

可降解橡碗单宁产鞣花酸的菌种筛选

吕远平 姚 开 李 庆

(四川大学轻纺与食品学院, 成都, 610065)

摘 要 以 *COD* 去除率为指标, 筛选出可降解橡碗单宁的微生物菌株, 其 *COD* 去除率为 59%。通过对该菌株产鞣花酸的单因素优化条件研究结果表明, 该菌株产鞣花酸的最适条件为: 培养温度 30℃, 培养时间 4 d, 250 mL 锥形瓶中的装瓶量为 150 mL, 发酵培养基(NaNO_3 2.0 g/L, K_2HPO_4 1.0 g/L, MgSO_4 0.5 g/L, FeSO_4 0.01 g/L, 橡碗单宁 5 g/L, 葡萄糖 30 g/L) 中单宁浓度为 5 g/L, pH 值 5.0。在此最适条件下鞣花酸产率可达 7.7%。经鉴定, 该菌株属于半子囊菌纲, 内孢霉目, 内孢霉科, 内孢霉属。

关键词 橡碗单宁, 降解, 鞣花酸, 菌种, 分离

橡碗单宁属水解类鞣花单宁, 其水解产物主要是鞣花酸或其他与六羟基联苯二酸有生源关系的物质^[1]。鞣花酸多以鞣花单宁及葡萄糖苷的形式存在于水果、蔬菜或坚果中。研究表明, 鞣花酸及其衍生物具有抗脂质过氧化、捕捉自由基的能力, 且可抑制癌症的诱发, 其抗氧化活性是 V_E 的 50 倍^[2], 在药品、食品及化妆品等领域具有广阔的应用前景^[3, 4]。其制备可采用化学降解或化学合成法, 但效果并不理想。以鞣花单宁为原料, 采用生物降解的方法生产鞣花酸, 具有污染小、反应条件温和、反应程度容易控制等优点, 是一条有效的途径。

鞣花单宁在自然界中分布广泛, 其复杂的化学结构和植物单宁的广谱抑菌性, 使得其生物降解比较困难。在本论文中以橡碗单宁为底物, 以发酵液的 *COD* 去除率为指标, 筛选出一株降解橡碗单宁效果好的微生物菌株, 并研究了该菌株的产鞣花酸性能, 对其进行了菌种鉴定。

1 材料和方法

1.1 材 料

(1) 采样: 采集成都栲胶厂橡碗堆放场表

层及深层土壤。

(2) 橡碗单宁提取: 橡碗壳粉碎至 10 目, 以 3 倍体积 $V(\text{丙酮}): V(\text{水}) = 7:3$ 溶液在 30℃ 下浸提 3 次, 每次 24 h, 过滤后合并滤液, 45℃ 真空浓缩干燥。单宁含量为 68.3%。

(3) 富集培养基(1000 mL): 蛋白胨 5.0 g, 酵母浸出粉 2.0 g, MgSO_4 0.5 g, K_2HPO_4 1.0 g, 葡萄糖 20 g。

(4) 发酵培养基(1000 mL): NaNO_3 2.0 g, K_2HPO_4 1.0 g, MgSO_4 0.5 g, FeSO_4 0.01 g, 橡碗单宁 5 g, 葡萄糖 30 g/L。

(5) 选择培养基: 葡萄糖和橡碗单宁随需要加入发酵培养基。其余培养基按参考文献[5]配制。

1.2 测定方法

COD 测定采用重铬酸钾法^[6]。单宁含量测定采用皮粉法^[7]。鞣花酸含量测定采用分光光度法^[7]。

1.3 菌种分离与筛选

将土样制成菌悬液, 接种于富集培养基中, 28℃ 摇床(120 r/min) 培养 48 h, 使土样中微生物活化及增殖。活化微生物用划线法接种于选择培养基平板上(葡萄糖和橡碗单宁

质量浓度分别为 20 g/L 和 1.0 g/L), 28℃ 恒温培养 48 h。选取生长良好的菌落制成菌悬液, 再次接种入新的选择培养基(葡萄糖和橡碗单宁浓度分别为 15 g/L 和 2 g/L)进行驯化。每驯化一次, 选择培养基的葡萄糖质量浓度减少 5 g/L, 橡碗单宁浓度增加 1 g/L。经 5 次驯化, 直至选择培养基中不含葡萄糖, 以橡碗单宁(浓度为 5 g/L)为唯一碳源。选取生长良好的微生物菌株, 测定菌株在以 5 g/L 橡碗单宁为唯一碳源的液体选择培养基中培养 5 d 后的 *COD* 去除率。

1.4 橡碗单宁降解为鞣花酸实验

将选育菌株接种于 150 mL、含 5 g/L 橡碗单宁的发酵培养基中, 调节 pH 至 5.0, 于 30℃ 摇床培养(120 r/min) 4 d, 测定发酵液中鞣花酸含量, 计算鞣花酸产率。

$$\text{鞣花酸产率}(\%) = \frac{\text{降解产物中鞣花酸含量}}{\text{降解前橡碗单宁含量}} \times 100\%$$

1.5 菌种鉴定

按照微生物分类鉴定原则, 将选育菌株在适当条件下进行培养, 观察菌株的菌落形态、细胞形态、繁殖方式等, 结合生理生化实验结果, 参照标准菌株, 查有关检索表^[8], 对其进行鉴定。

2 结果与讨论

2.1 筛选菌株的 *COD* 去除率

经筛选得到 30 株橡碗单宁耐受菌, 测定菌株的 *COD* 去除率, 可直接表征微生物利用降解橡碗单宁的能力和程度。本论文选取 *COD* 去除率最高为 59% 的菌株为目的菌株, 研究其降解橡碗单宁为鞣花酸的性能并进行菌种鉴定。

2.2 选育菌株降解橡碗单宁产鞣花酸的性能研究

2.2.1 培养温度对鞣花酸产率的影响

不同培养温度的鞣花酸产率结果如表 1 所示。可以看出, 在 20~30℃ 范围内, 鞣花酸产率随着温度升高而增大, 30℃ 时鞣花酸产率达到最大值。当温度超过 30℃ 时, 鞣

酸产率开始下降。

表 1 不同培养温度下的鞣花酸产率

培养温度/℃	20	25	28	30	35
鞣花酸产率/%	3.2	5.8	7.2	7.4	6.5

2.2.2 单宁浓度对鞣花酸产率的影响

不同单宁浓度下的鞣花酸产率结果见图 1。结果显示, 橡碗单宁浓度为 5.0 g/L 时鞣花酸产率达到最大值。低浓度下, 鞣花酸产率随底物(橡碗单宁)浓度增加而升高。当单宁浓度增加到一定程度时, 其抑菌性逐渐显现出来, 微生物的生长受到限制, 鞣花酸产率随之下降。

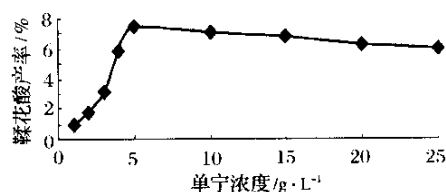


图 1 单宁浓度与鞣花酸产率关系曲线

2.2.3 培养时间对鞣花酸产率的影响

不同培养时间的鞣花酸产率结果如图 2 所示。结果表明, 培养 96 h 时鞣花酸产率达到最大值。此后, 随着培养过程的进行, 鞣花酸产率下降。可以推测, 菌株可产生降解鞣花酸的酶, 使之进一步降解。这对鞣花酸的积累非常不利, 因此, 控制培养时间可有效提高鞣花酸产率。

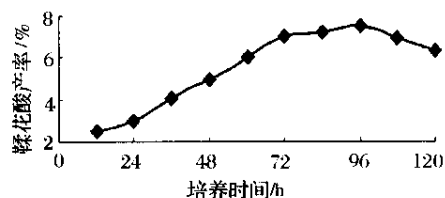


图 2 培养时间与鞣花酸产率关系曲线

2.2.4 发酵液 pH 值对鞣花酸产率的影响

不同 pH 值的鞣花酸产率结果如图 3 所示。pH 值为 5.0 时鞣花酸产率最高。

2.2.5 通气量对鞣花酸产率的影响

通过控制锥形瓶(250 mL)中培养基的装液量考察通气量对鞣花酸产率的影响。不

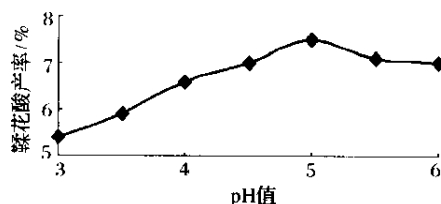


图3 pH值与鞣花酸产率关系曲线

同通气量时的鞣花酸产率结果见表2。装液量为150 mL时鞣花酸产率最高。装液量的多少通过发酵液中溶氧量的多少影响鞣花酸产率。装液量过少,造成溶解氧过多,从而加速单宁的氧化,而过多的装液量会使菌体生长的需氧量不足,影响菌体的生长和代谢,从而影响橡碗单宁降解为鞣花酸。

表2 不同通气量下的鞣花酸产率

装瓶量/mL	25	50	100	150	200
鞣花酸产率/%	3.2	4.2	7.3	7.5	6.0

通过对产鞣花酸的单因素优化条件研究,将选育菌株接种于150 mL橡碗单宁浓度为5.0 g/L、pH值为5.0的发酵培养基中,30℃摇床(120 r/min)培养4 d,鞣花酸产率可达7.7%。

2.3 菌种鉴定结果

(1)群体形态:在土豆培养基上30℃培养7 d,形成直径4~4.5 cm白色圆形菌落,中间凸起,菌落背面微黄色。倒置培养有泌滴产生,无水溶性色素。液体培养基中不产气,产菌膜。

(2)个体形态:幼龄菌菌丝无隔膜,老龄菌菌丝出现横隔或断裂成节孢子。无性繁殖产节孢子,有性繁殖产子囊孢子,孢囊3~7 μm,内含1~4个圆形子囊孢子。

(3)生理生化特征:表3结果表明,选育菌株在马铃薯、马丁、玉米、豆芽汁培养基上生长良好。在察氏、Kleyn、Maclary和Gordokowa培养基上生长受限,在类淀粉培养基、5%的食盐培养基、Pfeffer和石蕊牛奶培养基上不生长。这些生理生化实验结果与内孢霉标准菌株完全相同。

表3 选育菌株的生理生化实验结果

培养基名称	内孢霉标准株	选育菌株
马铃薯培养基	++	++
察氏培养基	+	+
马丁培养基	++	++
玉米培养基	++	++
类淀粉培养基	-	-
豆芽汁培养基	++	++
Kleyn培养基	+	+
5%食盐培养基	-	-
Pfeffer培养基	-	-
Maclary培养基	+	+
Gordokowa培养基	+	+
石蕊牛奶培养基	-	-

注:“++”表示生长良好,“+”表示能生长或阳性反应,“-”表示不能生长或阴性反应。

根据菌落形态、个体形态、生长特征和生理生化实验结果表明,菌株与内孢霉标准菌株一致。查有关检索表,按Ainsworth分类法判定该菌株属于子囊菌亚门(Ascomycotina)半子囊菌纲(Hemiascomycetes),内孢霉目(Endomycetales),内孢霉科(Endomycetaceae),内孢霉属(*Endomyces*)。

3 结论

通过筛选、驯化,选育出可降解橡碗单宁的微生物菌株。选育菌株接种于150 mL橡碗单宁浓度为5.0 g/L、pH值为5.0的发酵培养基中,30℃摇床(120 r/min)培养4 d,鞣花酸产率可达7.7%。根据菌落形态、个体形态、生长特征和生理生化实验结果,判定选育菌株属于半子囊菌纲,内孢霉目,内孢霉科,内孢霉属。本论文选育菌株具有降解橡碗单宁的能力,这对于植物单宁的生物降解具有指导意义,并且为生物降解法生产鞣花酸奠定了基础。

参考文献

- 1 石碧,狄莹. 植物多酚. 北京:科学出版社, 2000. 10~11
- 2 Heur Y H, Zeng W. Journal of Natural Products, 1992, 55(10): 1402~1407
- 3 Nepka C. European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, APR - JUN, 1999, 24

- (2): 183 ~ 189.
- 4 Chung K T. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1998, 38(6): 421 ~ 464
- 5 沈 萍等. 微生物学实验. 北京: 高等教育出版社, 2000. 214 ~ 222
- 6 中国环保局. 水和废水检测分析方法(第三版). 北京: 中国环境科学出版社, 1989. 354 ~ 357
- 7 西北轻工业学院皮革研究室. 皮革分析检验. 北京: 中国轻工业出版社, 1996. 3 ~ 112
- 8 戴芳澜. 真菌的形态和分类. 北京: 科学出版社, 1987. 212 ~ 220

Isolation of a Strain Capable of Degrading *Valonia* Tannin into Ellagic Acid

Lü Yuanping Yao Kai Li Qing

(College of Light Industry and Food, Sichuan University, Chengdu 610065)

ABSTRACT A strain, proved to be effective in degrading *Valonia* tannin into ellagic acid, was isolated from nature according to its high capacity of removing chemical oxygen demand (59%). The strain property of degrading *Valonia* tannin was studied. The optimum conditions, in which the rate of ellagic acid production achieved maximum (7.7%), was that the strain was incubated in 150 mL medium (pH 5.0, NaNO₃ 2.0 g, K₂HPO₄ 1.0 g, MgSO₄ 0.5 g, FeSO₄ 0.01 g, *Valonia* tannin 5 g, glucose 30 g/L) at 30°C for 4 d. Based on its morphological and physiologic characteristics, the strain was identified as Hemiascomycetes, Endomycetales, Endomycetaceae, *Endomyces*.

Key words *Valonia* tannin degradation ellagic acid strain isolation

中国生物化学与分子生物学会工业生化专业委员会会讯与征稿

一、会 讯

为加快西部地区生物高科技的开发,促进东西部地区的交流和合作,中国生物化学与分子生物学会工业生化专业委员会和山西省化学与分子生物学会商定,于 2003 年 8 月中旬,在山西太原市举办“全国生物技术产品研制与开发学术研讨会”,山西大学生物技术研究所协办此次大会。大会将请生物高科技各领域的著名院士、教授、专家作内容丰富的学术报告,热忱欢迎产、学、研各界代表参加会议。

二、征 稿

1. 征稿内容:就研讨会主题各学术领域即基因工程(含蛋白质工程)、细胞工程(含组织工程)、发酵工程、代谢工程、酶工程、食品工程(含海洋中草药、微生态资源等的功能食品开发等)、新药开发战略与技术等生物科技领域。欢迎全国各地产、学、研各界专家、科技工作者来稿。

2. 稿件要求:一般论文只需 500 ~ 1 000 字摘要(可自带全文交流),大会专题学术报告与综述性论文则以 6 000 字以下为宜,标题用“4 号”字黑体,正文用“5 号”字宋体,一律以 E-mail 形式投稿,稿件自信息发布日起截止于 2003 年 7 月 20 日。

3. 其他事宜:会议还组织科技成果交流与洽谈,相关仪器设备和生化药品、试剂等的展销,此次研讨会还精心选编会议论文集,欢迎来函、来电联系相关事宜。

4. 联系地址:上海市梅陇路 130 号 华东理工大学 431 信箱 工业生化专业委员会收

邮编 200237 E-mail: huizhzh@online.sh.cn (张惠展教授、副秘书长)

电话 021-64252515 (张惠展教授、副秘书长) 021-64253238 (金新根 秘书长)