文章编号:1673-1689(2005)04-0061-05

黑曲霉产粥化酶的发酵条件优化和浓缩酶液的制备

赵允麟, 姜晓红, 张倩, 顾宇峰
(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室,江苏 无锡 214036)

摘 要: 对作者所在实验室保藏的高产果胶酶的粥化酶产生菌株 *A. niger* 537 进行发酵营养和培养条件的优化,确定优化的工艺条件,果胶酶、纤维素酶、木聚糖酶、蛋白酶和糖化酶的干曲酶活分别达到 4 973,199.8, 4 993.3, 26 636.7, 3 170 μ/g. 同时对浸提条件及浓缩酶液的制备进行了考察.

关键词: 粥化酶;果胶酶;优化;浸提;浓缩
中图分类号:TQ 920 **文献标识码**: A

Optimal Macerating Enzyme Fermentation Condition by *Aspergillus niger* and the Condensed Enzyme Liquid Preparation

ZHAO Yun-lin, JIANG Xiao-hong, ZHANG Qian, GU Yu-feng
(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Minstry of Education, Southze Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The optimal nutrition and culture conditions of *Aspergillus niger* strain 537 were studied. The solid koji activity of pectinase, CMCase, xylanase, glucoamylase and proteinase were 4 973.6, 199.8, 4 993.3, 3 170.0, 26 636.7 U/g, respectively. The extracting conditions of the fermented broth was also studied.

Key words: macerating enzymes; pectinase; optimize; extracting; condense

粥化酶(macerating enzymes)又称软化酶,它是一种复合酶,主要有果胶酶、半纤维素酶、纤维素酶、蛋白酶、淀粉酶等[1]. 粥化酶可由单一微生物培养产生,其中各种酶的比例可根据使用要求的不同,通过菌种或营养、培养条件的改变而变化. 它主要用于果蔬加工,可促进过滤,提高出汁率,因此这种复合酶的研究具有很好的实际意义和应用前景. 作者对粥化酶产生菌 *A. niger* 537 的营养条件和培养条件进行了考察,确定了优化的工艺条件,并研究了酶液的制备和浓缩条件.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株 果胶酶产生菌黑曲霉 *A. niger* 537,作者所在实验室保藏.

1.1.2 试剂 低酯果胶:苏州丹尼尔公司惠赠,酯化度约为28%;高酯果胶:苏州丹尼尔公司惠赠,酯化度约为81%;苹果渣:自制(国光苹果切碎榨汁后用两层纱布过滤,滤渣烘干粉碎);其他试剂均为分析纯.

1.2 培养基

1.2.1 斜面活化培养基 PDA 培养基.

1.2.2 基础发酵培养基 麸皮 4 g,豆饼粉 1 g,$(NH_4)_2SO_4$ 0.1 g,水 6 mL.

1.3 测定方法

1.3.1 果胶酶酶活测定 Somogyi 法[2].

1.3.2 纤维素酶酶活测定 DNS 法[3].

收稿日期:2004-04-14; 修回日期:2004-05-20.
作者简介: 赵允麟(1946-),男,江苏无锡人,工学学士,高级工程师.

万方数据

1.3.3 木聚糖酶酶活测定 DNS法[4].

1.3.4 蛋白酶酶活测定 Folin法[5].

1.3.5 糖化型淀粉酶酶活测定 见文献[6].

1.4 干曲酶活的测定

把发酵鲜曲经过1次、2次、3次浸提,由3次浸提液的单位体积酶活和浸提液体积算得总酶活,用总酶活除以经烘干后得曲的干重,即得干曲酶活(U/g).

2 结果与讨论

2.1 营养条件的正交优化

选择低酯果胶:蔗糖、NH_4NO_3、KH_2PO_4、固水比4个因素作为影响产酶培养基的主要因子,分别以不同浓度选择3个水平,列$L_9(3^4)$表,综合极差分析结果见表1,2.

表1 正交试验方案

Tab.1 Orthogonal layout of factors and number

水平	A (果胶+蔗糖) 质量浓度/(g/dL)	B (NH_4NO_3) 质量浓度/(g/dL)	C (KH_2PO_4) 质量浓度/(g/dL)	D (固水比)
1	(1)	2	2	1∶0.8
2	(2)	3	3	1∶1.0
3	(3)	4	4	1∶1.2

注:(1)果胶8 g/dL+蔗糖2 g/dL;(2)果胶5 g/dL+蔗糖5 g/dL;(3)果胶2 g/dL+蔗糖8 g/dL.

表2 正交试验结果

Tab.2 The results of orthogonal experiment

实验号	A	B	C	D	酶活(U/mL) 果胶酶	纤维素酶	木聚糖酶	蛋白酶	糖化酶
1	1	1	1	1	129.0	5.4	184.7	848.0	114.4
2	1	2	2	2	118.1	3.7	151.1	737.6	93.6
3	1	3	3	3	145.2	3.5	144.5	684.8	84.4
4	2	1	2	3	177.4	3.4	132.2	622.4	76.4
5	2	2	3	1	145.2	5.0	199.1	812.8	101.3
6	2	3	1	2	141.9	4.9	151.1	798.4	96.0
7	3	1	3	2	114.2	3.8	137.5	747.6	92.6
8	3	2	1	3	140.0	6.4	172.8	894.0	121.1
9	3	3	2	1	127.8	5.1	161.3	832.8	107.3

通过正交度验可以看出,各种酶的正交结果如下:

果胶酶:$D>A>C>B$ $A_2B_1C_2D_3$

纤维素酶:$C>D>B>A$ $A_3B_2C_1D_1$

木聚糖酶:$D>B>C>A$ $A_2B_2C_1D_1$

糖化酶:$C>D>B>A$ $A_3B_2C_1D_1$

蛋白酶:$D>C>B>A$ $A_3B_2C_1D_1$

万方数据

最优产酶营养条件各不相同,除了果胶酶以外,因素C和D对其它酶的产酶影响比较大,因素A的影响比较小.对于纤维素酶、木聚糖酶、糖化酶、蛋白酶来说,其最优条件基本一致,因此试验以果胶酶为主,相应考虑其它酶类.综合极差分析取相对较优的培养基组成为$A_2B_2C_1D_3$,即低酯果胶0.25 g,蔗糖0.25 g,NH_4NO_3 0.15 g,KH_2PO_4 0.1 g,固水比为1∶1.2.当然,培养基组成可以根据不同的加工原材料、不同的生产需求进行一定的调整,从而变化黑曲霉产酶的酶系组成.如生产中需要的蛋白酶和淀粉酶相应比较多时,可以考虑调整为$A_3B_2C_1D_1$.

2.2 培养条件的选择

2.2.1 接种量对产酶的影响 以孢子悬浮液(10^6个/mL)接种,接种量过低其生长缓慢,发酵周期延长,增加了染菌的可能性,而过高的接种量则会造成菌株生长迅速,曲温过高不利于产酶[7].从表3中可以看出,接种量在0.03 mL/g湿料比较合适.

表3 接种量对537菌株产酶的影响

Tab.3 The effect of inoculative amount on enzyme production

接种量(mL/g湿料)	酶活/(U/mL) 果胶酶	纤维素酶	木聚糖酶	蛋白酶	糖化酶
0.01	140.0	4.15	123.5	653	67.8
0.02	165.9	5.22	150.6	820	88.5
0.03	180.1	6.09	190.7	901	95.9
0.04	175.7	6.12	167.9	887	90.4
0.05	166.9	5.34	144.0	812	87.8

2.2.2 装料量对产酶的影响 在500 mL三角瓶中,装有不同量的培养基,结果见表4.装料量过多,菌株产酶能力变弱.这是因为装料多,料面厚不利于通气,因此影响产酶[8],所以在大三角瓶中培养比在小三角瓶中培养的酶活力高.

表4 装料量对537菌株产酶的影响

Tab.4 The effect of medium contents on enzyme production by 537

装料量/g	酶活/(U/mL) 果胶酶	纤维素酶	木聚糖酶	蛋白酶	糖化酶
10	207.1	7.09	216.7	944	110.9
15	185.2	6.37	222.1	912	116.2
20	174.2	5.70	172.4	883	111.3
25	97.4	5.86	130.1	555	106.0
30	89.7	4.75	138.7	653	89.6

2.2.3 最优条件试验 干曲酶活是衡量菌株产酶

水平的重要参数. 三角瓶中装入 10 g 优化培养基(麦麸 8 g,豆饼粉 2 g,低酯果胶 0.5 g,蔗糖 0.5 g,NH_4NO_3 0.3 g,KH_2PO_4 0.2 g,吐温-80 0.02 g,固水比为 1:1.2),以 0.03 mL/g 湿料的接种量接入菌株 537 孢子悬液(10^6个/mL),于 30 ℃培养 72 h 后浸提 3 次测酶活,并计算各酶的总酶活. 总酶活除以干曲重(3.06 g)所得商即为干曲酶活,见表 5.

表 5　最优条件下试验结果

Tab. 5　The experimental result under the optimal condition

酶	干曲酶活/(U/g)
果胶酶	4 973.6
纤维素酶	199.8
木聚糖酶	4 993.3
蛋白酶	26 636.7
糖化酶	3 170.0

2.3　浸提条件的选择

2.3.1　浸提溶剂的选择　将发酵成熟的固体培养物分别用 5 倍 2%$CaCl_2$溶液、2%NaCl 溶液、自来水,在往复式摇床上于 30 ℃,120 r/min 下振荡1 h,取滤液测定酶活,结果见图 1. 可以看出:用无机盐溶液浸提比用纯自来水浸提效果好,其中 $CaCl_2$溶液的浸提效果最好.

2.3.2　浸提时间的选择　固体培养物加入 5 倍的 2%$CaCl_2$溶液后于 30 ℃,120 r/min 下分别振荡浸提 0.5,1,1.5,2, 3 h 后测酶活,结果见图 2. 可以看出,浸提时间对各种酶的提取效果是有影响的,各酶活力并不是一直随浸提时间延长而增加,当时间增加至 1.5 h 后,酶液中的酶活力呈下降趋势,从而确定最适浸提时间为 1.5 h.

2.3.3　浸提液量的选择　固体培养物加入 5 倍、10 倍、15 倍的 2%$CaCl_2$溶液后分别于 30 ℃,120 r/min 下浸提 1 h,测定浸提液中的酶活,结果见表 6. 浸提酶液中各酶的单位体积酶活随着浸提液体积的增加而降低,但是总酶活是逐渐增加的,浸提倍数为 15 倍和 10 倍的总酶活比 5 倍的分别提高了约 50%和 20%. 但是必须考虑到尽量减少浓缩所消耗的动力能源,以 5 倍固液比浸提比较经济,滤渣残存酶活可采用多次浸提加以提取.

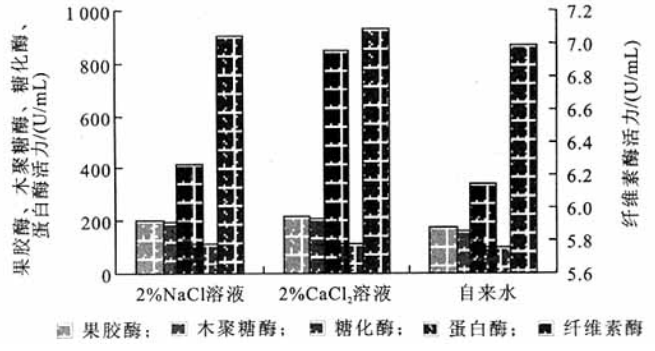

图 1　浸提溶剂对酶活的影响

Fig. 1　The effect of different extracting media on the activity of enzymes

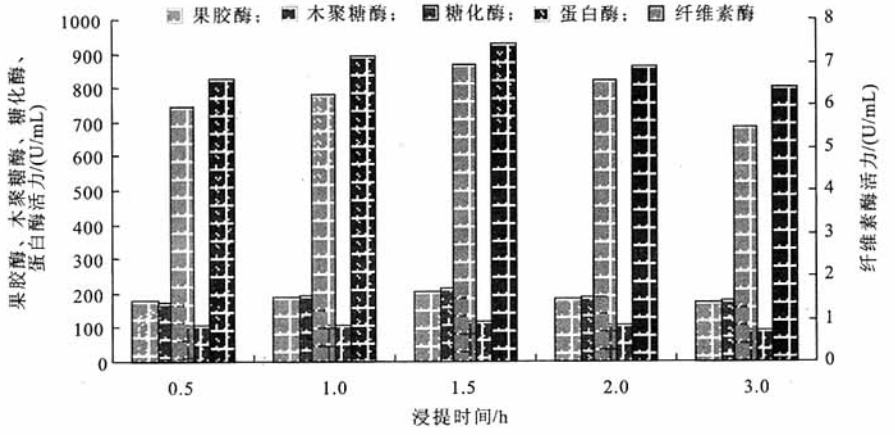

图 2　浸提时间对酶活的影响

Fig. 2　The effect of different extracting time on the activity of enzymes

万方数据

表6 浸提液量对酶活的影响

Tab. 6 The effect of the quantity of extracting media on the activity of enzymes

固液比	浸提液体积/mL	单位体积酶活/(U/mL)					总酶活/U				
		果胶酶	纤维素酶	木聚糖酶	糖化酶	蛋白酶	果胶酶	纤维素酶	木聚糖酶	糖化酶	蛋白酶
1∶5	55	212	7.0	214	113	931	11 660	385	11 770	6 215	5 1205
1∶10	110	137	4.1	127	65	558	15 070	451	13 970	7 150	61 380
1∶15	165	101	3.4	105	50	476	16 665	561	17 325	8 250	78 540

2.4 浓缩酶液的制备

2.4.1 *浓缩方法的选择* 由于液体酶需要长期保存,其酶浓度的增加是必不可少的.实验中分别考察了卷式膜超滤浓缩、中空纤维膜超滤浓缩以及真空减压浓缩3种方法对酶液浓缩的影响.卷式膜超滤浓缩选用UF202型超滤器,膜相对分子质量为30 000,在25 ℃,40 kPa(冷却水温18 ℃)的条件下浓缩,浓缩倍数为7倍左右.真空减压浓缩选用R-501旋转蒸发器,在50 ℃,0.1 MPa的真空条件下浓缩,浓缩倍数为5倍左右.中空纤维膜超滤浓缩实验中酶液先用硅藻土进行过滤后,选用UPIS-503型中空纤维膜的超滤装置,膜相对分子质量为10 000,在室温下于60～80 kPa的操作压强下进行浓缩,浓缩倍数在25倍左右.各种浓缩方法的回收率见表7.

可以看出,中空纤维膜超滤浓缩的效果最好,回收率都达到了90%,而卷式膜超滤浓缩和真空减压浓缩的回收率比较低.在实验中发现,用卷式膜超滤浓缩时较易发生堵塞,浓缩倍数较低,回收率降低.而采用真空减压浓缩不仅动力消耗高,而且由于浓缩时温度升高,酶液较易失活,使得酶的回收率比较低.因此选用中空纤维膜进行超滤浓缩比较合适.

表7 浓缩方法的比较

Tab. 7 The recovery rates with different methods of condensation

浓缩方法	回收率/%				
	果胶酶	纤维素酶	木聚糖酶	淀粉酶	蛋白酶
卷式膜超滤浓缩	91	73	85	59	65
中空纤维膜超滤浓缩	94	89.6	94	90	95
真空减压浓缩	75	69	70	72	67

2.4.2 *超滤浓缩对酶活力的影响* 由于液体酶需要长期保存,其酶浓度的增加是必不可少的.试验中酶液先用硅藻土进行过滤后,选用UPIS－503型中空纤维膜的超滤装置,膜截留相对分子质量为10 000,在室温,60～80 kPa的操作压强下进行浓缩,浓菌倍数在25倍左右,结果见表8.可以看出,中空纤维膜超滤浓缩的效果很好,回收率都达到90%.

表8 超滤浓缩结果

Tab. 8 The results of ultrafiltration experiments

项目	酶活/(U/mL)				
	果胶酶	木聚糖酶	纤维素酶	淀粉酶	蛋白酶
浸提液(5 L)	130.33	104.67	4.37	71.11	640
硅藻土滤液(5 L)	129.03	102.62	4.26	67.78	616
超滤浓缩液(0.2 L)	3 039	2 298.7	100.0	1 527.8	14 600
浸提液总活力($\times10^4$ U)	65.2	52.3	2.18	35.6	320
硅藻土滤液总活力($\times10^4$ U)	64.5	51.3	2.13	33.9	308
超滤浓缩液总活力($\times10^4$ U)	60.8	46.0	2.00	30.6	292
硅藻土回收率(%)	99	98	97	95	96
超滤回收率(%)	94	89.6	94	90	95
总回收率(%)	93	88	91	85.5	91.2

3 结 论

1) 通过对菌种营养条件和培养条件的研究得到优化的发酵工艺条件,最优条件试验菌种果胶酶、纤维素酶、木聚糖酶、蛋白酶和糖化酶的干曲酶活分别达到4 973,199.8,4 993.3,26 636.7,3 170.0 U/g.

2) 对浸提条件进行了考察,最佳浸提条件为2%$CaCl_2$溶液以1∶5的固液比加入鲜曲中,于30 ℃,120 r/min振荡条件下浸提1.5 h.

3) 选择中空纤维膜超滤浓缩方法,酶活回收率都达到了90%.

万方数据

参考文献：

[1] 胡学智. 国内外酶制剂工业及其应用[J]. 工业微生物，2001,31(3):41－46.
[2] Somogyi, Michael. Notes on sugar determination[J]. **J Biol Chem**,1952,195(1):19－23.
[3] Mary Mandels, Raymond Andreotti, Charles Roche. Measurement of saccharifying cellulase[J]. **Biotech and Bioeng Symp**, 1976,20(6):21－23.
[4] Bailey Michael J, Biely Peter. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity[J]. **J Biotechnol**,1999,23 (3): 257－270.
[5] 邬显章. 酶的工业生产技术[M]. 吉林：吉林科学出版社,1998.
[6] 诸葛健,王正祥. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京：中国轻工业出版社,1994.
[7] 陈哲超，谢必峰，林宇野. 黑曲霉产果胶酶特性的研究[J]. 食品科学,1995,16(2):36－39.
[8] 陈陶声. 酶制剂生产技术[M]. 北京：化学工业出版社,1987.
[9] 赵允麟. 粥化酶及在苹果汁中应用简介[J]. 食品工业,2003,(2):36－37.
[10] 张倩. 粥化酶及其在果蔬加工中的应用[J]. 食品工业科技,2003,(10):155－157.

（责任编辑：李春丽）

（上接第 60 页）

相当一部分丙酮酸流向乙酰 CoA，使得从丙酮酸到缬氨酸的流量减少. 然而，对发酵液进行有机酸的分析表明，加入 VB_1 可使发酵液中乙酸及草酰乙酸的质量浓度降低. 因此，下一步选育缬氨酸的高产菌株，除了进一步加强丙酮酸向缬氨酸方向流动外，还要设法减弱丙酮酸形成草酰乙酸和乙酰 CoA 方向的消耗. 减弱丙酮酸羧化酶活性和减少丙酮酸流向 TCA 循环的流量，可望有效地提高缬氨酸产量和缬氨酸对葡萄糖的转化率.

参考文献：

[1] 张伟国，钱和. L－缬氨酸发酵条件的研究[J]. 氨基酸和生物资源,2001，23(3)：28－31.
[2] Radmacher E, Vaitsikova A, Burger U, *et al*. Linking central metabolism with increased pathway flux: L-valine accumulation by *Corynebacterium glutamicum*[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2002, 5: 2246－2250.
[3] 蔡武城，袁厚积. 生物物质常用化学分析法[M]. 北京：科学出版社，1982.
[4] 杨毅，李崎，陈蕴，等. 反相高效液相色谱法(RP-HPLC)测定啤酒中的有机酸[J]. 食品与发酵工业，2003，29(8)：6－13.
[5] 张克旭，陈宁，张蓓，等. 代谢控制发酵[M]. 北京：中国轻工业出版社，1998.
[6] 袁易全，陈思忠. 近代超声原理与应用[M]. 南京：南京大学出版社，1996. 134.
[7] Hermann Sahm, Lothar Eggeling, Bernd Eikmans, *et al*. Metabolic design in amino acid producing bacterium *Corynebacerium glutamicum*[J]. **FEMS Microbiology Reviews**, 1995,16: 243－252.
[8] 李琼. 以纯生物素代玉米浆、糖蜜的研究[J]. 广西轻工业，2000,(4)：22－27.
[9] Tosakao, Yoshiharay, Ikenas, *et al*. Production of L-lysine by fluoropyruvate sensitive mutants of *Brevibacteruim lactofermentum*[J]. **Agric BioChem**, 1985, 50(5): 1305.
[10] 张星元，李秀敏，杨毅，等. 谷氨酸棒杆菌的氨基酸输送系统的存在、功能及其在氨基酸生产上的重要性[J]. 无锡轻工大学学报,2004，23(3)：105－110.
[11] Bauer K A, Ben-Ben-Bassat A, Dawson M, *et al*. Improved wxpression of human interleukin-2 in high-cell-density fermentor cultures of *Escherichia coli* K-12 by a phosphotransacetylase mutan[J]. **Appl Environ Microbiol**, 1990, 56(5): 1296.
[12] 沈同，王镜岩. 生物化学(第二版)[M]. 北京：高等教育出版社，2000.

（责任编辑：杨 勇）

万方数据