

黑曲霉 SL2-111 固态发酵生产聚半乳糖醛酸酶

汤鸣强¹ 谢必峰²

1(福建师范大学福清分校生物与化学工程系,福清,350300) 2(福建师范大学生物工程学院,福州,350007)

摘要 以麸皮为主要原料,采用黑曲霉(*Aspergillus niger*)诱变菌株 SL2-111 进行聚半乳糖醛酸酶固态发酵,培养物最高酶活力可达到 2 695 U/g(鲜曲)。产酶最适培养基为:麸皮 15 g,柚皮粉 1.5 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.8 g, CaCl_2 0.075 g。最佳产酶条件为:28℃, pH6.0, 培养 72h。成曲的最佳浸提条件为:以 0.1 mol/L, pH4.0 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液为浸提剂,在 30℃下浸提 5 h。

关键词 黑曲霉,聚半乳糖醛酸酶,固态发酵,浸提

果胶酶是分解果胶质的多种酶的总称。广泛应用于果汁、果酒的澄清^[1],水果蔬菜的液化、浸解,浓缩咖啡和速溶茶的加工以及木材防腐,麻类脱胶,棉织物精练加工等方面^[2]。聚半乳糖醛酸酶(EC3.2.1.15)是果胶酶的重要组分,它专一性地分解果胶中 2 个非酯化半乳糖醛酸间的糖苷键,在这些应用中起主要作用。

国内对于果胶酶的研究多是以复合酶的形式进行的^[3,4],对其中单一组分酶的研究开发是果胶酶研究的必然趋势。黑曲霉(*Aspergillus niger*)所产果胶酶系较全,是商品果胶酶生产的常用菌株。文中报道了黑曲霉 SL2-111 固态发酵产聚半乳糖醛酸酶的产酶条件及成曲中浸提聚半乳糖醛酸酶的试验。

1 材料与方法

1.1 菌种

黑曲霉(*Aspergillus niger*) SL2-111,由福建师范大学微生物工程研究所的保藏菌种经采用紫外线和亚硝基胍诱变筛选得到。

1.2 果皮粉的制备

将干净果皮 60℃烘干,用粉碎机粉碎后经 100 目筛得到。

1.3 培养基

斜面培养基(g/L):马铃薯 200 g,蔗糖 20 g,琼脂 20 g。

三角瓶基础发酵培养基:取粉碎后新鲜麸皮 15 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.3 g 加入到 250 mL 三角烧瓶中,再加入 15 mL 蒸馏水,搅合均匀,高压灭菌后待用。

1.4 培养条件

基础发酵培养基灭菌后接入 1 mL 浓度为 1×10^7 个/mL 的孢子悬液,搅拌均匀,28℃恒温培养 72 h。

1.5 仪器和试剂

1.5.1 仪器

Ultrospec2000 紫外/可见分光光度计:Amersham Biosciences 公司;水浴恒温振荡器:深圳天南海北有限公司;CS-15R 冷冻高速离心机:BECKMAN 公司。

1.5.2 试剂

果胶:上海康达化工技术服务部提供;D-半乳糖醛酸:北京经欣科生物技术有限公司提供。其余试剂均为国产分析纯。

1.6 固态发酵酶液的制备

将培养后的固体曲捣碎,加入固体曲总质量 5 倍的生理盐水,置 40℃水浴中,120 r/min 浸提 1h,1 层滤纸过滤得粗酶液。测定时取缓冲溶液稀释适当倍数。

1.7 聚半乳糖醛酸酶活力测定^[5]

取 0.5 mL 适当稀释的酶液于试管中,加入 1.0 mL pH 4.2 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液,40℃水浴平衡 5 min。加入预先平衡至 40℃的 0.5 mL 1% 果胶溶液,40℃保温 30 min,加入 3.0 mL DNS 溶液终止反应,沸水浴 7 min,冷却,加 10 mL 蒸馏水,在 550 nm 处测吸收值,测定反应体系中半乳糖醛酸量。酶活力单位定义为:在本实验条件下,每分钟释放 1 μg 半乳糖醛酸所需酶量为 1 个酶活力单位(U)。

2 结果与讨论

2.1 SL2-111 菌株固态曲的产酶条件

2.1.1 不同含果胶物质对产酶的影响

在基础发酵培养基中加入 1.5 g 不同种类果皮粉,经高压灭菌接种后,28℃恒温培养 72 h,测定酶活力。图 1 说明添加果胶粉及含果胶丰富的果皮粉可明显促进聚半乳糖醛酸酶的合成。其中,向基础发酵培养基中添加 1.5 g 柚皮粉时的酶活力为 900 U/g,比对照组提高了 80%。

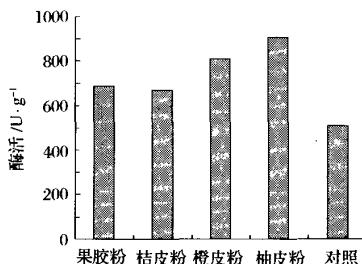


图 1 不同果胶物质对产酶的影响

第一作者:硕士,讲师。

收稿日期:2004-11-10, 改回日期:2005-01-17

2.1.2 不同浓度葡萄糖对产酶的影响

在基础发酵培养基中分别添加不同量的葡萄糖(0~1.5 g)。图2结果表明,试验范围内增加葡萄糖用量可使产酶量提高,葡萄糖添加量为1.5 g时的酶活力为3 160 U/g,是对照组的1.89倍。葡萄糖并未对所试菌株酶的合成产生抑制。

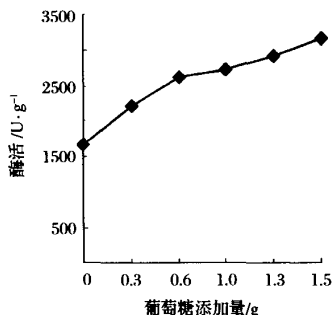


图2 葡萄糖对产酶的影响

2.1.3 无机氮源对产酶的影响

用5组无机氮化合物进行产酶实验,含氮量按0.424%计,其他成分不变,结果如图3所示。

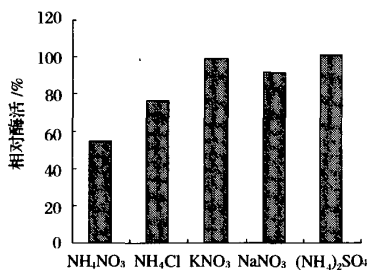
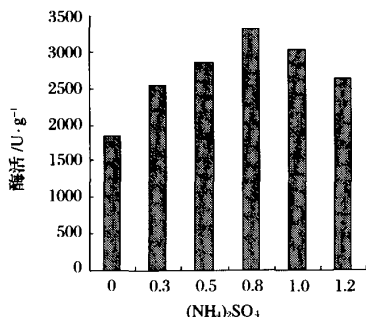


图3 无机氮源对产酶的影响

结果表明,在所试的5种无机氮源中,(NH₄)₂SO₄对产酶有明显的促进作用,KNO₃和NaNO₃次之。

试验中进一步考察了不同(NH₄)₂SO₄添加量对产酶的影响,结果如图4所示。结果表明,适当添加(NH₄)₂SO₄有利于产酶。当(NH₄)₂SO₄添加量为0.8 g(占培养基干重的5.06%)时酶活力为3 305 U/g。

图4 (NH₄)₂SO₄对产酶的影响

2.1.4 无机盐对产酶的影响

在基础发酵培养基中分别添加0.5%的无机盐,以聚半

乳糖醛酸酶活为响应值,结果如图5所示。试验表明,在所试的4种无机盐中,CaCl₂能明显促进产酶,NaCl、MgSO₄也有利于酶的产生。

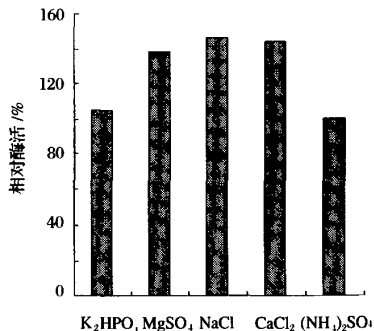


图5 无机盐对产酶的影响

2.1.5 温度对产酶的影响

将接种后的培养基置于26℃、28℃、30℃、32℃、34℃恒温培养72 h,以聚半乳糖醛酸酶活为考察指标,结果见图6。结果表明,温度明显影响酶的产量。26℃下,菌体生长缓慢,产酶量较少,而过高温度,菌体虽然生长较快,但容易衰老,再加上快速分解代谢产生的热量,使中后期培养料温度进一步升高,产酶量下降。适合产酶的最佳温度为28℃。

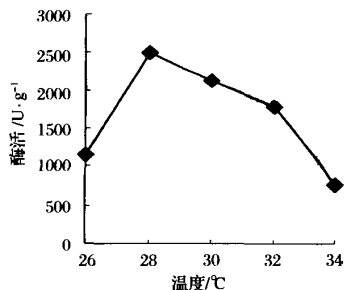


图6 温度对产酶的影响

2.1.6 培养基起始pH对产酶的影响

选择不同的起始pH培养基,研究SL-111菌株产聚半乳糖醛酸酶的情况,结果如图7所示。结果表明,适合供试菌株产酶的培养基最适起始pH值是6.0。

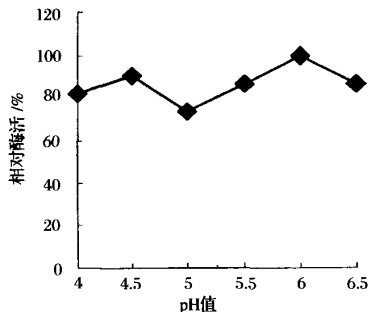


图7 培养基起始pH对产酶的影响

2.1.7 不同培养基装量对产酶的影响

在 250 mL 三角瓶中装 5、10、15、20、25 g 的湿基,进行产酶实验,结果见图 8 所示。表明装量 15 g 时酶活力最高。

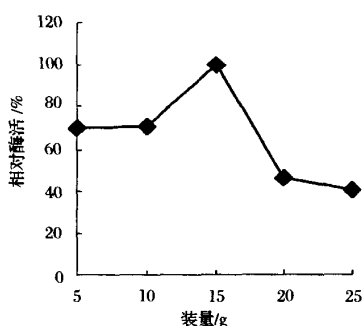


图 8 不同培养基装量对产酶的影响

2.1.8 接种量对产酶的影响

在新鲜斜面菌种中加入无菌水,刮泡制成浓度约为 10^7 个/mL 的孢子悬液。于 15g 固形物培养基中分别加入 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0 mL 孢子悬液,探讨不同接种量对产酶的影响。结果(图 9)表明接种量为 1.0 mL 时,酶活力最高。接种量过低,菌种生长缓慢,发酵周期延长,而过高的接种量则使菌种生长迅速,不利于产酶。

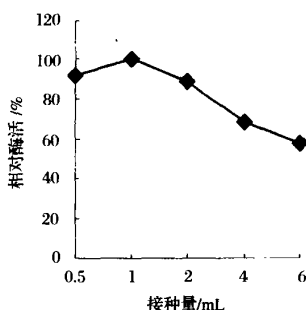


图 9 接种量对产酶的影响

2.1.9 SL2-111 菌株固态发酵的产酶过程

在上述实验基础上,采用合适的营养和培养条件进行产酶进程实验。每隔 4 h 取样测定聚半乳糖醛酶活力,中间扣瓶 3~4 次。得到培养时间与酶活力关系曲线(图 10)。培养 20h 左右,物料表面可见零星白色菌丝,24 h 物料表面可见较多的白色菌丝,此时,酶活力较低。之后菌丝分化产生分生孢子,颜色逐渐加深,由浅黄、鼠绿到黑褐色,在 52~56 h 间颜色深化很快,以至全部物料变为黑褐色。酶活力也因时间的延长而有所增加。但 72 h 后酶活力有所下降。72 h 时聚

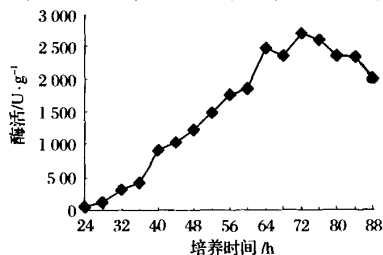


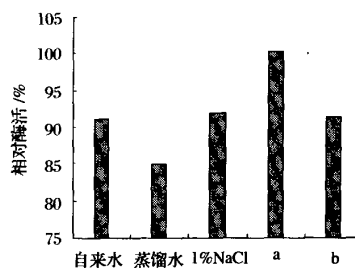
图 10 接种量对产酶的影响

半乳糖醛酶活力达到最高值 2 695 U/g(鲜曲)。

2.2 固体曲浸提条件的研究

2.2.1 各种浸提剂对酶浸出效果的影响

为了尽可能多地浸提出固体曲中的聚半乳糖醛酶,试验采用不同浸提剂,在 40℃ 水浴中,120 r/min 浸提 1 h,测定酶活力。结果见图 11。最为适合聚半乳糖醛酶的浸提剂是 pH4.0,0.1 mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。



a: pH4.00,0.1 mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液

b: pH4.00,0.1 mol/L 柠檬酸- Na_2HPO_4 缓冲液

图 11 各种浸提剂对酶浸出效果的影响

2.2.2 温度和浸提时间对浸出效果的影响

以 0.1 mol/L, pH4.0 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液为浸提剂,采用不同温度和不同浸出时间浸提鲜曲中的聚半乳糖醛酶,结果见图 12。结果表明,适当提高温度有利于聚半乳糖醛酶浸出。在 30℃ 用 0.1 mol/L, pH4.0 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液浸提时,5 h 为最佳浸提条件,浸提时间延长酶活力反而降低。

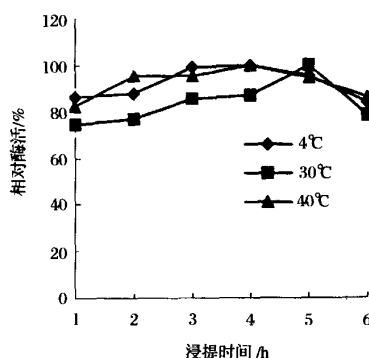


图 12 温度和浸提时间对浸出效果的影响

3 结 论

(1) 利用 SL-111 菌株通过固态发酵生产聚半乳糖醛酶。培养温度 28℃,起始 pH6.0,接种量为 1.0 mL,培养 72 h,达到的最高酶活力为 2 695 U/g(鲜曲)。

(2) 添加果胶粉及含果胶丰富的果皮粉可明显促进聚半乳糖醛酶的生产;基础发酵培养基中添加 1.5 g 的柚皮粉可使酶活提高 80%。

(3) 葡萄糖对所试菌株聚半乳糖醛酶的合成不会产生抑制作用。向基础发酵培养基中添加葡萄糖 1.5 g 时的酶活

力为对照组的 1.89 倍。

(4) 鲜曲中聚半乳糖醛酸酶的最佳浸提条件是: 以 0.1 mol/L, pH 4.0 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液为浸提剂, 30℃ 下浸提 5 h。

参 考 文 献

1 Alkorta I, Garbisu C, Llama M J, et al. Industrial applications of pectic enzymes: a review[J]. Process Biochem, 1998, 33: 21~28

2 Hoondal G, Tiwari R, Tewari R, et al. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 59: 409~418

3 陈哲超, 谢必峰. 黑曲霉发酵生产果胶酶的研究[J]. 福建师范大学学报(自然科学版), 1995, 11(4): 68~73

4 朱宝成. 果胶酶生产菌原生质体再生及诱变育种[J]. 微生物学通报, 1994, 21(1): 15~18

5 Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars[J]. Anal Chem, 1959, 31: 426~428

Studies on Solid Fermentation Production Conditions of Polygalacturonase by *Aspergillus niger* SL2-111

Tang Mingqiang¹ Xie Bifeng²

1(Department of Biology and Chemistry Engineering, Fuqing Branch of Fujian Normal University, Fuqing, 350300, China)

2(Bioengineering Institute, Fujian Normal University, Fuzhou, 350007, China)

ABSTRACT Under solid state fermentation with wheat bran as the main material, the maximum polygalacturonase activity from mutant strain *Asp. niger* SL2-111 could reach 2695 U/g. The optimal medium components were: wheat bran 15 g, peel powder 1.5 g, (NH₄)₂SO₄ 0.8 g, CaCl₂ 0.075 g. The optimal incubating conditions for polygalacturonase was 28℃ for 72 h with original pH 6.0. The optimal conditions for polygalacturonase extraction were: 0.1 mol/L, pH 4.0 citric acid buffer as infuser 30℃ for 5 h.

Key words *Aspergillus niger*, polygalacturonase, solid state fermentation, extraction

信 息 窗

“仪器信息网”介绍

www.instrument.com.cn

仪器信息网是中国分析测试协会和中国仪器仪表学会分析仪器学会指定的网站,也是目前知名的科学仪器门户网站。致力于为仪器行业提供专业化的信息服务和互联网应用服务。并不定期发行印刷版的网刊《仪器快讯》。

目前,注册仪器厂商数超过 2 000 家,个人注册会员超过 7 万名,开设的特色栏目有:

“网上仪器展览”: 350 多家国内外知名仪器厂商的全最新动态信息和产品资料,新产品,推荐产品,特价促销产品信息,也可直接访问: www.netshow.com.cn。

“仪器专场”: 按仪器的种类对市场上的各主打仪器进行专门展示,并给出采购方面的指导,目前开设了气相色谱,液相色谱,紫外可见分光光度计,原子吸收,热分析,电化学等近 200 个仪器专场,是仪器用户身边的必备采购手册。

“耗材配件”: 按仪器的种类分为色谱仪配件、光谱仪配件、质谱仪配件、玻璃仪器、化学试剂等 31 个大类,200 多个小类,目前有数十家供应商在此栏目出售近万种产品,可方便地查找出是否有现货,是否有促销等信息。

“人才频道”: 业内单位发布招聘信息,是分析测试类专业人才找工作的好地方。

“仪器论坛”: 由中国分析测试协会青年学术委员会、北京大学、中科院等多个单位合作建设,是分析测试界人士讨论问题,结交业内朋友的好去处。

“仪器讲座”: 本网多位专家精心整理编写的仪器系列讲座。

“专家咨询”: 多位资深仪器专家为您提供从分析方法到仪器原理、仪器应用等网上咨询。

“展会信息”: 与仪器及分析测试有关的展览、学术会议信息。

“专业期刊”: 提供 20 多种专业期刊的全新信息浏览,部分期刊可网上订阅。

“推荐好书”: 多种分析测试类的相关专业书籍信息,部分新书和好书可网上订购。

另外,仪器信息网为业内各单位(仪器厂商,测试中心及实验室,相关会议、展览等)提供专业化的网站建设服务。欢迎垂询!

电话: 010-51654077 传真: 010-82053100 地址: 北京市西城区新外大街 28 号普天科技园 B 座 416

邮编: 100088 Email: info@instrument.com.cn 网址: http://www.instrument.com.cn http://www.netshow.com.cn