

# 产聚半乳糖醛酸酶菌株 *Aspergillus niger* M-8 的筛选及产酶条件研究

王志伟, 江晓路, 牟海津

(中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东 青岛, 266003)

**摘 要** 从腐烂的葡萄干中定向分离筛选出适合液态发酵法生产聚半乳糖醛酸酶的菌株 M-8, 鉴定为黑曲霉 (*Aspergillus niger*)。经摇瓶产酶实验可知, 此菌株的产酶培养基组成及发酵条件为: 果胶 0.7%,  $\text{NaNO}_3$  0.1%,  $\text{MgSO}_4$  0.02%,  $\text{FeSO}_4$  0.001%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.03%, 豆粉 1.0%, 马铃薯 20.0%; 培养温度 28℃, 初始 pH7.0, 装液量 50mL/250mL, 接种量 7% (v/v), 培养时间 48h。在此优化发酵条件下, 酶活力达 964U/mL。该菌株生长周期短, 产酶性状稳定, 在食品领域有良好的应用前景。

**关键词** 黑曲霉, 果胶酶, 聚半乳糖醛酸酶, 发酵条件

果胶主要是由 D-半乳糖醛酸以  $\alpha$ -1,4 糖苷键连接形成的直链状聚合物。果胶酶是指分解果胶的多种酶的总称, 分为解聚酶和果胶酯酶 (PE) 2 大类<sup>[1]</sup>。果胶解聚酶主要包括聚半乳糖醛酸酶 (PG) 和果胶裂解酶 (PL)。果胶酶在食品工业中主要用于果汁澄清、橘子脱囊衣、制造浓缩果汁、果粉和低糖果冻、葡萄酒的生产等方面, 应用十分广泛<sup>[2]</sup>。在果胶酶系当中, 聚半乳糖醛酸酶可通过水解作用专一性地分解果胶质中半乳糖醛酸残基之间的糖苷键, 使高分子的半乳糖醛酸降解为小分子物质, 在工业应用当中起主要作用。

据报道, 对该酶的生产研究主要集中于固态发酵法, 但由于该方法的周期长、易污染, 在发酵中后期容易积累毒素, 而且所生产的酶成分复杂, 不利于酶的分离提纯, 产品质量很难达到食品行业的使用要求。相反, 液态发酵法具有周期短, 发酵条件容易控制, 不易污染, 可进行连续化生产, 所生产的酶组分单一等优点, 适宜于大规模工业化生产。文中以从腐烂的葡萄干中定向分离出的 1 株黑曲霉 M-8 为出发菌株, 采用液态发酵法, 研究了聚半乳糖醛酸酶的产酶条件和工艺。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 菌 种

从腐烂的葡萄干中分离筛选出 1 株产酶活力较高的菌株 M-8, 作为实验用菌株。

#### 1.1.2 培养基

(1) 初筛培养基 (%): 果胶 0.3,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.05,  $\text{NaNO}_3$  0.03,  $\text{MgSO}_4$  0.02,  $\text{FeSO}_4$  0.001,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.03, 琼脂 1.5, pH7.0。

(2) 复筛培养基 (%): 果胶 0.3,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.05,  $\text{NaNO}_3$  0.03,  $\text{MgSO}_4$  0.02,  $\text{FeSO}_4$  0.001,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.03, 马铃薯 20.0, pH7.0。

(3) 种子培养基 (%): 蔗糖 2, 马铃薯 20.0, pH 自然。

(4) 发酵培养基 (%): 果胶 0.7,  $\text{MgSO}_4$  0.02,  $\text{FeSO}_4$  0.001,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.03,  $\text{NaNO}_3$  0.1, 豆粉 1.0, 马铃薯 20.0, pH7.0。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 菌株筛选

先将采集的不同样品进行富集培养, 之后涂于初筛培养基平板上, 并于 28℃ 下恒温培养 3d。然后将初筛平板中的菌落根据不同的形态、颜色、大小等特征挑选出来进行纯化。将多次纯化后的初筛菌株接于复筛培养基中, 并于 28℃ 下摇瓶培养 48h。最后将发酵液于 3 000 r/min 下离心 5 min, 取上清液测定酶活。

### 1.2.2 酶活性测定 (DNS 法)

取 0.2% 的果胶溶液 1mL 于具塞试管中, 并于 35℃ 水浴平衡 5 min, 然后加入 50  $\mu\text{L}$  的粗酶液, 35℃ 保温 30 min, 再加入 1 mL DNS 溶液终止反应, 沸水浴 5 min 之后迅速冷却, 用蒸馏水定容至 25 mL, 以灭酶发酵液作为空白对照, 在 520 nm 处比色, 测定反应体系中半乳糖醛酸量。在上述条件下, 每分钟催化底物产生 1  $\mu\text{g}$  半乳糖醛酸所需酶量定义为 1 个酶活力单位, 以 U/mL 表示。

第一作者: 硕士研究生 (江晓路教授为通讯作者)。

收稿日期: 2006-07-06, 改回日期: 2006-09-19

### 1.2.3 黑曲霉 M-8 的培养方法

将孢子接种在初筛培养基斜面上, 28℃ 培养 96 h。然后在斜面试管培养基中, 加入 9 mL 无菌生理盐水, 并用接种环将孢子轻轻刮下, 接 2 mL 的孢子悬液于种子培养基中, 28℃ 摇瓶培养 36 h。之后按 5% 的接种量将种子接入 50 mL 发酵培养基中, 28℃ 摇瓶培养 48 h。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株筛选结果

由图 1 可知, 在复筛出的 10 株产酶菌株当中, 菌株 M-8 的初始酶活较高, 可达 189 U/mL, 因此选用此菌株作为实验菌。

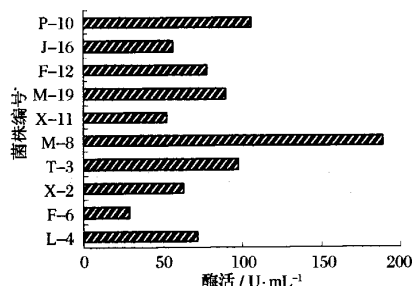


图1 产酶菌株筛选结果

### 2.2 菌落的形态观察及菌种的鉴定

菌株 M-8 在察氏培养基上生长良好, 28℃ 培养 72 h, 菌落直径为 1~1.5 cm, 菌丝初为白色, 厚绒状, 成熟菌落产生大量孢子, 黑色, 菌落反面无色。分生孢子头幼时成球形, 直径为 110~150 μm, 黑褐色。分生孢子梗长短不一, 一般为 1.20~2.85 mm, 直径 7.5~17.5 μm, 透明, 光滑, 无横隔, 壁厚。顶囊球形, 直径 42.5~67.5 μm。小梗双层, 自顶囊全面着生, 梗基一般 (18.5~28) μm × (~5.5) μm, 小梗 (6.5~9) μm × (2.5~3) μm。分生孢子球形, 直径 2.5~4 μm。经鉴定为黑曲霉 (*Aspergillus niger*)<sup>[3]</sup>。

### 2.3 产酶培养基的优化

#### 2.3.1 果胶添加量对产酶的影响

分别按 0.3%、0.5%、0.7%、0.9% 的添加量加入果胶, 其他成分及比例与复筛培养基相同, 28℃, 48 h 摇瓶发酵, 检测其酶活力。由图 2 可知, 当果胶添加量为 0.7% 时, 产酶活力为 551 U/mL, 但过高的添加量反而会抑制产酶。

#### 2.3.2 碳源对产酶的影响

按 0.7% 的量分别添加不同碳源, 其他成分及比例与复筛培养基相同, 28℃, 48 h 摇瓶发酵, 检测其

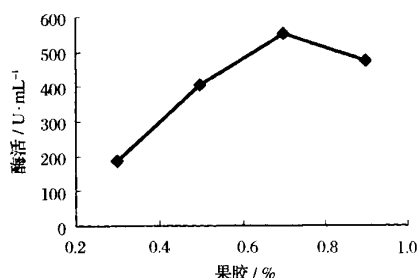


图2 果胶添加量对产酶的影响

酶活力。由图 3 可知, 果胶的作用要明显优于其他碳源, 酶活可达 559 U/mL, 而以葡萄糖和蔗糖为碳源时酶活最低, 说明这 2 种碳源明显阻遏了酶的合成, 这与一些文献报道的结果一致<sup>[4,5]</sup>, 表明该菌株所产生的酶以诱导型为主。

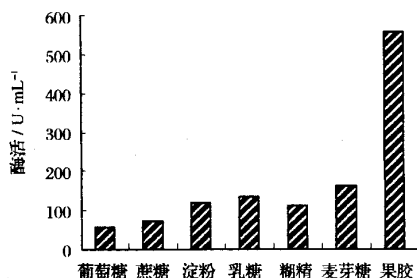


图3 碳源对产酶的影响

#### 2.3.3 氮源对产酶的影响

按 0.1% 的量添加  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、 $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{KNO}_3$  和  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 按 0.3% 的量添加牛肉膏、蛋白胨和酵母膏, 按 1.5% 的量添加豆粉, 果胶按 0.7% 的量添加, 其他成分及比例与复筛培养基相同, 28℃, 48 h 摇瓶发酵, 检测其酶活力。由图 4 可知, 豆粉作为氮源时产酶活力较高, 为 755 U/mL。

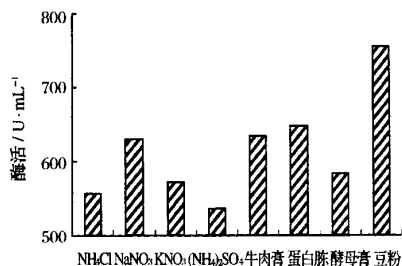


图4 氮源对产酶的影响

#### 2.3.4 正交实验

选取碳源(果胶)、无机氮源( $\text{NaNO}_3$ )和有机氮源(豆粉)进行三因素三水平正交实验。实验结果见表 1。

表 1 正交实验数据分析表

实验号	果胶(A) /%	NaNO <sub>3</sub> (B) /%	豆粉(C) /%	酶活 /U·mL <sup>-1</sup>
1	0.3	0.05	1.0	368
2	0.3	0.10	1.5	392
3	0.3	0.15	2.0	269
4	0.5	0.05	1.5	516
5	0.5	0.10	2.0	439
6	0.5	0.15	1.0	585
7	0.7	0.05	2.0	710
8	0.7	0.10	1.0	873
9	0.7	0.15	1.5	807
M <sub>1j</sub>	343.0	531.3	608.7	
M <sub>2j</sub>	513.3	568.0	571.7	
M <sub>3j</sub>	796.7	553.7	472.7	
m <sub>1j</sub>	114.3	177.1	202.9	
m <sub>2j</sub>	171.1	189.3	190.6	
m <sub>3j</sub>	265.6	184.6	157.6	
R <sub>j</sub>	151.3	12.2	45.3	

经过极差分析可以得出,ABC3种因素对酶活的影响大小为A>C>B,即果胶>豆粉>NaNO<sub>3</sub>,产酶培养基组成为A<sub>3</sub>C<sub>1</sub>B<sub>2</sub>,与表1得出的第8组培养基组成吻合,即果胶0.7%,豆粉1.0%,NaNO<sub>3</sub>0.1%。

## 2.4 产酶条件的优化

### 2.4.1 不同初始 pH 对产酶的影响

将种子按5%的接种量接入装有50 mL发酵培养基的250 mL三角瓶中,在不同的起始pH的条件下,28℃,48 h摇瓶发酵,检测其酶活力。由图5可知,当培养基初始pH为7.0时,产酶活力较高,为873 U/mL。

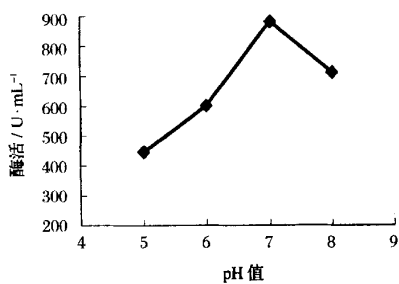


图 5 培养基初始 pH 对产酶的影响

### 2.4.2 不同发酵温度对产酶的影响

将种子按5%的接种量接入装有50 mL发酵培养基的250 mL三角瓶中,分别置于25℃、28℃、31℃、34℃的恒温摇床中振荡培养48 h,检测其酶活力。由图6可知,菌株产酶的适宜温度为28℃,产酶活力达870 U/mL。

### 2.4.3 不同装液量对产酶的影响

将种子按5%的接种量接入分别装有25 mL、50

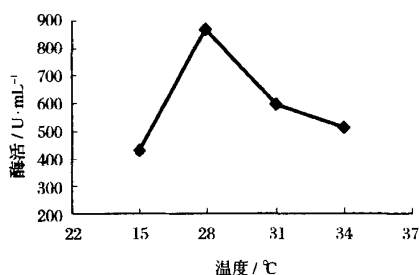


图 6 温度对产酶的影响

mL、75 mL、100 mL、125 mL 发酵培养基的250 mL三角瓶中,28℃,48h摇瓶发酵,检测其酶活力。由图7可知,装液量为50 mL时发酵液酶活较高,达895 U/mL。

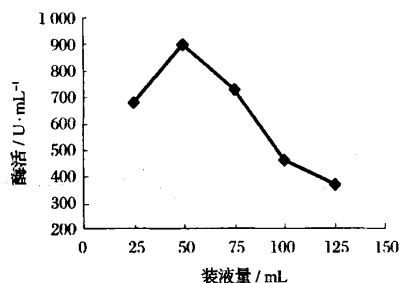


图 7 装液量对产酶的影响

### 2.4.4 不同接种量对产酶的影响

将种子分别按3%、5%、7%、9%(v/v)的接种量接入装有50 mL发酵培养基的250 mL三角瓶中,28℃,48 h摇瓶发酵,检测其酶活力。由图8可知,当接种量为7%(v/v)时发酵液酶活最高,为957 U/mL。

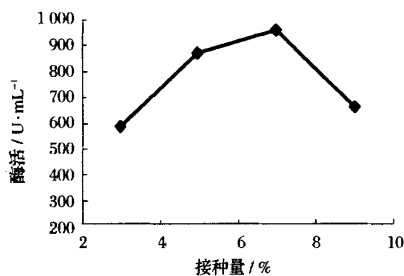


图 8 接种量对产酶的影响

## 2.5 生长及产酶曲线

将种子按7%的接种量接入50 mL发酵培养基中,28℃摇瓶发酵,每隔4 h测定1次酶活力并计算菌体干重。由图9可知,菌株M-8发酵40 h时达到生长高峰,48 h时达到产酶高峰,酶活力为964 U/mL。

## 2.6 菌株 M-8 产酶性状的稳定性

由图10可知,该菌株在最佳的产酶条件下进行

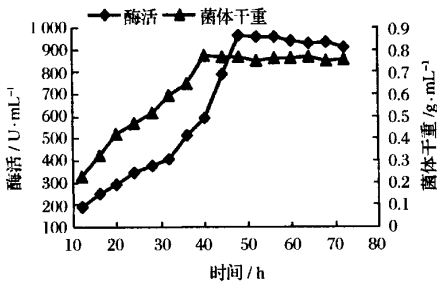


图9 菌株的生长及产酶曲线

传代产酶稳定性实验,结果表明,连续传10代,其产酶活力具有较好的稳定性。

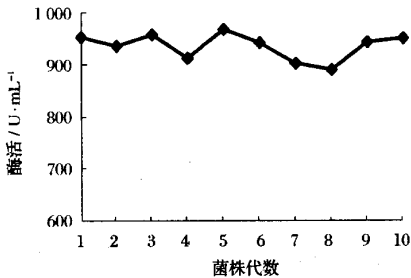


图10 菌株 M-8 的遗传稳定性

### 3 结论

研究用产酶菌株 M-8 是从腐烂的葡萄干中分离筛选出来的。通过对其产酶条件的研究,确定了产酶培养基的组成及发酵条件,在优化发酵条件下,酶活力可达 964 U/mL,比初始酶活力提高了 4 倍。在研究中发现,果胶含量对产酶有相当大的影响,提高果胶含量可明显促进聚半乳糖醛酸酶的生产,而葡萄糖和蔗糖这 2 种速效性碳源对产酶有很大的抑制作用。

从菌株的发酵周期、产酶性状和安全性角度分析,该菌株具有一定的工业化开发潜力。该菌株发酵 40 h 时达到生长高峰,48 h 时达到产酶高峰,与研究较多的利用真菌进行固态发酵产酶相比<sup>[6~8]</sup>,采用该菌株进行液态发酵可明显缩短发酵周期,克服固态发酵法易污染,产酶质量不稳定的缺点;传代实验表明,该菌株的产酶性状具有较好的稳定性,同时黑曲霉又是国际公认的食用级安全菌株,可以安全的用于食品行业领域。因此实验主要研究了液体发酵法生产聚半乳糖醛酸酶的条件和工艺,以期食品工业上有更大的应用价值。

### 参 考 文 献

- 1 张树政. 酶制剂工业[M]. 北京: 科学出版社, 1984. 625~634
- 2 吴 琼, 刘自溶. 放线菌果胶酶的分离纯化及酶学性质的研究[J]. 山东轻工业学院学报, 1996, 10(4): 53~58
- 3 常见与常用真菌[M]. 北京: 科学出版社, 1978. 172~173
- 4 Maldonado MC, Strasser de Saad AM. Production of pectinesterase and polygalacturonase by *A. niger* in submerged and solid systems[J]. J Indus Microbiol Biotechnol, 1998, 20: 34~38
- 5 陈 峰, 赵学慧. 液体发酵法生产霉菌果胶酶的工艺条件[J]. 中国酿造, 1998(5): 4~5
- 6 陈 静, 王淑军, 杨从发, 等. 果胶酶产生菌的选育[J]. 淮海工学院学报, 1999, 8(3): 63~65
- 7 周建琴. 黑曲霉果胶酶产生条件的初步研究[J]. 现代食品科技, 2006, 22(1): 91~94
- 8 汤鸣强, 卞 矛, 李琼华. 米曲霉固体发酵生产果胶酶的研究[J]. 福建师范大学福清分校学报, 2006(2): 31~35

## Screen and Optimization of Polygalacturonase-producing Strain *Aspergillus niger*. M-8

Wang Zhiwei, Jiang Xiaolu, Mou Haijin

(School of Food Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**ABSTRACT** A Polygalacturonase-producing strain was isolated from rotten raisin and was identified as *Aspergillus niger*. The optimal medium and the optimal fermentation condition were determined in this paper: pectic 0.7%,  $\text{NaNO}_3$  0.1%,  $\text{MgSO}_4$  0.02%,  $\text{FeSO}_4$  0.001%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.03%, bean powder 1.0%, potato 20.0%, culture temperature at 28°C, initial pH at 7.0, the culture medium volume at 50 mL, inoculum concentration of 7%(v/v), and the culture time of 48 h. Under the above conditions, the polygalacturonase activity reached maximal level: 964 U/mL. As this strain showed some advantages in growth cycle and genetic stability, some potential applications could be found in food industries.

**Key words** *Aspergillus niger*, pectinase, polygalacturonase, fermentation condition