

果胶酶 G5512 菌株深层液体发酵 中试及提取工艺研究^{*}

余秋生^{1,2}, 郭蔼光¹, 王建林², 邵建宁³, 晁开¹, 刘海森³

(1 西北农林科技大学 生命科学院, 陕西 杨凌 712100;

2 兰州大学 生命科学院, 甘肃 兰州 730000; 3 甘肃省科学院 生物研究所, 甘肃 兰州 730000)

[摘要] 以炭黑曲霉(*Aspergillus carbonarius*) AS 3 396 的高产果胶酶突变株 G 5512 为生产菌, 在 500 L 发酵罐中进行深层液体发酵中试。结果表明, 在发酵过程中分别进行补料和调节 pH, 能大幅度提高酶活性; 同时进行补料和调节 pH, 以高酯果胶为底物时发酵液最高酶活性可达 1 248 17 U/mL, 以低酯果胶为底物时达 2 235 75 U/mL, 分别较出发菌株提高了约 2 倍和 11 倍。通过试验, 还确定了从发酵液中分离提取果胶酶的最佳工艺流程: 发酵酶液→超滤→酒精沉淀→真空干燥, 其酶活性回收率在以高酯果胶为底物时达到 89.3%, 以低酯果胶为底物时为 80.3%。

[关键词] 果胶酶; 突变菌株 G5512; 深层液体发酵; 提取工艺

[中图分类号] TS201.2⁺5

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)05-0085-04

果胶酶是一种能分解果胶的酶系的总称^[1], 它在果品加工和纺织工业等领域的应用越来越广泛, 需求量也愈来愈大。传统的生产果胶酶的工业化方法为固体发酵法, 该法耗料多, 劳动强度大, 易污染, 且质量不稳定, 而深层液体发酵法可克服上述不足。目前, 国内外对液体生产果胶酶的研究较少, 一般为摇瓶发酵, 最大仅为 10 L 发酵罐水平^[2~4]。

本研究以炭黑曲霉(*Aspergillus carbonarius*) AS 3 396 为出发菌, 经物理、化学方法诱变筛选, 获得 1 株高产果胶酶突变株 G5512^[5,6], 先在 1 L 通气培养玻璃瓶和日本产 MD-5L 发酵罐中进行发酵试验, 初步确定各种发酵参数, 然后在 500 L 发酵罐上进行了中试, 现将试验结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 炭黑曲霉突变株 G5512 由 *A. carbonarius* AS 3 396 诱变选育而来, 该出发菌株由中国科学院微生物研究所提供。出发菌株摇床发酵酶活性, 在以高酯果胶和低酯果胶为底物时分别为 415 和 181 U/mL^[6]。

1.1.2 培养基 斜面培养基配方为察氏培养基^[7]。

种子培养基配方: 蔗糖 50 g/L, 辅料。发酵培养基配方: 配方 0 为麦麸 50 g/L, 甜菜渣 50 g/L, 蔗糖 30 g/L, 辅料; 配方 1 为麦麸 10 g/L, 甜菜渣 50 g/L, 辅料。其中辅料成分包括: (NH₄)₂SO₄ 10 g/L, MgSO₄ 1 g/L, K₂HPO₄ · 3H₂O 1 g/L, KCl 0.5 g/L, FeSO₄ · 7H₂O 0.1 g/L。

1.2 试验方法

1.2.1 工艺流程^[8] 试管斜面菌种→茄子瓶扩大菌种→种子罐培养液体菌种→发酵→发酵酶液→过滤→超滤浓缩→ $\begin{cases} \rightarrow \text{喷雾干燥} \\ \text{— 保护剂 —} \end{cases}$ 酒精沉淀→真空干燥

1.2.2 种子罐培养条件 种子罐总容积为 50 L, 培养基装量 40 L, 初始 pH 4.0, 培养温度 30℃, 罐压 0.05 MPa, 通入无菌压缩空气, 每分钟通气量与培养基装量的体积比为 (0.8~1.2):1.0, 搅拌速度 100~135 r/min, 接种量为 1 支 300 mL 茄子瓶斜面孢子悬液, 培养时间 32~36 h。

1.2.3 发酵罐培养 (1) 发酵罐培养条件。发酵罐总容积 500 L, 培养基装量 350 L, 初始 pH 4.5, 培养温度 30℃, 罐压 0.03~0.05 MPa, 通入无菌压缩空气, 每分钟通气量与培养基装量的体积比为 (1.0~1.3):1.0, 搅拌速度 100~300 r/min, 接种

^{*} [收稿日期] 2003-04-25

[基金项目] 甘肃省科技攻关项目 (GZ914-2-19)

[作者简介] 余秋生(1963-), 男, 陕西武功人, 工程师, 主要从事微生物发酵工程研究。

量(体积分数)8%~10%,培养时间54~67 h。(2)补料。从发酵24 h开始,每8 h补料10 L,共补料4次;补料成分:蔗糖100 g/L,低酯果胶50 g/L,牛肉膏50 g/L。(3)调pH。用NaOH调整发酵液的pH值在4.0~4.5。(4)试验次数。发酵培养基筛选、补料及调pH对产酶效率的影响均进行5次重复试验;发酵产酶进行3次重复试验。

1.2.4 果胶酶活性的测定^[6,9] 取pH 3.5(高酯果胶)或pH 4.5(低酯果胶)的0.05 mol/L磷酸氢二钠和0.025 mol/L柠檬酸缓冲液配制的0.25%的果胶溶液0.5 mL,加入适当稀释的酶液0.2 mL,50℃水浴保温1 h,用Somogyi比色法^[10]测定水解产物的还原糖。将1 h产生1 mg还原糖(以半乳糖醛酸计)的酶量计为一个酶活力单位(U)。

1.2.5 果胶酶的分离提取 发酵液经0.175 mm尼龙滤布过滤后离心,得澄清的发酵酶液,后续试验均采用该酶液。(1)酒精沉淀。将发酵酶液10 L+淀粉50 g(处理1)和发酵酶液10 L(处理2)分别与体积分数95%的酒精按1:3比例混合,比较其酶活性回收率。(2)喷雾干燥。以丹麦ANHYDRO喷雾干燥器对发酵酶液进行离心式喷雾,热风温度300℃,出风温度150℃。(3)超滤。选用截留分子质量为6 000 u的生物型中空纤维超滤器浓缩果胶酶发酵液,外压式,压力0.02~0.04 MPa,膜通量50 L/(MPa·min),每支4 m²,3支串联,三级超滤。

2 结果与分析

2.1 发酵培养基的筛选

筛选菌种时的摇床发酵培养基在以高酯果胶和低酯果胶为底物时,其酶活性分别为415和181 U/mL^[6]。由表1可知,大罐发酵时其对应的酶活性均有所提高,且配方1优于配方0,故选用配方1作为后续试验的发酵配方。该试验为后续试验的对照。

表1 培养基配方对发酵产酶的影响

Table 1 Effect of different combinations of medium on pectinase productivity

培养基编号 Type of medium	酶活高峰 时间/h The time of the highest enzyme activity	酶活性/(U·mL ⁻¹) Enzyme activity	
		高酯果胶 为底物 For high ester pectin	低酯果胶 为底物 For low ester pectin
0	65	920	1 280
1	60	1 074.6	1 393.4

2.2 补料对产酶效率的影响

由表2得知,随着发酵的继续,培养基中营养消耗较快,菌体会随之衰老、自溶,该发酵系统的产酶

效率相应较低;加入含有果胶酶诱导物的补料,可使发酵系统的产酶效率大幅度提高。

表2 补料对产酶效率的影响

Table 2 Effect of additional material on pectinase productivity

组别 Type	酶活高峰 时间/h The time of the highest enzyme activity	酶活性/(U·mL ⁻¹) Enzyme activity	
		高酯果胶 为底物 For high ester pectin	低酯果胶 为底物 For low ester pectin
补料 Additional material	61.0	1 150.3	1 721.2
CK	60.0	1 074.6	1 393.4

2.3 调pH值对产酶效率的影响

该菌体生长最适pH为4.0~4.5,在发酵过程中,菌体进行着旺盛的代谢活动,使得培养基pH值降低至3.0以下,从而抑制了菌体的正常代谢活动。由表3知,及时调整pH值到4.0~4.5,能促进菌体生长,提高产酶能力。

表3 调pH值对产酶效率的影响

Table 3 Effect of adjusting the pH value of fermentation liquor on pectinase productivity

组别 Type	酶活高峰 时间/h The time of the highest enzyme activity	酶活性/(U·mL ⁻¹) Enzyme activity	
		高酯果胶 为底物 For high ester pectin	低酯果胶 为底物 For low ester pectin
调节pH值 Adjusting the pH value	63	1 178.5	1 963.2
CK	60	1 074.6	1 393.4

2.4 发酵产酶

以配方1为发酵培养基,在发酵过程中分批补料并不断调整发酵液的pH值,所得果胶酶在以高酯果胶和低酯果胶为底物时的酶活性分别较对照提高了约16%和60%(表4);与出发菌株相比,则分别提高了约2倍和11倍。

表4 发酵产酶的最高酶活性

Table 4 The highest enzyme activity in the course of fermentation

组别 Type	酶活高峰 时间/h The time of the highest enzyme activity	酶活性/(U·mL ⁻¹) Enzyme activity	
		高酯果胶 为底物 For high ester pectin	低酯果胶 为底物 For low ester pectin
试验 Test	61.7	1 248.17	2 235.75
CK	60	1 074.6	1 393.4

2.5 分离提取

果胶酶为具生物活性的热敏性蛋白质,在常温下,处于溶液中的酶活性降低很快,这一特性为工业化分离提取增加了难度,本试验探索了常温下分离

提取果胶酶的有效方法。

剂(处理 1)后用酒精沉淀, 对酶有一定保护作用, 酶活性回收率较未加淀粉的处理 2 高, 达 80% 以上。

2 5 1 酒精沉淀 由表 5 可知, 酶液中加淀粉保护

表 5 酒精沉淀分离果胶酶的效果

Table 5 Effect of separating pectinase in alcohol

样品处理 Sample proces- sing	干酶粉量/g Amount of dry enzyme dust	对高酯果胶的酶活性 For high ester pectin			对低酯果胶的酶活性 For low ester pectin		
		酶活性 Enzyme activity	总酶活性/MU Total enzyme activity	回收率/% Received efficiency	酶活性 Enzyme activity	总酶活性/MU Total enzyme activity	回收率/% Received efficiency
发酵酶液 Femmentation enzyme liquor		820 U/mL	8 2		1 98 kU/mL	19 8	
处理 1 Treatment 1	541	12 6 kU/g	6 83	83 3	30 4 kU/g	16 4	82 9
处理 2 Treatment 2	483	12 6 kU/g	6 10	74 4	31 1 kU/g	15 0	75 9

2 5 2 喷雾干燥 该方法是从溶液中纯化、干燥热敏物质的一种有效方法。发酵酶液喷雾干燥后得到酶粉, 酶活性回收率在以高酯果胶和低酯果胶为底物时分别为 50 5% 和 70 4%。

表 6 喷雾干燥分离果胶酶的效果

Table 6 Effect of separating pectinase by spraying-fog dry

样品 Sample	体积或重量 Volume or weigh	对高酯果胶的酶活性 For high ester pectin			对低酯果胶的酶活性 For low ester pectin		
		酶活性 Enzyme activity	总酶活性/MU Total enzyme activity	回收率/% Received efficiency	酶活性 Enzyme activity	总酶活性/MU Total enzyme activity	回收率/% Received efficiency
发酵酶液 Femmentation liquor enzyme 酶粉 Enzyme dust	800 L	297 U/mL	237		600 U/mL	480	
	37. 3 kg	3 220 U/g	120	50 5	9 070 U/g	338	70 4

2 5 3 超 滤 果胶酶是酶蛋白, 通过选用截留分子质量 6 000 u 的中空纤维超滤膜, 使果胶酶酶液得到浓缩后, 回收率可达 80% 以上(表 7)。

2 5 4 超滤浓缩并酒精沉淀 由表 8 知, 超滤浓缩酶液在以高酯果胶和低酯果胶为底物时, 其酶活性回收率分别为 94% 和 89 2%; 超滤浓缩酶液经酒精沉淀、真空干燥后所得酶粉, 其对应的酶活性回收率分别为 95% 和 90%。在超滤浓缩后用酒精沉淀分离与单纯用酒精沉淀相比, 可节省大量酒精, 回收效果更好。总回收率为超滤浓缩酶液酶活性回收率与酒精沉淀酶活性回收率的乘积, 即最终的酶活性回收

表 7 超滤浓缩回收果胶酶的效果

Table 7 Effect of separating pectinase by ultrafiltration

反应底物 Reaction substrate	原酶液活性/ (kU · mL ⁻¹) Enzyme activity in initial enzyme liquor	超滤浓缩 酶活性/ (kU · mL ⁻¹) A activity of enzyme concentra- ted by ultra- filtration	回收率/% Received efficiency
高酯果胶 High ester	1 12	5 92	83 3
低酯果胶 Low ester	2 11	12 1	90 9

表 8 超滤浓缩并酒精沉淀分离果胶酶的效果

Table 8 Effect of separating pectinase by ultrafiltration and alcohol

样品 Sample	体积或重量 Volume or weight	对高酯果胶的酶活性 For high ester pectin			对低酯果胶的酶活性 For low ester pectin		
		酶活性 Enzyme activity	总酶活性/MU Total enzyme activity	回收率/% Received efficiency	酶活性 Enzyme activity	总酶活性/MU Total enzyme activity	回收率/% Received efficiency
发酵酶液 Femontation enzyme liquor	80 L	1 13 kU/mL	90 7		1 9 kU/mL	152	
超滤浓缩酶液 Ultra- filtrated enzyme liquor	9 5 L	8 97 kU/g	85 2	94	14 2 kU/g	135	89 2
酒精沉淀的酶粉 Pectinase dust from precipitated in alcohol	700 g	116 kU/g	81	95	174 kU/g	122	90
总回收率% Total re- ceived efficiency	8 75 g/L			89 3			80 3

3 结 论

根据以上试验结果可知,选用超滤加酒精沉淀提取果胶酶的效果最优。其流程为:发酵至终点,发酵液离心粗滤(转速 4 000 r/min,滤布 0.175 mm),粗滤发酵酶液再经超滤浓缩,获得高酶活性的超滤

浓缩酶液,然后加入淀粉保护剂进行酒精沉淀,即有果胶酶沉淀析出,过滤沉淀物并进行真空干燥,便可获得果胶酶成品;也可对果胶酶超滤浓缩液进行喷雾干燥而得其成品,此法酶活性回收率虽较低,但生产程序简单。

[参考文献]

- [1] Rombouts F M, Pilnikw. Economic microbiology[J]. Microbial Enzymes and Bioconversions, 1980, (5): 228- 272
- [2] 陈 峰, 赵学慧. 液体发酵生产霉菌果胶酶的工艺条件[J]. 中国酿造, 1998, (5): 4- 5
- [3] 周仕春, 邵继荣. 果胶酶 SM 40-6 菌株的选育及其液体发酵条件[J]. 西南农业学报, 1996, 9(4): 63- 68
- [4] 项 明, 秦 淮, 巫华美, 等. 禾黑芽枝霉诱变体的果胶酶生产液体发酵动态研究[J]. 贵州科学, 1997, 15(2): 81- 85
- [5] 刘海森, 周剑平, 路等学, 等. 黑曲霉果胶酶辐射杀菌研究[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 1991, 9(1): 59- 60
- [6] 刘海森, 丁雨辰, 周剑平, 等. 产果胶酶的菌种选育及发酵条件[J]. 微生物学报, 1993, 33(3): 199- 203
- [7] 中国微生物菌种保藏管理委员会. 中国菌种目录[M]. 北京: 轻工业出版社, 1983. 405
- [8] 陈哲超, 谢必峰, 林宇野, 等. 黑曲霉发酵生产果胶酶的研究[J]. 福建师范大学学报, 1995, 11(4): 68- 73
- [9] 崔福绵, 刘 茵, 张树政. 果胶酶 CP-85211 菌株的选育及其液体发酵条件的研究[J]. 微生物学报, 1987, 27(1): 37- 44
- [10] 北京大学生物系生物化学教研室. 生物化学实验指导[M]. 北京: 人民教育出版社, 1983. 36- 39

Pilot tests of deep fermentation for the pectinase mutant strain G5512 and extracting technology

SHE Qiu-sheng^{1,2}, GUO Ai-guang¹, WANG Jian-lin², SHAO Jian-ni³, CHAO Kai¹, LIU Hai-sen³

(1 College of Life Sciences, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 College of Life Science, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000, China;

3 Institute of Biology, Gansu Academy of Science, Lanzhou, Gansu 730000, China)

Abstract: A mutant strain G5512 with high yield of pectinase, which is suitable for the fermentation, was obtained from *Aspergillus carbonarius* A S 3396 by chemical mutation using N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) and treatment with Co⁶⁰ radiation. Pilot tests of deep fermentation have been carried out in a 500 liter tank by using the mutant strain G5512. The results showed that the enzyme activity of fermentation was 1 248.17 U/mL for high ester pectin and 2 235.75 U/mL for low ester pectin. The activity was three times in high ester pectin than the original strain's, and it was twelve times in low ester pectin. The optimal technological flow was obtained from collecting a pectinase of the fermentation liquor.

Key words: pectinase; mutant strain G5512; deep fermentation; extracting technology