶质,而初生细胞壁主要由果胶质、纤维素和半纤维素组成,故对于需氧量少的兼性厌氧产生果胶酶的细菌的研究具有实际应用前景。

参 考 文 献

- 1 Rombouts F M, Pilnik W. Economic microbiology. Microbial Enzymes and Bioconversions, 1980(5), 228~272
- 2 徐要学. 从蚕沙中提取果胶. 食品科学, 1989(5): 16
- 3 Perlman D. Advances in Applied Microbiology. New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco, Academic Press, 1979. 8~19
- 4 杨天波, 屈龙庆, 詹高越. 果胶酶产生菌白色孢子突变株的诱变选育. 微生物学通报, 1985, 4: 162~163
- 5 中山大学生物系生化微生物学教研室编. 生化技术导论. 北京: 人民教育出版社, 1979. 64~65
- 6 陈聪敏. 厌氧菌及其感染. 上海: 上海医科大学出版社, 1989. 187~188

责任编辑 徐象平

A Study the Isolation Selection and Fermentative Condition of a Producing Pectinase *Bacillus* Sp X_g - 01

Guo Ailian Wang Shaohui Liu Zhong

(Department of Biology, Northwest University, 710069, Xi'an)

Abstract A facultative anaerobic bacillus strain x_g - 01, which can produce pectinase, was isolated from the dirt. Its pH adaptable range was wide, The optimum pH and temperature for growth of this strain were neutral and 37℃ respectively. The life-force of this strain was great, the growth was quick. The medium for fermentation consisted of citrus peel powder, ammonium sulfate, yeast extract and salt, pectinase activity was 9.48 u/mL

Key words pectinase; bacillus; facultative anaerobic