

文章编号 :1009-038X(2003)05-0095-03

促进剂对发酵生产碱性果胶酸裂解酶的影响

董云舟, 赵政, 堵国成, 陈坚

(江南大学 生物工程学院 江南大学工业技术教育重点实验室 江苏 无锡 214036)

摘 要:为制取适用于纺织用碱性果胶酶,必须得到高酶活的发酵液.通过促进剂的单因素试验及正交试验,对 *Bacillus subtilis* WSH02-02 产生碱性果胶酸裂解酶的摇瓶发酵条件进行了优化.优化后该菌株产酶活比对照提高了 30%,所采用的促进剂优化组合为:Tween-60 3 g/L, CaCO_3 7 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4 g/L.

关键词:枯草芽孢杆菌;碱性果胶酸裂解酶;发酵;促进剂

中图分类号:Q 55

文献标识码:A

Effect of Promoters on the Fermentation of Alkaline Pectate Lyase

DONG Yun-zhou, ZHAO Zhen, DU Guo-cheng, CHEN Jian

(School of Biotechnology, Key Laboratory of Industrial Biotechnology under Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The optimized conditions of several promoters in the shaking flask fermentation of alkaline pectate lyase from *Bacillus subtilis* WSH02-02 was studied, based on single factor and orthogonal experiments. The optimal formula of the promoters was as follows: Tween-60 3 g/L, CaCO_3 7 g/L, and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4 g/L. With this formula, alkaline pectate lyase activity increased 30%, compared with that of the control.

Key words: *Bacillus subtilis*; alkaline pectate lyase; fermentation; promoters

果胶酶(Pectinase)是指分解果胶质的一类含多种酶的复合酶,是一类具有广泛用途的生物酶.其中碱性果胶酸裂解酶(Alkaline pectate lyases)是在碱性范围内具有较高活性的果胶酶,主要用于从桔皮中提取香料油和类胡萝卜素等医用原料;在果汁的制备中可提高水果出汁率、改善果汁的过滤效率、加速和增强果汁的澄清作用;还可用于提取咖啡和香料,以及提高葡萄酒的收率等.与此同时,由于传统的棉纺织染整加工需要耗用大量的水和化学物质,不仅消耗资源,而且产生严重污染,不能适

应社会的可持续发展.解决这一问题的根本出路就在于发展生态型染整工艺,即绿色染整工艺,其中应用生物技术是重要途径之一.进入 21 世纪,随着生物技术与纺织技术的进一步结合,人们对与棉纺织加工相关的生物技术越加重视.其中,特别是碱性果胶酶在棉纺织预处理上的优良特性,使之越来越受到人们的关注^[1-5].为此,作者研究了碱性果胶酶产生菌株 *Bacillus subtilis* WSH02-02 在添加促进剂情况下对发酵酶活的影响.

收稿日期 2003-03-28; 修回日期 2003-05-02.

基金项目 国家高技术研究发展计划(国家“863”计划)项目(2001AA320709)资助课题.

作者简介 董云舟(1971-),男,江苏无锡人,发酵工程博士研究生.

1 材料与方法

1.1 菌种

菌株 *Bacillus subtilis* WSH02-02, 由江南大学作者所在实验室保藏。

1.2 培养基

1) 种子培养基 组分(g/L): 豆饼粉水解液 50, 葡萄糖 5, 酵母膏 5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 36.7, KH_2PO_4 12, 玉米浆 3, pH 7.0。

2) 发酵培养基(对照) 组分(g/L): 豆饼粉水解液 50, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 36.7, KH_2PO_4 12, pH 7.0。

1.3 果胶酸裂解酶(Pectate lyase)活力测定

以聚半乳糖醛酸(PGA)为底物, 在波长 235 nm 处测定反应混合物吸光值的增加。取发酵液离心后的上清液, 根据实际酶活情况, 稀释后取 20 μL , 加入 2 mL 0.2 g/dL 的 PGA 溶液(PGA 溶于 pH 9.4 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液, 其中含有 0.6 mmol/L 的 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 在 45 $^\circ\text{C}$ 保温 15 min。用 3 mL 0.03 mol/L 的磷酸终止反应。一个标准酶活单位(U)定义为: 每分钟使聚半乳糖醛酸裂解产生 1 μmol 的不饱和聚半乳糖醛酸所需的酶量。不饱和聚半乳糖醛酸在波长 235 nm 处的摩尔吸光系数为 4 600 (mol/L)。

1.4 试验方法

每只 250 mL 三角瓶中装入 25 mL 培养液, 于 121 $^\circ\text{C}$ 条件下灭菌 20 min。冷却后, 从斜面接种两环于种子培养基中, 进行种子培养, 时间为 12 h。再从中移接种子液于发酵培养基中(接种量为体积分数 10%), 发酵培养 15 h。培养温度 37 $^\circ\text{C}$, 在 230 r/min 离心。

2 结果与讨论

2.1 CaCO_3 对产酶的影响

在发酵培养基中, 加入不同质量浓度的 CaCO_3 , 进行产酶试验见图 1。结果表明, CaCO_3 对产酶有促进作用。进一步试验表明, 加入 CaCO_3 7 g/L 时发酵滤液的果胶酸裂解酶(PL)酶活最高, 比对照提高了 25%。

2.2 硫酸镁对产酶的影响

在发酵培养基中加入不同质量浓度的硫酸镁, 进行摇瓶发酵试验。从图 2 可以看出, 硫酸镁对产酶有促进作用, 且在质量浓度为 3 g/L 时, 产酶酶活达最高, 与对照相比提高了 10%。

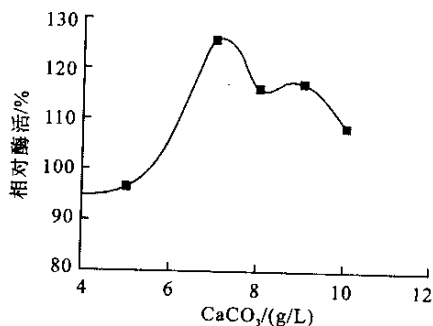


图 1 CaCO_3 对产酶的影响

Fig.1 Effect of CaCO_3 on the production of PL

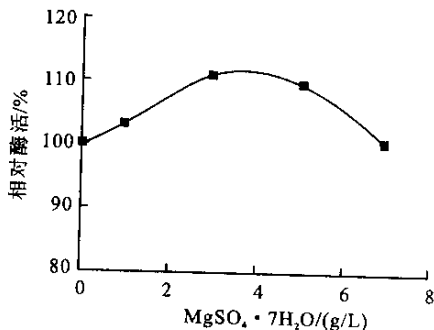


图 2 硫酸镁对产酶的影响

Fig.2 Effect of MgSO_4 on the production of PL

2.3 表面活性剂对产酶的影响

选用不同表面活性剂(Tween-80、Tween-60、Tween-20)加入培养体系, 发现其中仅有 Tween-60 对产酶有利(其他数据未列)(见图 3)。从图 3 可以看出, 当加入质量浓度 3 g/L 的 Tween-60 时, 可使产酶酶活达最高, 比对照高出近 10%。

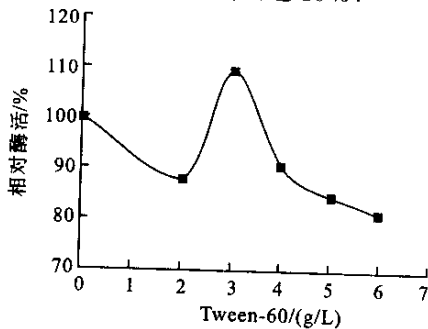


图 3 Tween-60 对产酶的影响

Fig.3 Effect of Tween-60 on the production of PL

2.4 正交试验

根据上述对 CaCO_3 、硫酸镁及表面活性剂 Tween-60 等试剂单因素试验结果, 设计三因素三水平正交试验, 各因素水平见表 1, 结果见表 2。

表 1 正交试验因素水平

Tab.1 Levels and factors of orthogonal experiments			
水平	A	B	C
	CaCO ₃ / (g/L)	MgSO ₄ ·7H ₂ O/ (g/L)	Tween-60/ (g/L)
1	6	2	2
2	7	3	3
3	8	4	4

表 2 正交试验结果

Tab.2 Result of orthogonal experiments				
试验号	列 号			PL 活力/ (U/mL)
	A	B	C	
1	1	1	3	5.65
2	2	1	1	7.18
3	3	1	2	6.46
4	1	2	2	6.73
5	2	2	3	5.21
6	3	2	1	7.43
7	1	3	1	6.79
8	2	3	2	7.60
9	3	3	3	3.94
T1	19.17	19.29	21.40	
T2	19.99	19.37	20.79	
T3	17.83	18.33	14.80	
R	2.16	1.04	6.60	

根据表 2 的极差分析 ,影响该菌株产果胶酸裂解酶能力的主次因子顺序为 :C>A>B. 以上三因素的优势组合为 Tween-60 3 g/L ;CaCO₃ 7 g/L ;MgSO₄·7H₂O 4 g/L ,由此得酶活可对照提高 30% .

2.5 讨论

Bacillus subtilis 作为碱性果胶酸裂解酶的生

产菌株 ,经大量试验证明 ,其产酶能力往往被大多数碳源所阻遏 .因此 ,欲提高其产酶能力 ,必须从其内部的代谢机理作进一步研究 .在发酵体系中加入一定种类及数量的促进剂能有效提高微生物的产酶能力 ,而在众多促进剂中 ,金属离子及表面活性剂的作用较为突出 .

1) *Bacillus subtilis* 的代谢网络主要由 EMP、HMP 及 TCA 途径组成 ,其中有相当一部分酶则需要各种金属离子作为辅助因子 .EMP 途径中的限速酶己糖激酶、磷酸果糖激酶等需要 Mg²⁺ ;作为合成碱性果胶酸裂解酶所需氨基酸的提供者——TCA 循环中 ,琥珀酰 CoA 合成酶亦需要 Mg²⁺ ;再如 HMP 途径中 ,转酮酶、葡萄糖酸内酯水化酶等同样需要 Mg²⁺ [6] .

2) 对于 Ca²⁺ 而言 ,碱性果胶酸裂解酶又需要其作为激活剂 [6] .在对果胶酸裂解酶结构研究中 ,发现均有 Ca²⁺ 的结合位点 [7~8] .

3) 在试验中发现 ,加入表面活性剂 Tween-60 后对产酶有促进作用 .Tween-60 为饱和脂肪酸的亲水性衍生物 ,较其游离态易溶于水 ,且在结构上比其他脂肪酸更能拮抗油酸(生物素的前体) ,从而形成异常的细胞质膜结构 ,膜磷脂含量降低 ,使细胞膜的通透性得以改善 ,增大了细胞膜的通透力 ,有利于打破胞内酶合成的动力平衡 ,从而影响酶的分泌 ;另一方面 ,亦可改善通气效果 ,它们作用于有限的位置 ,促进酶在此较快释放 [10~11] .

3 结 论

通过 3 种促进剂分别对产酶影响的研究 ,并结合正交试验 ,得出了它们的优化组合 .结果表明 ,在发酵体系中加入促进剂能有效改善菌种的产酶能力 .使用优化后的促进剂组合 ,可使摇瓶发酵产碱性果胶酸裂解酶能力提高 30% .

参考文献 :

[1] Durden D K , Eters J N. Advances in commercial biopreparation of cotton with alkaline pectinase[J] . AATCC review , 2001 , 8 28-31.

[2] Sawada K. Bioscouring of cotton with pectinase enzym[J] . JSDC , 1998 , 114 333-336.

[3] Tzanko Tzanov , Cavaco-Paulo A. Biopreparation of cotton fabrics[J] . Enzyme and Microbial Technology , 2001 , 29 :357-362.

[4] Cavaco-Paulo A. Biotechnology in the textile industry-perspectives for the new millenniun[J] . J Biotechnology , 2001 , 89 89-90.

(下转第 101 页)

[11] 静天玉 , 赵晓瑜 . 用终止剂改进超氧化物歧化酶邻苯三酚测定法 [J]. 生物化学与生物物理进展 , 1995 , 22 (1) : 84 – 86 .

[12] 韩强 , 林惠芬 , 朱玲莉 . 一些天然提取物对超氧自由基和羟基自由基的清除作用 [J]. 日用化学工业 , 2000 , 30 (6) : 14 – 17 .

[13] XiaoJun Yan , Briant T Murphy , Gerald B Hammomd , *et al* . Antioxidant activities and antitumor screening of extracts from cranberry fruit (*Vaccinium macrocarpon* [J] . **J Agric Food Chem** , 2002 , 50 : 5844 – 5849 .

[14] Leong L P , Shui G . An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets [J] . **Food Chemistry** , 2002 , 76 : 69 – 75 .

[15] Joan-Hwa Yang , Hsiu-Ching Lin , Jeng-Leun Mau . Antioxidant properties of several commercial mushrooms [J] . **Food Chemistry** , 2002 , 77 : 229 – 235 .

[16] Al-Saikhan M S , Howard L R , Miller J C . Antioxidant activity and total phenolic in different genotypes of potato (*Solanum tuberosum* L [J] . **Journal of Food Science** , 1995 , 60 (2) : 341 – 343 .

[17] Tanislaw Burda , Wieslaw Oleszek . Antioxidant and antiradical activities of flavonoid [J] . **J Agric Food Chem** , 2001 , 49 : 2774 – 2779 .

[18] Dace Oomah , Giuseppe Mazza . Flavonoids and antioxidative activities in buckwheat [J] . **J Agric Food Chem** , 1996 , 44 : 1746 – 1750 .

[19] Negro C , Tommasi L , Miceli A . Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts [J] . **Bioresour Tech-**
nology , 2003 , 87 : 41 – 44 .

(责任编辑 朱 明)

(上接第 97 页)

[5] 董云舟 , 堵国成 , 陈坚 , 等 . 生物技术在棉纺织工业上的应用与进展 [J]. 印染 , 2002 , 28 (224) : 53 – 56 .

[6] 沈同 , 王镜岩 . 生物化学 [M]. 北京 : 高等教育出版社 , 1991 . 79 – 108 .

[7] Herron Steven Richard . A structural and kinetic understanding of the enzymatic mechanism of the pectate lyases [D] . Irvine : University of California , 2001 .

[8] Kazuhisa Sawada . Nucleotide and amino-acid sequences of a new-type pectate lyase from an alkaliphilic strain of *Bacillus* [J] . **Eur J Biochem** , 2000 , 267 : 1510 – 1515 .

[9] Yuji Hatada . Enzymatic properties of the highly thermophilic and alkaline pectate lyase Pel-4B from alkaliphilic *Bacillus sp* . Strain P-4-N and the entire nucleotide and amino acid sequences [J] . **Extremophiles** , 2001 , 5 : 127 – 133 .

[10] Kapoor M . Production and partial purification and characterization of a thermo-alkali stable polygalacturonase from *Bacillus sp* . MG-cp-2 [J] . **Process Biochemistry** , 2000 , 36 : 467 – 473 .

[11] Kapoor M . Improved polygalacturonase production from *Bacillus sp* . MG-cp-2 under submerged (SmF) and solid state (SSF) fermentation [J] . **Letters in Applied Microbiology** , 2002 , 34 : 317 – 322 .

(责任编辑 杨 萌)