

文章编号:1673-1689(2008)02-0112-05

米曲霉 ASP-m21 产果胶酶及其酶学性质

唐湘华¹, 许锁链¹, 慕跃林², 陈文久³, 黄遵锡^{1,2}

(1. 云南师范大学 生命科学学院, 云南 昆明 650222; 2. 云南师范大学 微生物研究所, 云南 昆明 650222; 3. 云南昭通烟草公司, 云南 昭通 657000)

摘要:以产果胶酶 PG 为主的米曲霉(*Aspergillus oryzae*)为出发菌株进行固态发酵研究。确定最适合发酵条件为:以 30 g/dL 麸皮, 8 g/dL 橘皮粉, 添加 2 g/dL 的泡沫材料作为透气支撑载体, 每千克原料添加 8 g 硫酸铵, 10 g 葡萄糖, 接种体积分数为 10%, 经过 42 h 发酵, 最终果胶酶酶活可达 807 U/g(干曲计)。果胶酶的最适反应温度为 50 ℃, 最适 pH 范围在 3.0~3.6 之间。试验结果表明:果胶酶在 3.0~7.0 的 pH 的范围内, 适合产物生成速度最大的 pH 点在 3.6 左右, 产物生成速度为 0.3 mmol/(L·min); 50 ℃是酶促反应的最适温度, 在 30 min 条件下生成的产物最高可达 9 mmol/L。在桔子澄清实验中, 向含有体积分数 30% 的橙汁中添加酶活为 1 U/mL 的果胶酶, 分解果胶为半乳糖醛酸, 并且随着半乳糖醛酸量的增加, 橙子浆的黏度降低, 透光率增加。反应 7 h 后, 透光率可高达 91.1%。

关键词:果胶酶; 固态发酵; 应用; 澄清; 半乳糖醛酸

中图分类号:Q 814.1

文献标识码:A

Study on Characteristics of Polygalacturonase Production from *Aspergillus oryzae*

TANG Xiang-hua¹, Xu Suo-lian¹, Mu Yue-ling², CHENG Wen-Jiu³, HUANG Zun-xi^{1,2}

(1. College of Life Science, Yunman Normal University, Kunming 650222, China; 2. Microorganismal Institute, Yunman Normal University, Kunming 650222, China; 3. Tobacco Company of Zhaotong, Zhaotong 657000, China)

Abstract: The pectinase production from *Aspergillus oryzae* by solid-state fermentation was reported. The result suggested that the optimum medium components is: 30% bran, 8% orange peel powder, 0.8% (NH₄)₂SO₄, 1% glucose, 2% polyurethane foam plastic (PFP). The best material-water ratio is 1:1.2. Under the optimum condition, a maximum enzyme activity of 807 U/g was obtained under 50 ℃ at 42 h. The stable pH range of the enzyme was 3.0 to 3.6. The application of the pectinase on orange juice demonstrated that the suspension was clarified, the viscosity was reduced and the galacturonate was increased after 1 U/mL of the polygalacturonase produced from Asp-m21 was added. The transmittancy of the orange juice treated with the enzyme could be increased by 1.5 times compared to that of the control.

Key words: pectinase; solid-state fermentation; application; clarification; galacturonic acid

收稿日期:2007-04-20.

基金项目:云南省科技应急项目(2006c0004z).

作者简介:唐湘华(1973-),男,云南昆明人,工学硕士,工程师,主要从事生物技术与酶工程方面的研究.

通讯作者:黄遵锡(1964-),男,安徽金寨人,工学博士,教授,主要从事发酵工程的研究.

Email:huangzunxi@163.com

果胶类物质是存在于高等植物初生壁和细胞间隙中的多糖,是非淀粉多糖(NSP)中化学组成和相对分子质量结构变化最大的一类多糖,在不同植物组织中其化学结构和相对分子质量变化很大^[1,2]。果胶酶(E. C. 3. 2. 1. 15)是一类分解果胶质酶的总称,是含有多种组分的复合酶,而在复合酶中具有代表性的水解酶是多聚半乳糖醛酸酶(PG)。果胶酶广泛存在于高等植物和微生物中,在某些原生动物和昆虫中也有发现。在微生物中,细菌、放线菌、酵母和霉菌都能合成果胶酶^[3-5],其中研究最多的是黑曲霉^[6,7]。国外对果胶酶的研究自20世纪30年代开始,通过诱变处理方法提高菌株的产酶活性,取得了很大进展。国内对果胶酶方面的研究始于20世纪60年代,许多工作者对果胶酶菌种的选育、生产工艺和酶的应用等方面做了许多工作,崔福绵^[6]等利用黑曲霉突变株 CP85211,在500 L发酵罐中表达酶活力为308 U/mL。

以米曲霉为菌株经发酵制得的果胶酶,最适pH值在3.0~3.6,广泛应用于果汁制造、果酒酿造和饲料工业^[8]。此外,果胶酶在木材防腐和麻类脱胶方面也有应用^[9-10]。近年来,在饲料中添加果胶酶以降解饲料中含有的植物细胞壁中的果胶,促使淀粉、脂类、矿物质和蛋白质等营养物质释放出来,从而提高饲料的消化利用率^[11-12]。目前,将果胶酶用于农村能源沼气发酵中处理富碳原料,使富碳原料得到充分利用。作者以廉价的麸皮和橘皮粉作为培养基,添加泡沫作为透气载体进行固态发酵^[13]生产果胶酶,研究了pH值和温度对果胶酶稳定性的影响,并从酶动力学方面进行研究^[14],最后在橙子果汁应用实验中进行验证。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 米曲霉 Asp-m21,由作者所在微生物工程研究所保藏。

1.1.2 培养基

1) 斜面查氏培养基:NaNO₃ 2 g, K₂HPO₄ 1 g, KCl 0.5 g, MgSO₄ 0.5 g, FeSO₄ 0.01 g, 蔗糖 30 g, 琼脂 20 g, 水 1 000 mL, pH 值自然。

2) 种子培养基:麸皮 2 g, 葡萄糖 2 g, (NH₄)₂SO₄ 0.5 g, K₂HPO₄ 0.5 g, 水 100 mL。

3) 固体发酵培养基:水 60 mL, 麸皮 30 g, 橘子粉 8 g, (NH₄)₂SO₄ 0.04 g (0.8%干料计), 2 g/dL 的泡沫, 葡萄糖 1.0 g (1%干料计), 0.1 MPa, 121 °C 灭菌 45 min。

1.1.3 实验试剂 0.1 mol/L 的柠檬酸缓冲液^[15]; pH 3.6 的 0.25 g/dL 的果胶(Fluka, 76280) 底物缓冲液; DNS 试剂。

1.1.4 实验仪器 各种规格的移液枪(Eppendorf, Gilson); KL-009 II 高精度酸度计(自动温补); 722 型分光光度计(LENG GUANG) EBA12 离心机(Hettich); 水果搅拌机(广东威的公司制造); SHZ-82 水浴恒温振荡器(江苏省金坛市医疗仪器厂制造); ML-902 定时恒温磁力搅拌器(上海浦江分析仪器厂制造); 电子天平(the Mettler-Toledo Group 制造)。

1.2 实验方法

1.2.1 半乳糖醛酸的标准曲线的制作 精确称取 0.100 g 半乳糖醛酸, 用缓冲溶液定容至 100 mL, 制得质量浓度为 0.1 g/dL 的半乳糖醛酸的标准溶液。作标准曲线, 求得系数 k 。

1.2.2 酶活定义 在 pH 3.6, 50 °C 条件下, 每分钟内从底物溶液中分解释放 1 μmol 半乳糖醛酸所需要的酶量定义为一个酶活单位 U/g。

1.2.3 酶活计算公式

果胶酶活力单位 (U/g) = $k \times A \times N \times 1\,000 / (T \times W \times M) / (1 - P)$

式中: A 为样品的 OD 值; K 为标准曲线的斜率; N 为稀释倍数; T 为反应时间(min); 1 000 为转换因子 1 mmol = 1 000 μmol; W 为半乳糖醛酸的相对分子质量(200.16); P 为水分含量(固体曲而言); M 为加入酶液量(mL)

1.2.4 酶活的测定(DNS 法) 分别吸取待测酶液 0.2 mL 于两支已在 50 °C 预热的试管 A、B 中, A、B 管中含有果胶底物 1.8 mL, 50 °C 保温 30 min, 取出后加入 3 mL DNS 试剂终止反应, 即入沸水浴沸腾 5 min, 流水冷却, 加蒸馏水 10 mL 混匀。在 C 管中先加入 1.8 mL 果胶溶液, 50 °C 保温 30 min, 再加入 3 mL DNS 溶液, 取出后加入 0.2 mL 待测酶液, 即入沸水浴 5 min, 流水冷却后立即加蒸馏水 10 mL 混匀, 在 722 型分光光度计以 C 管为空白, 于 540 nm 比色, 记录数据^[16]。

1.2.5 不同载体对产酶的影响 取液体种子按照体积分数 10% 的接种量接种于含有不同质量浓度的泡沫载体固体培养基, 于 30 °C 的培养箱中培养 45 h, 以不加载体为空白, 测定酶活。从培养 24 h 起每隔 4 h 取样测定, 直到发酵酶活降低为止。

1.2.6 待测酶液的制备 称取固体曲 2.0 g, 放置于 100 mL 相应 pH 值的缓冲溶液中, 用磁力搅拌器搅拌 30 min, 纱布过滤, 对滤液进行微孔过滤, 得

到棕红色的酶液,根据所得滤液酶活高低用缓冲溶液稀释至适当浓度,备用。

1.2.7 酶作用的最适 pH 值 取经过稀释的果胶酶液加入到 pH 值为 2.0、3.0、3.6、4.5、6.0 的底物缓冲溶液中,于 50 ℃ 反应 30 min,测定酶活。

1.2.8 酶作用的最适温度 取经过稀释的果胶酶液分别在 30、37、50、60、70 ℃,底物质量浓度为 0.25 g/dL, pH 为 3.6 的条件下测定酶活。

1.2.9 金属离子对酶活力的影响 在经过稀释的果胶酶液中分别添加金属离子 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 K^{+} 、 Na^{+} 、 Pb^{2+} 和 Ag^{+} ,使反应液中各种金属离子的质量分数分别为 5、50、500、1 000 $\mu\text{g/g}$ 。在 pH 3.6, 50 ℃ 下反应 30 min,以不加金属离子为对照(以对照组酶活力为 100%),测定果胶酶活力。

1.2.10 果胶酶在橙子中的应用

1) 橙子浆的配制:取 300 g 橙子(去皮),加入 700 g pH 3.0 的缓冲溶液,用水果搅拌机搅碎,混合均匀,分装在 10 个三角瓶中,待用。

2) 橙子浆中半乳糖醛酸的测定:取搅碎橙子浆离心,取 0.2 mL 上清液加入到 1.8 mL pH 3.0 的缓冲溶液中,再加入 3 mL DNS, 100 ℃ 沸水中 5 min,取出后立即加蒸馏水 10 mL 混匀冷却,测 OD 值,换算半乳糖醛酸。

3) 果胶酶添加量对橙汁的影响:分别取添加后终浓度为 0.5、1.0、1.5、2.0 U/mL 的果胶酶到橙汁中,以不加酶为空白,50 ℃ 保温,在 pH 3.0 的条件下,每隔 30 min 取样测定半乳糖醛酸的相对增加量和透光率 $T_{540\text{nm}}$ 。

2 结果与讨论

2.1 不同质量浓度的泡沫载体对酶活的影响及固体发酵产酶历程

图 1 表明:添加载体对固体发酵产酶有促进作用,添加 2 g/dL 的泡沫能提高酶产量 40%。图 2 是产酶历程。果胶酶的酶活从 24 h 的 120 U/g(干基计),经过 16 h 后达到最大值,为 807 U/g(干基计),之后酶活开始降低。

2.2 酶作用的最适 pH 值

由图 3 可以看出:当 pH 值为 3.0~3.6 时,果胶酶的稳定性较好,酶活力较高。随着 pH 值增加,果胶酶酶活有下降的趋势;当 pH 值为 6.0 时,酶活力降低到 56%。图 4 表明,不同 pH 值的酶促反应速度随作用时间的延长趋于平缓,达到一个平衡状态。

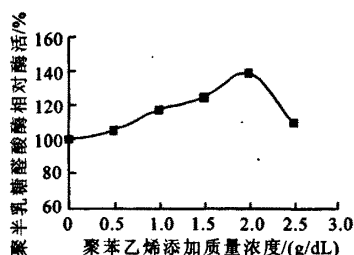


图 1 不同质量浓度的 PEP 对产酶的影响

Fig. 1 The effect of various PEP on pectinase production

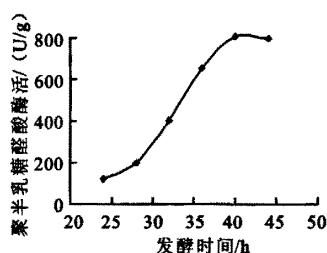


图 2 固体发酵生产果胶酶变化趋势图

Fig. 2 Time course of the pectinase solid fermentation

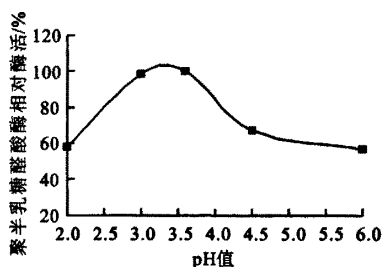


图 3 pH 值对酶活的影响

Fig. 3 Effect of pH on pectinase activity

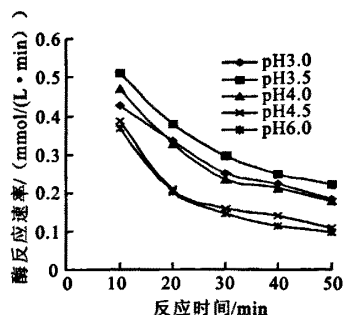


图 4 不同作用 pH 值对酶反应速度的影响

Fig. 4 Effect of pH on enzyme reaction velocity

2.3 酶作用的最适温度

图 5 表明:果胶酶的最适温度范围为 50~55 ℃,在 70 ℃ 时酶损失较大,只有最大酶活的 30% 左

右。图6表明,在不同温度条件下的产物生成最大量随作用温度的升高而降低。

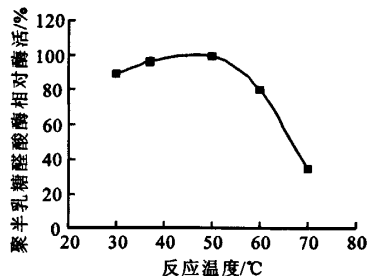


图5 酶作用温度与酶活力的影响

Fig. 5 Effect of temperature on pectinase activity

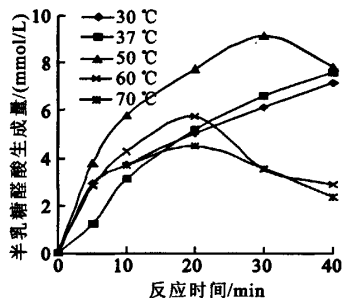


图6 作用温度对半乳糖醛酸产物生成量的影响

Fig. 6 Effect reaction temperature on galacturonic acid production

2.4 金属离子对酶活力的影响

由图7可以看出, Pb^{2+} 和 Ag^{+} 严重抑制该酶活力; Cu^{2+} 抑制此酶而 Mg^{2+} 、 K^{+} 、 Na^{+} 对酶无明显激活或抑制作用; Ca^{2+} 有较弱的激活作用。

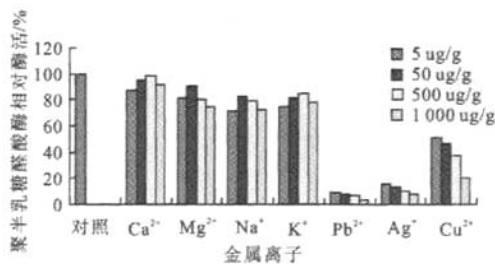


图7 金属离子对PG稳定性的影响

Fig. 7 Influence of metal salt on enzyme stable

2.5 橙汁的运用实验

由图8、9可以看出:因橙子浆中含有大量果胶,果胶属于多糖类物质,故黏度较大。添加果胶

酶后,其能分解果胶为半乳糖醛酸,并且随着半乳糖醛酸量的增加,橙子浆的黏度降低,透光率增加。当添加1 U/mL的果胶酶降解7 h后,透光率可高达91.1%;同时,橙子浆随着果胶酶酶量的增多,分解释放的半乳糖醛酸的相对增加量也越来越多。实验表明,半乳糖醛酸的生成量与橙汁的澄清度有一定的相关性。

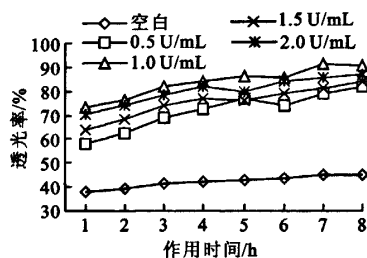


图8 透光率随作用时间的变化趋势

Fig. 8 Time course of transmittancy

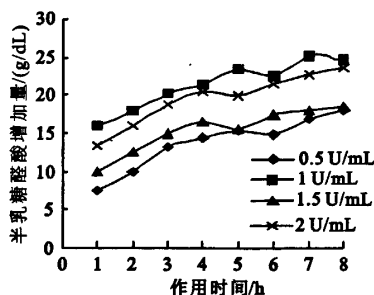


图9 半乳糖醛酸生成量随时间的变化

Fig. 9 Time course of galacturonic acid production

3 结 语

以产果胶酶的米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 为出发菌株,进行固态发酵的研究,确定最适合发酵条件为:麸皮为30 g/dL,橘皮粉8 g/dL,添加2 g/dL的泡沫材料作为透气支撑载体,每千克原料添加8 g硫酸铵,10 g葡萄糖,接种体积分数为10%,经过42 h发酵,最终果胶酶酶活可达807 U/g(干曲计)。果胶酶的最适温度为50℃,最适pH值范围在3.0~3.6。通过橙子的应用试验结果表明,添加适量的果胶酶可使橙子浆中的果胶分解为半乳糖醛酸,黏度下降,显著提高果汁的透光率,使果汁变得澄清;当添加果胶酶为1 U/mL时,能使透光率达到91.1%,比未加酶时提高1.5倍。

参考文献:

- [1] 王卫东,孙月娥. 果胶酶及其在果蔬汁加工中的应用[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(11): 222-226.
WANG Wei-dong, SUN Yue-e. Pectinase and its application in fruit and vegetable juice processing[J]. **Food Research and Development**, 2006, 27(11): 222-226. (in Chinese)
- [2] 薛长湖, 张永勤, 李兆杰, 等. 果胶及果胶酶研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24(6): 94-99
XUE Chang-hu, ZHANG Yong-qin, LI Zhao-jie, et al. Recent development of pectin and pectolytic enzyme[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2005, 24(6): 94-99. (in Chinese)
- [3] Rosane F S. Endopolugalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp-degrading yeasts[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 1995, 21: 234-244.
- [4] 李建洲, 李江华, 许正宏, 等. 嗜盐嗜碱菌 *Alkalibacterium* sp. F26 产碱性果胶酶发酵条件的优化[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24(6): 43-48.
LI Jian-zhou, LI Jiang-hua, XU Zhang-hao, et al. Optimizing fermentation of alkaliphilic and halophilic alkalibacterium sp1 F26 for producing alkaline pectinase[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2005, 24(6): 43-48. (in Chinese)
- [5] Frid B. purification and characterization of an extracellular pectatelyase from *Amycolatas* p [J]. **Microbiology**, 1995, 61 (10): 3580-3585.
- [6] S Sol-Pereira, E Favela Torres, G Viniegra Gonzalez, et al. Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentations[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 1993, 39(1): 36-41.
- [7] 崔福锦, 刘茵, 张树政. 果胶酶 CP-85211 菌株的选育及其液体发酵条件的研究[J]. 微生物学报, 1987, 27(1): 37-44.
CUI Fu-jin, LIU Han, ZHANG Shu-zheng. Studies on screening of cp-85211 strain and liquid-state fermentation conditions[J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 1987, 27(1): 37-44. (in Chinese)
- [8] 宋贤聚, 张慙, 许智慧. 芦笋复合汁的加工工艺和配方的优化[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(1): 37-42.
SHONG Xian-jun, ZHANG Min, XU Zhi-hui, et al. Optimization of processing technology and ingredients of *Asparagus* compounded juice[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2007, 26(1): 37-42. (in Chinese)
- [9] Kashyap D R, Vohra P K, Chopra S, et al. Application of pectonases in the commercial sector, a Review[J]. **Bioresource Technology**, 2001, 77: 215-227.
- [10] 靳贺玲, 范雪荣, 王强. 响应面分析法优化棉针织物的国产碱性果胶酶精练工艺[J]. 江南大学学报: 自然科学版, 2006, 5 (2): 228-231.
Jin He-ling, FAN Xue-rong, WANG qiang. Optimizing some aspects on homemade alkaline pectinase scouring of cotton fabric by using the response surface methodology[J]. **Journal of Southern Yangtze University: Natural Science Edition**, 2006, 5(2): 228-231. (in Chinese)
- [11] Roco A, Castaneda P, Perez L M. Oligosaccharides released by pectinase treatment of citrus on seedlings are elicitors of the plant response[J]. **Phytochemistry**, 1993, (6): 1301-1306.
- [12] 张礼星, 郑文路, 张银军. 果胶酶的固态发酵法生产及在肉仔鸡饲料中的应用[J]. 浙江工业大学学报, 2004, 32(1): 34-37.
ZHANG Li-xing, ZHENG Wen-lu, ZHANG Yin-jun. Pectinase production by solid-state fermentation and application in feeding young chickens[J]. **Journal of Zhejiang University of Technology**, 2004, 32(1): 34-37. (in Chinese)
- [13] 章克昌, 徐柔, 张礼星, 等. 固体发酵生产细菌淀粉酶[J]. 无锡轻工大学学报, 2000, 19(1): 54-57.
ZHANG Ke-chang, XU Rou, ZHANG Li-xing, et al. Production of bacterial alpha-amylase by solid-state fermentation [J]. **Journal of WuXi University of Light Industry**, 2000, 19(1): 54-57. (in Chinese)
- [14] 伦世仪. 生化工程[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1993.
- [15] 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,
- [16] 宁正祥. 食品成分分析手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998.

(责任编辑: 李春丽)