

一株果胶酶产生菌的筛选、鉴定及其产酶条件研究

袁志辉*

湖南科技学院生命科学与化学工程系, 永州 425100

摘要: 为从自然界寻找高效的果胶酶生产菌, 以用于后续的研究和应用, 采集富含果胶质的土壤样品, 从中筛选分离出 11 株产果胶酶菌株。以其中一株产酶活力最高的菌株 HYL6 为研究对象, 对其进行了种属鉴定并初步探索了最佳的产酶条件。菌株鉴定结果表明, 菌株 HYL6 为芽孢杆菌属。产酶条件优化及正交试验表明, 菌株 HYL6 最佳的产酶条件组合为: 可溶性淀粉 5 g/L, 蛋白胨 15 g/L, pH 值 7 时, 36 °C、180 rpm 振荡培养 34 h。在这一条件下进行发酵, 最高产酶活力可达 415 U/mL。

关键词: 果胶酶; 酶活力; 产酶条件

中图分类号: Q939.96

文献标识码: A

Screening and Identification of Pectinase Producing Strain and Study on Its Pectinase-producing Conditions

YUAN Zhi-hui*

Hunan University of Science and Engineering, Hunan Yongzhou 425100, China

Abstract: The aim of this work was to screen highly pectinase producing bacteria for following laboratorial research and industrial application. The soil sample that is rich in pectin substance was collected from ramie field located in the suburbs of Ling-Ling district for screening of pectinase producing bacteria, and 11 stains were gained by enrichment procedure and screening test successively. Strain HYL6 which produced the highest enzyme activity tested by 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method in 11 strains was identified as *Bacillus* sp. and its pectinase producing conditions were optimized by one-factor experiments and orthogonal test successively. The optimized conditions were as follows: soluble starch 5 g/L, peptone 15 g/L, pH 7, and shaking fermentation 34 hours at 36 °C, 180 rpm. The activity of pectinase produced by the strain HYL6 under the optimal conditions reached 415 U/mL.

Key words: pectinase; enzyme activity; pectinase-producing conditions

果胶酶(E. C. 3. 2. 1. 15)是一类分解果胶质的酶的总称^[1], 是含有多种组分的复合酶, 在食品工业、医药工业、纺织工业、造纸工业、环境领域、生物技术领域、烟叶处理和饲料工业等行业或领域中具有广泛应用^[2-5]。天然来源的果胶酶广泛存在于动植物和微生物中, 但由于材料获取不易、提取条件复杂等原因, 动植物来源的果胶酶难以大规模的提取制备。而微生物具有生长周期短, 培养条件简单易控, 分布范围广泛等优势, 因此微生物成为果胶酶生产和提取的重要来源。

目前生产微生物果胶酶的菌种很多, 来源极其广泛, 包括细菌、霉菌、酵母菌和放线菌。如芽孢杆

菌属(*Bacillus*)、青霉菌属(*Penicillium*)、欧文氏菌(*Erwinia*)、根霉属(*Rhizopus*)、曲霉属(*Aspergillus*)、克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)、侧孢霉属(*Sporotrichum*)、多子菌属(*Polyporus*)、密螺旋体菌属(*Trepone*)、酵母属(*Saccharomyces*)、刺盘孢属(*Colletotrichum*)、螺孢菌属(*Spirillospora*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、毛霉属(*Mucor*)、毕赤氏酵母属(*Pichia*)等。细菌在微生物中具有生长时间更短, 生长条件更为简单的特点, 因此本文以细菌为研究目标, 从富含果胶质的土壤中筛选分离能高效产生果胶酶的菌株。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土样

湖南省永州市零陵区郊苕麻地表层土壤。

收稿日期: 2013-03-04 接受日期: 2013-07-02

基金项目: 湖南科技学院科学研究项目(10XKYTC014); 永州市科技计划项目(2012-17)

* 通讯作者 Tel: 86-746-6381164; E-mail: zhh_yuan@126.com

1.1.2 试剂

果胶,美国 Sigma 公司产品;3,5-二硝基水杨酸、 KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 、乙酸铜,国药集团化学试剂有限公司产品;乙二胺四乙酸二钠,天津纵横兴工贸有限公司产品;蛋白胨,北京奥博星生物技术有限公司产品;葡萄糖、蔗糖等均为国产化学分析纯试剂。

1.1.3 培养基

富集培养基(g/L):牛肉膏 2,蛋白胨 2,NaCl 5, K_2HPO_4 1, KH_2PO_4 0.3, pH 7.0-7.2, 分别逐量加入果胶至 5、10、15、20 g/L 完成富集驯化过程。分离培养基(g/L):果胶 5,蛋白胨 20, 酵母抽提物 5, NaCl 5,牛肉膏 5,琼脂 20, pH 7.0-7.2。产酶液体培养基(g/L):果胶 10, LB 肉汤培养基 21, pH 7.0-7.2。基准培养基(g/L):葡萄糖 10,蛋白胨 10, K_2HPO_4 1, KH_2PO_4 0.3, pH 7.0-7.2。所有培养基均为 121 °C 灭菌 20 min。

1.2 方法

1.2.1 富集驯化

称取土壤样品 1 g, 加入到一个盛有 99 mL 无菌水带有玻璃珠的三角瓶中, 将样品充分打散、混匀, 即成 10^{-2} 泥浆稀释液, 然后再按 10 倍稀释法依次稀释到 10^{-5} 。吸取 10 mL 稀释液至 90 mL 富集培养基中, 37 °C 振荡培养 1~2 d。

1.2.2 初筛分离

取富集培养液 10 mL 梯度稀释至 10^{-5} , 然后取 1 mL 稀释液均匀涂布于分离培养基平板上 37 °C 倒置培养 1~2 d。将待鉴定的菌落用牙签转移到另一分离培养基平板上, 37 °C 培养 2~4 d; 往培养皿中加入适量的饱和乙酸铜溶液, 染色 15 min; 弃去染液, 若细菌产生果胶酶, 则在菌落的周围会出现清晰的透明圈, 依据是否产生透明圈来选择产酶菌株^[6]。将得到的产酶菌株进行划线纯化, 用于下一步的复筛。

1.2.3 复筛及酶活测定

通过 DNS 法测定果胶酶活性进行复筛^[7]。将纯化后的菌落接种到 30 mL 产酶液体培养基中, 于 37 °C、180 rpm 下振荡培养 48 h, 培养液 3000 rpm、4 °C 离心 5 min, 上清液即为粗酶液。取 0.5% 果胶溶液 5 mL 与 5 mL 粗酶液混合, 37 °C 温育 0.5 h, 沸水浴中加热 5 min 灭活。取 1 mL 反应液与 1 mL DNS 试剂、8 mL 蒸馏水混合, 沸水浴加热 5 min, 迅速冷却。用分光光度计在 540 nm 处测其吸光度值 C 。对照液配制: 沸水浴加热灭活 10 min 的 0.5 mL 的

稀释酶液与 0.5 mL 0.5% 果胶溶液充分混合。

$$\text{酶活} = (A \times S \times D \times 1000) / (0.5 \times 10)$$

式中, A 为吸光度, S 为测得光吸收在标准曲线上对应的半乳糖醛酸量, D 为酶液的稀释系数。标准曲线的制作参考王薇^[1] 的方法。在以上测定条件下, 1 min 水解果胶产生 1 μg 还原糖(以半乳糖醛酸计)所需酶量定义为 1 个酶活力单位(U)。

1.2.4 菌株的形态学和生理生化鉴定

按《伯杰细菌鉴定手册》(第 8 版) 中菌种鉴定方法进行。

1.2.5 产酶条件优化

分别将不同碳源、氮源、pH 值替代基准培养基中相应因素及不同生长时间和生长温度进行单因素实验。根据单因素实验结果选取碳源浓度、氮源浓度及 pH 值 3 个重要因素, 进行 3 因素 3 水平 L_9 (3^3) 正交实验。根据得出的最佳产酶条件进行实验验证并测定其酶活。

2 结果与分析

2.1 菌株筛选

经过富集培养基的驯化及分离培养基的初筛分离, 从采集的土样中共获得能够产生水解透明圈的菌株 11 株。DNS 法测定酶活的结果表明, 在筛选到的 11 个菌株中, 最高酶活为 312 U/mL, 最低酶活为 107 U/mL。将最高酶活的菌株命名为 HYL6, 将其作为进一步研究对象。

2.2 菌株鉴定

HYL6 菌株在分离培养基上的特征为: 菌落较大, 乳白色, 表面干燥, 中央有褶皱, 不透明。油镜观察菌体形态及革兰氏染色、芽孢染色结果显示: 菌体呈直杆状, 两端为圆形, 无荚膜, 鞭毛侧生, 单个细胞大小约为 $0.8 \times 3 \mu\text{m}$, 革兰氏染色为阳性, 产芽孢, 大小约为 $0.8 \times 1.5 \mu\text{m}$, 形状圆柱形, 位置靠近细胞中央。生理生化实验结果见表 1。综合菌落特征、菌体形态及生理生化特征, 初步判断 HYL6 为芽孢杆菌属。

表 1 HYL6 菌株生理生化特性

Table 1 Biochemical and physiological characteristics of strain HYL6

检测项目 Testing item	检测结果 Results
淀粉 Starch	+

葡萄糖 Glucose	+
蔗糖 Sucrose	+
尿素 Urea	-
明胶液化 Gelatine hydrolysis	+
马尿酸盐 Hippurate	-
D-阿拉伯糖 D-Arabinose	+
甘露醇 Mannitol	+
M. R.	+
产气 Gas producing	-
接触酶 Catalase	-
V. P.	-
柠檬酸盐利用 Utilization of Citrate	+
吲哚 Indole	+
溶菌酶 Lysozyme	+

2.3 产酶条件优化

2.3.1 最佳产酶时间

在产酶液体培养基中,37 ℃、180 rpm 培养不同时间,菌株 HYL6 产果胶酶情况见图 1。由图可知,培养液中果胶酶活力的变化趋势与细菌的生长曲线较相似,即在细菌生长的不同阶段,其产酶活力会发生变化,说明果胶酶的产生与其生长有着较为密切的关系。果胶酶活力在 HYL6 生长至 34 h 达到最大,为 320 U/mL。

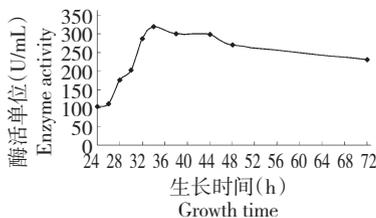


图 1 不同生长时间产酶活力曲线

Fig. 1 The curve of pectinase production at different growth period

2.3.2 最佳产酶温度

在产酶液体培养基中,不同培养温度、180 rpm 培养 34 h,菌株 HYL6 产果胶酶情况见图 2。由图可知,发酵温度为 36 ℃时,果胶酶活力最高,为 309 U/mL,此温度与 HYL6 的最佳生长温度 37 ℃接近,因此也可以 37 ℃作为最佳产酶温度。生长温度大于 36 ℃时,果胶酶活力下降,在 38 ℃时,下降幅度不大,酶活为 298 U/mL。当温度高于 38 ℃时,酶活出现明显的下降,至 42 ℃时,其活力降为 143 U/

mL。这种现象与 HYL6 在偏离最佳生长温度之外的生长情况是一致的。

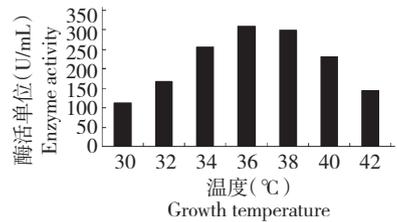


图 2 不同生长温度下产酶活力

Fig. 2 Pectinase production at different culturing temperature

2.3.3 最佳产酶 pH 值

将 HYL6 接种于不同 pH 值的产酶液体培养基中,36 ℃、180 rpm 振荡培养 34 h,产果胶酶情况见图 3。从图上可以看出,在 pH6-8 的范围内,HYL6 都能产生较高的果胶酶活,其中在 pH7.5 时为最高的 321 U/mL。

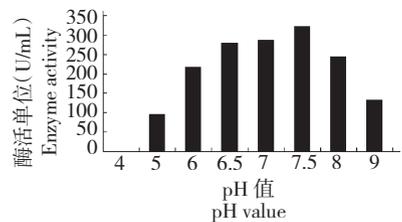


图 3 不同生长 pH 值下产酶活力

Fig. 3 Pectinase production at different culturing pH

2.3.4 最佳产酶氮源

将 HYL6 菌株接种于用 10 g/L 不同氮源替代基础培养基中的蛋白胨,pH 7.5、36 ℃、180 rpm 振荡培养 34 h,产果胶酶情况见图 4。由图可知,(NH₄)₂SO₄ 为氮源时酶活最低 102 U/mL,以蛋白胨为氮源时活力最高为 204 U/mL。

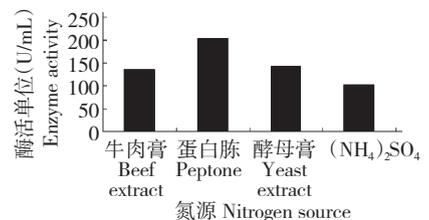


图 4 不同氮源条件下产酶活力

Fig. 4 Pectinase production at different nitrogen sources conditions

2.3.5 最佳产酶碳源

用不同碳源取代基础培养基中的葡萄糖,pH 7.5、36 ℃、180 rpm 振荡培养 34 h 进行最佳产酶碳

源研究,结果见图5。由图可知,产酶活力最高碳源为可溶性淀粉,为321 U/mL。

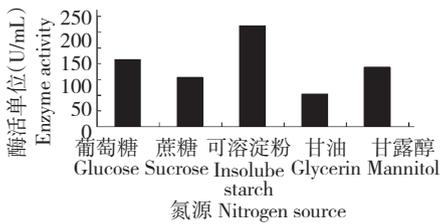


图5 不同碳源条件下产酶活力

Fig. 5 Pectinase production at different carbon sources conditions

2.3.6 果胶酶发酵最佳条件

根据以上实验结果,设计了3因素3水平的正交试验(3个重复),分析结果见表2。

由表2结果可知,对果胶酶发酵影响最大是pH值,发酵最佳的条件组合是A₁B₃C₂即可溶性淀粉5 g/L,蛋白胨15 g/L,pH值7时,36℃、180 rpm振荡培养34 h。验证实验结果显示,利用这一条件组合进行发酵,产生的果胶酶活力可达415 U/mL。

表2 果胶酶发酵的正交试验表

Table 2 Result of orthogonal test for pectinase fermentation

实验编号 No.	A 碳源 Carbon source (g/100mL)	B 氮源 Nitrogen source (g/100mL)	C pH 值	酶活 Enzyme activity (U/mL)
1	0.5	0.5	6	241
2	0.5	1	7	317
3	0.5	1.5	8	372
4	1	0.5	8	233
5	1	1	6	203
6	1	1.5	7	355
7	1.5	0.5	7	306
8	1.5	1	8	190
9	1.5	1.5	6	121
K ₁	310	260	188	
K ₂	264	237	326	
K ₃	206	282	265	
R	46	45	138	

3 结论

从富含果胶质的土壤中取样,经过确定一套有效可行的筛选方法,从中筛选出11株能够在含果胶的平板上产生水解透明圈的细菌菌株。通过DNS

法测定酶活,选择一株产酶活力最高的菌株命名为HYL6,进行鉴定及初步的发酵条件优化研究。

HYL6菌株经过形态学观察和生理生化实验初步确定为芽孢杆菌属。通过一系列产酶因素的研究,确定最佳产酶生长时间为34 h,最佳产酶生长温度为36℃,最佳利用碳源和氮源分别是可溶性淀粉和蛋白胨,pH值为7.5。在单因素研究的水平上选择碳源、氮源、pH值进行3因素3水平正交试验,结果表明发酵最佳的条件组合是:可溶性淀粉5 g/L,蛋白胨15 g/L,pH值7时,36℃、180 rpm振荡培养34 h。验证实验确证了这一结果。

用HYL6菌株在正交实验优化的条件下进行发酵,最高产酶活力可达415 U/mL,该结果与王媛等^[8]的10758 U/mL相比有较大差距,但其所使用的菌株是何种何属在结果中没有报道,并且其所采用酶活单位在文中也没有明确定义,因此不具可比性。而同是芽孢杆菌属产果胶酶发酵条件研究的翟秋梅等^[9]并没有说明其产酶活力大小,因此也无从比较。因此只能从本文所筛选到的11株菌进行比较,本研究所选择的菌株产酶活力比筛选到的最低产酶活力高出大约4倍,具备进一步研究的潜力如通过人工诱变的方法进一步提高其产酶活力。

参考文献

- 1 Wang W(王薇), Zhang X(张琇), Bao YW(包邑汶), et al. Separation of pectinase producer and study on its pectinase-producing condition. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 2011, 39:11944-11946.
- 2 El-Sheekh MM, Ismail AS, El-Abd MA, et al. Effective technological pectinases by *Aspergillus carpus* NRCI utilizing the Egyptian orange juice industry scraps. *Int Biodeterior Biodegrad*, 2009, 63:12-18.
- 3 Ahlawat S, Dhiman SS, Battan B, et al. Pectinase production by *Bacillus subtilis* and its potential application in biopreparation of cotton and micropoly fabric. *Process Biochem*, 2009, 44:521-526.
- 4 Kashyap DR, Vohra PK, Chopra S, et al. Applications of pectinases in the commercial sector; a review. *Bioresour Technol*, 2001, 77:215-227.
- 5 Dai TC(代同成), Fan JQ(范坚强), Zheng HN(郑湖南), et al. Identification of pectin-degrading strains isolated from tobacco strips and evaluation of its pectinase activity. *Microbiol Chin* (微生物学通报), 2011, 38:816-824.