

文章编号: 1000-5013(2011)03-0300-04

阿魏酸酯酶产生菌的筛选及产酶条件的优化

邓轶韬, 李夏兰, 陈宗香, 蔡婀娜

(华侨大学 化工学院, 福建 泉州 362021)

摘要: 从土壤中筛选到1株阿魏酸酯酶活力较高的菌株,通过形态观察,初步鉴定其为曲霉.通过单因素轮换法,对其液态发酵的产酶条件进行优化.结果表明:在查氏培养基中,以质量体积比为6%的麦麸为碳源,质量体积比为5%的硝酸钠为氮源,在30℃下发酵培养6d后,其酶活力最高可达 $16.33 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$.

关键词: 阿魏酸; 阿魏酸酯酶; 曲霉; 筛选

中图分类号: Q 556.1

文献标志码: A

阿魏酸酯酶(Feruloyl Esterases, FAEs)是羧酸酯酶的一个亚类,能水解植物细胞壁中羟基肉桂酸与糖之间的酯键^[1],可应用于从农副产品中释放阿魏酸^[2],漂白纸浆^[3],生产燃料乙醇^[4],以及生物合成酚酸衍生物^[5].自1991年Faulds等^[6]首次分离出阿魏酸酯酶以来,已有超过30种阿魏酸酯酶被纯化^[7].国内对阿魏酸酯酶的研究主要集中于黑曲霉.欧仕益等^[8]开展了黑曲霉液态发酵产阿魏酸酯酶和阿拉伯木聚糖酶的研究;王洪川等^[9]利用黑曲霉进行固态发酵生产阿魏酸酯酶,其酶活可达 $7.421 \text{ nkat} \cdot \text{g}^{-1}$;张帅兵等^[10]完成了黑曲霉阿魏酸酯酶A的克隆和表达;谢春元等^[11]研究了阿魏酸酯酶在饲料瘤胃降解中的功效,发现阿魏酸酯酶既能加快饲料的降解速率,又能提高降解程度.本文通过初筛和复筛从土壤中获得1株阿魏酸酯酶产生菌,并优化其液态发酵的产酶条件.

1 材料与方法

1.1 培养基成分及培养条件

(1) 菌种保藏培养基(马铃薯琼脂培养基).取200g马铃薯切成小块,加水煮沸0.5h,过滤,取滤液,加入20g葡萄糖,15g琼脂,补足水至1L,pH值自然;然后,倒入试管中,于121℃灭菌20min后制成斜面.菌种接种到培养基后于30℃培养数天,待菌落成熟后转到4℃保存.

(2) 菌种分离培养基.将灭过菌的马铃薯培养基倒入无菌平皿中室温冷却凝固;将菌液涂布于培养基上,于30℃培养至成熟.

(3) 初筛培养基. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, NaNO_3 2.0 g, KCl 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, K_2HPO_4 1.0 g, 蔗糖 30 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 L, pH 值自然; 121℃灭菌 20 min. 每块平板倒入约 20 mL 培养基后,立即加入 0.3 mL 无菌的含阿魏酸乙酯的二甲基甲酰胺溶液(质量体积比为 10%),摇匀至平板呈均匀的乳白色.接种后于 30℃培养数天,观察是否有透明圈出现.

(4) 种子培养基(马铃薯培养基,不含琼脂).在 250 mL 摇瓶中加入 50 mL 培养基,于 121℃灭菌 20 min.取一环保存于 4℃马铃薯斜面上的菌种接种到 50 mL 马铃薯摇瓶培养基中,于 30℃, 200 r·min⁻¹下培养 24 h.

(5) 复筛培养基(发酵培养基). $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, NaNO_3 2.0 g, KCl 0.5 g, K_2HPO_4 0.76 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, 麦麸 20 g, 蒸馏水 1 L, pH 值自然.在 250 mL 摇瓶中称取 1 g 麦麸,再加入 50 mL 液体部分,于 121℃灭菌 20 min.将培养 24 h 的种子液按体积比为 4% 的接种量接种到 50 mL 发酵

收稿日期: 2010-04-23

通信作者: 李夏兰(1965-),女,教授,主要从事生物化工的研究. E-mail: xialan@hqu.edu.cn.

培养基中,于 30 ℃,200 r·min⁻¹下培养一定时间.

1.2 菌种筛选与鉴定

土样分别取自福建泉州华侨大学附近的菜地和果园. 将一定量的土样置于无菌平皿中,再以体积比为 1∶1.5 的比例加入麦糟(50 目),搅拌均匀后用无菌水润湿,于 30 ℃培养 3 d. 称取 1 g 土样放入盛有 99 mL 无菌水和玻璃珠的三角烧瓶中,逐步稀释制成 10⁻²,10⁻³,10⁻⁴,10⁻⁵ 的土壤溶液;然后,各取 0.1 mL 的土壤溶液接种在 PDA 培养基的平板上,用涂布棒涂布均匀后,在 30 ℃培养 3 d.

用无菌牙签将产生的单菌落接种到初筛培养基的平板上,于 30 ℃培养 5 d;然后,将产生透明圈的菌落用划线分离的方法再一次接种于初筛培养基的平板上,培养 4 d 得到纯菌落平板. 最后,从纯菌落平板上选取 1 株透明圈最大的菌种,接种于 50 mL 的 PDA 种子培养基,于 30 ℃培养 1 d 后以体积比为 4% 的接种量接于 50 mL 复筛培养基中,于 30 ℃培养 7 d,每 24 h 取样 1 次测定酶活.

在马铃薯琼脂平板上培养菌株,观察菌落培养特征和显微形态,对其进行鉴定.

1.3 产酶条件的优化

采用单因素轮换法,考察碳源、氮源、麦麸浓度、硝酸钠浓度、培养温度和发酵时间等因素对产酶量的影响,并对发酵条件进行优化. 每次试验中只变化一个因素的水平,其他因素的水平保持固定不变,得到的每个因素的最优水平用于后续试验,逐一考察每个因素对产酶的影响,最终得到最优的发酵条件.

1.4 粗酶液的制备

取 1 mL 发酵液于 4 ℃,10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,上清液即为粗酶液.

1.5 阿魏酸酯酶活力的测定

取 250 μL 粗酶液于 2 mL 离心管中,于 50 ℃保温 5 min;然后,加入 250 μL 一定浓度的阿魏酸甲酯溶液,反应 10 min,再加入体积比为 10% 的 500 μL 的冰乙酸终止反应. 样品离心后于 4 ℃保存,用高效液相色谱(HPLC)法测定样品中的阿魏酸含量. 空白样品中冰乙酸在反应前加入,其他处理同上.

2 结果与讨论

2.1 菌种筛选

经过筛选得到 1 株阿魏酸酯酶活力较高的菌株,在初筛平板上培养 3 d 后产生明显的透明圈,如图 1 所示. 图 2 为菌株的液态发酵产酶曲线. 从图 2 可知,第 3 d 开始产酶,随后酶活稳定,至第 7 d 开始下降. 菌株在马铃薯培养基上生长 3 d 后,菌落中部呈黄绿色,分生孢子头呈半圆形,小梗 1 层,顶囊半球形. 初步鉴定其属于真菌门、半知菌类、丛梗孢目、丛梗孢科、曲霉族、曲霉属、黄-米曲霉组.

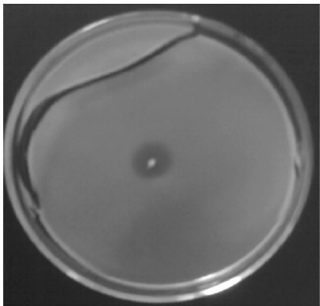


图 1 培养 3 d 后初筛平板中的菌落形态

Fig.1 Colony morphology in first screening plate after 3 d

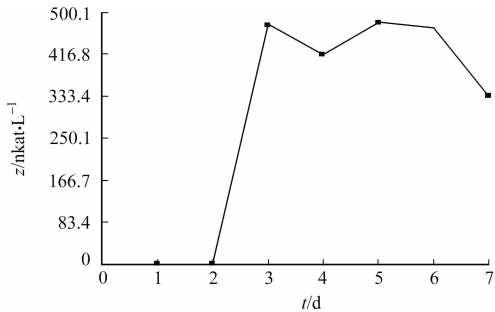


图 2 真菌的液态发酵产酶曲线

Fig.2 Time-course of feruloyl esterase of fungus liquid fermentation

2.2 产酶条件对产酶的影响

2.2.1 碳源和氮源 将种子液接种于不同种类碳源的发酵培养基中,于 200 r·min⁻¹,30 ℃下培养 3 d 后取样测定酶活. 考察不同碳源和氮源对产酶的影响,结果如表 1 所示.

从表 1 可知,麦麸的发酵产酶最高,是脱淀粉麦麸发酵产酶的 184%,表明去除麦麸中的淀粉后进行发酵,产酶量下降. 但是,以淀粉为唯一碳源发酵,其结果与以木糖为唯一碳源一样,都不产阿魏酸酯酶. 这与 Shin 等^[12] 的报道结果一致,其原因可能与诱导机制有关. 麦麸中的淀粉可能仅仅有利于发酵

初期菌体的生长,对阿魏酸酯酶的产生无诱导作用.

从表 1 可知,添加有机氮源(如酵母粉和蛋白胨)进行发酵,产酶普遍高于添加无机氮源(如酒石酸铵、氯化铵和硝酸铵),但硝酸钠除外. 以硝酸钠为氮源进行发酵,产酶最高.

表 1 碳源和氮源对产酶的影响

Tab. 1 Effects of carbon sources and nitrogen sources on feruloyl esterase production

碳源	麦麸	麦糟	脱淀粉麦麸	脱淀粉麦糟	淀粉	木糖
$z/\text{nkat} \cdot \text{L}^{-1}$	883.5	571.8	480.1	445.1	0	0
氮源	酵母粉	蛋白胨	硝酸钠	硝酸铵	酒石酸铵	氯化铵
$z/\text{nkat} \cdot \text{L}^{-1}$	733.5	443.4	845.2	90.0	250.1	158.4

2.2.2 麦麸质量体积比 考察不同麦麸质量体积比 w (麦麸)对产酶的影响,如图 3 所示. 从图 3 可知,当麦麸质量体积比较低时,培养基中的麦麸不能满足菌体生长的需要,酶活较低;当麦麸质量体积比为 6%~8%时,产酶最高;进一步提高麦麸浓度后,培养基中水含量减少,菌体的生长受到抑制,酶活降低.

2.2.3 硝酸钠质量体积比 考察了不同硝酸钠质量体积比 w (硝酸钠)对产酶的影响,结果如图 4 所示. 从图 4 可知,当硝酸钠质量体积比较低时,培养基中的硝酸钠不能满足菌体生长的需要,酶活较低;

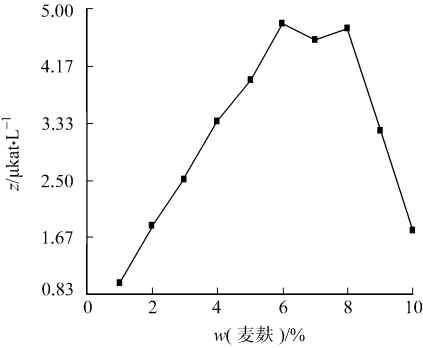


图 3 麦麸质量体积比对产酶的影响

Fig. 3 Effect of wheat bran mass/volume on feruloyl esterase production

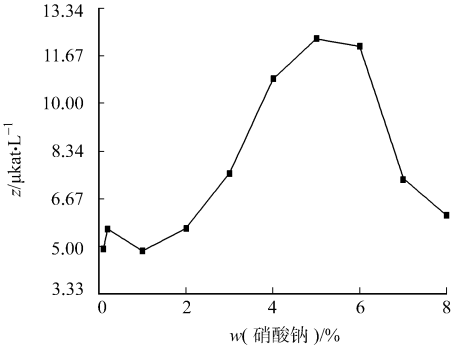


图 4 硝酸钠质量体积比对产酶的影响

Fig. 4 Effect of sodium sulfate mass/volume on feruloyl esterase production

随着硝酸钠质量体积比的增大,酶活逐渐提高;当硝酸钠质量体积比为 5%时,产酶最高;进一步提高硝酸钠质量体积比,培养基中离子浓度增大,抑制了菌体的生长,酶活降低.

2.2.4 培养温度 不同培养温度(θ)对发酵产酶的影响,如图 5 所示. 从图 5 可知,当温度为 24 ℃时,产酶较少;随着温度的提高,酶产量增大;温度为 30 ℃时产酶最多,温度至 33 ℃时酶活略有下降.

2.3 发酵产酶时间曲线

考察了菌株产酶的时间曲线,如图 6 所示. 从图 6 可知,发酵至第 3 d 开始产酶,并以每天约 10%的速度增长;发酵至第 6 d 达到最高,酶活为 16.33 $\mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$,随后开始下降.

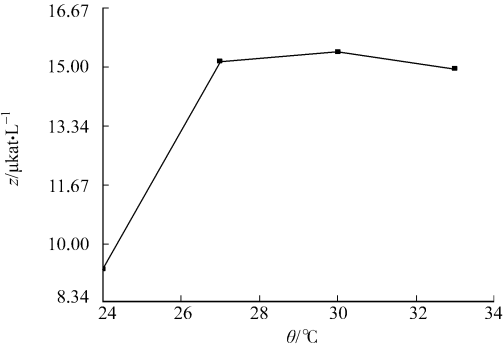


图 5 培养温度对产酶的影响

Fig. 5 Effect of cultivation temperature on feruloyl esterase production

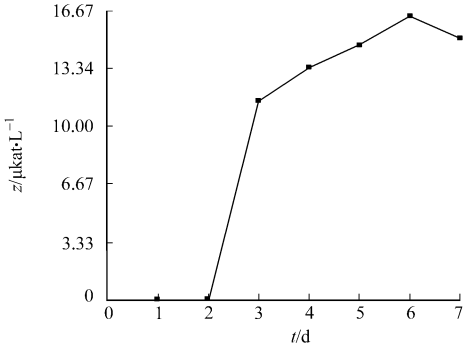


图 6 发酵产酶的时间曲线

Fig. 6 Time-course of feruloyl esterase production

3 结束语

通过富集培养、梯度稀释、平板初筛和摇瓶复筛的方法,从土壤中得到 1 株阿魏酸酯酶活力较高的菌株,初步鉴定为曲霉。运用单因素法对其液态发酵的产酶条件进行优化,酶活最高可达 16.33 $\mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$,为阿魏酸酯酶的进一步研究打下了良好的基础。

参考文献:

[1] CREPIN V, FAULDS C, CONNERTON I. Functional classification of the microbial feruloyl esterases[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 63(6): 647-652.

[2] BENOIT I, NAVARRO D, MARNET N, et al. Feruloyl esterases as a tool for the release of phenolic compounds from agro-industrial by-products[J]. Carbohydrate Research, 2006, 341(11): 1820-1827.

[3] RECPRD E, ASTHER M, SIGOILLOT C, et al. Overproduction of the *Aspergillus niger* feruloyl esterase for pulp bleaching application[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 62(4): 349-355.

[4] TABLA M, HERPOËL-GIMBERT I, MONOD F, et al. Enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production by a combined cellulase xylanase and feruloyl esterase treatment[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 39(4): 897-902.

[5] GIULIANI S, PIANA C, SETTI L, et al. Synthesis of pentylferulate by a feruloyl esterase from *Aspergillus niger* using water-in-oil microemulsions[J]. Biotechnology Letters, 2001, 23(4): 325-330.

[6] FAULDS C, WILLIAMSON G. The purification and characterization of 4-hydroxy-3-methoxycinnamic (ferulic) acid esterase from *Streptomyces olivochromogenes*[J]. Microbiology, 1991, 137(10): 2339-2345.

[7] TOPAKAS E, VAFIADI C, CHRISTAKOPOULOS P. Microbial production, characterization and applications of feruloyl esterases[J]. Process Biochemistry, 2007, 42(4): 497-509.

[8] 欧仕益, 张璟, 汪勇, 等. 采用黑曲霉发酵制备阿拉伯木聚糖酶和阿魏酸酯酶的研究[J]. 食品科技, 2004, (4): 90-95.

[9] 王洪川, 陈洪章. 高产阿魏酸酯酶菌株的筛选及其固态发酵的研究[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(4): 11-14.

[10] 张帅兵, 裴小琼, 吴中柳. 黑曲霉阿魏酸酯酶 A 的克隆、表达及快速酶活检测体系的建立[J]. 应用与环境生物学报, 2009, 15(2): 276-279.

[11] 谢春元. 阿魏酸酯酶在饲料细胞壁瘤胃降解中的功效和饲用复合酯酶配伍筛选[D]. 北京: 中国农业大学, 2007.

[12] SHIN H, CHEN R. Production and characterization of a type B feruloyl esterase from fusarium proliferatum NRRL 26517[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 38(3/4): 478-485.

[13] DONAGHY J, KELLY P, MCKAY A. Detection of ferulic acid esterase production by *Bacillus spp.* and lactobacilli[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1998, 50(2): 257-260.

Screening of Feruloyl Esterases Producing Strain
and Optimization of the Enzyme Production

DENG Yi-tao, LI Xia-lan, CHEN Zong-xiang, CAI E-na

(College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

Abstract: A strain producing feruloyl esterases was obtained from the soil. It was preliminarily identified as *Aspergillus sp.* according to the morphological characteristics. Production of feruloyl esterserses was optimized by single factor method. Results showed that the highest enzyme activity could reach 16.33 $\mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ after 6 days at 30 $^{\circ}\text{C}$ in Czapek medium containing 6% (mass/volume) wheat bran and 5% (mass/volume) sodium nitrate.

Keywords: ferulic acid; feruloyl esterase; *Aspergillus sp.*; screening

(责任编辑: 黄晓楠 英文审校: 刘源岗)