文章编号:1009-038X(2004)03-0095-04

新型果蔬加工用酶——粥化酶

张 倩, 姜晓红, 赵允麟*
(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室,江苏 无锡 214036)

摘 要: 以黑曲霉菌株 *A. niger*103 为出发株,通过紫外、亚硝基胍等诱变剂进行反复诱变处理,得到一株高产菌株 *A. niger*537,果胶酶酶活提高了 130%,同时测定了其纤维素酶、木聚糖酶、蛋白酶及淀粉酶的酶活,分别达到 4.76,176.82,832.4,105.73 U/mL. 并通过单因素试验研究了营养条件对改变各酶产酶量及其酶系组成的影响.

关键词: 粥化酶;果胶酶;诱变;优化
中图分类号:Q 55 **文献标识码**: A

The Macerating Enzyme for Processing of Fruit and Vegetable

ZHANG Qian, JIANG Xiao-hong, ZHAO Yun-lin*
(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southen Yangtes University, Wuxi 214036, China)

Abstract: *Aspergillus niger* strain 103 was mutanted by UV-radiation and NTG to get strain *A. niger*537 with the pectinase activity increased by 130%, compared with that of the original strain. The activities of cellulosase, xylanase, proteinase, and glucoamylase of strain *A. niger*537 were also detected, 4.76 U/mL, 176.82 U/mL, 832.4 U/mL, and 105.73 U/mL, respective. In order to determine the effects of medium ingradients on the enzymatic activities changes, the single factor test was carried out.

Key words: macerating enzymes; pectinase; mutation; optimization

粥化酶(Macerating enzymes)又称软化酶,它是一种复合酶,主要有果胶酶、半纤维素酶、纤维素酶及蛋白酶、淀粉酶等[1]. 粥化酶可由单一微生物培养产生,其中各种酶的比例可根据使用要求的不同,通过菌种或营养、培养条件的改变而变化. 它主要用于果蔬加工,可以促进过滤,提高出汁率. 目前国内对此尚未见相关报道,本实验将原有菌株通过紫外和亚硝基胍诱变,得到一株果胶酶酶活相对较高的菌株,然后考察了各种不同碳源、氮源对菌株产酶的影响[2].

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 果胶酶产生菌黑曲霉(*Aspergillus niger*)103:作者所在实验室分离筛选.

1.1.2 材料 NTG(亚硝基胍):Sigma 公司产品;低酯果胶:苏州丹尼尔公司惠赠,酯化度约为 28%;高酯果胶:苏州丹尼尔公司惠赠,酯化度约为 81%;

收稿日期:2003-09-18; **修回日期**:2003-10-03.
作者简介: 张 倩(1979-),女,江苏江阴人,发酵工程硕士研究生;* 通讯作者.

万方数据

苹果渣:自制(国光苹果切碎榨汁后用两层纱布过滤,滤渣烘干粉碎);其他试剂均为分析纯.

1.2 培养基

1.2.1 斜面活化培养基 PDA 培养基.

1.2.2 平板筛选培养基 成分(g/L):蔗糖 20,果胶 10,$MgSO_4$ 0.5,KCl 0.5,$FeSO_4$ 0.01,K_2HPO_4 1,$NaNO_3$ 3.

1.2.3 基础发酵培养基 麸皮 4 g,豆饼粉 1 g,$(NH_4)_2SO_4$ 0.1 g,水 6 mL.

1.3 测定方法

1.3.1 果胶酶酶活测定 Somogyi 法[3].

1.3.2 纤维素酶酶活测定 DNS 法[4].

1.3.3 木聚糖酶酶活测定 DNS 法[5].

1.3.4 蛋白酶酶活测定 Folin 法[6].

1.3.5 糖化型淀粉酶酶活测定[7] 见参考文献[7].

1.4 产果胶酶黑曲霉突变株的诱变和筛选

1.4.1 紫外诱变 见参考文献[8].

1.4.2 NTG 诱变 见参考文献[8].

1.4.3 菌株筛选方法 经紫外和 NTG 诱变处理后取 0.1 mL 稀释菌液涂布于筛选培养基上,30 ℃培养 3 d 后加入 20 g/L 十六烷基溴化铵静置 10 min,将透明圈较大的单菌落分别移接到斜面[8]. 30 ℃培养 3 d 后,挑一环接入固态发酵培养基,30 ℃静置培养 60 h,用 5 倍湿物料的 10 g/L NaCl 溶液,30 ℃浸提 1 h,两层纱布过滤得滤液按 1.3.1 中方法测定酶活(文中所列的酶活均为一次浸提液的酶活).挑出酶活高的再进行复筛.

2 结果与讨论

2.1 紫外诱变结果

2.1.1 诱变剂量的选择 在对出发菌进行诱变处理时诱变剂量的选择是至关重要的.通常剂量的大小是根据致死率及其正突变率确定的.随着照射时间的增加,致死率不断增大,在照射 9 min 后致死率达到了 99.3%.而正突变率在 6 min 时达到 65.3%,在 9 min 时却降到 21.6%,由此可以确定较佳的诱变照射时间为 6 min.

2.1.2 诱变结果 按照 1.4.3 中所述方法进行复筛的菌株酶活见表 1.虽然 308 菌株的酶活提高幅度最大,但由于其传代稳定性不好,因此选用 323 作为后续诱变的出发菌株.

2.2 亚硝基胍诱变结果

2.2.1 亚硝基胍诱变剂量的确定 诱变时间越长则致死率就越高,在诱变 1 h 时其致死率达到 99.4%.一般认为亚硝基胍诱变的致死率较低其诱变的效果较好,因此选 30 min 的反应时间作为较佳诱变时间.

2.2.2 诱变结果 亚硝基胍诱变后菌株酶活的变化相对来说比较大,选取 6 株酶活高的进行复筛,结果见表 2.

表 1 紫外诱变结果

Tab. 1 The results of UV-radiation mutation

菌株号	果胶酶酶活/(U/mL)	提高幅度/%
103	64.52	0
308	97.74	51.5
312	75.48	16.9
314	82.90	28.5
321	72.58	12.5
323	83.87	30.0

酶活提高幅度比紫外诱变后的大,菌株号为 537 提高幅度达 73.17%,比出发菌株 *A. niger*103 提高了 130%.

表 2 亚硝基胍诱变结果

Tab. 2 The results of NTG mutation

菌株号	果胶酶酶活/(U/mL)	提高幅度/%
323	85.69	0
509	135.48	58.10
522	141.94	65.44
525	122.58	43.05
537	148.39	73.17
557	136.13	58.86
569	132.26	54.34

2.3 菌株 537 的选育谱系及稳定性实验

2.3.1 选育谱系

出发菌株 *A. niger* 经紫外和亚硝基胍诱变后获得一株果胶酶高产菌,其选育谱系如下:

	果胶酶酶活
*A. niger*103	64.52 U/mL
↓ UV 照射 6 min	
*A. niger*323	83.87 U/mL
↓ 亚硝基胍 1 mg/mL,30 min	
*A. niger*537	148.39 U/mL

2.3.2 传代试验 将诱变株进行遗传稳定性试验(见表 3),由表 3 数据可见,菌株号 537 的遗传稳定性较好,可以作为生产菌株.

万方数据

表 3　菌株号 537 的传代试验

Tab. 3　The genetic stability of strain 537

代数	果胶酶酶活/(U/mL)	纤维素酶酶活/(U/mL)	木聚糖酶酶活/(U/mL)	蛋白酶酶活/(U/mL)	淀粉酶酶活/(U/mL)
1	145.45	4.76	176.82	832.4	105.73
5	144.68	4.65	175.08	829.5	105.96

2.4　果胶酶的诱导性试验

果胶酶分为组成型和诱导型两种. 少量组成型的果胶酶,降解果胶酸产生不饱和寡聚半乳糖醛酸,这些降解物可被细胞吸收,并在不导致降解物阻遏的条件下直接或间接地诱导细胞产生更多的果胶酶[9]. 本实验选取了苹果渣、高酯果胶、低酯果胶 3 种添加物进行诱导试验,果胶酶酶活结果见表 4.

表 4　诱导物实验

Tab. 4　Tests of inducing materials

果胶酶酶活/(U/mL)

添加物	m(麸皮):m(添加物)		
	7:1	6:2	5:3
苹果渣	120.65	113.55	110.97
高酯果胶	143.87	134.19	127.74
低酯果胶	174.19	163.87	161.29

可以看出,添加不同的诱导物对果胶酶的生成效果不同,以低酯果胶效果最好. 而且从不同的添加量来看,添加的比例越高果胶酶的酶活越低. 从而又考察了低酯果胶的添加量对果胶酶以及其他酶类生产的影响,结果见表 5.

表 5　低酯果胶不同的添加量对产酶的影响

Tab. 5　The effect of different addition amounts of inducing material on enzymes

每 100 g 干基果胶添加量/g	果胶酶酶活(U/mL)	纤维素酶酶活(U/mL)	木聚糖酶酶活(U/mL)	蛋白酶酶活(U/mL)	淀粉酶酶活(U/mL)
1	130.32	4.9	176.92	768.0	116.66
2	135.48	5.33	165.83	732.2	106.00
4	138.71	4.87	176.5	752.0	102.44
6	161.29	4.72	172.81	680.0	120.00
8	180.65	5.5	174.45	820.0	106.44
10	161.94	4.59	188.82	688.0	88.89

由表 5 可以看出,果胶酶酶活不是随着果胶添加量的减少而增大,当果胶添加量下降到每 100 g 干基为 8 g 果胶时其果胶酶酶活到达最高,而且其它酶也在此水平上也达到一定的酶活,由此确定最佳添加量为每 100 g 干物料为 8 g 果胶.

2.5　碳源的选择

以单糖、低聚糖及高聚糖等 11 种糖为不同碳源进行试验,不同糖类的添加量为每 100 g 干基 2 g,30 ℃培养 60 h 测酶活,结果见表 6. 从表中可以看出,木聚糖对蛋白酶以外的其它酶类的生成都有促进作用,但由于系纯试剂,价格较高,因此选用效果次之的蔗糖作为另加的碳源,同时在粥化酶生产时可根据不同的生产需要添加不同的碳源来提高某种特定的酶类的酶活.

表 6　碳源对产酶的影响

Tab. 6　The effect of different carbon resources on enzymes

碳源种类	果胶酶酶活/(U/mL)	纤维素酶酶活/(U/mL)	木聚糖酶酶活/(U/mL)	蛋白酶酶活/(U/mL)	淀粉酶酶活/(U/mL)
CK	146.45	4.71	176.51	830.4	104.66
葡萄糖	154.84	5.04	175.69	832.0	97.77
蔗糖	158.06	4.96	192.92	849.6	102.22
麦芽糖	154.84	4.60	184.72	744.0	93.55
木糖	151.61	4.29	188.82	800.0	97.77
淀粉	136.13	4.62	159.27	784.0	98.00
半乳糖	134.19	4.34	168.30	622.4	82.22
玉米粉	120.00	3.98	149.00	600.0	76.44
稻草粉	138.71	4.37	184.72	844.8	91.11
纤维素粉	133.55	5.49	131.35	752.0	97.55
CMC	143.87	4.47	172.40	891.2	84.44
木聚糖	174.20	5.51	208.52	816.0	116.66

注:CMC 为羧甲基纤维素.

如需要的纤维素酶酶活较高可以添加纤维素粉降低一定的其它酶的酶活来提高纤维素酶的酶活,从而达到生产加工要求.

2.6　氮源的选择

分为无机氮源和有机氮源. 本试验选用了 3 种有机氮源和 3 种无机氮源,分别代替基础培养基中的豆饼粉和$(NH_4)_2SO_4$,30℃培养 60 h 测酶活(见表 7,8)综合起来看,有机氮源中干酪素的效果最好,酵母膏对各种酶的产生都没有促进作用. 无机氮源中 NH_4NO_3 的作用较好. 但是考虑到经济性的原因,选用 NH_4NO_3 作为部分氮源比较合理.

3　结　论

通过紫外和亚硝基胍诱变获得一株突变株,果胶酶产酶较出发菌株提高了 130%,并且测定了其它酶的酶活水平. 果胶的添加对产酶有促进作用,每 100 g 干基添加 8 g 果胶时效果最好. 考察了不同碳源和氮源对产酶的影响,可以看出不同的添加

万方数据

物对各种酶类的产酶水平有不同的影响，因此根据不同的生产要求调整各种酶的产酶水平及产酶比例是完全可能的.

表7 有机氮源的添加对产酶的影响

Tab.7 The effect of different organic nitrogen resources on enzymes

有机氮源种类	添加量/g	果胶酶酶活/(U/mL)	纤维素酶酶活/(U/mL)	木聚糖酶酶活/(U/mL)	蛋白酶酶活/(U/mL)	淀粉酶酶活/(U/mL)
豆饼粉	1	145.16	4.78	175.68	798.4	105.55
豆粕粉	1	141.93	4.90	170.35	782.4	106.89
酵母膏	1	120.64	4.21	153.93	761.6	94.89
干酪素	0.5	176.13	4.89	174.45	851.2	101.33

表8 无机氮源对酶活组成的影响

Tab.8 The effect of different inorganic nitrogen resoures on enzymes

无机氮源种类	添加量/g	果胶酶酶活/(U/mL)	纤维素酶酶活/(U/mL)	木聚糖酶酶活/(U/mL)	蛋白酶酶活/(U/mL)	淀粉酶酶活/(U/mL)
$(NH_4)_2SO_4$	0.1	145.16	4.78	175.68	798.4	105.55
NH_4Cl	0.08	140.64	4.61	158.44	764.8	96.00
NH_4NO_3	0.06	158.06	4.81	176.51	816.0	107.33
尿素	0.045	124.52	4.34	139.56	689.0	90.66

参考文献：

[1] 胡学智. 国内外酶制剂工业及其应用[J]. 工业微生物，2001，31(3)：41－46.

[2] 赵允麟，赵莉. 黑曲霉复合酶系组成的调节与控制[J]. 工业微生物，2001，31(4)：35－39.

[3] Somogyi, Michael. Notes on sugar determination[J]. **J Biol Chem**，1952，195(1)：19－23.

[4] Mary Mandels, Raymond Andreotti, Charles Roche. Measurement of saccharifying cellulase[J]. **Biotech and Bioeng Symp**，1976，20(6)：21－23.

[5] Bailey, Michael J, Biely, *et al*. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity[J]. **J Biotechnol**，1999，23(3)：257－270.

[6] 邬显章. 酶的工业生产技术[M]. 吉林：吉林科学出版社，1998.

[7] 施安辉，于温旭. 乾氏曲霉 $78B_2$ 的生物学特性、酶系分析及其再食醋酿造中的应用试验[J]. 食品科学，1998，(2)：1－5.

[8] 诸葛健，王正祥. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京：中国轻工业出版社，1994.

[9] 高东，段作营，张怀强，等. Aspergillus usamii B_1-12 果胶酶合成诱导的初步研究[J]. 山东大学学报，1992，27(1)：115－123.

（责任编辑：杨 萌）

万方数据