

果胶酶高产菌株的激光选育及发酵条件的优化

朱宏莉^{1,2}, 宋纪蓉^{2,*}, 张嘉¹, 黄洁², 徐抗震²

(1.西北大学生命科学学院, 陕西 西安 710069; 2.西北大学化工学院, 陕西 西安 710069)

摘要: 利用氦氖激光诱变原生质体筛选到了一株产果胶酶性能稳定且酶活明显提高的突变株 ZH-2。其最适发酵条件为: 以 2% 桔皮粉 + 1% 乳糖作碳源, 以 1% (NH₄)₂SO₄ + 0.3% 酵母膏作氮源, 在起始 pH7.0, 33℃ 摇床发酵 32h 左右达产酶高峰。分析 ZH-2 所产果胶酶的性质得出, 酶作用最适条件为: pH6.5, 50℃, 以聚半乳糖醛酸为底物, 酶的热稳定性实验显示, 50℃ 保温 60min 后, 酶活力基本不变。

关键词: 果胶酶; He-Ne 激光; 诱变; 发酵条件; 原生质体

The Breeding of High-yield Pectinase Producing Baterial Using He-Ne Laser and Studies on Its Optimal Fermentation Conditions

ZHU Hong-li^{1,2}, SONG Ji-rong^{2,*}, ZHANG Jia¹, HUANG Jie², XU Kang-zhen²

(1.Institute of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China;

2.Institute of Chemistry Engineering, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: A mutant strain ZH-2 with high yield of pectinase was selected by He-Ne laser mutagenesis on protoplasts of the original one. The optimal fermentation conditions were investigated: initial pH7.0, temperature 33℃, with 2% citrus peel powder and 1% lactose as carbon source, 1% (NH₄)₂SO₄ and 0.3% yeast extract paste as nitrogen source, after fermenting for 32h on a rotary shaker. By preliminary analysis of the pectinase produced by ZH-2, optimum conditions for enzyme catalysis were pH6.5 at 50℃. It was stable and even retained 90% activity after incubation at 50℃ for 60min.

Key words: pectinase; He-Ne laser; mutagenesis; fermentation conditions; protoplasts

中图分类号: Q93

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)12-0160-05

果胶酶是指能催化果胶质分解的多种酶类的总称, 由于它在食品、发酵、环保、麻料脱胶、木材防腐、饲料加工等多领域的广泛应用^[1~3], 因此已成为世界上产销量最大的五种工业酶制剂之一^[4]。果胶酶可以快速彻底地脱除果胶, 降低水果等榨汁的粘度, 有利于果汁的过滤和澄清。近年来, 随着我国果汁和果酒业的迅速发展, 对果胶酶的需求也日益高涨。目前关于果胶酶产生菌的研究主要集中在酶活较高的霉菌, 对细菌的研究很少, 然而霉菌生产果胶酶存在产酶周期长, 耗氧量多, 菌丝易缠结等不足, 因此筛选高酶活细菌具有广泛的应用价值。本实验利用 He-Ne 激光诱变原生质体获得了一株性能稳定的果胶酶细菌高产菌株, 并对其

发酵条件进行了优化, 为微生物果胶酶的深入研究和应用提供了依据。

1 材料与方法

1.1 菌种来源

出发菌株为本实验室选育菌种^[5]

1.2 培养基

1.2.1 试管斜面培养基、平板分离培养基、种子培养基(%)、发酵培养基(%)、初筛培养基见文献[5]。

1.2.2 完全培养基(CM)(%)

牛肉膏 1, 蛋白胨 1, 葡萄糖 0.5, NaCl 0.5,

收稿日期: 2005-04-25

* 通讯作者

基金项目: 陕西省教育厅专项研究基金项目(00JK138)

作者简介: 朱宏莉(1971-), 女, 讲师, 博士, 主要从事应用微生物方面的研究。

pH7.0~7.2, 固体培养基加2%琼脂粉。

1.2.3 再生培养基(DM)

给CM培养基内加入0.5mol/L蔗糖(17.1g/100ml), pH7.0~7.2, 固体培养基加2%琼脂粉, 半固体培养基加0.7%琼脂粉。

1.2.4 原生质体制备液或原生质体稀释用高渗缓冲液(DF)

0.25mol/L蔗糖, 0.25mol/L丁二酸钠, 0.001mol/L EDTA, 0.02mol/L K_2HPO_4 , 0.11mol/L KH_2PO_4 , 0.01mol/L $MgCl_2$, pH7.0。

1.3 原生质体诱变^[6,7]及突变株的筛选

原生质体的制备和再生另文发表, 详细内容略。

将在最佳条件下制备的原生质体液^[8] (原生质体含量约 10^6 个/ml) 0.2ml装入无菌小试管中, 用He-Ne激光($\lambda=632.8nm$)辐射, 输出功率15mW(减掉玻璃损耗), 扩束光斑直径0.3cm, 输出电流11mA, 激光透过玻璃的损耗为5mW, 照射距离30cm。辐射剂量(以分计)15'、20'、25'、30', 另设对照(CK)0'。

将照射后的菌液先经过中间培养4~6h, 再用DM液系列稀释, 采用涂布法在DM平皿上培养, 将再生单菌落(尤其是生长迅速、表型特征典型的菌落)镜检并移接斜面, 33℃培养24h后, 在初筛培养基平板上点种, 将其中生长快及透明圈与菌落直径比大的菌株挑出, 进行复筛。

复筛方法: 将初筛选出的菌株先移接斜面, 然后取一环菌接入种子培养液中, 35℃摇床培养12~14h, 再以5%的接种量接入发酵培养基中, 33℃摇床发酵, 测发酵液中果胶酶的活力, 确定高产稳定株。

1.4 ZH-2发酵条件的优化

1.4.1 培养时间对ZH-2生长及产酶的影响

将ZH-2接一环于种子培养液中, 35℃振荡培养12~14h, 再以5%的接种量接入发酵培养基中进行摇床培养, 从第12h开始, 每隔4h取样, 测其酶活力。用光电比浊计数法测细胞数目, 以反映其生长情况。

1.4.2 起始pH对ZH-2生长与产酶的影响

用10%HCl和20% Na_2CO_3 (单独灭菌)调节发酵培养基的起始pH分别为: 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0, 进行产酶试验, 32h后测定不同pH下的酶活力和菌体生长情况。

1.4.3 培养温度对ZH-2生长及产酶的影响

在不同温度下摇床发酵32h后, 测定其酶活力和菌体生长情况。温度取值(℃)(25、28、30、33、35、37、40)。

1.4.4 碳源对ZH-2产酶的影响

在维持一定C/N比的基础上, 分别按2%加入果胶、

聚半乳糖醛酸等作为发酵培养基的碳源进行产酶试验。将2%桔皮粉作为基本碳源, 再分别按1%加入葡萄糖、乳糖、麸皮粉, 按2%加入麸皮粉、麦秆粉组成复合碳源进行试验。进一步用1%乳糖与不同浓度的桔皮粉组成复合碳源进行产酶试验。

1.4.5 氮源对ZH-2产酶的影响

在含1%乳糖和2%桔皮粉的发酵培养基中, 分别按1%加入 $(NH_4)_2SO_4$ 、酵母膏等作为氮源进行产酶试验。再以1% $(NH_4)_2SO_4$ 作为基本氮源, 分别按0.3%加入酵母膏、蛋白胨、尿素、黄豆粉, 组成复合氮源, 进行产酶试验。

1.4.6 静置条件对ZH-2产酶的影响

将ZH-2接种于起始pH7.0的处于静置状态的发酵培养基中, 33℃静置发酵, 测定静置条件对ZH-2产酶的影响。

1.5 ZH-2所产果胶酶性质的初步研究

1.5.1 粗酶制备

将已活化的ZH-2接一环于种子培养液中, 35℃振荡培养12~14h, 再以5%的接种量接入起始pH为7.0的发酵培养基中, 33℃摇床发酵32h后, 将发酵液0℃4000r/min离心20min, 取上清液作为粗酶液。

1.5.2 最适作用温度与热稳定性

分别取10ml 1%聚半乳糖醛酸和5ml粗酶液混合于不同温度的水浴中进行酶促反应, 测酶活, 确定最适作用温度; 热稳定性试验是分别取适当稀释的粗酶液5ml在20~80℃温度下保温60min后, 以1%聚半乳糖醛酸为底物, 用次亚碘酸法测酶活^[9]。

1.5.3 最适作用pH

配制pH4.0~8.0的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液及pH8.0~9.0的0.1mol/L Tris-HCl缓冲液。

将5ml粗酶液与用不同pH缓冲液配制的一系列底物(1%聚半乳糖醛酸)进行酶促反应, 测酶活, 确定最适作用pH。

1.6 酶活测定 采用次亚碘酸法^[9]。

1.7 ZH-2的斜面传代稳定性测定

将ZH-2每月传代一次, 连续传代五次, 将五次传代的斜面同时活化进行发酵, 测定每次传代后的酶活力。

2 结果与讨论

2.1 氦氖激光诱变原生质体及突变株的筛选

将在2mg/ml溶菌酶37℃处理2h的条件下制备的原生质体液(原生质体含量 10^6 个/ml), 用不同剂量的He-Ne激光辐射后, 从再生菌落中挑取上百株生长迅速, 或表型特征典型的菌落镜检并移接斜面培养24h, 然后初筛, 从中挑取32株透明圈与菌落直径比大的菌株摇床发

酵测酶活, 进行复筛, 其中 21 株的酶活与出发菌株相似或略高, 有 8 株为负变菌株, 还有 3 株酶活提高 18% 左右, 结果见表 1。

表 1 原生质体诱变所筛选的突变株的酶活力

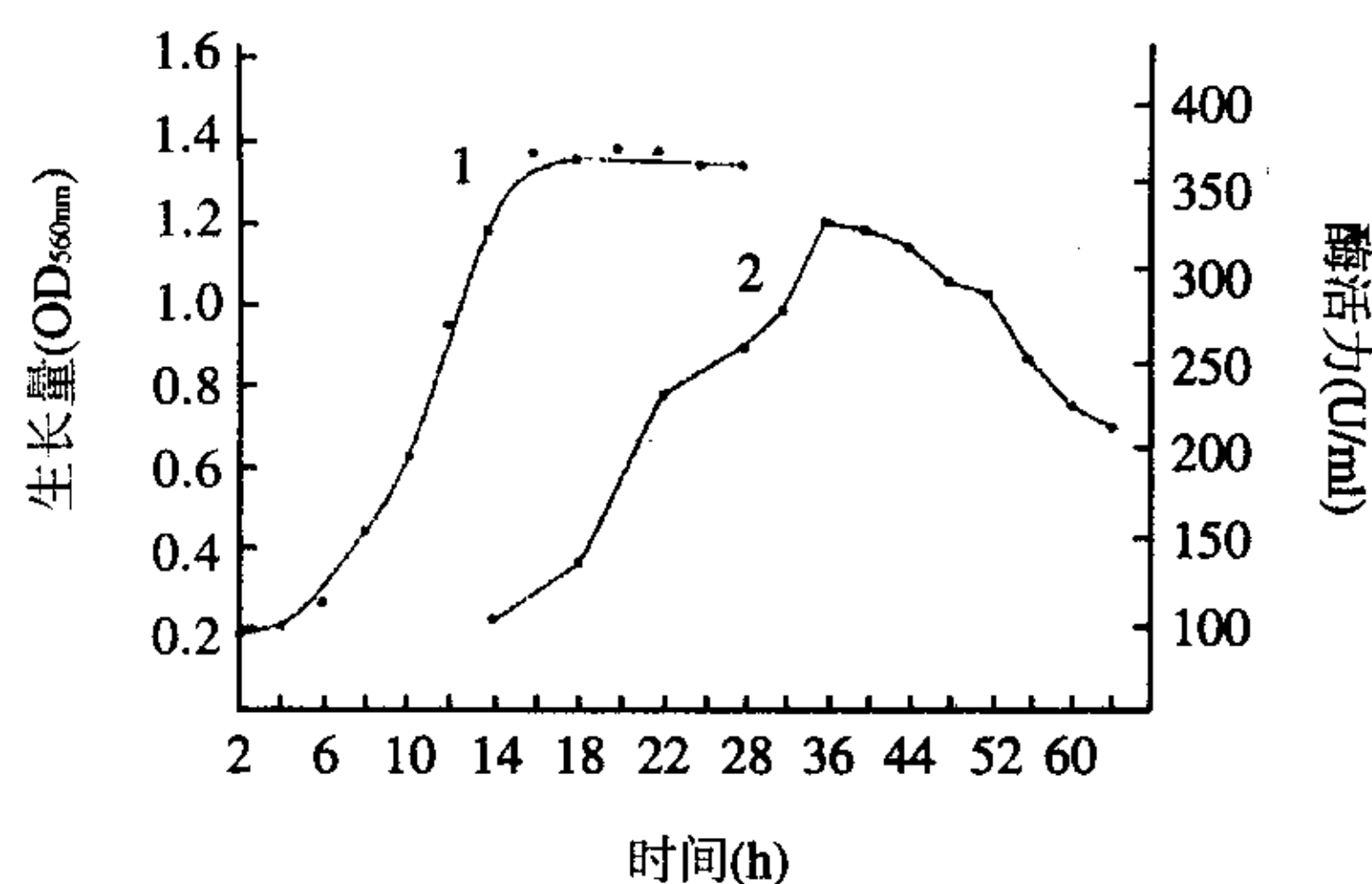
Table 1 The enzyme activity of the screened mutant strains after irradiation of He-Ne laser on the protoplasts

菌株编号	1*	2*	3*	出发菌株
辐射剂量(分)	20 分	20 分	15 分	
酶活力(U/ml)	341	357	338	301

经过原生质体诱变后, 筛选出了一株高产果胶酶菌株定名为 ZH-2。

2.2 ZH-2 发酵条件的优化

2.2.1 培养时间对 ZH-2 生长及产酶的影响

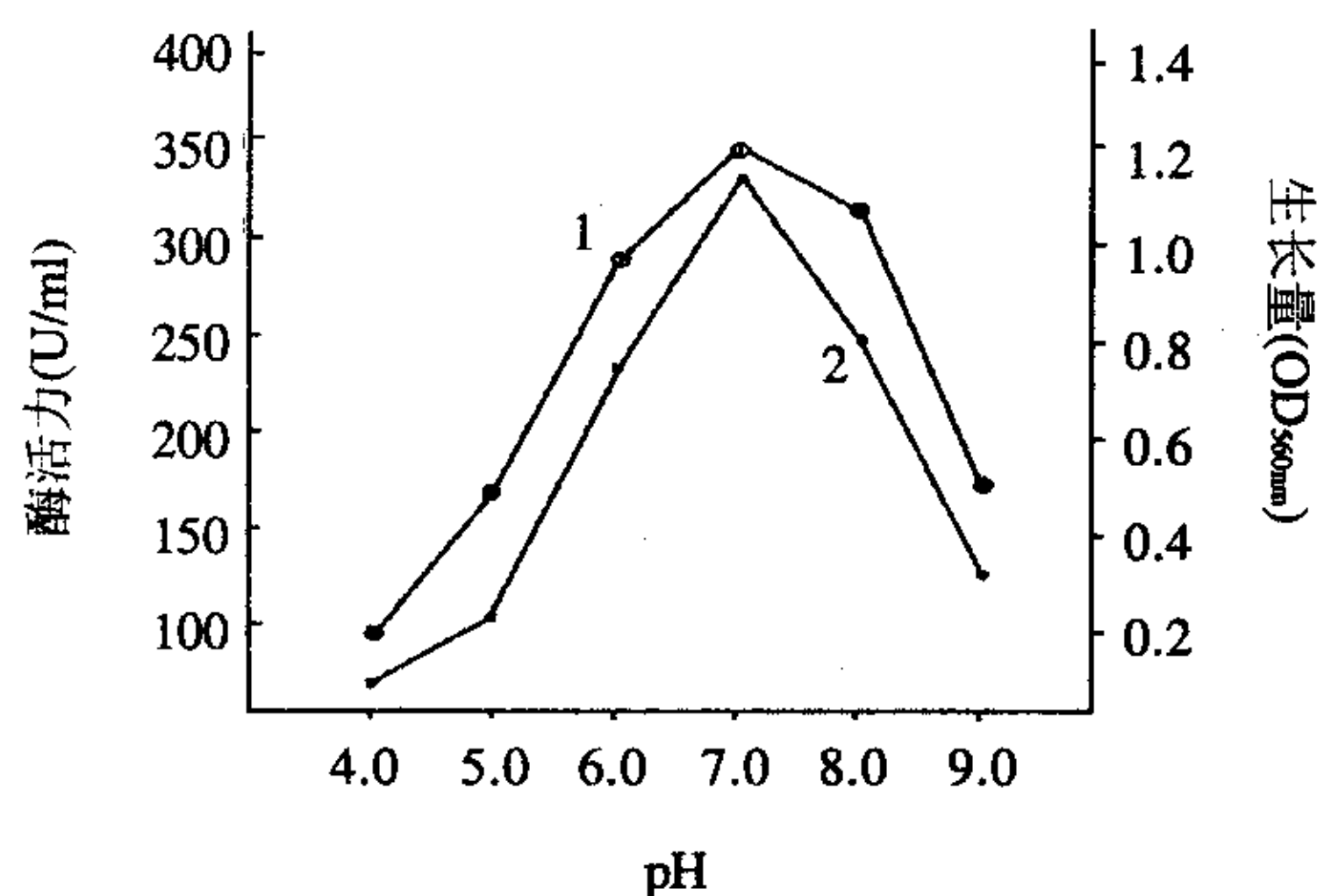


1 菌体的生长曲线 2 菌体的产酶曲线

图 1 培养时间与 ZH-2 生长及产酶的关系

Fig.1 The time course of enzyme production and cell growth of the strain ZH-2

由图 1 可看出, ZH-2 经历了约 6h 的延迟期后, 迅速生长, 进入对数期, 大约在 12~14h, 到达生长最高峰并转入稳定期, 维持菌数基本不变。但是 ZH-2 的产酶高峰期大约在第 32h 出现, 从第 48h 以后酶活下降较快, 从图中我们还可以看到 ZH-2 的生长高峰期与产



1 菌体生长量 2 菌体酶活力

图 2 起始 pH 与 ZH-2 生长及产酶的关系

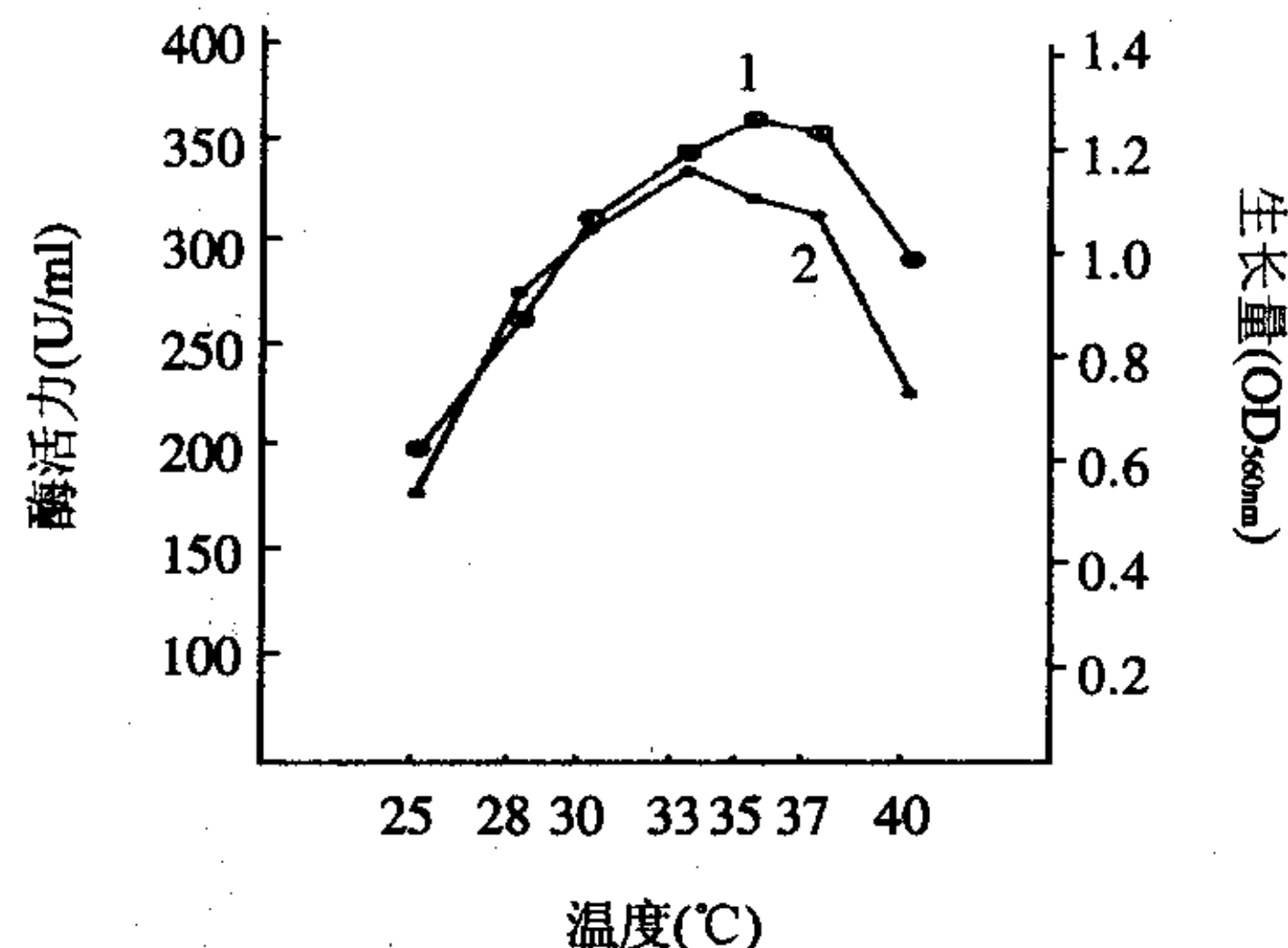
Fig.2 The effect of initial pH on cell growth and enzyme production of the strain ZH-2

酶高峰期是不一致的。

2.2.2 起始 pH 对 ZH-2 生长及产酶的影响

由图 2 可看出, ZH-2 的生长及产酶的最适 pH 均在 7.0 左右, 过酸或者过碱都会抑制菌体的生长和产酶。

2.2.3 培养温度对 ZH-2 生长及产酶的影响



1 菌体生长量 2 菌体酶活力

图 3 培养温度与 ZH-2 生长及产酶的关系

Fig.3 The effect of culture temperature on cell growth and enzyme production of the strain ZH-2

由图 3 可看出, ZH-2 的产酶最适温度为 33°C, 低于 28°C 或高于 37°C 都会使产酶量迅速降低。ZH-2 生长的最适温度在 35~37°C 左右。

2.2.4 碳源对 ZH-2 产酶的影响

碳源不仅被用来构成细胞物质, 同时也是菌体生长中的主要能源, 它还可作为酶的诱导物。在生产果胶酶时, 果胶类物质即是碳源, 又是酶的诱导物, 对菌体生长和产酶影响很大, 下面列表显示不同碳源对果胶酶产生的影响。

表 2 不同碳源对果胶酶产率的影响

Table 2 Effect of various carbohydrates on enzyme production

碳源(2%)	酶活(U/ml)	复合碳源(2%+1%)	酶活(U/ml)
果胶	269	桔皮粉+乳糖	341
聚半乳糖醛酸	176	桔皮粉+葡萄糖	248
半乳糖醛酸	120	桔皮粉+麸皮粉	265
葡萄糖	94	桔皮粉+麸皮粉(2%)	322
乳糖	151	桔皮粉+麦秆粉(2%)	289
桔皮粉	241		
玉米粉	42		

由表 2 可看出, 复合碳源的效果比单一碳源的好。当以 2% 桔皮粉+1% 乳糖作为碳源时, 酶活达到最高。以 2% 果胶作为唯一碳源时, 其产酶相对较高。这是因为它即是碳源, 又是酶的良好诱导物, 但从经济的角度考虑, 选用 2% 桔皮粉与其它碳源组成复合碳源, 这样即可降低成本, 又可以达到较高的酶活。从表中还可以看出, 果胶类物质的诱导效果是有一定差异的。其

表3 复合碳源桔皮粉浓度对果胶酶产率的影响

Table 3 Effect of concentration of citrus peel powder on enzyme production in compound carbon source

桔皮粉浓度(%)	0	0.5	1	1.5	2	3
酶活(U/ml)	108	176	223	275	337	326

中, 果胶的诱导效果要比聚半乳糖醛酸高, 这可能与果胶分子中甲氧基的存在有关。果胶分解的终产物半乳糖醛酸也有微弱的诱导效应。另外 ZH-2 能较好地分解利用处理过的麸皮粉及麦秆粉作为碳源, 当以 2% 桔皮粉+2% 麸皮粉或 2% 桔皮粉+2% 麦秆粉作为复合碳源时, 其产酶相对较高, 这在工业化大生产中可降低成本, 具有较高的经济效益。

进一步用 1% 乳糖与不同浓度的桔皮粉组成复合碳源进行产酶试验, 结果见表 3, 2% 桔皮粉与 1% 乳糖组成复合碳源时效果好。

2.3.5 氮源对 ZH-2 产酶的影响

氮源是菌体生长所不可缺少的成份, 也是构成细胞物质(包括酶在内)的主要元素, 表 4 列出了不同氮源对果胶酶产生的影响。

表4 不同氮源对果胶酶产率的影响

Table 4 Effect of various nitrogen source on enzyme activity

氮源(1%)	酶活(U/ml)	复合氮源(1%+0.3%)	酶活(U/ml)
(NH ₄) ₂ SO ₄	310	(NH ₄) ₂ SO ₄ + 酵母膏	348
NH ₄ NO ₃	152	(NH ₄) ₂ SO ₄ + 蛋白胨	319
NaNO ₃	233	(NH ₄) ₂ SO ₄ + 尿素	261
酵母膏	112	(NH ₄) ₂ SO ₄ + 黄豆粉	314
蛋白胨	104		
尿素	54		
黄豆粉	86		

从表 4 可看出, 不同氮源对产酶的影响是不同的, 以无机氮源作唯一氮源的产酶效果比有机氮源好, 将无机与有机氮源按一定比例混合对于产酶的提高作用更明显, 其中以 1%(NH₄)₂SO₄+0.3% 酵母膏组成复合氮源时, 产酶达到最高, 从经济的角度考虑, 以 1%(NH₄)₂SO₄+0.3% 的黄豆粉组成复合氮源或以 1%(NH₄)₂SO₄ 作为氮源时, 其产酶相对较高, 且成本也较低。

2.3.6 静置条件对 ZH-2 产酶的影响

ZH-2 于起始 pH7.0 的发酵培养基中, 33℃ 静置发酵 50h 左右, 产酶达到最高, 约为 308U/ml。此酶活较高, 尽管与好氧条件下相比有所降低, 但差距并不大, 这也从一个侧面说明了 ZH-2 在好氧和静置条件下均能良好生长及产酶。

2.4 ZH-2 所产果胶酶性质的初步研究

2.4.1 酶的最适作用温度与热稳定性

由图 4 可看出, ZH-2 所产果胶酶作用的温度范围较宽, 最适温度为 50℃。酶的热稳定性(图 5): 该酶在

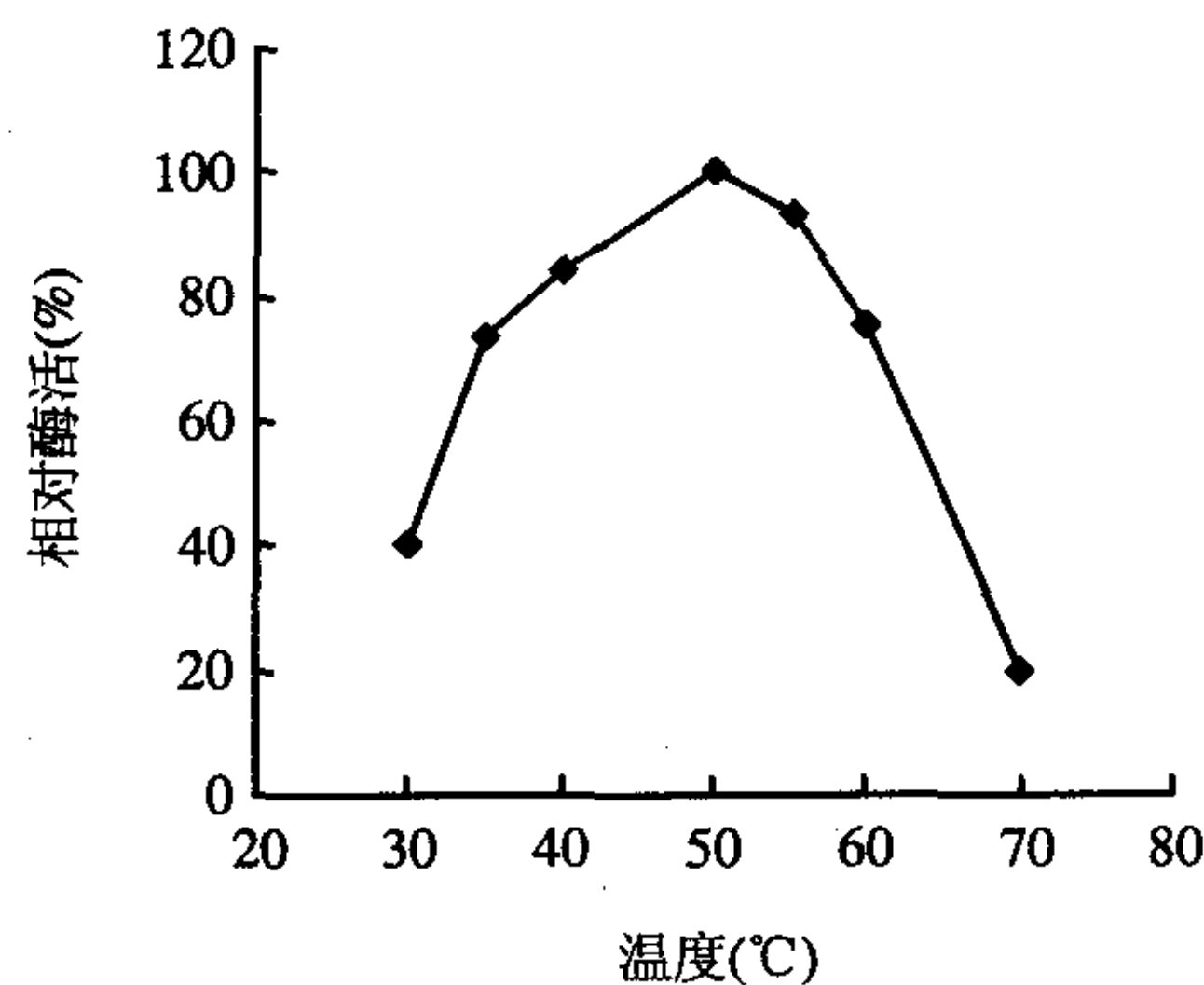


图4 温度对酶活力的影响

Fig.4 The effect of temperature on the enzyme activity

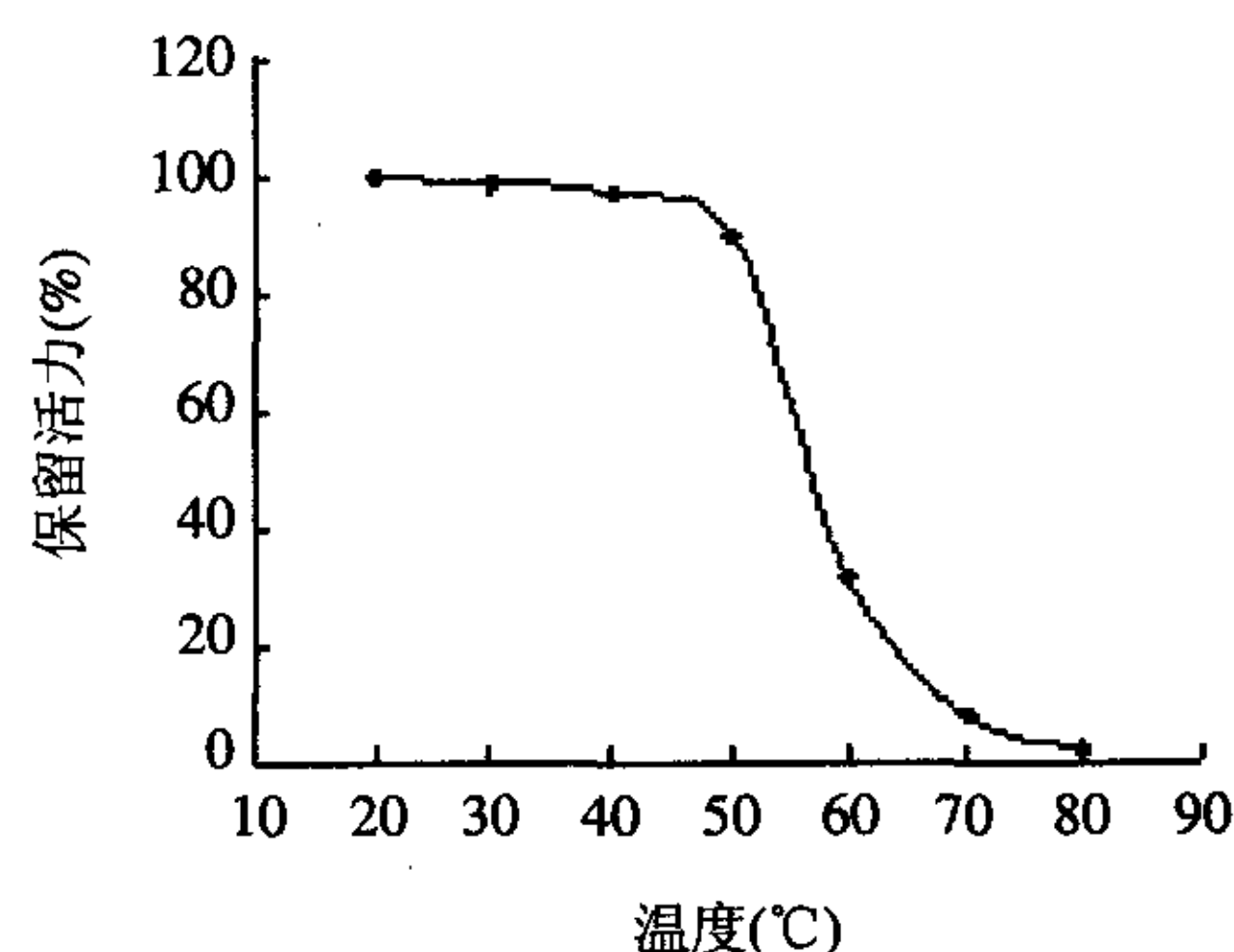


图5 酶的热稳定性

Fig.5 Thermal stability of enzyme

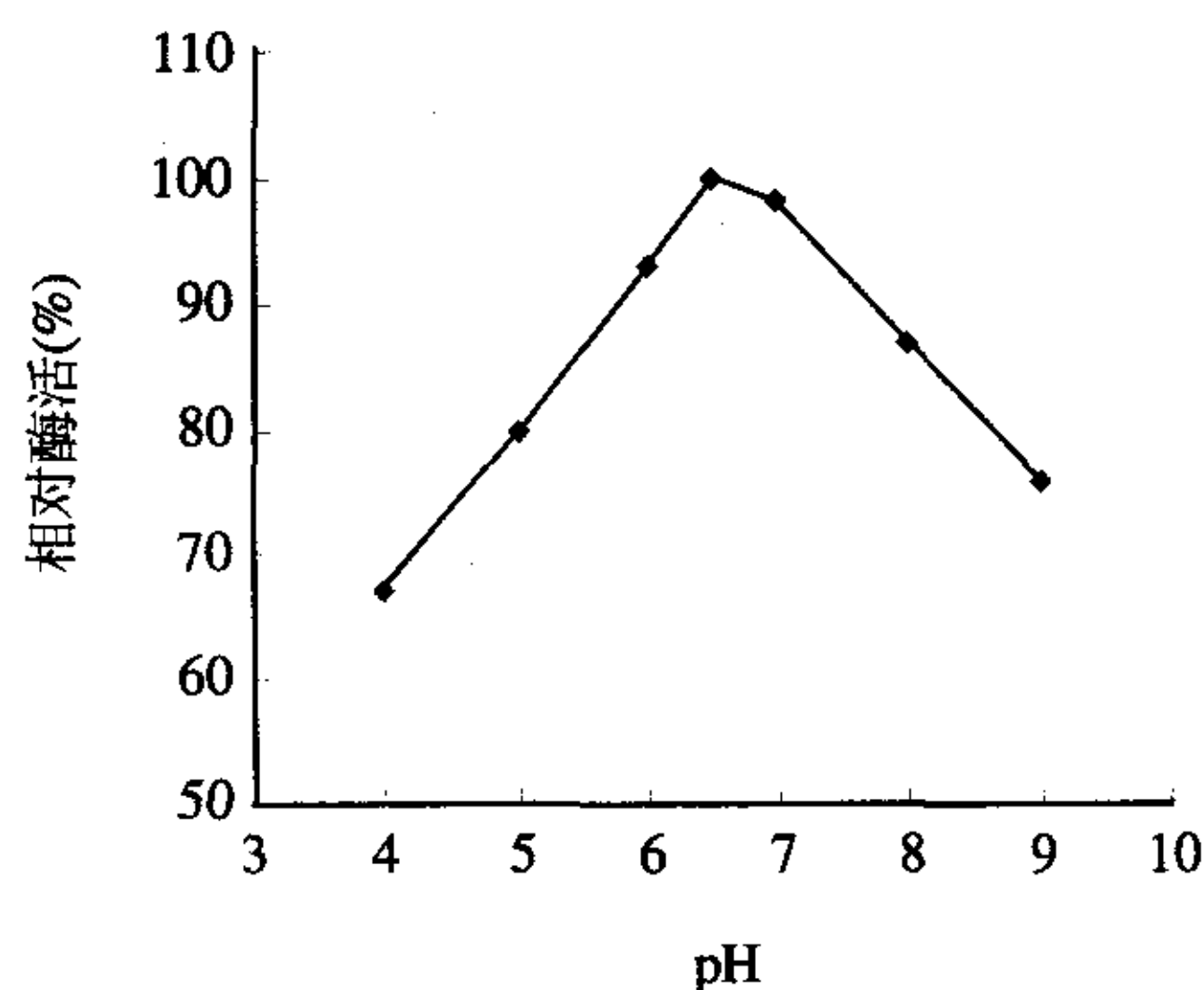


图6 pH对酶活力的影响

Fig.6 The effect of pH on enzyme activity

50℃保温 60min 后, 活力基本不变, 温度再升高, 酶活力迅速丧失。

2.4.2 酶的最适作用 pH

如图 6, ZH-2 所产果胶酶在 pH6-8 时酶活力较高, 在 pH6.5 时, 酶活力最高。

2.5 ZH-2 的斜面传代稳定性测定结果

将 ZH-2 每月传代一次, 连续传代五次, 测定每次传代后的酶活力结果见表 5。经传代五次后, 酶活力变化不大, 证明 ZH-2 的遗传性比较稳定。

3 结 论

表5 ZH-2 斜面传代稳定性试验
Table 5 The stability of the strain ZH-2

传代次数	一	二	三	四	五
ZH-2 的酶活力(U/ml)	347	353	339	344	332

利用氩氛激光以不同剂量诱变细胞原生质体, 筛选到了一株性能稳定的高产果胶酶突变株 ZH-2, ZH-2 在以 2% 桔皮粉+1% 乳糖作为碳源, 以 1%(NH₄)₂SO₄+0.3% 酵母膏作为氮源的培养基中, 培养基装量为 30ml/250ml 锥形瓶, 在起始 pH 为 7.0, 33℃ 摇床发酵 32h, 产酶达到最高峰。同时测定静置条件对 ZH-2 产酶的影响, 结果表明 ZH-2 在好氧和静置条件下均能良好生长且产酶较高。该酶的最适作用 pH 为 6.5, 最适作用温度为 50℃, 经连续传代五次, 产酶性能稳定。该菌能够很好地分解利用桔皮粉、麸皮粉、麦秆粉等天然富含果胶的植物材料, 使废物得以再利用。以这些成本低廉, 来源广泛的物质作为碳源, 不仅产酶高, 同时也较经济, 因此其应用潜力还是很大的。

参考文献:

[1] Voragen F, Schols H, Visser R. Advances in pectin and pecti-

nase research[M]. Klumer Academic Publishers, 2003. 10-155.

[2] 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.

[3] Liliana C, Jorge L. Determination of enzymatic activities of commercial pectinases for the clarification of apple juice[J]. Food Chemistry, 1998, 61(1/2): 237-241.

[4] 张树政. 酶制剂工业[M]. 北京: 科学技术出版社, 1995.

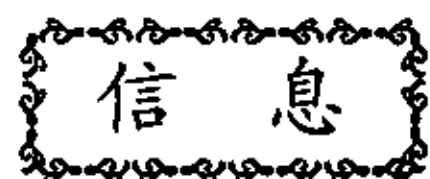
[5] 郭爱莲, 朱宏莉. 紫外、氩氛激光复合诱变产果胶酶细菌的研究[J]. 光子学报, 2002, 31(11): 1335-1339.

[6] Pelman D. Advances in applied microbiology[M]. New York, London, Toronto, Syronto, Sydney, San Francisco: Academic press, 1979. 8-19.

[7] 向洋. 激光生物学[M]. 湖南: 湖南科学技术出版社, 1995. 114-121.

[8] 周东坡, 平文祥. 微生物原生质体融合[M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1990. 1-406.

[9] 张玉墀. 果胶酶产生菌的选育[J]. 食品科学, 1987, (2): 14-18.



国外最近研制成神奇抗腐塑料袋

国外最近研制成神奇抗腐塑料袋, 它可使食物保鲜期延长至三年之久。它不仅适用于普通用户, 而且特别适应水果食品业、长途运输业。

美国密西西比州特洛伊市已采取在常规包装袋中放入一层塑料薄膜的方式包装, 初步收到良好效果。该薄膜含有一种被称为 Amosorp 的化学物质, 可以消除包装袋内的氧气。经反复长时间的实验表明, 存放在新型保鲜袋在新型保鲜袋中的食物, 能达到长期保鲜的效果。

澳大利亚韦恩汉德乐斯公司也在进行类似研究。科学家们采取将混合化学物质填入塑料袋中的方法制作, 但不进行除氧, 而是消除袋中促进水果成熟、变质的气体, 从而使水果长期保鲜。

澳大利亚科研组还在进行一种除氧化学物质的试验。该物质的物性与 Amosorp 相仿, 只是保鲜效果更好。据说, 该物质在特殊光波照射之前, 一直处于休眠状态, 当接受光波照射后, 其中的化学分子才开始活跃。这也就是说, 在进行包装食物时, 无需进行复杂的除氧处理, 只要在包装食物的最后一道工序用特殊光波照射即可。

美国生产出聚碳酸酯多层食品容器

美国莫巴伊公司利用聚碳酸酯树脂材料生产出一种高性能多层食品容器。这种容器有 3 层, 内外两层是聚碳酸酯, 中间是隔绝层, 可用于包装果冻、果酱、果蔬汁、干酪和腌制食品等。由于有一隔绝层, 因而存放的食品其保鲜期和保存期都长于普通的单层容器。