

菊粉酶高活力菌株的筛选及其产酶研究

贾英民

(河北农业大学食品科学系, 保定 071001)

赵学慧

(华中农业大学食科系, 武汉 430070)

摘要 利用透明圈法从 30 个菊粉酶活力菌株中筛选出两个高活力菌株 H_8 和 M_{89} , 两菌株均鉴定为黑曲霉。 H_8 和 M_{89} 产酶的最佳碳源是菊粉, H_8 最适氮源是 $(NH_4)_2SO_4$, M_{89} 以草酸胺最好, $(NH_4)_2SO_4$ 仅次于草酸胺。两菌株产酶的环境条件有一定差异, H_8 菌株以起始 pH7.0、29℃、150r/min 摇瓶培养产酶活力较高, M_{89} 以 pH7.0、32℃、210r/min 为宜, 菊芋汁产酶水平较合成培养基高, 在菊芋汁添加 $(NH_4)_2SO_4$ 的发酵液中, H_8 和 M_{89} 产酶分别在 120h 和 130h 达到高峰, H_8 在液体发酵时产酶活力低于 M_{89} , 在固体发酵时, H_8 菌株产酶明显高于 M_{89} 菌株。

关键词 菊粉酶, 黑曲霉, 菊芋

菊粉(Inulin)是由 β -2.1 键连接的多聚果糖, 其还原性末端含有一葡萄糖分子。菊粉富含于菊芋(*Jerusalem artichoke*)等多种菊科植物中, 菊芋块根含 70%~80% 菊粉^[1,2]。利用菊粉酶直接水解菊粉(或菊芋汁)生产果糖或超高果葡糖浆(UHFGS)已显示出巨大的工业应用潜力^[3~6]。UHFGS 果糖含量为 90%~95%^[7,8], 而利用淀粉生产的果葡糖浆仅含 42%~45% 的果糖^[9], 利用果糖或 UHFGS 替代蔗糖或果葡糖浆在食品工业上应用, 能避免由蔗糖、葡萄糖引起的龋齿、高血压、糖尿病等副作用^[8,9], 低聚果糖在消化道能促进双歧杆菌的繁殖, 从而抑制病原菌的活动^[10]。对菊粉酶的研究引起了越来越多学者的重视。

菊粉酶主要由部分微生物产生, 80 年代以来, 国外已报道很多菊粉酶高活力菌株, 并开展了产酶、酶学性质、酶固定化技术以及酶在生产上的应用等深入研究^[11~14], 在我国进入 90 年代才起步研究^[15~17]。本文报道两株产酶活力较高的黑曲霉菌株的筛选及其产酶特性。

1 材料与方法

1.1 试验材料

菊芋: 从武汉地区 11 月下旬采收(干物质含量 23.5%, 总还原糖 18.0% 鲜重)。

菊粉: 上海生化试剂厂。

基础培养基: 菊粉 30g, K_2HPO_4 1g, $NaNO_3$ 1.5g, $NH_4H_2PO_4$ 4g, KCl 0.5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01g 水 1000ml, pH5.5。

1.2 试验方法

还原糖测定: Somogyi Nelson 法^[18]。

菊粉酶活力测定: 参照 Uhm 的方法^[19]。酶活力单位定义为在上述条件下, 每 min 产生 $1\mu\text{mol}$ 还原糖的酶量即为 1 个单位(u)。

菊芋汁制备: 鲜菊芋清洗称重 \rightarrow 100℃ (杀酶) 5min \rightarrow 搅碎(加 80℃ 水适量) \rightarrow 100 目滤布压滤 \rightarrow 滤渣加适量热水 \rightarrow 重复压滤 \rightarrow 混合滤汁定容到每 100 克菊芋出 100ml 汁。

2 结果

2.1 菊粉酶高活力菌株的筛选

以菊粉作唯一碳源, 利用透明圈法从 30 个菊粉酶活力菌株选出 11 个活力较高的菌株, 用菊芋汁进行摇瓶发酵, 250ml 三角瓶装培养基 50ml, 30℃、200r/min 发酵, 测定产酶活力进行复筛, 结果列入表 1。根据复筛结果, 选出 M_{89} 和 H_8 两菌株进行产酶试验。两菌株均鉴定为

黑曲霉 (*Aspergillus niger*)。

2.2 H₈ 和 M₈₉ 产酶的营养条件

在基础培养基的基础上,利用各碳源物质替代菊粉,研究两菌株产酶的最适碳源;同样利用各氮源物质替代基础培养基中的 NH₄H₂PO₄ 和 NaNO₃ 探讨其最适氮源,结果列入表 2。可以

看出,两菌株在供试碳源中,均不能利用乳糖生长,其它碳源物质都能被利用,但产酶以菊粉最佳。麦芽糖对 H₈ 菌株的产酶活力接近菊粉,对 M₈₉ 稍差。氮源中 H₈ 以无机氮 (NH₄)₂SO₄ 产酶最佳,有机氮中,草酸胺效果较好,M₈₉ 以草酸胺作氮源产酶活力最高,(NH₄)₂SO₄ 次之。

表 1 菊粉酶高活力菌株的复筛

| 发酵时间 (h) | 不同菌株的产酶活力(u/ml) | | | | | | | | | | |
|-------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|----------------|----------------|
| | M ₇₀ | M ₈₁ | M ₈₂ | M ₈₉ | M ₉₀ | M ₉₃ | W ₁₀₁ | W ₁₀₄ | W ₁₀₅ | H ₅ | H ₈ |
| 48 | 4.89 | 3.40 | 3.74 | 7.86 | 4.54 | 5.35 | 3.06 | 3.06 | 2.60 | 2.90 | 6.26 |
| 72 | 8.55 | 11.52 | 11.2 | 21.05 | 8.32 | 9.47 | 11.30 | 11.30 | 10.61 | 9.01 | 17.70 |
| 96 | 7.18 | 10.38 | 12.67 | 32.81 | 7.18 | 7.18 | 14.04 | 13.81 | 12.21 | 11.75 | 23.65 |

表 2 H₈ 菌株和 M₈₉ 菌株产酶的营养条件

| 碳源物质 | 相对酶活力(%) | | 氮源物质 | 相对酶活力(%) | |
|------|----------------|-----------------|---|----------------|-----------------|
| | H ₈ | M ₈₉ | | H ₈ | M ₈₉ |
| 菊粉 | 100 | 100 | 牛肉膏 | 49.25 | 41.40 |
| 蔗糖 | 5.27 | 44.91 | 蛋白胨 | 58.18 | 46.50 |
| 麦芽糖 | 95.74 | 48.37 | 酵母膏 | 64.35 | 48.23 |
| 乳糖 | * | * | (NH ₄) ₂ SO ₄ | 100 | 92.45 |
| 淀粉 | 48.24 | 42.49 | NH ₄ NO ₃ | 40.02 | 32.12 |
| 葡萄糖 | 45.47 | 5.27 | NH ₄ H ₂ PO ₄ | 83.88 | 90.05 |
| D-果糖 | 52.43 | 45.28 | NaNO ₃ | 7.79 | 6.41 |
| 鼠李糖 | 5.27 | 40.74 | 尿素 | * | * |
| 半乳糖 | 5.27 | 5.27 | 草酸胺 | 91.43 | 100 |
| 甘露糖 | 5.27 | 5.27 | | | |
| 棉子糖 | 52.09 | 58.18 | | | |
| 纤维素 | 5.27 | 47.21 | | | |

*: 菌株不生长

2.3 环境条件对产酶的影响

在单因素预试验的基础上,对发酵培养基的 pH,摇床转速和发酵温度进行正交试验,实验设计及统计分析见表 3、表 4。结果表明,三因素对产酶均有显著性影响,其中对 H₈ 菌株产酶影响程度为温度 > 转速 > pH,最佳组合为 29℃、150r/min、pH7.0;对 M₈₉ 产酶的影响程度为转速 > 温度 > pH,最佳组合为 32℃、

210r/min、pH7.0。

2.4 几种液体发酵培养基的产酶比较

在前述试验基础上,对几种产酶培养基进行比较,结果列入表 5,以菊芋汁为基础的培养基产酶活力明显优于基础培养基,在菊芋汁中添加麦芽糖未显示出酶活的提高,而加 (NH₄)₂SO₄ 后有促进产酶作用,产酶活力提高幅度不大。

表3 正交试验设计 $L_9(3^3)$

| | 温度(℃) | 转速(r/min) | pH |
|---|-------|-----------|-----|
| 1 | 26 | 210 | 5.0 |
| 2 | 26 | 150 | 6.0 |
| 3 | 26 | 270 | 7.0 |
| 4 | 29 | 210 | 6.0 |
| 5 | 29 | 150 | 7.0 |
| 6 | 29 | 270 | 5.0 |
| 7 | 32 | 210 | 7.0 |
| 8 | 32 | 150 | 5.0 |
| 9 | 32 | 270 | 6.0 |

表4 正交试验结果方差分析

| 变异来源 | F 值 | |
|-------------------------|----------|-------|
| | M_{89} | H_8 |
| 区组 | <1 | <1 |
| 温度 | 43.7 | 38.79 |
| 转速 | 76.43 | 28.90 |
| pH | 9.45 | 19.81 |
| $F_{0.05}(2,26) = 3.37$ | | |
| $F_{0.01}(2,26) = 5.53$ | | |
| 三因素均在 0.01 水平显著 | | |

表5 几种产酶培养基比较

| 培养基 | 最高产酶活力(u/ml) | |
|---|--------------|-------|
| | M_{89} | H_8 |
| 菊芋汁+2%麦芽糖 | 47.04 | 30.20 |
| 菊芋汁+0.5%(NH ₄) ₂ SO ₄ | 52.93 | 36.23 |
| 菊芋汁+2%麦芽糖 +0.5%(NH ₄) ₂ SO ₄ | 51.03 | 34.10 |
| 菊芋汁 | 48.05 | 30.08 |
| 基础培养基 | 13.50 | 8.40 |

2.5 液态发酵产酶进程

以菊芋汁加 (NH₄)₂SO₄ 发酵培养基, 测定发酵过程中的产酶变化, 结果列入表 6, M_{89} 菌株的酶活力高峰出现在 130h, 以后逐渐下降, 而 H_8 菌株的酶活力高峰表现在 120h, 到 130h 时已开始下降。

2.6 不同固体发酵培养基的比较

用以下(表 7)固体培养基进行发酵产酶试验, 取一定量固体曲按 1:20 加入 0.1mol/L pH5.0 醋酸缓冲液, 振荡器打散, 室温浸酶 4h, 测定浸出液的酶活力, 两菌株都以麸皮加菊芋粉加 (NH₄)₂SO₄ 的产酶活力最高, 在固体发酵中 H_8 产酶明显优于 M_{89} 。

表6 液体发酵产酶进程

| 菌株 | 不同发酵时间(h)的产酶活力(u/ml) | | | | | | | |
|----------|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| | 48 | 72 | 96 | 120 | 130 | 144 | 168 | 192 |
| M_{89} | 10.36 | 19.63 | 40.74 | 50.61 | 52.93 | 41.34 | 16.54 | 8.82 |
| H_8 | 5.21 | 14.40 | 25.0 | 36.23 | 27.87 | 25.98 | 13.62 | |

表7 固态发酵产酶试验

| 培养基(组成%) | 产酶活力(u/g 干曲) | |
|--|--------------|----------|
| | H_8 | M_{89} |
| 麸皮 66, 水 33, 菊粉 1 | 249.4 | 218.3 |
| 麸皮 65.5, 水 33, 菊粉 1, (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.5 | 285.6 | 234.5 |
| 麸皮 60, 水 33, 菊芋粉 6.5, (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.5 | 352.5 | 292.0 |
| 麸皮 60, 水 33, 菊芋粉 7 | 319.3 | 270.3 |
| 麸皮 67, 水 33 | 210.4 | 148.6 |

3 讨论

多数菊粉酶活力菌株产酶与菊粉的诱导有关^[20,21]。本文报道两黑曲霉菌株产酶的最佳碳源均为菊粉, 且以菊芋汁为基础的培养基明显优于添加菊粉的合成培养基, 尽管如此, 笔者认为把菊粉酶定义为诱导酶是不确切的, 因为利用其它碳源也有一定程度的产酶活力。(NH₄)₂SO₄ 是两菌株的最适产酶氮源, 这与 Derycke 和 Nakamura 报道的结果是一致的。两黑曲霉菌株产酶的环境条件(温度及通氧量)

有明显的差异,说明了不同菌株间的不一致性。

H_8 菌株尽管在液体发酵产酶活力低于 M_{89} ,而在固体发酵培养基上 H_8 明显高于 M_{89} 菌株,导致这一现象的原因待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Margaritis A, Pajpai P, Cannell E. *Biotechnol Lett*, 1981, **3**: 595~600.
- [2] Gupta A K, Kaur N, Singh R. *Phytochemistry*, 1986, **25**: 2765~2768.
- [3] Fuchs A, Debruijn J M, Niedevelde C J, Antonie Van Leeu J *Microbiol*, 1985, **51**: 333~351.
- [4] Uhm T B, Byun S M, *Biotechnol Lett*, 1987, **9**: 287~290.
- [5] Byun S, Hienahm B. *J Food Sci*, 1979, **43**: 1871~1873.
- [6] Grootwassink J W D, Fleming S E. *Enzyme Microb Technol*, 1980, **2**: 45~53.
- [7] Manzoni M, Cavazzoni V. *J chem Tech Biotechnol*, 1992, **54**: 311~315.
- [8] Pilnik W, Vervelde G J. *J Agron Crop Sci*, 1976, **142**: 153~162.
- [9] Allen I. *Adv Appl Microb*, 1983, **29**: 139~176.
- [10] Wang X. *J Appl Bacteriol*, 1993, **75** (4): 373~380.
- [11] Nakamura T, Hoashi S, Nakatsu S. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, 1978, **52**: 105~110.
- [12] Derycke Birk G, Vandamme Erick J. *J chem Tech Biotechnol*, 1984, **34B**: 45~51.
- [13] Kierstan M, Bucke C. *Biotechnol Bioeng*, 1977, **19**: 387~397.
- [14] Kim C H, Rhee S L. *Biotechnol Lett*, 1989, **11** (3): 1357~1363.
- [15] 魏文玲, 谢 忠, 王群力等. *工业微生物*, 1994, **24** (4): 19~23.
- [16] 王惠莲, 宋国勇, 李 虹. *食品与发酵工业*, 1994, **3**: 16~20.
- [17] 郑忠辉, 刘月英, 蔡文静等. *厦门大学学报*, 1993, **32** (3): 360~364.
- [18] 张惟杰. *复合多糖生化研究技术*, 上海: 上海科技出版社, 第一版, 1987, 8.
- [19] Uhm T B, Jeon D Y, Byun S M *et al*, *Biochem, Bioph Acta*, 1987, **26**: 119~126.
- [20] Negoro H, Kito E. *J Ferment Technol*, 1973, **51**: 103~110.
- [21] Rouwenhorst R J, visser L E, VanDerbaan A A. *Appl Environmental Microb*, 1988, **54**: 1131~1137.

SCREENING OF HIGH INULINASE ACTIVE STRAINS AND THEIR ENZYME YIELD CONDITIONS

Jia Yingmin

(Department of Food Science, Hebei Agricultural University, Baoding 071001)

Zhao Xuehui

(Department of Food Science And Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract Two inulinase producing strains, H_8 and M_{89} , were screened out of inulinase active strains based on their transparent circle formation and enzyme productions. Two strains were identified as *Aspergillus niger*. H_8 and M_{89} produce higher enzyme levels with inulin as carbon source. The optimum nitrogen substrate for strain H_8 is $(NH_4)_2SO_4$. While, ammonium oxalate is superior to $(NH_4)_2SO_4$ for M_{89} . About the environmental conditions for enzyme yields, strain H_8 shows optimum inulinase production with initial pH 7.0 at temperature 29°C, 150r/min stirring culture; but, initial pH 7.0, 32°C and 210r/min are optimum conditions for strain M_{89} . Both H_8 and M_{89} produce much higher inulinase levels on the media based on Jerusalem artichoke extract juice than on synthetic ones. On Jerusalem artichoke juice added 0.5% $(NH_4)_2SO_4$, strains H_8 and M_{89} give maximal enzyme activity at 120h and 130h respectively. Strain H_8 produces lower enzyme level than M_{89} on liquid media, but the former behaves much better than strain M_{89} on solid media.

Key words Inulinase, *Aspergillus niger*, Jerusalem artichoke