

胡椒经地衣芽孢杆菌发酵脱皮过程中的主要酶系及 pH 值变化

熊海波^{1,2}, 侯源源¹, 刘四新¹, 苗子健¹, 李从发^{1,*}

(1. 海南大学食品学院, 海南 海口 570228; 2. 海南大学环境与植物保护学院, 海南 海口 570228)

摘 要: 采用地衣芽孢杆菌进行静置液态发酵对胡椒进行脱皮, 与生产实践中传统水沤法脱皮对比, 研究二者发酵脱皮过程中的果胶酶、木聚糖酶、纤维素酶和发酵液 pH 值的动态变化。结果表明: 在发酵脱皮过程中, 两种方法的聚半乳糖醛酸酶(PG)和果胶裂解酶(PL)变化规律相似, 都出现两次酶活力高峰; 而纤维素酶活力都很低, 果胶酯酶(PE)酶活力都比较高; 在传统水沤法中木聚糖酶活力出现两个高峰, 而在发酵法中木聚糖酶活力在脱皮后期逐渐上升; pH 值变化总趋势也相似, 脱皮完成时 pH 值均在 5~5.5 之间。由此推知, 胡椒鲜果发酵脱皮过程中果胶酶系起主要作用, 脱皮前期 PG、PL 先作用于果胶类物质, 破坏胶质复合体的稳定结构, PE 再作用于果胶分子, 形成果胶酸, 同时 pH 值降低, 脱皮后期木聚糖酶活力上升, 半纤维素降解加快, 在多种酶的协同作用下, 胡椒鲜果最终完成彻底脱皮。

关键词: 胡椒; 脱皮; 发酵法; 水沤法; 地衣芽孢杆菌; 果胶酶; 木聚糖酶; 纤维素酶

Dynamic Changes in Main Enzyme Activities and pH during Pepper (*Piper nigrum* L.) Decortication by *Bacillus licheniformis* Fermentation

XIONG Hai-bo^{1,2}, HOU Yuan-yuan¹, LIU Si-xin¹, MIAO Zi-jian¹, LI Cong-fa^{1,*}

(1. College of Food Science and Technology, Hainan University, Haikou 570228, China;

2. College of Environment and Plant Protection, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: Static liquid-state *Bacillus licheniformis* fermentation was used for pepper decortication and compared with traditional water retting. Meanwhile, the dynamic changes of pectinases, xylanase, cellulase and pH during pepper decortication by the two methods were explored. The results showed that the changes of polygalacturonase (PG) and pectin lyase (PL) revealed a similar pattern with two activity peaks during both decortication processes. However, cellulase activity was low and the pectin esterase (PE) activity remained high. Similar pH changes were observed during both decortication processes pH was between 5 and 5.5 at the end of decortication. Xylanase activity showed two peaks in traditional water retting method and a gradual increase in the late stage of *Bacillus licheniformis* fermentation. Therefore, pectinase might play an important role during pepper decortication. In the early stage of decortication, PG and PL first acted on pectin substances and damaged the pectin complex structure, and then PE hydrolyzed pectin molecules to form pectic acid accompanied with pH decrease. Further, xylanase activity increased gradually in the late stage of decortication and as a result, hemicellulose was rapidly depolymerized. Therefore, pepper decortication was completed under the synergistic action of multiple enzymes.

Key words: *Piper nigrum* L.; decortication; water retting method; *Bacillus licheniformis*; pectinase; xylanase; cellulase

中图分类号: Q814.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)15-0205-04

胡椒(*Piper nigrum* L.)是重要的热带辛香料植物, 其中白胡椒的市场占有率超过 60%。脱皮是白胡椒加工中的关键步骤, 传统使用的水沤法脱皮周期长, 劳动强度大, 特别是沤臭味重, 脱皮不彻底, 产品质量不稳

定。为了克服传统工艺的不足, 近年来国内外都在寻求新的白胡椒加工方法, 其中利用微生物发酵进行生物法脱皮是白胡椒加工的未来发展方向。

胡椒微生物发酵法脱皮的原理是利用接种的微生物

收稿日期: 2010-09-14

基金项目: “十一五” 国家科技支撑计划项目(2007BAD76B02)

作者简介: 熊海波(1984—), 男, 硕士研究生, 研究方向为应用微生物技术。E-mail: haijunxiong@foxmail.com

* 通信作者: 李从发(1967—), 男, 教授, 博士, 研究方向为发酵与功能食品。E-mail: congfa@vip.163.com

产生各种酶类, 分解果皮中的有机物质, 从而破坏果皮的致密结构, 即在温和条件下进行一系列“胶养菌, 菌产酶, 酶脱胶”的生化反应, 使得果皮与胡椒种子(即胡椒粒)分离, 达到脱皮目的。在这个生化作用过程中, 所需酶类一般认为是两类, 即果胶酶和半纤维素酶。在麻类脱皮^[1-2]的实验中, 刘自镒等^[3]认为苧麻脱胶中的关键酶是果胶酶, Akin 等^[4]和何连芳等^[5]研究麻类脱胶专用酶制剂时指出半纤维素酶和果胶酶共同作用才能使麻类脱胶的速度加快, 且所得麻类品质更好。但对于胡椒脱皮过程中酶作用的动态变化的报道很少。传统水沤法脱皮是将成穗胡椒装在编织袋里, 在自然水体中浸沤 7~15d, 然后在流水中搓洗胡椒使果皮脱除干净。其原理可能主要是自然水体中多种微生物的共同作用。由于许多腐败微生物参与该过程, 因此所加工的白胡椒往往带有明显的沤臭味。本课题组致力于研究胡椒的生物法脱皮工艺, 其中对胡椒在传统水沤法和地衣芽孢杆菌发酵法脱皮过程中生化指标特别是各种酶的变化进行研究, 为阐明胡椒微生物发酵法脱皮的生物化学机制、为胡椒生物法脱皮的深入研究和进一步推广应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)3-x-05 由海南大学食品学院应用微生物研究室筛选。

胡椒(*Piper nigrum* L.)鲜果及水沤处理中的胡椒采自海南省琼海市阳江镇。

果胶、D-半乳糖醛酸、木聚糖、木糖 美国 Sigma 公司; 羧甲基纤维素钠 天津市光复精细化工研究所。

1.2 仪器与设备

HMS 智能型恒温恒湿培养箱 宁波江南仪器厂; Hettich32R 高速冷冻离心机 德国 Zentrifugen 公司; W-1100 型紫外-可见分光光度计 上海美谱达仪器有限公司; Delta 320-S 型 pH 计 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; SW-CT-IFD 型超净工作台 苏州佳宝净化工程设备有限公司; PB303-N 型电子天平 梅特勒-托利多仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 菌种培养

种子培养液: 果胶 2g/L、K₂HPO₄ 2g/L、NaH₂PO₄ 2g/L、(NH₄)₂SO₄ 2g/L、NaNO₃ 1.5g/L、MgSO₄ 0.5g/L、酵母浸膏 0.0001g/L。

直接用接种环从试管斜面上挑取 2 环地衣芽孢杆菌于种子培养基中, 30℃、160r/min 振荡培养 24h。

1.3.2 胡椒地衣芽孢杆菌发酵脱皮

称取 3000g 成穗胡椒鲜果, 热烫 3min, 添加 1g/L 的葡萄糖溶液, 料液质量比 1:3, 接种 10% 的地衣芽孢

杆菌 3-x-05 种子液, 28℃ 静止培养直至 72h 胡椒脱皮完成(未脱皮颗粒在 30 颗以内, 下同)。在脱皮过程中每隔 6h 定期取样, 分别测定发酵液中的 pH 值和果胶酶、木聚糖酶、纤维素酶的酶活力。

1.3.3 传统水沤法脱皮

海南省琼海市是胡椒的主产区, 胡椒种植户生产白胡椒时均采用自然水体浸沤法, 通常需要 7~10d 后。从农户的露天浸沤池中定期(每隔 12h)吸取编织袋中央的沤液样品, 同 1.3.2 节测定样品液中的 pH 值和果胶酶、木聚糖酶、纤维素酶的酶活力。

1.3.4 pH 值测定

采用 pH 计测定。

1.3.5 酶活力测定

果胶酶系中聚半乳糖醛酸酶(PG)活力测定采用 3,5-二硝基水杨酸比色法(DNS)法^[6]。40℃、pH4.0 条件下, 1mL 酶液中 1min 产生 1μg 半乳糖醛酸所需要的酶量定义为一个酶活力单位(U)。

果胶酯酶(PE)活力测定采用 NaOH 滴定法^[6]。45℃、pH6.0 条件下, 1mL 酶液中 1min 释放出 1μmol 羧酸所需要的酶量定义为一个酶活力单位(U)。

果胶裂解酶(PL)活力测定采用紫外光谱仪测定吸光度法^[6]。40℃、pH5.0 条件下, 1mL 酶液中 1min 分解果胶, 波长 235nm 处吸光度增加 0.01 所需要的酶量定义为一个酶活力单位(U)。

木聚糖酶活力测定采用 DNS 法^[7]。50℃、pH7.0 条件下, 1mL 酶液 1min 催化木聚糖生成 1μmol 木糖所需要的酶量定义为一个酶活力单位(U)。

纤维素酶系中滤纸酶活力和 CMC 酶活力测定采用 DNS 法^[8]。50℃、pH3.8 条件下, 1mL 酶液 1min 水解纤维素底物生成 1μmol 葡萄糖所需要的酶量定义为一个酶活力单位(U)。

2 结果与分析

2.1 胡椒脱皮过程中果胶酶活力的变化

2.1.1 胡椒脱皮过程中 PG 酶活力的变化

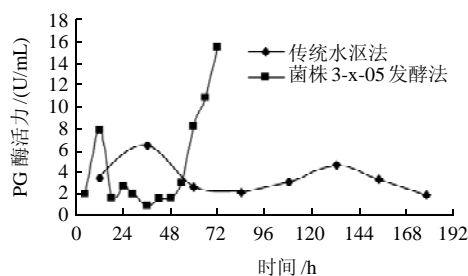


图1 胡椒两种脱皮方法中 PG 酶活力随时间变化曲线
Fig.1 PG activity change curve over time

PG 专一水解果胶分子的糖苷键,属于果胶水解酶^[9],能够有效降低果胶的黏度。从图 1 可以看出,在传统水沤法中 PG 在 32h 和 132h 存在酶活力高峰;而在地衣芽孢杆菌发酵法中 12h 就出现酶活力高峰且酶活力比传统水沤法高。

2.1.2 胡椒脱皮过程中 PE 酶活力的变化

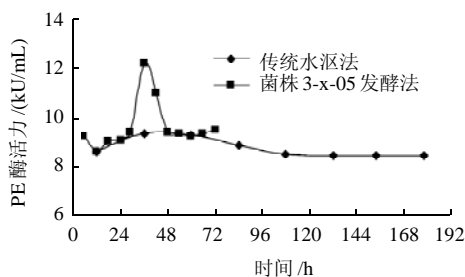


图 2 胡椒两种脱皮方法中 PE 酶活力随时间变化曲线

Fig.2 PE activity change curve over time

从图 2 可以看出,在传统水沤法中 PE 酶活力变化不大,一直维持在 8500~9500U/mL 之间;而在地衣芽孢杆菌发酵法中,在 36h 就达到 12216.6U/mL,随着脱皮时间的延长,PE 酶活力逐渐下降,维持在 9500U/mL 左右,直到脱皮结束时。PE 作用于果胶分子,脱去甲氧基,形成果胶酸^[9],在整个脱皮过程中,PE 酶活力都维持在一个较高的水平。

2.1.3 胡椒脱皮过程中 PL 酶活力的变化

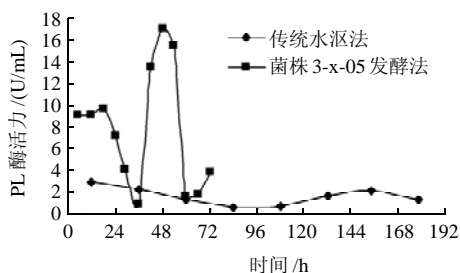


图 3 胡椒两种脱皮方法中 PL 酶活力随时间变化的曲线

Fig.3 PL activity change curve over time

PL 主要是通过反式消去作用切割果胶分子中的 α -1,4 糖苷键,形成果胶分子末端的 C4—C5 不饱和键^[9],能更迅速降低黏度。从图 3 可以看出,传统水沤法中 PL 酶活力较低,而在地衣芽孢杆菌发酵法中,6~18h 之间 PL 酶活力维持 9.0U/mL 左右,且在 42~54h 出现第 2 次较高的酶活力。地衣芽孢杆菌发酵法能更快地完成脱皮,可能与脱皮过程中存在较高的 PL 酶活力有关^[10]。

2.2 胡椒脱皮过程中木聚糖酶的变化

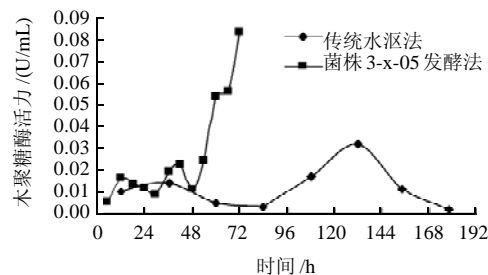


图 4 胡椒两种脱皮方法中木聚糖酶活力随时间变化的曲线

Fig.4 Xylanase activity change curve over time

从图 4 可以看出,传统水沤法中木聚糖酶在 36h 和 132h 存在酶活力高峰,但酶活力比地衣芽孢杆菌发酵法低;在地衣芽孢杆菌发酵法的脱皮前期木聚糖酶活力较低,从 36h 起酶活力逐渐上升,在脱皮结束时,木聚糖酶活力达到 0.086U/mL。对于两种脱皮法,木聚糖酶都是在脱皮后期才有较高的酶活力,这可能是因为木聚糖酶属于诱导酶,在脱皮后期,果胶酶作用于果皮,使得果皮中的半纤维素暴露出来,从而诱导产生较多的木聚糖酶。

2.3 胡椒脱皮过程中纤维素酶活力的变化

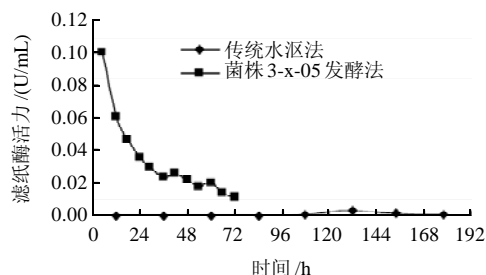


图 5 胡椒两种脱皮方法中滤纸酶活力随时间变化的曲线

Fig.5 FPA activity change curve over time

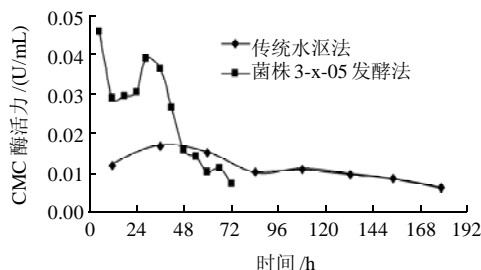


图 6 胡椒两种脱皮方法中 CMC 酶活力随时间变化的曲线

Fig.6 Carboxymethylcellulase activity change curve over time

从图 5、6 可以看出,在整个脱皮过程中,两种脱皮方法中纤维素酶的活力都较低,由此推测胡椒的

脱皮过程与纤维素的降解关系不大。这可能与胡椒鲜果的果皮中含有较少的纤维素有关。

2.4 胡椒脱皮过程中 pH 值的变化

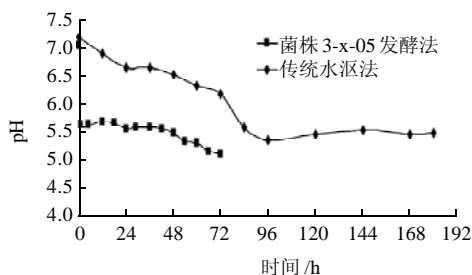


图7 胡椒两种脱皮方法中 pH 值随时间变化的曲线

Fig.7 pH change curve over time

从图7可以看出,传统水沤法中,pH值从最初的7.2逐渐降低,脱皮结束pH值稳定在5.5左右;地衣芽孢杆菌发酵法中,环境水体的pH值从5h开始就降低至pH5.5,脱皮结束时pH值在5.1左右。发酵液的pH值变化与发酵液中的微生物菌群和发酵产酶情况关系密切,传统水沤法中随着脱皮的进行,多种微生物大量繁殖,代谢产生酸性物质,使得pH值逐渐下降^[11];地衣芽孢杆菌发酵法脱皮前期由于优势菌株代谢产生酸类物质和CO₂,使得pH值迅速降低,接着果胶类物质被分解成小分子的糖类,pH值下降减缓。

3 结论与讨论

本实验对胡椒鲜果的传统水沤法脱皮和地衣芽孢杆菌3-x-05发酵法脱皮过程中的果胶酶系、木聚糖酶、纤维素酶和pH值进行了动态变化研究。结果表明在脱皮的全过程中,两种方法的PG和PL的变化规律相似,但地衣芽孢杆菌发酵法中的酶活力水平高于传统水沤法,且PG和PL酶活力高峰出现时间更早。PE酶活力都维持在较高水平,但纤维素酶活力都较低,且地衣芽孢杆菌发酵法的纤维素酶活力随时间延长逐渐降低。两种方法的pH值总体趋势相似,都是逐渐下降,在脱皮完成

时pH值稳定在5~5.5;两种方法的木聚糖酶变化趋势有明显的区别,传统水沤法中木聚糖酶有两个酶活力高峰,而在发酵法中,在脱皮前期木聚糖酶活力缓慢增加,从36h开始酶活力迅速提高。

实验结果表明在脱皮前期PG、PL先作用于果胶类物质,破坏起交联作用的胶质复合体的稳定结构,随后PE再作用于果胶分子,形成果胶酸^[12],同时pH值降低,脱皮后期木聚糖酶活力上升,半纤维素迅速降解,最终在多种酶的协同作用下,胡椒鲜果完成彻底脱皮。地衣芽孢杆菌发酵法之所以比传统水沤法高效、快速,主要是发酵用菌种相关酶系较齐全、酶活力较高,使脱皮相关的整个生化过程更早、更快完成。

参考文献:

- [1] 丁绍敏,钮光,马艺华,等.桑皮纤维生物脱胶探索[J].广西纺织科技,2010,39(1):2-4;21.
- [2] 黄小龙.南方亚麻微生物脱胶技术及其机理研究[D].长沙:湖南农业大学,2004.
- [3] 刘自镨,任建平,冯瑞良.一株产韧皮纤维脱胶酶的菌株及其在苧麻、大麻脱胶上的应用:中国,ZL01127440.9[P].2004-07-14.
- [4] AKIN D E, MOIRISON W H III, GAMBLE G R, et al. Effect of retting enzymes on the structure and composition of flax cell wall[J]. Textile Res J, 1997, 67: 279-287.
- [5] 何连芳,张玉苍.苧麻韧皮纤维微生物固态脱胶的方法:中国,200910012071.2[P].2009-11-11.
- [6] 汤鸣强.黑曲霉产果胶酶的分离纯化和酶学性质研究[D].福州:福建师范大学,2004.
- [7] 谭秀山.CXJ295-198菌株分泌果胶酶和半纤维素酶的活性研究及果胶酶的分离纯化[D].乌鲁木齐:新疆农业大学,2004.
- [8] 王春燕.红树林纤维素酶产生菌产紫青霉HBZ003发酵条件及酶学性质[D].海口:海南大学,2010.
- [9] 薛长湖,张永勤,李兆杰,等.果胶及果胶酶研究进展[J].食品与生物技术学报,2005,24(6):94-99.
- [10] AKIN D E, CONDIN B, SOHN M, et al. Optimization for enzyme-retting of flax with pectate lyase[J]. Industrial Crops and Products, 2007, 25: 136-146.
- [11] YU Hongqin, YU Chongwen. Study on microbe retting of kenaf fiber[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 40: 1806-1809.
- [12] MEIJER W J M, VERTREGT N, RUTGERS B, et al. The pectin content as a measure of the retting and rettability of flax[J]. Industrial Crops and Products, 1995(4): 273-284.