

黑曲霉果胶裂解酶和聚半乳糖醛酸酶合成的发酵调控

张蕊, 陈慧洁, 章银军, 汪钊

(浙江工业大学生物与环境工程学院, 浙江杭州, 310014)

摘要 通过对黑曲霉(*Aspergillus niger*) wz 003 液态发酵过程的调控, 制备了高活性的果胶裂解酶, 并讨论了发酵过程中聚半乳糖醛酸酶活力的变化情况。实验表明, 发酵产酶培养基组成为(g/L): 麸皮 60, 玉米粉 40, 酵母膏 20, 胡萝卜 12, CaCO_3 10。培养条件为: 初始 pH 6.5, 30 ℃, 接种量 8%, 培养 2 d。此时果胶裂解酶活力为 375.3 U/mL, 为基础条件下的 6.225 倍, 而聚半乳糖醛酸酶的合成得到了有效控制, 酶活仅为 29.4 U/mL。改变发酵条件, 有利于聚半乳糖醛酸酶的发酵生产, 此时酶活力为基础条件下的 5.05 倍。

关键词 黑曲霉, 液态发酵, 果胶裂解酶, 聚半乳糖醛酸酶

自 1980 年代以来, 对果胶低聚半乳糖醛酸的研究已引起了国内外学者的广泛关注^[1~4]。果胶酶(pectinolytic enzyme)是分解果胶质的一类酶的总称^[5], 其中主要是聚半乳糖醛酸酶(polygalacturonase, 简称 PG)、果胶裂解酶(pentinylases, PL)。自然界中, 许多不饱和物质通常具有饱和物质所不具备的独特生物活性, 因此如何减少酶系中其他组分的影响, 从而获得高活力的果胶裂解酶来制备不饱和果胶低聚糖的研究具有重要意义。

PMG 水解高酯化果胶分子的 α -1,4 糖苷键, 而 PG 则通过水解作用切断果胶酸分子的 α -1,4 糖苷键, 形成相应的饱和低聚半乳糖醛酸。后者对果胶的水解速度及程度随果胶酯化程度的增加而降低, 与 PE 的协同作用可加速降解; 对寡聚半乳糖醛酸的水解作用也随着聚合度的长度减少而降低^[6]。endo-PG 可将果胶降解为小分子, 使果胶粘度降低并释放还原末端。PL 只能裂解贴近甲酯基的 α -1,4 糖苷键, 裂解反应遵循 β -消去机制, 生成在非还原末端的 C4 和 C5 位置有不饱和键的半乳糖醛酸^[7], 产生不饱和和低聚半乳糖醛酸, 但还原性末端与用 PG 水解的情况完全相同。即 PL 与 PG 的分解效果在表观上是一样的, 都能造成还原糖含量的增高和粘度的降低。

我国从 1990 年代初开始对果胶裂解酶进行研究, 一般均停留在菌种筛选及对酶特性研究阶段^[8~15]。有关果胶酶系中各个酶之间相互影响关系的研究鲜有报道。

本文以黑曲霉菌种(*Aspergillus niger*) wz 003 为出发菌株, 改变培养基及发酵条件, 以利于高活性 PL

的制备, 同时在发酵过程中控制 PG 的合成, 减少 PG 的影响, 同样改变控制条件也可获得较高活力的 PG。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种

黑曲霉(*Aspergillus niger*) wz003 菌株, 由浙江工业大学生物与环境工程学院实验室保藏。

1.1.2 斜面培养基(查氏培养基^[16])

NaNO_3 2g, K_2HPO_4 1 g, KCl 0.5g, MgSO_4 0.5g, FeSO_4 0.01g, 蔗糖 3 g, 琼脂 15~20 g, 水 1 000 mL, pH 自然。121 ℃灭菌 20 min。

1.1.3 基础培养基

麸皮 10.0 g, 豆饼粉 4.0 g, 水 50 mL, pH 中性。121 ℃灭菌 20 min。

1.1.4 主要试剂

DNS 试剂, 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(pH 4.2, pH 6.8), 半乳糖醛酸。

果皮粉的制备: 将果皮粉 50 ℃烘干, 用粉碎机粉碎后经 100 目筛得到的粉末即可。

1.1.5 主要仪器

隔水式电热恒温培养箱, 紫外可见分光光度仪, 高速冷冻离心机, 鼓风电热恒温干燥箱, 恒温摇床。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基优化

分别讨论碳源、氮源、无机盐、诱导物及不同配比对 PL 和 PG 酶活力的影响, 从而得到优化因素及优化配比。

1.2.2 发酵条件优化

研究起始 pH、发酵温度、接种量、发酵时间对产酶的影响, 通过对 PL 酶活力和 PG 酶活力的测定选

第一作者: 硕士研究生(汪钊教授为通讯作者)。

收稿日期: 2007-10-25, 改回日期: 2007-12-20

择发酵条件。

1.2.3 酶液的制备

发酵产物用2层纱布进行过滤,滤渣舍弃,滤液在4℃条件下10 000 r/min离心10min,滤渣舍弃,取上清液。

1.2.4 聚半乳糖醛酸酶(PG)活力测定方法

参照 Miller (1959)方法^[17]。取2.5 mL适当稀释的酶液于试管中,加入5 mL pH 4.2 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液,40℃水浴平衡5 min。加入2.5 mL的2%果胶溶液,40℃保温30 min,煮沸灭酶活,过滤。取2.0 mL滤液,加入3.0 mL DNS溶液,沸水浴7 min,冷却后加10 mL蒸馏水,置分光光度计上于550 nm处比色,测定反应体系中半乳糖醛酸量。

酶活单位定义(U):每分钟产生1 μg 半乳糖醛酸的酶量定义为1个单位聚半乳糖醛酸酶(PG)酶活(U)。

1.2.5 果胶裂解酶(PL)活力测定方法

参照 Ishii(1975)等^[18]的方法。取2.0 mL 1%果胶溶液(pH 6.8)于试管中,40℃水浴平衡5 min,加入待测酶液1 mL,40℃保温10 min。取上述反应混合物1 mL于9 mL的0.01 mol HCl中充分混合终止反应,在235 nm处测定吸光值。

酶活单位定义(U):在40℃,pH 6.8条件下,每分钟水解1%果胶,使235 nm处消光值增加0.01的酶量定义为1个果胶裂解酶(PL)酶活单位。

2 结果与讨论

2.1 优化发酵培养基

2.1.1 碳源种类和添加量对 PL 和 PG 合成的影响

以玉米粉为原料,与来源广泛,价格较为便宜的葡萄糖对照组进行产酶实验比较。实验结果如图1所示。

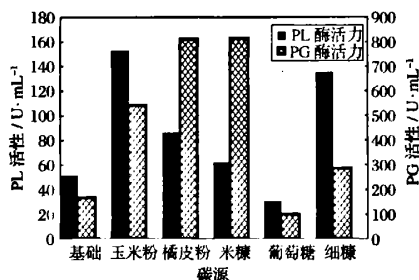


图1 不同碳源对 PL 和 PG 合成的影响

由图1可见,对 PL 的合成而言,玉米粉的促进作用最大;而对 PG 的合成而言,其中以粗糠和橘皮

粉为碳源时酶活最高。结果表明,在所试验的5种碳源中,玉米粉为合成 PL 的最佳碳源,添加量为4%时果胶裂解酶(PL)酶活达到152.4 U/mL,为基础培养基条件下的2.99倍;玉米粉价廉易得,以它作碳源可以大大减少酶的生产成本,而葡萄糖有效抑制了 PG 的合成,Maldonado 等人^[19]对葡萄糖的抑制机理作了研究,认为这种抑制是可逆的。因此,在添加量不大的情况下也有可能解除抑制效果。

2.1.2 氮源对 PL 和 PG 合成的影响

氮源对2种果胶酶的影响实验结果如图2所示。

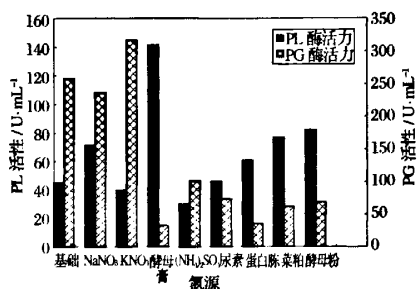


图2 不同氮源对 PL 和 PG 合成的影响

结果表明,酵母膏为促进 PL 合成,抑制 PG 合成的较佳氮源。而 NaNO₃、KNO₃ 等无机氮源对 PL 的合成影响不大,却大大提高了 PG 的酶活,其原因可能是无机氮源中小分子中的氮比大分子有机物中的氮更有利于产 PG,因此,可以初步得出结论,无机氮源有利于产 PG,有机氮源有利于产 PL。汤鸣强等^[8]考察了无机氮源对黑曲霉产 PL 的影响,其中 NaNO₃、KNO₃ 促进了 PL 的合成。说明固态发酵与液态发酵的调控机理是不同的。

2.1.3 碳氮比对 PL 和 PG 合成的影响

培养基中碳氮比对微生物生长繁殖和产物合成有非常显著的影响。实验选择碳氮比为:1/1、2/1、3/1、4/1、5/1、6/1 和 7/1。结果如图3所示。

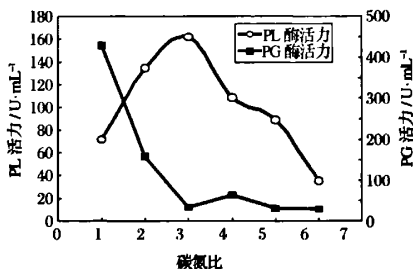


图3 不同碳氮比对 PL 和 PG 合成的影响

由图3可知,对 PL 而言,当碳氮比达到5/1时,PL 酶活力达到最大值162.3 U/mL,PG 酶活力为

33.8U/mL。

2.1.4 无机盐对 PL 和 PG 合成的影响

实验选取 10 种不同的无机盐,按 0.5% 的添加量加入基础培养基中,结果如图 4 所示。在所试的 10 种无机盐中, CaCO_3 、 K_2HPO_4 、 KCl 和 CaCl_2 4 种无机盐对 PL 的合成有较明显促进作用,其中 CaCO_3 的促进作用最大,酶活达到 241.5U/mL 为基础条件下的 3.96 倍。说明钙盐和钾盐对 PL 的合成影响较大,而且可以较好的抑制 PG 的合成,添加无机盐后, PL 和 PG 的合成得到了比较有效地控制。

2.1.5 不同浓度无机盐对 PL 和 PG 合成的影响

由表 1 中数据可以看出,在实验所试的不同浓度无机盐中,当 CaCO_3 质量浓度为 10 g/L 时,PL 酶活

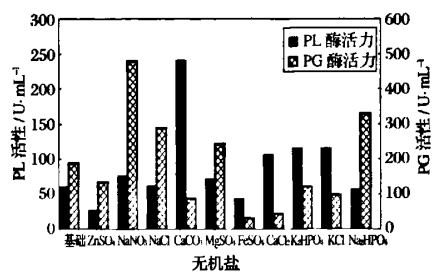


图 4 无机盐对 PL 和 PG 合成的影响

力最大,达到 161.40 U/mL,为空白对照的 3.0 倍。而质量浓度为 8 g/L 时,PL 活力仅为 10 g/L 时的 50%,说明无机盐的添加量对产酶影响显著。虽然 Mg^{2+} 对 PG 活力的影响比较大,但是同种无机盐不同浓度对 PG 的合成影响并不明显。

表 1 不同浓度无机盐对 PL 和 PG 酶活的影响

无机盐	质量浓度 /g · L ⁻¹	PL 酶活力 /U · mL ⁻¹	PG 酶活力 /U · mL ⁻¹	PL 酶活变化	PG 酶活变化
空白	/	53.70	282.98	/	/
KCl	1	60.60	111.13	+	-
KCl	5	66.30	114.05	+	-
KCl	10	53.10	71.16	-	-
K ₂ HPO ₄	1	92.40	51.32	+	-
K ₂ HPO ₄	3	120.00	62.70	++	-
K ₂ HPO ₄	5	77.40	57.74	+	-
CaCO ₃	6	92.10	106.75	+	-
CaCO ₃	8	86.10	141.47	+	-
CaCO ₃	12	161.40	101.79	+++	-
MgSO ₄	2	113.70	409.31	++	+++
MgSO ₄	4	97.50	392.68	+	++
MgSO ₄	6	52.50	294.94	-	+

注:/表示酶活无变化,+表示活力增大,-表示活力减小,++表示活力增大的幅度较大,+++表示活力增到最大。

2.1.6 诱导物对 PL 和 PG 合成的影响

由图 5 可见,以胡萝卜作为诱导物时,对 PL 的合成促进作用最大,酶活力达到 176.1 U/mL,为不添加诱导物时的 1.68 倍,此外,胡萝卜的添加较好地

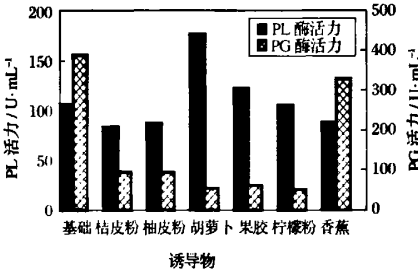


图 5 不同诱导物对 PL 和 PG 合成的影响

抑制了其合成,PG 酶活力由 387.1 U/mL 降至 50.1 U/mL。Biely 等人^[20]认为橘子果胶可以诱导产酶,但实验发现果胶的诱导效果不明显。推测原因可能是不同菌种对不同诱导物的利用程度不同,虽然橘皮

粉中果胶含量较高,但黏度也比较大,不易于微生物吸收利用。

2.1.7 不同添加量诱导物对 PL 和 PG 合成的影响

通过改变胡萝卜的添加量,考察了 PL 和 PG 酶活力的变化(图 6)。

由图 6 可以看出,对 PL 来说,当胡萝卜的添加量为 1.2% 时,酶活力最大,达到 177.3 U/mL,此后增大胡萝卜添加量,PL 酶活力下降。说明调节诱导物的添加量是可以调控产酶的,这与 Aguilar 等人^[21]报道的低聚半乳糖醛酸浓度的对产酶影响的机理是类似的。

2.2 果胶裂解酶发酵条件优化

2.2.1 接种量对 PL 和 PG 合成的影响

接种量对 PL 活力的影响如图 7 所示。可以看出,在接种量 2%~14%,接种量对 PL 合成影响较大。随着接种量的增大酶活力不断增大,当接种量为 8%,PL 酶活力达到最高。此外,接种量对 PG 合成

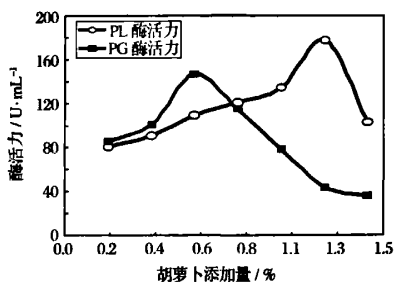


图6 诱导物不同添加量对PL和PG合成的影响
的也影响显著,12%时酶活最大。为了更有效提高PL含量并降低PG含量,选用8%的接种量为适宜。

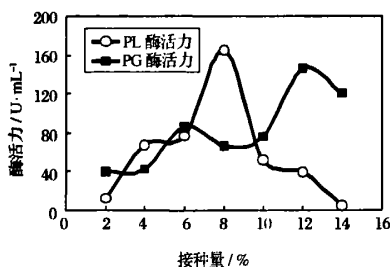


图7 接种量对PL和PG合成的影响

2.2.2 pH对PL和PG合成的影响

如图8所示,对PL来说,pH 6.5时PL酶活达到最高,为177.8 U/mL,此时PG酶活相对较低为46.4 U/mL。

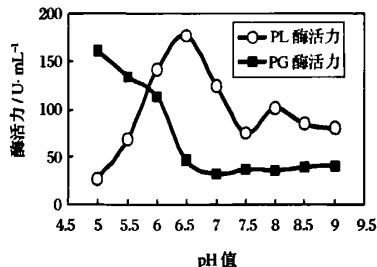


图8 不同起始pH值对PL和PG合成的影响

2.2.3 发酵时间对PL和PG合成的影响

将优化出的产酶发酵培养基放入30℃恒温摇床中连续培养,定期取样测定PL和PG酶活力,得到培养时间和酶活力的关系曲线。结果如图9所示。

对PL来说,发酵48h时,酶活力达到最大,为261.9 U/mL。在48~72h,PL酶活力下降不大,当发酵时间超过72h,PL酶活力随着发酵时间的延长迅速下降。因此,发酵48h有利于PL的合成,PG活力却是随着发酵时间的延长而增大。Ramesh^[22]发现,PG的最适发酵时间为72h。根据文献报道及

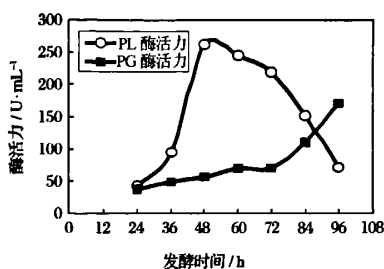


图9 不同发酵时间对PL和PG合成的影响
实验结果比较可得PG的发酵周期比PL的周期长。

2.2.4 温度对PL和PG合成的影响

温度对2种果胶酶合成的影响实验结果如图10所示。

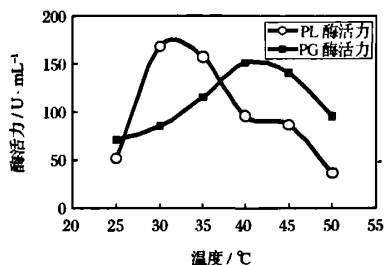


图10 不同温度对PL和PG合成的影响

由图10可以看出,培养温度对产酶有比较明显的影响。通过比较,可以得出,适合产PL的最适温度为30~35℃。而对于PG来说,在40~45℃有利于其发酵生产。Bailey^[23]发现,不同培养基中产酶条件有着明显的差别,当采用查氏培养液培养黑曲霉VTT-D86267时,18℃是产酶的最适温度,30℃时产酶量极低。而在甜菜渣培养液(30 g/L)中培养该菌株时,30℃条件下产酶高峰18℃条件下的产酶高峰提前约1W,但2者的高峰值大小较接近。

3 结论

(1)通过控制培养基配方和发酵条件可以有效地控制黑曲霉(*A. niger*) wz003发酵物中PL和PG的产量。wz003发酵生产PL的液态发酵最佳培养基(g/L)为:麸皮60,玉米粉40,酵母膏20,胡萝卜12, CaCO₃ 12,起始pH 6.5。培养温度为30℃,接种量为8.0%,发酵时间48h。在优化条件下,发酵液中PL活力可达到375.3 U/mL,为基础发酵条件下的6.225倍;此时PG的活力是29.4 U/mL,仅为基础条件下的18.3%,因此,大大降低了PG的影响。

(2)当液态发酵培养基(g/L)为:橘皮40, KNO₃

40, NaNO_3 5, MgSO_4 2, 发酵条件控制为起始 pH5.0, 接种量 12%, 培养温度 40 °C, 发酵时间 96 h 时, 有利于 PG 的发酵生产, 此时 PG 的活力为基础条件下的 5.05 倍。

参 考 文 献

- Brent L R, Malcolm A O, Debra M. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling [J]. *Phytochemistry*, 2001, 57: 929~967
- Tadashi I, Junji I, Hajime M, et al. Fluorescent labeling of pectic oligosaccharides with 2-aminobenzamide and enzyme assay for pectin [J]. *Carbohydrate Research*, 2002, 337: 1 023~1 032
- Fanny G, Jason D S, Knud J J, et al. Solid-supported enzymatic synthesis of pectic oligogalacturonides and their analysis by MALDI-TOF mass spectrometry [J]. *Carbohydrate Research*, 2003, 338: 1 951~1 960
- Bedouet L, Courtois B, Courtois J. Methods for obtaining neutral and acid oligosaccharides from flax pectins [J]. *Biotechnology Letters*, 2005, 27: 33~40
- 杨辉, 振海, 春吉. 苹果渣固体发酵生产果胶酶的研究 [J]. *陕西科技大学学报*, 2003, 21(4): 1~5
- Huisman M M H, Schols H A, Voragen A G J. Enzymatic degradation of cell wall polysaccharides from soybean meal [J]. *Carbohydrate Polymers*, 1999, 38(4): 299~307
- Sathyanarayana N G, Panda T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases-a review [J]. *Process Biochemistry*, 2003, 38: 987~996
- 汤鸣强, 谢必峰. 黑曲霉产果胶酶的分离纯化和酶学特性研究 [D]. 福建师范大学, 2004
- 彭彩红, 张春枝, 金凤鸾. 果胶内切酶产生菌的筛选及其发酵条件 [J]. *大连轻工业学院学报*, 2004, 23(1): 39~41
- 葛菁萍, 凌宏志, 宋 刚, 等. 果胶酶产生菌的分离及培养条件研究 [J]. *中国生物工程杂志*, 2004, 24(8): 93~95
- 赵 政. 碱性果胶裂解酶摇瓶发酵条件的研究 [J]. *工业微生物*, 2003, 33(2): 9~14
- 兰颖辉, 路福平. 果胶裂解酶液态发酵条件的研究 [J]. *天津科技大学学报*, 2006, 21(2): 15~18
- Friedrich J, Cimerman A, Steiner W. Submerged production of pectolytic enzymes by *Aspergillus niger* effect of different aeration/agitation regimes [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1989, 31: 490~494
- Fonseca M J V, Said S. The pectinases produced by *Tuberaria vulgaris* in submerged culture using pectin or orange pulp pellets as inducer [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1994, 42: 32~35
- Acuna Arguillas M E, Gutierrez Rojas M, Viniestra Gonzalez G. Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1995, 43: 808~814
- 沈 萍, 范秀容, 李广武, 等. 微生物实验 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1999
- Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars [J]. *Anal Chem*, 1959, 31: 426~428
- Ishii S. *Agricultural Biology Chemistry*. 1975, 39: 313~321
- Maldonado M C. *Current Microbiology*. 1989, 18: 303~306
- Biely P. *Current Microbiology*. 1996, 33(1): 6~10
- Guillermo Aguilar, Carlos Huitron. Stimulation of the production of extracellular pectinolytic activities of *Aspergillus* sp. by galacturonic acid and glucose addition [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1987, 9(11): 690~696
- Ramesh Chander Kuhad, Mukesh Kapoor, Renuka Rustagi. Enhanced production of an alkaline pectinase from *Streptomyces* sp. RCK-SC by whole cell immobilization and solid state cultivation [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2004, 20: 257~263
- Michael J Bailey. Effect of temperature on polygalacturonase production by *Aspergillus niger* [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1990, 12(8): 622~624

Fermentation Conditions of *Aspergillus niger* for Production of Pectin Lyase and Polygalacturonase

Zhang Rui, Chen Huijie, Zhang Yinjun, Wang Zhao

(College of biological and Environmental engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China)

ABSTRACT Fermentation conditions for *Aspergillus niger* wz003 for production of high active pectin lyase was investigated in this paper. The effect of polygalacturonase activity was also tested. The experimental result indicated: the optimal fermentation medium was (g/L): wheat bran 60, cornmeal 40, yeast extract 20, carrot 12, CaCO_3 10. After inoculation with 8% (v/w, 10⁶ entries/mL) *A. niger* wz003, the medium was cultivated at 30 °C for 2 d with original pH 6.5, the pectin lyase activity could reach 375.3 U/mL, increased to 6.225 times of that cultivated under the basic conditions, and the synthesized of polygalacturonase was effectively controlled. The enzyme activity was 29.4 U/mL. When the fermentation conditions change, the polygalacturonase activity could reach 5.05 times of which cultivated under basic conditions.

Key words *Aspergillus niger*, submerged fermentation, pectin lyase, polygalacturonase