

橘皮果胶酶高产菌株的筛选与产酶条件的优化

罗 群¹, 李路娥²

(1. 成都师范学院, 四川 成都 611130; 2. 东莞市第六高级中学, 广东 东莞 523400)

摘要:为合理利用橘皮进行工业化提取果胶酶, 采用平板分离法进行果胶酶高产菌株的筛选与产酶条件的优化。结果表明: 经过初筛和复筛分离得到 1 株果胶酶的高产菌株, 根据形态特征观察初步鉴定其为黑曲霉。其固态发酵最优产酶条件为: 橘皮粉 0.5 g, 硫酸铵 0.20 g, 麸皮 10 g, 水 10 mL, 28℃ 培养 3 d, 在此条件下, 该菌株的酶活力可达到 1 447.86 U·mL⁻¹。

关键词:果胶酶; 高产菌; 筛选; 优化

中图分类号:Q946.5; Q93-331

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2014)07-0119-04

果胶酶(pectinase), 又称多聚半乳糖醛酸酶, 是水解组成果胶的 D-聚半乳糖醛酸 α -(1,4)糖苷键的酶。果胶酶在食品工业方面主要应用于果汁提取、果胶澄清和植物纤维分解等^[1-4], 其广泛存在于动植物和微生物中, 但动植物来源的果胶酶产量低, 难于大规模地提取制备。近年来, 随着我国果汁饮料行业的快速发展, 对果胶酶的需求日益增长, 果胶酶制剂的产量呈现供不应求的现状。

柑橘是世界产量第一的水果, 也是我国第二大水果^[5], 橘子在加工生产橘子汁或生鲜食用时, 约产生 40%~50% 的皮渣, 橘子皮除极少数用来制作陈皮这一中成药外, 几乎 98% 的橘子皮都被作为废料丢弃了, 既造成了资源的浪费, 也造成了环境的污染。橘子皮中含有大量的果胶成分, 约 20%~30%, 可作为食品级的果胶增稠剂与稳定剂。

研究从腐烂的橘皮中分离筛选能够分解果胶的菌株, 通过富集培养结合刚果红平板水解圈法, 初步筛选到多株有果胶分解能力的菌株, 通过液体摇瓶复筛, 测定菌株的酶活, 从中获得 1 株高产果胶酶的果胶分解菌株, 对其进行形态特征观察, 并研究菌株液体发酵产酶条件, 为合理利用橘皮及其工业化提取果胶酶奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试橘子皮为市购柑橘手工剥皮所得, 剔除

果蒂后备用。橘皮粉为橘子皮高温干燥后粉碎, 过 40 目筛后备用。

供试培养基(1)增殖培养基: 土豆 100 g, 蔗糖 10 g, 水 500 g, 琼脂 15.0 g·L⁻¹, pH 自然。(2)初筛培养基: 粗果胶 10.0 g·L⁻¹, 牛肉膏 2.5 g·L⁻¹, 蛋白胨 10.0 g·L⁻¹, NaCl 为 5.0 g·L⁻¹, K₂HPO₄ 1.0 g·L⁻¹, KH₂PO₄ 0.3 g·L⁻¹, 琼脂 15.0 g·L⁻¹, pH 6.0。(3)对照培养基: 牛肉膏 2.5 g·L⁻¹, 蛋白胨 10.0 g·L⁻¹, NaCl 5.0 g·L⁻¹, K₂HPO₄ 1.0 g·L⁻¹, KH₂PO₄ 0.3 g·L⁻¹, 琼脂 15.0 g·L⁻¹, pH 6.0。(4)选择培养基: K₂HPO₄ 1.0 g·L⁻¹, MgSO₄ 0.5 g·L⁻¹, NaNO₃ 3.0 g·L⁻¹, FeSO₄ 0.01 g·L⁻¹, 纯果胶 2.0 g·L⁻¹, 琼脂 15.0 g·L⁻¹, pH 6.0。(5)固体发酵培养基: 麸皮 10 g, 橘皮粉 0.2 g, 硫酸铵 0.3 g, 水 10 mL, pH 自然。

1.2 方法

1.2.1 果胶的提取制备 称取新鲜橘皮 50 g 置于大烧杯中, 加入 500 mL 清水 55℃ 水浴 30 min, 沸水浴灭酶 5 min。取出后将橘皮冷却, 切成直径为 0.5 cm 左右的小块, 蒸馏水冲洗 2 次, 纱布沥干。将处理后的橘皮置于大烧杯中, 加入 pH 2.0 的盐酸溶液 200 mL, 75℃ 水浴 60 min, 并不断搅拌。四层纱布过滤, 待滤液冷却后向其中加入 150 mL 的 95% 乙醇有絮状沉淀产生。将其静置 30 min 后用 4 层纱布过滤, 取沉淀烘干, 得到粗果胶产物, 并将其用于之后的菌株培养。

1.2.2 菌株的筛选 菌株的筛选分 4 个步骤。

(1)采样: 将新鲜橘皮置于潮湿环境中密封保存, 7~14 d 后将已发霉生菌的橘皮置于三角瓶中, 加适量无菌水置于摇床中, 120 r·min⁻¹ 振荡 30 min, 制成菌悬液备用。

收稿日期: 2014-03-05

基金项目: 四川省教育厅资助项目(11ZB076)

第一作者简介: 罗群(1979-), 女, 四川省宜宾市人, 硕士, 讲师, 从事生物学及预防医学研究。E-mail: 372384664@qq.com。

(2)富集培养:菌悬液经梯度稀释后,涂布到增殖培养基中,28℃富集培养1~2 d。

(3)初筛:将富集培养基中产生的菌落分别制备菌悬液,梯度稀释后将每株菌悬液分别涂布到初筛培养基中,28℃培养3 d后挑取长势较好的菌株进行复筛。

(4)复筛:将初筛所得到的菌株分别点式接种到选择培养基中,28℃培养3 d,待菌落长出后,用2%的刚果红染液染色4 h,再用1 mol·L⁻¹的NaCl溶液冲洗,选取透明圈/菌落直径比值较大的菌株,进行发酵实验与酶活性的测定。

1.2.3 菌种的形态鉴定 将筛选出来的菌株接入选择培养基,28℃培养1~3 d,肉眼观察菌落的正面观、背面观,并在显微镜下观察菌丝及孢子的形态,对菌株进行初步鉴定^[6]。

1.2.4 发酵因素对酶活力的影响 将菌株接种到发酵培养基中,28℃恒温培养,通过改变发酵天数、发酵培养基中的橘皮粉含量、硫酸铵含量,以DNS比色法测定各组酶活力,优化产酶条件^[8]。

(1)固体发酵培养基成分不变,发酵天数分别为1、2、3和4 d时,测定各组酶液的酶活,以确定最佳发酵时间^[7]。

(2)培养基中其它成分不变,在发酵2 d的条件下,改变培养基中硫酸铵的含量,分别为0.05、0.10、0.15、0.20和0.25 g,测定各组酶活,以确定达最佳产酶量所需的硫酸铵含量。

(3)发酵培养基中其它成分不变,在发酵2 d的条件下,往培养基中添加不同含量的橘皮粉,分别为0、0.5、1.0和1.5 g,测定各组酶活,以确定达最佳产酶量所需的橘皮粉含量。

(4)正交试验。在经过多次单因素试验的基础上,以酶活力为考察指标,进行3因素4水平(L₉3⁴)正交试验(见表1),优化产酶条件。

表1 正交试验因素水平

Table 1 Factors and levels of the orthogonal test

| 水平 Levels | 因素 Factors | | |
|--------------|------------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| | 培养时间/d Culture time | 硫酸铵/g Ammonium sulfate content | 橘皮粉/g Orange peel content |
| 1 | 1 | 0.15 | 0.25 |
| 2 | 2 | 0.20 | 0.50 |
| 3 | 3 | 0.25 | 0.75 |

1.2.5 酶活力测定 先制备菌悬液,再进行酶活动测定。

(1)菌悬液的制备:以增殖培养基制备固体斜面,将待测菌株接种到斜面上,28℃培养3 d,向试管中加入10 mL无菌水,振荡,制成菌悬液。移取1 mL菌悬液至固体发酵培养基中,28℃培养2 d,将所得到的固体酶曲加蒸馏水浸提1 h(水料比5:1),每隔15 min搅拌1次,抽滤得粗酶液。

(2)酶活力的测定:取甲、乙两只试管,分别加入0.5 g·mL⁻¹果胶底物1.5 mL和乙酸-乙酸钠缓冲液2.5 mL。甲管中加入1 mL粗酶液,摇匀,48℃水浴反应30 min;反应完成后,再向乙管中加入1 mL粗酶液,迅速将两试管同时放入沸水浴中加热5 min终止反应。待冷却后分别移取甲、乙反应液各2 mL于另两只试管中,再加入蒸馏水2 mL及DNS试剂3 mL,摇匀,沸水浴加热5 min,冷却后定容至25 mL。以乙反应液为对照调零,540 nm处测定甲管的吸光值。参照葡萄糖标准曲线,计算酶活力^[7]。

2 结果与分析

2.1 菌株分离筛选

经过富集培养再分离,初步筛选出9株菌株。将9株菌株分别接入以果胶为唯一碳源的选择培养基中,复筛出有较好长势的菌株共3株,其中2株为细菌,1株为霉菌。刚果红染色结果显示霉菌的透明圈/菌落直径比值(D_p/D_c)比较大(见表2),确认霉菌LH-3有最佳产果胶酶效果,故选用霉菌LH-3进行下一步试验。

表2 D_p/D_c 的比较

Table 2 Comparison of the D_p/D_c

| 菌株代号 Code | LH-1 | LH-2 | LH-3 |
|--------------------------------|------|------|------|
| D _p /D _c | 1.20 | 1.33 | 1.76 |

2.2 菌株的形态鉴定结果

霉菌LH-3的菌落呈黑褐色,边缘不整齐,呈草帽状,菌丝白色、发达多分枝,质地丝绒状。孢子黑色饱满,分布在菌丝上,有放射性瘠状延伸至菌落边缘,背面无色或中央略带黄褐色。菌丝有隔多核,顶部形成球形顶囊,其上全面覆盖一层梗基和一层小梗,小梗上长有成串褐黑色的球状物,分生孢子头褐黑色放射状。经形态观察,LH-3菌株初步鉴定为黑曲霉(*Aspergillus niger*)。

2.3 不同发酵因素对酶活力的影响

2.3.1 培养天数对果胶酶活力的影响 由图1

可知,随发酵时间的延长果胶酶活力呈先上升后下降趋势。当培养时间为 2 d 时,果胶酶的酶活力最强,达到 $1\,347.69\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$;超过 2 d 后,随着发酵天数的增加,酶活力呈平稳下降趋势。这可能是由于随着发酵时间的增加,培养基内有效成分减少和次生代谢产物的积累阻碍了酶的产生。

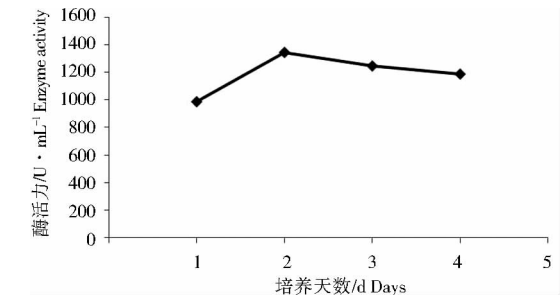


图 1 培养天数对果胶酶活力的影响
Fig. 1 The effect of culture time on enzyme activity of pectinase

2.3.2 硫酸铵含量对果胶酶活力的影响 由图 2 可知,随培养基中硫酸铵含量的增加酶活力呈先上升后下降的趋势,当培养基中硫酸铵含量为 0.20 g 时,酶活力最高,为 $1\,393.85\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。随

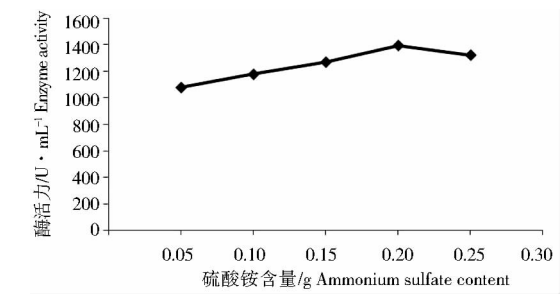


图 2 硫酸铵含量对果胶酶产量的影响
Fig. 2 The effect of ammonium sulfate content on yield of pectinase

后有所下降,故培养基中硫酸铵最佳含量为 0.20 g。

2.3.3 橘皮粉含量对果胶酶活力的影响 由图 3 可知,当培养基中加入橘皮粉含量为 0.5 g 时,果胶酶活力最高,为 $1\,439.99\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$,随着橘皮粉含量的进一步增加,酶活力呈下降趋势。表明在发酵过程中,果胶酶作为诱导酶,橘皮粉作为诱导剂具有一定的提升酶活力的效果;但过量的橘皮粉会导致酶活的降低,对产酶有抑制作用,分析可能是由于橘皮粉中的其它化学成分在过量之后,抑制了酶活力。

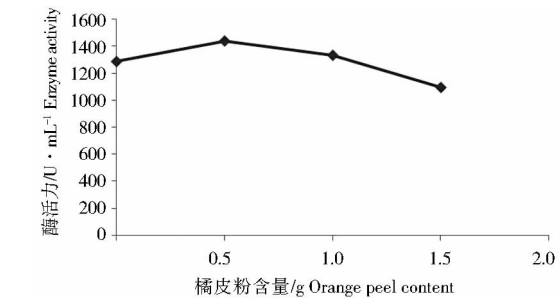


图 3 橘皮粉含量对果胶酶活力的影响
Fig. 3 The effect of orange peel content on enzyme activity of pectinase

2.3.4 正交试验结果分析 由表 3 可以看出,发酵天数对果胶酶活力的影响差异显著。影响果胶酶活力的主次因素顺序为发酵天数>橘皮粉含量>硫酸铵含量,果胶酶的最佳产酶条件为 $A_3B_2C_2$,即发酵天数 2 d,硫酸铵的含量为 2%,橘皮粉的含量为 5%。根据此条件进行最佳优化组合验证,3 次重复后,果胶酶活力分别为 $1\,447.69$ 、 $1\,445.52$ 及 $1\,452.37\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$,平均值为 $1\,447.86\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$,RSD 为 $1\,448.52\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$,RSD 为 0.24%,均高于正交试验中任意组合条件得到的果胶酶活力。

表 3 正交试验结果

Table 3 Orthogonal test results

| 试验号 No. | 因素 Factors | | | 酶活/ $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ Enzyme activity |
|------------|-----------------------------|-----------------------------------|------------------------------|--|
| | A 发酵时间 Fermentation time | B 硫酸铵 Ammonium sulfate content | C 橘皮粉 Orange peel content | |
| | | | | |
| 1 | 1(1d) | 1(0.15 g) | 1(0.25 g) | 1229.47 |
| 2 | 1 | 2(0.20 g) | 2(0.50 g) | 1302.28 |
| 3 | 1 | 3(0.25 g) | 3(0.75 g) | 1317.59 |
| 4 | 2(2d) | 1 | 2 | 1433.53 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1440.25 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 1340.27 |
| 7 | 3(3d) | 1 | 3 | 1414.28 |

续表 3

Continuing Table 3

| 试验号 No. | 因素 Factors | | | 酶活/ $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ Enzyme activity |
|------------|-----------------------------|-----------------------------------|------------------------------|--|
| | A 发酵时间 Fermentation time | B 硫酸铵 Ammonium sulfate content | C 橘皮粉 Orange peel content | |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 1385.46 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1442.21 |
| K1 | 3849.34 | 4077.28 | 3955.20 | |
| K2 | 4214.05 | 4127.99 | 4178.02 | |
| K3 | 4241.95 | 4100.07 | 4172.12 | |
| k1 | 1283.11 | 1359.09 | 1318.40 | |
| k2 | 1404.68 | 1376.00 | 1392.67 | |
| k3 | 1413.98 | 1366.69 | 1390.71 | |
| 极差 R | 130.87 | 16.91 | 74.27 | |
| F 值 | 28.78* | 0.39 | 9.67 | |

注: * 表示在 0.05 水平上差异显著($P<0.05$)Note: * mean the significant difference at 0.05 level($P<0.05$).

3 结论与讨论

筛选分离菌株工作量大,选择高效的筛选方法是获取菌株的关键,刚果红染色法透明圈明显,具有显色迅速、效率高的特点,是产果胶酶菌株筛选的优良方法^[9]。该试验以果胶为唯一碳源,采用刚果红染色法筛选出 LH-3 菌株为具有较高降解果胶能力的黑曲霉。

在产酶条件的研究中,作为碳源的橘皮粉含有较多的果胶物质,起到了诱导剂的作用,比在培养基中直接加果胶作诱导剂既增加了这一废弃材料的利用价值,又降低了生产成本。硫酸铵作为最适氮源,起到了速效氮源的作用,麸皮主要起到持效氮源和碳源的作用,这样的组合更有利于黑曲霉持续快速地生长。试验结果表明,橘皮粉 0.5 g、硫酸铵 0.2 g、麸皮 10 g、水 10 mL,温度为 28℃,培养天数为 3 d 时产果胶酶最高,达到 1 447.86 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$,该结果为橘皮这一废弃资源的开发利用途径提供了理论支撑,也为其优化果胶

酶的工业化生产提供了理论支持。

参考文献:

- [1] 刘兴艳,张树林.果胶酶对樱桃提汁效果的研究[J].农产品加工,2011,109(8):35-38.
- [2] 姜守军,周广麒.果胶酶澄清葡萄汁的工艺研究[J].安徽农业科学,2007,35(4):1109-1110.
- [3] 陈晓燕,陈少华,熊天旻,等.益肾型覆盆子复合饮料的制作工艺研究[J].北方园艺,2013(19):133-136.
- [4] 巩效伟,陈兴,申晓峰,等.利用果胶酶改善烟梗内在品质的研究[J].安徽农业科学,2013,41(15):6889-6891.
- [5] 丁春霞.橘子皮中主要有效成分提取工艺研究进展[J].化工时刊,2012,26(10):46-48.
- [6] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:上海科学技术出版社,1979:405-642.
- [7] 王媛,韩舜愈,祝霞.果胶酶高产菌的筛选机发酵条件的优化[J].甘肃农业大学学报,2010,45(3):117-121.
- [8] 王小敏,吴文龙,闫连飞.分光光度计法测定果胶酶活力的方法研究[J].食品工业科技,2007,28(5):227-229.
- [9] 沈萍,陈向东.微生物学实验[M].北京:高等教育出版社,2007:53.

Screening of High-producing Strain and Optimization of Enzyme Production Conditions for Pectinase from Orange Peel

LUO Qun¹, LI Lu-e²

(1. Chengdu Normal College, Chengdu, Sichuan 611130; 2. Dongguan No. 6 Senior High School, Dongguan, Guangdong 523400)

Abstract: For industrialized extraction of pectinase from orange peel, screening of high-producing strain and optimization of enzyme production conditions were carried out with plate separation. The results showed that a high-producing strain pectinase was screened through primary screening and secondary screening. According to morphological characteristics, it was preliminarily identified as *Aspergillus niger*. The optimum conditions were 0.5 g orange peel powder, 0.2 g ammonium sulfate, 10 g wheat bran, cultured for 2 d in 28℃. Under these conditions, the enzyme activity of the strain was 1 447.86 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Key words: pectinase; high-producing strains; screening; optimization