

果胶酶生产及其在苹果汁澄清中的应用

邬敏辰^{1,2} 王瑾² 刘月¹ 卜静¹

1 (江南大学医学系, 无锡, 214064) 2 (江南大学生物工程学院, 无锡, 214036)

摘要 对黑曲霉(*Aspergillus niger*) LLW-1 菌株固态发酵生产酸性果胶酶的发酵培养基组成和发酵条件以及利用果胶酶澄清苹果汁的工艺条件进行了研究。固态发酵产酶条件为:250 mL 三角瓶装 10 g 基料(豆饼:麸皮 = 2.0 g:8.0 g), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20 g/kg, Tween-80 1.5 g/kg, 玉米浆 50 mL/kg, KH_2PO_4 3.0 g/kg, CaCl_2 1.0 g/kg, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g/kg(均相对于基料), 料水比 1:1.2, 自然 pH; 31℃ 静置培养 72 h, 期间在 24 h 翻曲 1 次, 果胶酶活力达 2 418 IU/g(干曲)。酸性果胶酶澄清苹果汁的工艺条件为:果汁自然 pH 值, 果胶酶用量 500 IU/L(果汁), 明胶添加量 0.05 g/L(果汁), 酶解温度和时间分别为 45℃ 和 1 h。

关键词 固态发酵, 正交试验, 酸性果胶酶, 苹果汁, 澄清

果胶酶(pectinases)是指能协同分解植物组织中果胶质的一组酶的总称,可分为 2 大类:解聚酶(depolymerizing enzymes)和果胶酯酶(pectinesterase enzyme)。酸性果胶酶一般指内聚半乳糖醛酸酶(endo-polygalacturonase, EC 3.2.1.15),通过水解作用方式无规则切断果胶酸分子的 $\alpha-1,4$ 糖苷键,将其降解成寡聚半乳糖醛酸和少量半乳糖醛酸,目前主要应用于食品工业的果蔬汁和果酒澄清、桔子脱囊衣、低糖果冻生产,麻料脱胶,木材防腐^[1]和饲料工业^[2]等。碱性果胶酶一般多指聚半乳糖醛酸裂解酶(polygalacturonate lyase, EC 4.2.2.1~2),通过反式消去作用方式裂解果胶酸分子的 $\alpha-1,4$ 糖苷键,其主要应用于植物病毒的纯化、纸浆漂白和棉织物处理等^[3]。

本研究室选育了 1 株高产酸性果胶酶的黑曲霉 LLW-1 菌株(另文报道)。文中报道了 LLW-1 菌株固态发酵生产果胶酶的发酵培养基和发酵条件试验结果以及利用果胶酶澄清苹果汁的工艺条件试验结果。

1 材料与方 法

1.1 生产菌株

黑曲霉(*Aspergillus niger*) LLW-1 酸性果胶酶高产菌株,江南大学医学系分子生物学研究室选育和保藏。

1.2 原料和试剂

麸皮、豆饼粉和玉米浆,无锡市恒盛生物技术有限公司;食用果胶, Danisco 公司;试剂级果胶和半乳

糖醛酸, Sigma 公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.3 培养基及培养方法

1.3.1 固体培养基

马铃薯琼脂培养基^[4],用于菌种的活化和保藏等。

1.3.2 平皿分离培养基

在马铃薯琼脂培养基中添加 1.5 g/L 去氧胆酸钠,以限制丝状真菌在平皿上扩散生长,便于单菌落的分离和挑选^[5]。

1.3.3 麸曲种子培养基

250 mL 三角瓶装 10 g 基料(麸皮), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 g/kg, KH_2PO_4 3.0 g/kg, CaCl_2 1.0 g/kg, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g/kg(均相对于基料),料水比 1:1.0, 自然 pH; 121℃ 灭菌 30 min;接种一菌耳斜面活化种子, 30℃ 静置培养 96 h,期间约 28 h 翻曲 1 次。对于发酵培养基优化试验,30℃ 培养 72 h,24 h 翻曲 1 次。

1.4 果胶酶活力测定(DNS 法)

参照文献[6]的方法并作相应改动。

1.4.1 果胶酶抽提

称取成熟固态发酵曲 1.0 g,加 29 mL Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液(pH 3.5),于研钵中充分研磨,40℃ 浸提 30 min,滤纸过滤,滤液再经适当稀释,待测定。

1.4.2 酶活力测定

吸取 0.1 mL 适当稀释的酶液,加至 2.4 mL 用 pH 3.5、 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液配制的 5.0 g/L 果胶(Sigma)溶液中,50℃ 准确反应 10 min;采用 DNS 法测定酶水解产生的还原糖。以每分钟水解果胶产生 1 μmol 还原糖(以半乳糖醛酸计)的酶量定义为 1 个果胶酶活力国际单位(IU)。

1.5 苹果汁澄清试验方法^[7]

第一作者:博士,副教授。

收稿日期:2006-04-29,改回日期:2006-09-19

用水把苹果洗净(市售红富士),去核,切成碎块,浸泡于 1.0 g/L 的抗坏血酸溶液中,取出沥干,用捣碎机打成果浆,迅速于沸水浴中处理 5~10 min 灭酶,纱布过滤,取滤汁 20 mL 分装于 25 mL 具塞刻度试管中,加入不等量的果胶酶和其他助剂,于不同温度下酶解澄清一定时间,待测定。

1.6 苹果汁澄清测定方法^[8]

1.6.1 澄清度测定

将酶处理的果汁定时取出,于沸水浴中处理 5 min 终止反应,滤纸过滤,用 722 型分光光度计在 660 nm 处以蒸馏水为参比,测定滤液透光度,即为澄清度的百分数。

1.6.2 过滤速率测定

将 20 mL 酶处理的果汁用滤纸过滤,记录过滤至 10 mL 滤液所需时间,换算成单位时间内的滤液体积(mL/min),即为过滤速率。

1.6.3 果胶降解量测定

参照文献[9]的方法并略作改动。吸取 2 mL 经过酶处理的果汁滤液,加入 4 mL 酸性乙醇(含 10 mL/L 浓 HCl),混匀,20 min 后用分光光度计在 660 nm 处以酸性乙醇为参比,测定透光度,定义为果胶降解量的百分数。

2 结果与讨论

2.1 LLW-1 菌株产酶培养基的单因素优化试验

2.1.1 豆饼粉与麸皮质量比

在麸曲种子培养基的基础上,用豆饼粉替换部分麸皮以补充有机氮源,其余成分不变,试验了豆饼粉与麸皮不同质量比对菌株产果胶酶的影响(表 1)。由表 1 可见,果胶酶活力随豆饼粉与麸皮质量比的升高而提高,当 $m(\text{豆饼粉}):m(\text{麸皮}) = 2:8$ 时,菌株产酶量最高,达 1 128 IU/g(干曲)。

表 1 豆饼粉与麸皮质量比对菌株产果胶酶的影响

$m(\text{豆饼粉}):m(\text{麸皮})$	0:10	1:9	2:8	3:7	4:6
酶活力/ $\text{IU}\cdot\text{g}^{-1}$ (干曲)	702	984	1 128	1 061	878

2.1.2 料水比

表 4 无机氮源添加量对菌株产果胶酶的影响

无机氮源/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$			NH_4Cl			NH_4NO_3		
	10	20	30	10	20	30	10	20	30
酶活力/ $\text{IU}\cdot\text{g}^{-1}$ (干曲)	1 423	1 747	1 241	1 228	1 412	1 075	1 178	1 280	1 346

2.1.5 Tween-80 添加量

试验了表面活性剂 Tween-80 不同添加量对菌株产果胶酶的影响(表 5)。由表 5 可见,添加 1.5 g/

将种子培养基中的基料(豆饼粉 + 麸皮)质量比改为 2:8,其余成分不变,试验了不同料水比对菌株产果胶酶的影响(表 2)。由表 2 可见,最适料水比为 1:1.2。在实验中发现,当培养基含水量过高时,曲料易结块成团,菌丝体只在团块表面生长,发酵不均匀,而影响菌株产酶。

表 2 不同料水比对菌株产果胶酶的影响

$m(\text{基料}):m(\text{水})$	1:0.9	1:1.0	1:1.1	1:1.2	1:1.3
酶活力/ $\text{IU}\cdot\text{g}^{-1}$ (干曲)	886	1 086	1 150	1 247	1 121

2.1.3 果胶、玉米浆添加量

在已确定的较佳培养基组成[$m(\text{豆饼粉}):m(\text{麸皮}) = 2:8$,料水比 1:1.2]基础上,又试验了添加果胶和玉米浆对菌株产果胶酶的影响(表 3)。

表 3 果胶、玉米浆添加量对菌株产果胶酶的影响

食用果胶/g	0			0.5			0.9			
	0	0	0.5	1.0	0	0.5	1.0	0	0.5	1.0
酶活力/ $\text{IU}\cdot\text{g}^{-1}$ (干曲)	1 236	1 033	1 564	1 318	1 182	1 614	1 286			

表 3 的结果表明,在发酵培养基中添加玉米浆对菌株产果胶酶有促进作用,用量为 0.5 mL/10 g(基料)时,产酶量最高。玉米浆中含有促生长因子、微量元素,对菌株的生长和产酶有促进作用^[10]。果胶酶属于诱导酶,一般认为,基质中含有的果胶或聚半乳糖醛酸对产酶起着诱导的作用,但本试验结果表明,向培养基中添加食用果胶,对该菌株产酶量影响不大,且增加了培养基的粘度和发酵成本,所以添加果胶对果胶酶的工业化生产意义不大。

2.1.4 无机氮源添加量

在已确定的发酵培养基组成的基础上,又试验了 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4Cl 和 NH_4NO_3 三种无机氮源不同添加量对菌株产果胶酶的影响(表 4)。结果表明,在已用豆饼粉做有机氮源的前提下,再添加无机铵盐可进一步提高产酶量,其中添加 20 g/kg $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的产酶量最高,达 1 747 IU/g(干曲)。

kg 的 Tween-80 对产酶有显著促进作用。某些特定表面活性剂能提高酶的产量,其作用机理目前尚不清楚,但一般认为可能是由于以下原因所致:(1) 表面

活性剂能改变细胞膜的通透性,使细胞内的酶更易透过细胞膜而分泌出来,但细胞内酶的数量总是趋于恒定不变。因此,细胞内的酶将随着不断向外分泌而不断合成,细胞外培养基中的酶则不断积累,从而提高了酶的产量。(2) 某些表面活性剂能提高酶的稳定性或对酶有激活作用。

表 5 表面活性剂及其用量对菌株产酶的影响

Tween-80/g·kg ⁻¹	0	0.5	1.0	1.5	2.0
酶活力/IU·g ⁻¹ (干曲)	1 648	1 821	2 046	2 395	2 173

2.2 固态发酵培养基正交试验

在上述单因素试验的基础上,选取影响菌株产酶活力较大的培养基组分:豆饼-麸皮、(NH₄)₂SO₄ 和 Tween-80 三个因素,利用正交试验表 L₉(3⁴) 进行三因素三水平正交试验(表 6),以进一步优化三角瓶固态发酵培养基。

表 6 正交试验试验数据及处理结果

试验	豆饼:麸皮 (g:g)	(NH ₄) ₂ SO ₄ /g·kg ⁻¹	Tween-80 /g·kg ⁻¹	酶活力 /IU·g ⁻¹
1	1(1.0:9.0)	1(10)	1(1.0)	1 251
2	1	2(20)	2(1.5)	1 702
3	1	3(30)	3(2.0)	1 452
4	2(2.0:8.0)	1	2	2 228
5	2	2	3	2 372
6	2	3	1	1 713
7	3(3.0:7.0)	1	3	1 938
8	3	2	1	2 024
9	3	3	2	1 845
k ₁	1 468	1 806	1 663	
k ₂	2 104	2 033	1 925	
k ₃	1 936	1 670	1 921	
R	636	363	262	

表 6 试验数据及处理结果表明, *m*(豆饼):*m*(麸皮)的极差 *R* = 636 为最大, Tween-80 的极差 *R* = 262 为最小。从 *k* 值分别取其数值最大的参数,可获得三角瓶固态发酵优化培养基配方为:250 mL 三角瓶装 10 g 基料, [*m*(豆饼):*m*(麸皮) = 2.0 g:8.0 g], (NH₄)₂SO₄ 20 g/kg, Tween-80 1.5 g/kg, 玉米浆 50 mL/kg, KH₂PO₄ 3.0 g/kg, CaCl₂ 1.0 g/kg, MgSO₄·7H₂O 1.0 g/kg(均相对于基料), 料水比 1:1.2, 自然 pH。

2.3 LLW-1 菌株发酵条件的确定

选取 28、31 和 34℃ 三个不同温度分别对 YL-1 菌株进行三角瓶固态发酵产酶试验,36 h 起每隔 12 h 取样测定酶活力(图 1)。由图 1 可见,31℃ 培养 72 h 果胶酶活力最高,达 2 418 IU/g(干曲);发酵温度

28℃ 时,微生物生长较缓慢,发酵周期延长;而发酵温度过高时,菌丝体过早衰老,产酶周期短。

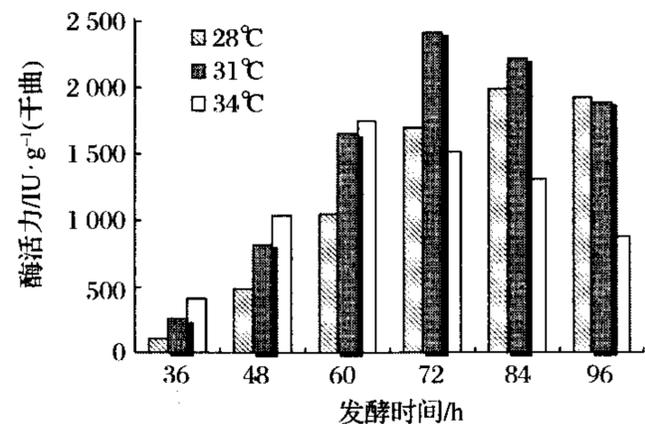


图 1 发酵温度和时间对 LLW-1 菌株产果胶酶的影响

2.4 果胶酶对苹果汁澄清效果的影响

2.4.1 明胶用量对果汁澄清效果的影响

试验了明胶不同添加量对果汁澄清效果的影响(表 7)。由表 7 可见,澄清度、过滤速率和果胶降解量随明胶添加量的增加而增加,当明胶添加量超过 0.05 g/L,各种参数的增加已不明显,因此在本试验条件下取明胶用量 0.05 g/L。加入明胶能形成明胶-单宁沉淀物,通常 0.05~0.1 g/L 的明胶对果汁的澄清已很充分^[1]。

表 7 明胶用量对果汁澄清效果的影响

明胶用量/g·L ⁻¹	0	0.025	0.05	0.075	0.1
澄清度/%	88.4	90.8	93.1	92.5	93.2
过滤速率/mL·min ⁻¹	1.13	1.34	1.50	1.60	1.56
果胶降解量/%	93.6	95.2	97.1	97.3	96.1

注:果胶酶浓度 500 IU/L,酶解温度和时间分别为 50℃ 和 1 h。

2.4.2 pH 值对果汁澄清效果的影响

将苹果汁(自然 pH 4.15)分别用 HCl 或 NaOH 调节至不同的 pH 值,试验了不同 pH 值对果汁澄清效果的影响(表 8)。由表 8 可见,在 pH 2.5~4.0 范围内,果胶酶均能有效地发挥其澄清果汁的作用。苹果汁根据苹果成熟度的不同,其自然 pH 一般在 3.2~4.5 范围内变化,几乎在酶的有效作用范围内。因此澄清过程中无需调节苹果汁 pH 值,而且在实际生产中也不宜用酸碱调节 pH 值。

表 8 pH 值对果汁澄清效果的影响

苹果汁 pH 值	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5
澄清度/%	96.6	95.2	93.9	92.6	88.5
过滤速率/mL·min ⁻¹	1.72	1.63	1.68	1.55	1.33
果胶降解量/%	97.9	96.6	96.2	95.0	92.1

注:果胶酶浓度 500 IU/L,明胶用量 0.05 g/L,酶解温度和时间分别为 50℃ 和 1 h。

2.4.3 温度对果汁澄清的影响

试验了不同酶解温度对果汁澄清效果的影响(表9)。表9结果表明,在不使酶失活的温度范围内,苹果汁的澄清度和果胶降解量随温度的升高而增加,但温度过高将产生后熟味,严重影响苹果汁的风味和品质。因此酶促果汁澄清的温度一般以45℃为宜,若要加快果汁澄清,可适当提高酶浓度或温度。

表9 温度对果汁澄清效果的影响

酶解温度/℃	20	30	40	45	50	60
澄清度/%	81.0	85.5	88.8	92.5	93.3	92.8
果胶降解量/%	90.6	93.3	93.5	95.2	97.8	96.8

注:果胶酶浓度500 IU/L,明胶用量0.05 g/L,酶解时间1 h。

2.4.4 酶浓度对果汁澄清的影响

于不同温度(30℃和45℃)和酶解时间(1 h)条件下,试验了不同酶浓度和温度对果汁澄清效果的影响(表10)。由表10可见,(1)为了达到一定的澄清度,温度越低,所需酶浓度越高;(2)在相同温度条件下,果汁澄清度随酶浓度增加而增加。综合各种因素选取45℃、酶浓度500 IU/L。

表10 酶浓度对果汁澄清效果的影响

酶解温度/℃	30			45			
	1 000	2 000	3 000	0	250	500	1 000
澄清度/%	86.1	94.1	93.9	56.9	91.0	93.5	94.0
过滤速率 /mL·min ⁻¹	1.31	1.62	1.70	0.36	1.25	1.66	1.73

3 结 论

(1)经一系列的三角瓶固态发酵单因素试验和正交试验,LLW-1菌株固态发酵优化培养基组成为:250 mL三角瓶装10 g基料[m(豆饼):m(麸皮)=2.0 g:8.0 g)],(NH₄)₂SO₄ 20 g/kg, Tween-80

1.5 g/kg,玉米浆50 mL/kg, KH₂PO₄ 3.0 g/kg, CaCl₂ 1.0 g/kg, MgSO₄·7H₂O 1.0 g/kg(均相对于基料),料水比1:1.2,自然pH。

(2) LLW-1菌株固态发酵条件为:31℃静置培养72 h,期间约24 h翻曲1次。在该发酵工艺条件下,黑曲霉LLW-1菌株所产果胶酶活力可达2 418 IU/g(干曲)。

(3)果胶酶澄清苹果汁的工艺条件为:果汁自然pH值,果胶酶用量500 IU/L,明胶添加量0.05 g/L,酶解温度和时间分别为45℃和1 h。

参 考 文 献

- 1 张树政. 酶制剂工业(下册)[M]. 北京:科学技术出版社, 1995, 625~650
- 2 郭敏辰, 郭显章. 饲用复合酶固体发酵工业化生产[J]. 饲料工业, 2003, 24(1): 5~8
- 3 张健红, 李寅, 刘和, 等. 一株碱性果胶酶高产细菌的分离、系统发育分析和产酶条件的初步优化[J]. 应用与环境生物学报, 2005, 11(3): 354~358
- 4 无锡轻工业学院. 微生物学[M]. 北京:轻工业出版社, 1990
- 5 郭敏辰, 方诗月, 李剑芳, 等. 绿色木霉WL 0422高产纤维素酶的研究[J]. 江苏食品与发酵, 2006(1): 1~3
- 6 李剑芳, 郭敏辰, 夏文水. β-甘露聚糖酶高产菌株选育及产酶条件的研究[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(9): 9~13
- 7 谭海运, 董周永. 苹果汁澄清技术的研究[J]. 西藏农业科技, 2005, 27(2): 15~23
- 8 杨建军, 马齐, 宋宏新. 复合酶在苹果汁加工中的应用研究[J]. 食品科技, 2005(3): 76~78
- 9 Beveridge T. Haze and cloud in apple juices[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1997, 37(1): 75~91
- 10 朱劼, 李剑芳, 郭敏辰. 酸性β-甘露聚糖酶的固态发酵工艺研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2005, 33(8): 139~143

Production of Pectinases and Its Application in Clarification of Apple Juice

Wu Minchen^{1, 2} Wang Jin² Liu Yue¹ Bu Jing¹

1 (Department of Medicine, Southern Yangtze University, Wuxi 214064, China)

2 (School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

ABSTRACT Fermentation medium and conditions of solid-state fermentation for production of pectinases by *Aspergillus niger* LLW-1 strain and the process conditions of apple juice clarification treated with the pectinases were studied in this paper. The results of solid-state fermentation tests showed the optimum conditions: *m*(soybean flour) : *m*(wheat bran) = 2:8, corn steep of 50 mL/kg, (NH₄)₂SO₄ 20 g/kg, KH₂PO₄ 3.0 g/kg, CaCl₂ 1.0 g/kg, MgSO₄ 1.0 g/kg, Tween-80 1.5 g/kg, water to base medium ratio of 1:1.2, and natural pH. The pectinases activity reached 2 418 IU/g dry medium at 31℃ for 72 h. The process of apple juice clarification process treated with the pectinases were pectinases of 500 IU/L, gelatin of 0.05 g/L, apple juice of natural pH, and 45℃ for 1 hour.

Key words solid-state fermentation, orthogonal tests, acidic pectinases, apple juice, clarification