

郑坚强,韩素娜,时锦锦,等. 西方许旺酵母菌产双加氧酶的发酵条件研究[J]. 江苏农业科学,2017,45(12):124-131.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.12.033

西方许旺酵母菌产双加氧酶的发酵条件研究

郑坚强¹, 韩素娜^{1,2}, 时锦锦¹, 赵楠¹, 彭新榜¹, 司俊玲¹, 许春平¹

(1. 郑州轻工业学院食品与生物工程学院, 河南郑州 450002; 2. 河南仰韶酒业有限公司, 河南三门峡 472400)

摘要:将 1 株西方许旺酵母菌株应用于降解类 β -胡萝卜素产生香味物质的体系中, 为生物技术制备香精香料提供研究基础, 对其液态发酵培养基及发酵条件进行优化, 确定纯种液态发酵最佳培养基组分及发酵条件。以西方许旺酵母为试验菌株, 采用摇瓶发酵的方式, 研究培养基组分(碳源、氮源、无机盐离子)及添加量与发酵培养条件(温度、初始 pH 值、接种量、摇床转速)对菌种产双加氧酶的情况。结果表明, 培养基最优组成为 10.00 g/L 葡萄糖、10.00 g/L 蛋白胨、5.00 g/L 酵母粉、0.20 g/L FeSO_4 、0.45 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、3.00 g/L NaNO_3 、0.50 g/L KCl ; 最佳优化条件为温度 27.90 $^{\circ}\text{C}$ 、起始 pH 值为 7.21、转速为 160.00 r/min、接种量为 5.00%, 发酵时间为 72.00 h, 此时酶活性达到 1.23 U/mL, 5 次中心点重复试验结果稳定可靠; 通过响应面分析发现, 温度、起始 pH 值作用极显著, 温度和起始 pH 值交互显著, 客观反映了微生物的发酵条件。

关键词:西方许旺酵母; 双加氧酶; 发酵条件; 优化

中图分类号: TS201.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)12-0124-07

类胡萝卜素广泛分布于自然界中, 是很多化合物的前体物质, 如 C13-类胡萝卜素(非萜类化合物), 该化合物包括紫罗酮、二氢大马酮等, 是构成茶叶、玫瑰、葡萄酒等的主要香味物质^[1]。这些化合物香味阈值低, 其中很多是强有效的香气化合物, 已经引起香精香料行业的极大关注^[2]。从植物资源中萃取类胡萝卜素降解的香味物质生产成本高, 而采用生物技术制备的香味物质是纯度高的天然化合物^[3]。有学者利用泥土中的细菌、丝状真菌降解类胡萝卜素转化为单环、双环的单萜, 但实际应用很少, 还没有任何一个单萜类的生物转化已经商品化、工业化生产^[4-6]。

目前学术研究主要采用微生物固态发酵技术裂解(降解)类胡萝卜素, 产生香味物质^[7]。在广泛的筛选中, 发现真菌、酵母菌具有降解类胡萝卜素的潜在能力。在以金银花为主要碳源化学成分的培养基中, 有 19 种具有降解叶黄素的菌株(或者菌属)被分离出来, 在这些分离得到的菌种中, 有 2 种在发酵时可产生挥发性化合物^[8]。Zorn 等研究报道, 50 多种丝状真菌、酵母菌能有选择性地降解 β -胡萝卜素转化为香味化合物, 生物转化产物为单萜、倍半萜、三萜、四萜等化合物^[9-10]。王树林等从沙棘汁中分离得到 1 株可降解 β -胡萝卜素的菌株, 并对培养基配方及培养条件进行优化^[11]。麻俊侠等探索适于 β -胡萝卜素降解葡萄球菌生长的最佳化学合成培养基配方, 试验对培养基中的碳源、氮源、矿物质、各种生长因子等进行了研究, 并确定了它们之间的配比, 同时对发酵液的粗酶活进行了初步探索^[12]。

查阅相关文献发现, 国内外对微生物定向降解类胡萝卜素产生香味化合物进行了初步研究, 没有进行工业化生物降解类胡萝卜素制备香味化合物生产的报道。此外, 由于筛选的材料不同, 导致筛选的菌株不同, 菌株与培养基以及富含类胡萝卜素的原料不同, 从而使菌种的发酵条件不同, 导致降解类胡萝卜素生成的香味物质种类和含量有差异。

试验以笔者所在实验室筛选的西方许旺酵母菌为培养菌株, 研究培养基、发酵条件对微生物产酶的影响情况, 从而分析微生物体代谢能力及菌种的产酶效果。提高菌株产氧化酶(双加氧酶)能力, 提高该微生物及其酶降解 β -胡萝卜素生成香味成分的含量。试验目的在于提高该菌株产双加氧酶能力, 为其后续在西方许旺酵母降解富含类胡萝卜素产品(番茄、枸杞等)生成香味物质的应用中提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试剂 β -胡萝卜素(分析纯, 美国 Sigma 公司); β -紫罗兰酮(分析纯, 美国 Sigma 公司); 葡萄糖、磷酸二氢钾、硫酸镁、氯化钾、硫酸铵、硫酸亚铁、氯化钠、石油醚、吐温 20、碳酸氢钠、乳糖、硼酸、麦芽糖、蔗糖, 均为分析纯; 酵母粉、琼脂粉、蛋白胨、天冬酰胺、麦芽提取物, 均为生物试剂。

1.1.2 仪器 LDZX-75KBS 立式蒸汽灭菌锅(上海申安医疗器械有限公司); RE-52AA 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂); SPX-160B-2 培养箱(上海福玛实验设备有限公司); QYC-200 摇床(上海福玛实验设备有限公司); DGX-8053B 干燥箱(上海福玛实验设备有限公司); UV765 紫外分光光度计(上海仪电分析仪器有限公司); CF16RXI 离心机(深圳市瑞鑫达科教仪器贸易部); DK-S18 水浴锅(上海浦东荣丰科学仪器有限公司); QL-866 点动仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司)等。

1.1.3 培养基 平板培养基: 葡萄糖 10.00 g/L, 蛋白胨

收稿日期: 2016-02-29

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31571778); 河南省高等学校重点科研计划(编号: 15A550007)。

作者简介: 郑坚强(1976—), 男, 山西临汾人, 博士, 副教授, 主要从事食品生物技术研究。Tel: (0371) 86609650; E-mail: jqzheng76@126.com。

5.00 g/L, 麦芽提取物 3.00 g/L, 酵母粉 3.00 g/L, 琼脂粉 15.00~20.00 g/L, β -胡萝卜素 80.00 mg/L, 121 °C, 灭菌 20 min。

种子培养基: 葡萄糖 10.00 g/L, 蛋白胨 5.00 g/L, 麦芽提取物 3.00 g/L, 酵母粉 3.00 g/L, K_2HPO_4 1.50 g/L, KCl 0.50 g/L, 121 °C, 灭菌 20 min。

液体发酵培养基: 葡萄糖 10.00 g/L, 蛋白胨 5.00 g/L, 麦芽提取物 3.00 g/L, 酵母粉 3.00 g/L, $MgSO_4$ 0.50 g/L, $NaNO_3$ 3.00 g/L, $FeSO_4$ 0.01 g/L, β -胡萝卜素 110.00 mg/L, 121 °C, 灭菌 20 min。

1.2 试验方法

1.2.1 菌体生长曲线的绘制 西方许旺酵母菌种活化 2 代后, 接种于 150 mL 种子培养基三角瓶中, 28 °C、160 r/min 避光培养 72 h 后作为种子液。按 5% (体积分数) 接种量, 接入装有 150 mL 发酵培养基的 300 mL 三角瓶中, 于 28 °C、160 r/min 避光培养, 每 12 h 取样 1 次, 用分光光度计测量吸光度 ($D_{600\text{nm}}$)。记录吸光度, 以时间为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制生长曲线。

1.2.2 摇瓶培养及菌种代谢产物的监测 在 300 mL 锥形瓶中装入 100 mL 培养基, 灭菌并冷却后, 向锥形烧瓶中加入 1.0% 活化的菌液, 在避光条件下 28 °C、150 r/min, 培养 24 h 后, 将 16 mg β -胡萝卜素、10 g 吐温 20 溶解在二氯甲烷中, 溶剂在旋转蒸发器中蒸馏除去, 抽滤除菌, 然后加无菌水稀释至 100 mL, 平均加入到锥形瓶中, 28 °C、150 r/min, 在避光条件下继续培养, 并且每天对样品进行分析, 剩余的 β -胡萝卜素和代谢物从培养上清液中用二氯甲烷萃取 3 次, 60 °C 水浴蒸发至 1 mL, 进行 GC-MS 分析。

1.2.3 目标产物 GC-MS 分析条件 色谱条件: 毛细管柱: HP-5MS (30.00 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m); 进样口温度 240 °C; 升温程序: 50 °C 保持 1 min, 以 8 °C/min 升温到 160 °C, 保持 2 min, 再以 8 °C/min 升温到 260 °C, 保持 15 min; 载气 (He) 恒流模式, 流量 1 mL/min; 进样量 2 μ L, 分流进样, 分流比为 25:1。

质谱条件: 电子轰击 (EI) 离子源; 电子能量 70 eV; 传输线温度 280 °C; 离子源温度 230 °C; 四级杆温度 160 °C; 质量扫描范围 35~455 m/z [13]。

1.2.4 β -胡萝卜素储备液的制备 避光称取 5 mg β -胡萝卜素溶于 10 mL 二氯甲烷中, 待 β -胡萝卜素彻底溶解后加入 1 g 吐温 20 进行乳化。在避光条件下, 将二氯甲烷彻底挥发干净, 倒入 100 mL 棕色容量瓶中定容, 混合均匀, 得到橘黄色清澈的 β -胡萝卜素储备液备用。

1.2.5 β -胡萝卜素标准曲线的制作 分别取 β -胡萝卜素储备液 0、20、40、60、120、180、240、480 μ L 于棕色容量瓶中加蒸馏水定容至 5 mL, 以蒸馏水做空白对照, 于 450 nm 处测定其吸光度, 所得数据见图 1, 得到 β -胡萝卜素溶液浓度与吸光度的线性关系。

β -胡萝卜素浓度与吸光度之间的线性方程: $y = 107.04x - 0.4326$, 决定系数 $r^2 = 0.992$ 。式中: y 为 β -胡萝卜素浓度 (μ mol/L); x 为吸光度。

1.2.6 粗酶液的制备 摇瓶发酵后得到发酵液, 发酵液 4 °C、10 000 r/min、离心 20 min。上清液即为粗酶液。

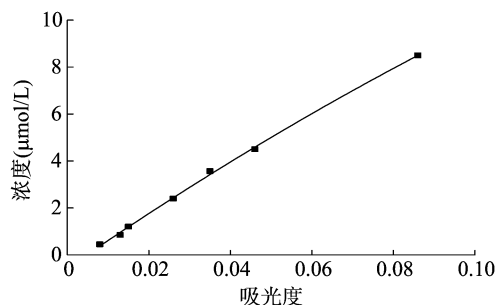


图1 β -胡萝卜素溶液浓度与吸光度的线性关系

1.2.7 β -胡萝卜素的降解率及酶活性的计算 取 5 mL 酶液 (37 °C 水浴中保温) 并加入 500 μ L β -胡萝卜素储备液, 加入光程 1 cm 的玻璃比色皿中, 以未加 β -胡萝卜素储备液的粗酶液作对照, 立刻在 450 nm 处测其吸光度, 测完后立即在 37 °C 下避光水浴, 每隔 1 min 测定 1 次吸光度。酶活性单位定义: 在 37 °C、pH 值为 6.5 条件下 1 min 降解 1 μ mol β -胡萝卜素所需的酶量为 1 个单位。

β -胡萝卜素降解率及酶活性的计算公式:

$$\text{降解率} = \frac{\text{原有 } \beta\text{-胡萝卜素含量} - \text{现有 } \beta\text{-胡萝卜素含量}}{\text{原有 } \beta\text{-胡萝卜素含量}};$$

$$\text{酶活性} = (C_0 - C_t) \times (5.0 + 0.5) / 5.0 \times t;$$

$$C_0 = \text{初始 } \beta\text{-胡萝卜素含量 } (\mu\text{mol/L});$$

$$C_t = t \text{ min 后 } \beta\text{-胡萝卜素含量 } (\mu\text{mol/L});$$

$$t = \text{时间 (min)}.$$

1.2.8 培养基优选试验

1.2.8.1 培养基组分单因素试验 (1) 碳源筛选: 分别以葡萄糖、蔗糖、乳糖、半乳糖、果糖、淀粉为发酵培养基中的唯一碳源, 碳源浓度均为 2%; 氮源筛选: 分别以蛋白胨、牛肉膏、酵母提取物、 $(NH_4)_2SO_4$ 为发酵培养基中的唯一氮源, 浓度均为 10 g/L。葡萄糖添加量筛选: 分别以 5.00、10.00、15.00、20.00、25.00、30.00 g/L 葡萄糖量进行发酵试验; 酵母粉添加量筛选: 分别以 3.50、4.00、4.50、5.00、5.50、6.00 g/L 酵母粉量进行发酵试验; 蛋白胨筛选: 分别以 8.00、9.00、10.00、11.00、12.00、13.00 g/L 蛋白胨含量进行发酵试验。活化后的西方许旺酵母接入已灭菌的装有 150 mL 培养基的 300 mL 三角瓶中, 接种量 5% (体积分数), 28 °C 培养 72 h 后, 测定西方许旺酵母酶活性, 试验数据为 3 次重复试验平均值。在此基础上, 采用正交试验优化基础培养基组成。

(2) 微量元素单因素试验: 微量元素在西方许旺酵母生长繁殖和代谢过程中起着重要的作用, 影响菌株产酶能力。测定西方许旺酵母酶活性, 试验主要考察 Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Na^+ 、 K^+ 对菌株产双加氧酶的影响。 $FeSO_4$ 添加量筛选: 分别以 0.10、0.15、0.20、0.25、0.30 g/L $FeSO_4$ 添加量进行发酵试验; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 添加量筛选: 分别以 0.40、0.45、0.50、0.55、0.60 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 添加量进行发酵试验; $NaNO_3$ 添加量筛选: 分别以 2.00、2.50、3.00、3.50、4.00 g/L $NaNO_3$ 添加量进行发酵试验; KCl 添加量筛选: 分别以 4.00、4.50、5.00、5.50、6.00 g/L $NaNO_3$ 添加量进行发酵试验。通过测定西方许旺酵母酶活性, 研究微量元素的添加量对西方许旺酵母菌株产酶的影响。在此基础上, 采用正交试验优化微量元素组成。

配制液体发酵培养基前,用 0.1 mol/L HCl 将微量元素成分配制成使用浓度 100 倍贮液,即每 100 mL 0.1 mol/L HCl 溶解一定量的 FeSO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 NaNO_3 、KCl, 每配制 100 mL 液体发酵培养基取 100 倍贮液 1 mL 即可。

1.2.9 发酵条件优化试验 以优化的发酵培养基为基础。培养温度对菌株产酶的影响:以温度 26.0、27.0、28.0、29.0、30.0 $^{\circ}\text{C}$ 等,于 pH 值 7.0、160 r/min 摇床培养 72 h。培养基初始 pH 值对菌株产酶的影响:用 0.1 mol/L HCl/NaOH 溶液调节培养基初始 pH 值梯度为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0,于 28 $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 摇床培养 72 h。

摇床转速对菌株产酶的影响:通过摇床转速控制通气量对菌株的影响。以优化的发酵培养基为基础,选取 140、150、160、170、180 r/min 等 5 个转速,于 pH 值 7.0、28 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养 72 h。接种量对菌株产酶的情况:活化后的菌株按照 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7% 等 7 个接种量,于 pH 值 7.0、28 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养 72 h。测定西方许旺酵母酶活性的大小,分别研究温度、初始 pH 值、摇床转速、接种量对菌株产酶的影响。试验数据为 3 次重复试验平均值。在此基础上,采用响应面设计试验,优化发酵条件。

2 结果与分析

2.1 西方许旺酵母生长曲线

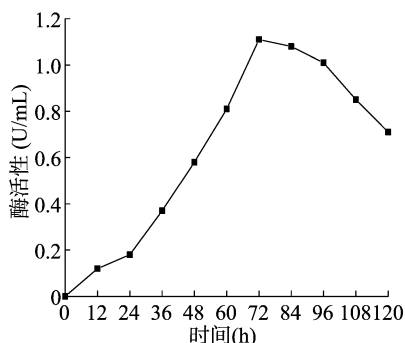


图2 西方许旺酵母生长曲线

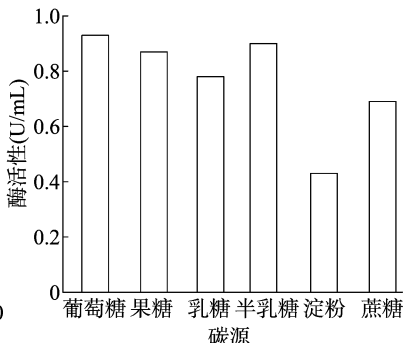


图3 不同碳源对西方许旺酵母酶活性的影响

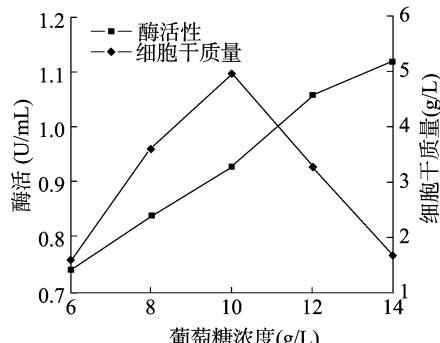


图4 不同浓度的葡萄糖对产酶的影响

2.2.2 不同氮源对西方许旺酵母菌株产酶的影响 (1) 不同氮源对西方许旺酵母酶活性的影响结果见图 5。(2) 不同浓度蛋白胨对酶活性的影响结果见图 6。由图 6 可知,西方许旺酵母酶活性和细胞生长的影响规律是基本一致的。在蛋白胨含量为 8.00 ~ 11.00 g/L 时,随着浓度的增加,其诱导作用明显增大,酶活性、细胞干质量也随之增加,酶活性最高达到 1.02 U/mL。当蛋白胨浓度继续增加时,诱导作用相对

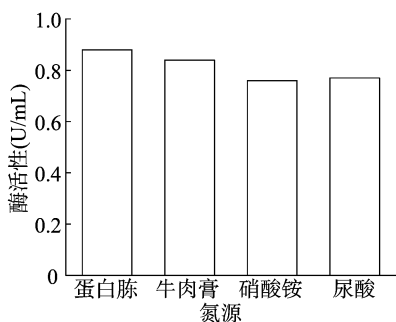


图5 不同氮源对西方许旺酵母酶活性的影响

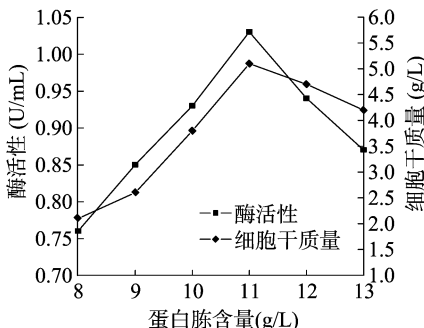


图6 不同浓度蛋白胨对酶活性的影响

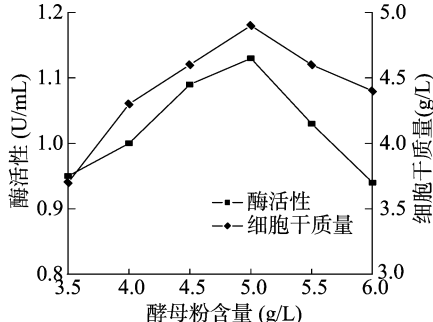


图7 不同浓度酵母粉对酶活性的影响

西方许旺酵母菌种于 28 $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 避光培养,每 12 h 取样 1 次,测定酶活性(图 2)。随着培养时间的延长,酶活性逐渐升高。西方许旺酵母在迟滞期时细胞数量较少,酶活性也较低;随着微生物对数生长期的到来,酶活性逐渐升高,在 72 h 左右达到最大值(1.11 U/mL)。可知,西方许旺酵母对数生长期后期,菌体能量不再主要用于菌体繁殖,而主要消耗在代谢产物上。因此,酶的收获要控制在生长的稳定期。

2.2 基础培养基筛选单因素试验结果

2.2.1 不同碳源对西方许旺酵母菌株产酶的影响 (1) 不同碳源对西方许旺酵母菌酶活性的影响。西方许旺酵母能利用葡萄糖、果糖、乳糖、半乳糖、淀粉、蔗糖进行生长并产生双加氧酶。从生成的酶活性来看,以葡萄糖为碳源时,产酶活性最高为 0.93 U/mL,反映出菌种对葡萄糖利用率较高,能够较快地促进菌种细胞生长繁殖,从而提高产酶能力。故选用葡萄糖作为培养基的碳源(图 3)。

(2) 不同浓度的葡萄糖对产酶的影响。当葡萄糖浓度为 6 ~ 10 g/L 时,随着葡萄糖浓度的增加,酵母菌产酶能力增强,当葡萄糖浓度为 10 g/L 时,西方许旺酵母酶活性最高可以达到 1.1 U/mL,当葡萄糖浓度超过 10 g/L 时,细胞生长量继续增加,但酶活性迅速下降,可能是充足的葡萄糖满足了细胞生长的需求,合成大量的细胞,但没有用于酶的合成,因此西方许旺酵母培养基中葡萄糖的添加量定为 10 g/L(图 4)。

减弱了,可能是高浓度的蛋白胨对酶的合成产生了阻遏作用。

2.2.3 不同浓度酵母粉对酶活性的影响 酵母粉对酶活性的影响结果见图 7。酵母粉含量为 3.50 ~ 5.00 g/L 时,酶活性随酵母粉含量逐渐增强,当酵母粉的含量大于 5.00 g/L 时,酶活性逐渐减少,总体来说酵母粉的含量对西方许旺酵母酶活性影响不大,当酵母粉含量达到 5.00 g/L 时,此时西方许旺酵母的酶活性达到最高,为 1.13 U/mL。

2.2.4 培养基基本组分正交试验 经单因素试验,培养基以葡萄糖、蛋白胨、酵母粉为主要能源物质,经正交试验,优化基本组分的配比,检测菌株酶活性,试验设计见表 1,正交试验结果见表 2,方差分析见表 3。由正交试验结果可知,较优组合水平为 A₂B₁C₂,基础培养基的较优组合为葡萄糖 10 g/L,蛋白胨 10 g/L,酵母粉 5 g/L,其中葡萄糖对菌株生长效果影响显著,说明葡萄糖对西方许旺酵母的生长起到主要作用。

表 1 培养基基本组分正交试验设计

因素水平	A:葡萄糖(g/L)	B:蛋白胨(g/L)	C:酵母粉(g/L)
1	9.00	10.00	4.00
2	10.00	11.00	5.00
3	11.00	12.00	6.00

2.3 无机盐筛选单因素试验

2.3.1 不同添加量的 FeSO₄ 对西方许旺酵母酶活性的影响

FeSO₄ 对西方许旺酵母酶活性的影响结果见图 8。FeSO₄ 的添加量对酶活性的影响非常明显,当 FeSO₄ 浓度为 0.20 g/L 时酶活性最强,为 0.98 U/mL。在 0.15~0.25 g/L 之间,西方许旺酵母酶活性较强,选择此区间为最佳正交设计水平。

2.3.2 不同添加量的 MgSO₄·7H₂O 对西方许旺酵母酶活性的影响 MgSO₄·7H₂O 对西方许旺酵母酶活性的影响结果见图 9。当 MgSO₄·7H₂O 浓度为 0.50 g/L 时酶活性最强,为 0.97 U/mL。

2.3.3 不同添加量的 NaNO₃ 对西方许旺酵母酶活性的影响

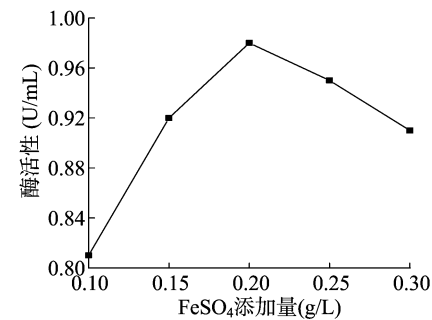


图8 不同添加量的 FeSO₄ 对西方许旺酵母酶活性的影响

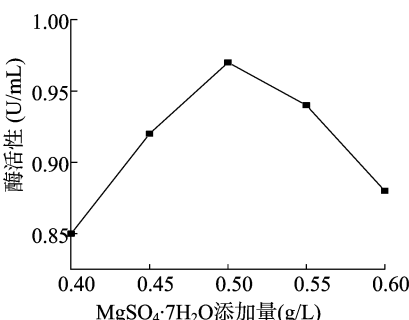


图9 不同添加量的 MgSO₄·7H₂O 对西方许旺酵母酶活性的影响

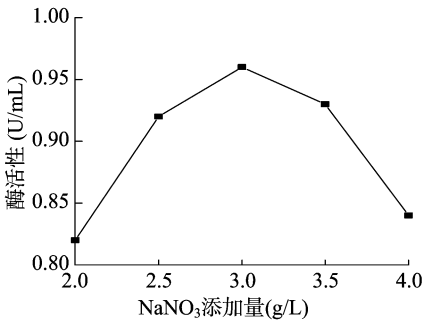


图10 不同添加量的 NaNO₃ 对西方许旺酵母酶活性的影响

2.3.4 不同添加量的 KCl 对西方许旺酵母酶活性的影响

KCl 对西方许旺酵母酶活性的影响结果见图 11。当 KCl 浓度为 5.0 g/L 时,酶活性最强为 0.98 U/mL。

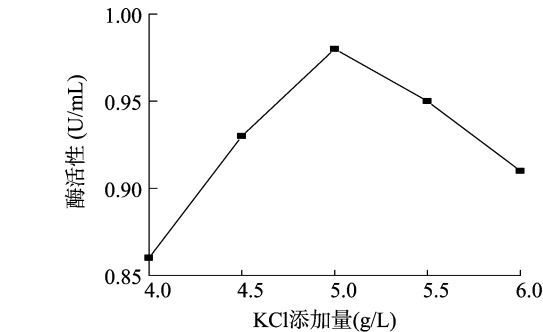


图11 不同添加量的 KCl 对西方许旺酵母酶活性的影响

2.3.5 微量元素正交试验设计 培养基的微量元素分别为 FeSO₄、MgSO₄·7H₂O、NaNO₃、KCl,经正交试验,优化微量元

表 2 培养基基本组分正交试验结果

试验编号	A	B	C	D (空列)	酶活性 (U/mL)
1	1	1	1	1	0.77
2	1	2	2	2	0.81
3	1	3	3	3	0.68
4	2	1	2	3	1.19
5	2	2	3	1	1.05
6	2	3	1	2	0.95
7	3	1	3	2	0.87
8	3	2	1	3	0.91
9	3	3	2	1	0.93
k ₁	0.753	0.943	0.877	0.917	
k ₂	1.063	0.923	0.977	0.877	
k ₃	0.903	0.853	0.867	0.927	
R	0.310	0.090	0.110	0.050	

表 3 培养基基本组分方差分析

因素	偏差平方和	自由度	F 值	F 临界值	显著性
A	0.144	2	36.000	19.000	显著
B	0.013	2	3.250	19.000	
C	0.022	2	5.500	19.000	
D	0.004	2	1.000	19.000	
误差	0.001	2			

响 NaNO₃ 对西方许旺酵母酶活性的影响结果见图 10。当 NaNO₃ 浓度为 3.0 g/L 时酶活性最强,为 0.96 U/mL。

素的最佳添加量,研究微量元素对菌株产酶的影响,试验以酶活性为检测目标。试验设计见表 4,优化试验结果见表 5,方差分析见表 6。由表 5、表 6 正交试验结果可知,较优组合水平为 A₂B₁C₂D₃,即微量元素的较优组合为 0.20 g/L FeSO₄、0.45 g/L MgSO₄·7H₂O、3.0 g/L NaNO₃、0.5 g/L KCl。其中 Fe²⁺ 对整个试验效果影响显著。适度增加 Fe²⁺ 浓度有利于西方许旺酵母的生长,Fe²⁺ 是影响该菌株生长的重要元素。对微量元素优化的结果,和 Eduardo 等在 2005 年的文献报道相似,在优化降解叶黄素转化为烟草香味物质中的菌种生长条件时,Fe²⁺ 起到重要作用,该优化的培养基中 FeSO₄ 为 0.136 g/L,在所有的微量元素中,Fe²⁺ 添加量最大^[14]。Dionfsio 等采用矿物质固态培养基培养微生物,降解转化 β-胡萝卜素,产生 β-紫罗兰酮、β-二氢大马酮等香味物质研究中,同样 Fe²⁺ 在矿物质中添加量明显^[7]。另外 Mg²⁺ 也是必不可少的,虽然添加量低,但同样有利于降解菌株的生长,从而使降解菌株产酶能力增加。Zorn 等在丝状真菌和酵母

表 4 培养基微量元素正交试验设计

水平	A:Fe ²⁺ (g/L)	B:Mg ²⁺ (g/L)	C:Na ⁺ (g/L)	D:K ⁺ (g/L)
1	0.15	0.45	2.50	0.3
2	0.20	0.50	3.00	0.4
3	0.25	0.55	3.50	0.5

表 5 培养基微量元素正交试验结果

试验编号	A	B	C	D	酶活性 (U/mL)
1	1	1	1	1	0.73
2	1	2	2	2	0.78
3	1	3	3	3	0.63
4	2	1	2	3	1.19
5	2	2	3	1	1.04
6	2	3	1	2	0.93
7	3	1	3	2	0.84
8	3	2	1	3	0.87
9	3	3	2	1	0.91
k ₁	0.713	0.920	0.843	0.893	
k ₂	1.053	0.897	0.960	0.850	
k ₃	0.873	0.823	0.837	0.897	
R	0.340	0.097	0.123	0.047	

菌降解β-胡萝卜素为香味化合物的菌株筛选时,无机盐中Mg²⁺是必须添加的^[9-10]。

2.4 产酶发酵条件优化结果

2.4.1 温度对酶活性的影响 温度对酶活性的影响结果见

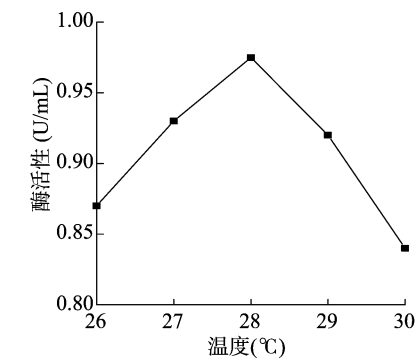


图12 温度对酶活性的影响

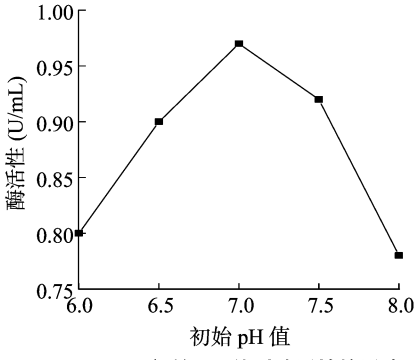


图13 初始 pH 值对酶活性的影响

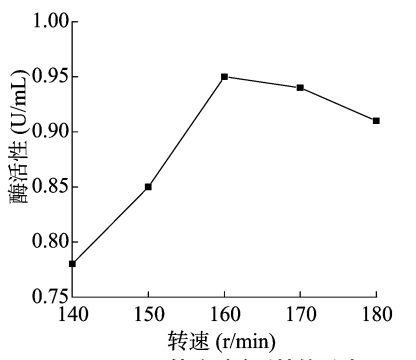


图14 转速对酶活性的影响

2.4.4 接种量对西方许旺酵母菌株产酶的影响 接种量对西方许旺酵母菌株产酶的影响结果见图 15。接种量对降解β-胡萝卜素双加氧酶的生成影响较大,接种量在 1%~5% 时,随着接种量的增加,双加氧酶的活性和菌体的生长量均随之增加,当添加量为 5% 时,酶活性达到最高,为 1.22 U/mL。但接种量继续增加,双加氧酶合成速度下降,导致酶活性降低。

2.4.5 响应面因素水平的设计和结果分析 菌株产酶条件响应面各因素水平设计见表 7,试验结果见表 8,以酶活性为检测目标。

由表 9 可知模型极显著,失拟项不显著,建模成功。模型的确定系数 R² = 0.996,说明模型能解释双加氧酶酶活性响应值的变化。该模型与实际情况拟合较好,可用于分析西方许旺酵母发酵液酶活性的实际情况。在水平范围内温度和起始 pH 值对酶活性的影响为极显著。酶活性 = -69.840 +

表 6 培养基微量元素方差分析

因素	偏差平方和	自由度	F 值	F 临界值	显著性
A	0.211	2	21.1	19	显著
B	0.02	2	2.0	19	
C	0.023	2	2.3	19	
D	0.01	2	1.0	19	
误差	0.01	2			

图 12。随着温度的升高,西方许旺酵母代谢能力增强,温度接近 28℃ 时,酶活性达到最高,27~29℃ 之间西方许旺酵母有较强的代谢能力,因此选择此区间作为响应面的温度设计水平。

2.4.2 初始 pH 值对酶活性的影响 初始 pH 值对酶活性的影响结果见图 13。酸性或者碱性的环境都不利于微生物的代谢活动,只有在中性环境下才较利于微生物的生长,有助于香味物质的累积,故选择起始 pH 值为 7.0。

2.4.3 转速对酶活性的影响 转速对酶活性的影响结果见图 14。转速越高溶解在培养基中的氧气越多,有利于菌体生长和产酶量的增加。西方许旺酵母的培养是需氧发酵,所以在 160~180 r/min 范围内随着转速的提高,培养基中溶氧量增加,细菌生长繁殖加快,菌体密度提高,同时酶产量提高。表明氧气是合成双加氧酶所必需的,并且溶解氧有利于该菌的生长代谢。但溶氧过大不仅造成浪费而且还可能改变代谢途径,所以发酵过程中并不是溶氧量越高越好,而是应以达到该菌的临界氧浓度为宜。本发酵过程中转速主要是影响培养基溶氧值,对于好氧微生物来说,溶氧充分有利于其生长,而对厌氧微生物就要控制环境中的氧含量。

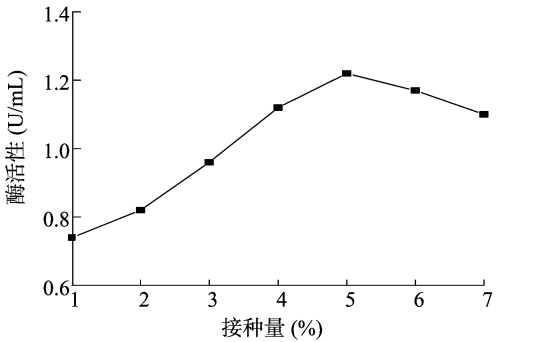


图15 接种量对酶活性的影响

3.143A + 4.501B + 0.140C + 0.025AB + 0.00025AC + 0.001BC - 0.0605A² - 0.372B² - 0.00048C²。

通过 DesignExpert 软件对各因素之间的交互作用进行响应面分析,绘制响应面曲线图。为了可视化3个因素对酶活

表 7 产酶条件 BOX - Behnken 试验设计

因素水平	A:温度 (℃)	B:起始 pH 值	C:转速 (r/min)
-1	27	6.5	150
0	28	7.0	160
1	29	7.5	170

表 8 产酶条件响应面试验结果

试验编号	A:温度 (℃)	B:起始 pH 值	C:转速 (r/min)	酶活性 (U/mL)
1	27	7.0	150	1.14
2	28	7.0	160	1.21
3	29	6.5	160	0.95
4	28	7.0	160	1.22
5	28	7.0	160	1.21
6	28	6.5	170	0.99
7	27	6.5	160	1.03
8	28	7.5	170	1.16
9	28	7.0	160	1.23
10	28	7.0	160	1.21
11	27	7.5	160	1.15
12	27	7.0	170	1.14
13	28	6.5	150	1.00
14	29	7.0	170	1.08
15	29	7.0	150	1.07
16	29	7.5	160	1.12
17	28	7.5	150	1.15

性的影响,将 1 个因素取 0 水平值,另 2 个因素对酶活性的影响见图 16 至图 18。

从图 16 至图 18 响应面立体图和等高线可知,温度和起始 pH 值的交互作用对产酶效果影响显著;而转速和温度以及转速和起始 pH 值的交互作用对产酶效果影响均不显著。

从图 16 响应面可以看出,随着温度的增加,酶活性先增

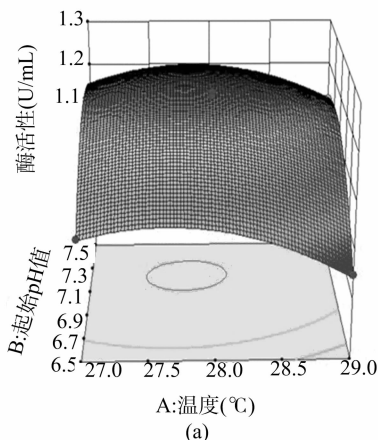


图 16 温度、起始 pH 值对酶活性的影响

从响应面立体图可以看出,响应值存在最大值。通过软件分析计算得出理论最佳西方许旺酵母菌株产酶最佳培养条件(表 10)。

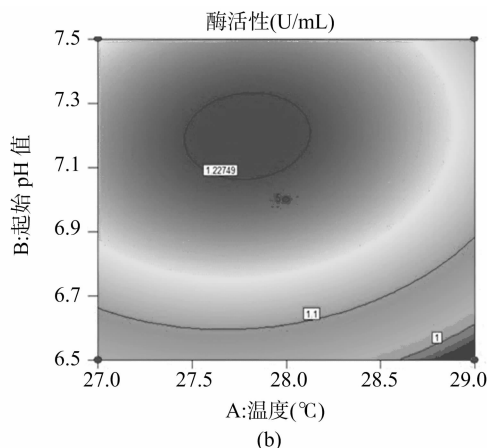
从表 10 可以看出,优化条件下,理论上菌株产酶的最高酶活性为 1.23 U/mL,而实际测得酶活性是 1.18 U/mL,和理论值仅相差 0.05 U/mL,说明该模型和实际情况拟合性好,能够反映发酵条件对酶活性的实际影响情况。

表 9 产酶条件回归方程的模型方差分析结果

方差来源	自由度	F 值	P 值	显著性
模型	9	192.45	<0.000 1	极显著
A	1	101.82	<0.000 1	极显著
B	1	657.75	<0.000 1	极显著
C	1	0.18	0.689 0	
AB	1	8.84	0.020 7	显著
AC	1	0.35	0.571 0	
BC	1	1.41	0.273 0	
A ²	1	217.94	<0.000 1	极显著
B ²	1	514.99	<0.000 1	极显著
C ²	1	137.19	<0.000 1	极显著
残差	7			
失拟项	3	0.73	0.586 0	
纯误差	4			
总和	16			

加后减少,且变化幅度较大;随着起始 pH 值的增大,酶活性先增后减,变化幅度较大。主要原因是随着温度的增加,菌株分裂细胞的速度增加,能快速达到细胞分裂稳定期,菌株产酶能力增大,从而导致酶活性提高,但过高的温度导致细胞死亡速度加快,从而使产酶细胞数量减少,致使酶液的酶活性降低。

由图 17、图 18 可以看出,发酵液的温度、起始 pH 值对酶活性的影响同样是先增后减。同时从响应面图 17、图 18 中发现,随着发酵罐转速的增加,酶活性先增加后减少。造成酶活性这种变化的原因是转速增加,酶与底物的结合概率增加,使酶催化降解 β -胡萝卜素产生的香味产物增加,而伴随着发酵罐转速的增加,发酵液能量增加,导致酶和底物结合牢固程度减低,从而使目标产物得率降低,所以在试验中适当控制发酵罐的转速,有利于酶活性的提高,增加香味物质的得率。



2.5 西方许旺酵母菌在优化培养条件下的生长和产酶过程

通过对西方许旺酵母菌产双加氧酶培养组分和培养条件的研究,确定最优培养基组成为:10 g/L 葡萄糖、10 g/L 蛋白胨、5 g/L 酵母粉、0.20 g/L FeSO_4 、0.45 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、3.00 g/L NaNO_3 、0.50 g/L KCl。培养基起始 pH 值为 7.21、28.0℃、转速 160 r/min 摇床培养。

研究菌体生长和酶的合成在最优条件下降解 β -胡萝卜

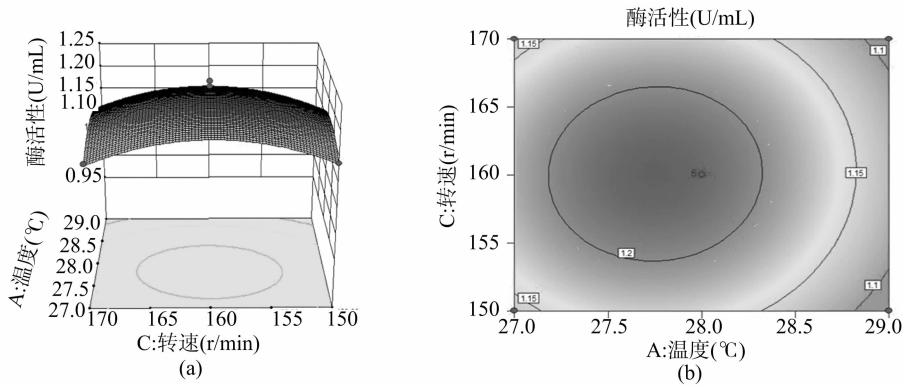


图17 转速、温度对酶活性的影响

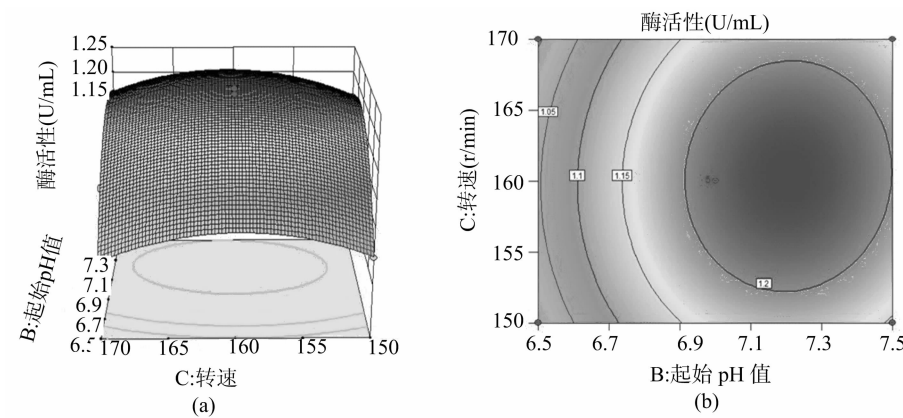


图18 转速、起始pH值对酶活性的影响

表 10 最佳因素优化结果

温度 (℃)	起始 pH 值	转速 (r/min)	酶活性 (U/mL)
27.90	7.21	160	1.23

素生成香味物质过程中,随培养时间的变化趋势。试验在最优条件下进行发酵,在发酵过程中定时取样,检测发酵上清液酶活性和菌体干质量,结果见图 19。降解 β -胡萝卜素双加氧酶的合成与细胞的生长基本上是一致的,西方许旺酵母菌在培养 12 h 左右进入对数生长期;双加氧酶的合成大约也在 12 h 开始,在 24 h 后开始大量生成,在 72 h 达到最大,为 1.18 U/mL。

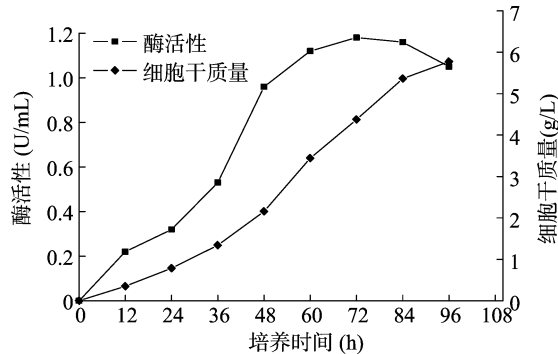


图19 降解 β -胡萝卜素双加氧酶发酵过程曲线

3 结论与讨论

本试验优化的培养基最佳组成:10.00 g/L 葡萄糖、

10.00 g/L 蛋白胨、5.00 g/L 酵母粉、0.20 g/L FeSO_4 、0.45 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、3.00 g/L NaNO_3 、0.50 g/L KCl。在此优化培养基条件下,采用发酵温度 27.90℃、起始 pH 值为 7.21、转速 160 r/min,接种量 5.0%,发酵时间为 72.0 h,此时酶活性达到 1.23 U/mL,5 次中心点重复试验结果稳定可靠。通过响应面分析,温度和起始 pH 值作用极显著,温度和起始 pH 值交互显著,客观反映了微生物的发酵条件。验证试验说明该模型和实际情况拟合性好,可以反映发酵条件对酶活性的实际影响情况,表明此优化条件是可行的。

参考文献:

[1] António - César S F, Judith M, Carla O, et al. Study of major aromatic compounds in port wines from carotenoid degradation [J]. Food Chemistry, 2008, 110(1): 83 - 87.

[2] Winterhalter P, Rouseff R. Carotenoid - derived aroma compounds [C]. Washington: American Chemical Society, 2001: 1 - 17.

[3] Aurélie B, Claudie D M, Manuel D, et al. Relationship between the kinetics of β -carotene degradation and formation of norisoprenoids in the storage of dried sweet potato chips [J]. Food Chemistry, 2010, 121(2): 348 - 357.

[4] Breheret S, Talou T, Rapior S, et al. Monoterpenes in the aromas of fresh wild mushrooms (*Basidiomycetes*) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997, 45(3): 831 - 836.

[5] McCaskill D, Croteau R. Prospects for the bioengineering of isoprenoid biosynthesis [M]//Biotechnology of aroma compounds. Berlin: Springer, 1997: 107 - 146.

孔祥佳,连至楠. 杨梅清汁加工中的酶解工艺研究[J]. 江苏农业科学,2017,45(12):131-134.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.12.034

杨梅清汁加工中的酶解工艺研究

孔祥佳,连至楠

(福建中医药大学药学院,福建福州 350122)

摘要:通过单因素和正交试验研究杨梅清汁加工中的酶解工艺,并探讨最优酶解工艺条件对杨梅清汁澄清效果的影响。结果表明,当果胶酶用量为 0.007%、pH 值为 3.5、酶解温度为 55℃、酶解时间为 150 min 时,杨梅出汁率为 81.66%、透光率为 77.09%,与相同 pH 值、温度和时间但未经过酶解工艺相比,其出汁率、透光率分别增加 20.23%、32.55%。

关键词:杨梅;酶解工艺;果胶酶;出汁率;澄清

中图分类号: TS275.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)12-0131-04

杨梅(*Myrica rubra* Sieb. & Zucc.) 属于杨梅科杨梅属亚热带常绿果树,是中国南方著名的特色水果之一。福建是我国杨梅的主产地,据统计,2010 年福建省杨梅种植面积为 17 542 hm²,总产量为 99 003 t,至 2014 年福建省杨梅种植面积为 18 992 hm²,总产量为 119 332 t^[1]。杨梅果实甜酸适口、风味浓郁、香气独特、营养价值丰富,除富含糖、有机酸、维生素 C、钙、铁、钾、花青素等营养成分外^[2-3],还具有较高的保健作用和药用价值,鲜食有抗氧化、抗肿瘤、抗过敏、抗菌消炎、降血糖、护肝、护胰岛等功效^[4-12],深受消费者喜爱。但杨梅果实成熟于梅雨季节,果实无外皮保护,肉柱突起易受伤害,鲜果货架期短,在贮藏、运输、销售过程中其营养价值和食用价值快速降低,故合理开发及加工杨梅产品成为充分利用资源、减少果实浪费的关键。杨梅的加工产品主要有果脯蜜饯、饮料和果酒酿制等^[13-14]。其中,杨梅果汁饮料能保留其原有的色泽、风味、营养成分和药理活性,具有良好的发展前景和市场潜力。

出汁率是果汁加工中首要考虑的因素。若采用传统的压榨工艺,很难破坏杨梅果实细胞壁组成中的果胶、纤维素、半

纤维素和糖蛋白等大分子物质的结构,使压榨后的果浆黏稠、取汁困难、出汁率低。而在果实细胞壁组成中,果胶物质含量相对较高,蛋白质含量相对较低^[15]。因此,破坏果胶分子结构、降低果胶物质含量是提高果实出汁率最为有效的加工方式。果胶酶是催化降解果胶物质的酶类,可破坏果胶分子结构、降低果胶物质含量,导致果实细胞壁结构的解体,从而降低果浆黏度、改善压榨性能、提高果汁可滤性和澄清度,更有利于后续过滤、澄清和浓缩工艺的进行^[16-17]。目前,果胶酶酶解澄清汁技术在蓝莓^[17]、哈密瓜^[18]、黑莓^[19]、欧李^[20]等果实中均有报道,但有关果胶酶对杨梅清汁的酶解工艺研究未见报道。本试验以“东魁”杨梅果实为材料,研究不同酶解条件对杨梅出汁率的影响及其最优酶解工艺条件下的澄清效果,确定果胶酶提高杨梅出汁率的最优工艺条件,并探讨最优酶解工艺条件对杨梅清汁澄清效果的影响,为工业化生产杨梅果汁饮料提供技术参数和理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

试验材料:“东魁”杨梅果实,采摘于福建省漳州市杨梅果园。

试验试剂:果胶酶(40 U/mg,生物试剂),上海索莱宝生物科技有限公司;柠檬酸(分析纯),国药集团化学试剂有限

收稿日期:2016-05-01

作者简介:孔祥佳(1983—),女,博士,讲师,主要从事农产品加工及贮藏工程研究。E-mail:nihaojia2005@126.com。

[6] Vander Werf M J, de Bont J A M, Leak D J. Opportunities in microbial biotransformation of monoterpenes [M]. Berlin: Springer, 1996: 15-27.

[7] Dionísio A P, Carvalho D S D, Pastore G M. Biotransformation of carotenoids into aroma compounds: screening using solid phase microextraction[J]. New Biotechnology, 2009, 25(6): 237.

[8] Sánchez-Contreras A, Jiménez M, Sánchez S. Bioconversion of lutein to products with aroma [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2000, 54(4): 528-534.

[9] Zorn H, Langhoff S, Scheibner M, et al. A peroxidase from *Lepista irina* cleaves β, β -carotene to flavor compounds [J]. Biological Chemistry, 2003, 384(7): 1049-1056.

[10] Zorn H, Langhoff S, Scheibner M, et al. Cleavage of β, β -carotene to

flavor compounds by fungi [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2003, 62(4): 331-336.

[11] 王树林,朱明明,李婧,等. 影响 β -胡萝卜素降解菌酶活性因素的研究[J]. 食品科学, 2013, 34(13): 157-161.

[12] 麻俊侠,樊明涛,王树林,等. β -胡萝卜素降解葡萄球菌化学合成培养基营养素的研究[J]. 食品科学, 2013, 34(5): 137-141.

[13] 刘维涓. β -胡萝卜素氧化降解产物的 GC-MS 研究及形成机理探讨[J]. 林产化学与工业, 2008, 28(6): 20-24.

[14] Eduardo R B, Gabriela M R, Marco A O, et al. Bioconversion of lutein using a microbial mixture - maximizing the production of tobacco aroma compounds by manipulation of culture medium [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2005, 68(2): 174-182.