



## 聚半乳糖醛酸酶的发酵条件优化及对造纸 白水 DCS 的控制

胡惠仁, 赵 晶

(天津市制浆造纸重点实验室, 天津科技大学材料科学与化学工程学院, 天津 300457)

**摘 要:** 研究了黑曲霉液体发酵产聚半乳糖醛酸酶的培养基优化. 研究表明, 最佳发酵培养基为 (g/L): 麸皮 40, 鲜苹果渣 20,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  20, NaCl 1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  6,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1. 最佳初始 pH 3.5, 接种量 3%, 装液量 50 mL, 发酵时间 3 d. 经过培养基优化, 酶活可达到 1 505.8 U. 用其处理 BCTMP (化学热磨机械浆) 的 DCS (溶解物质和胶体物质) 水, 处理 30 min 后, DCS 水的 CD (阳电荷需求量) 降低 27%.

**关键词:** 黑曲霉; 聚半乳糖醛酸酶; 液体发酵; DCS

中图分类号: X793 文献标识码: A 文章编号: 1672-6510 (2008) 04-0001-05

## Optimization of Conditions for Polygalacturonase Fermentation and Its Effect on DCS in White Water of Papermaking

HU Hui-ren, ZHAO Jing

(Tianjin Key Laboratory of Pulp and Paper, College of Material Science and Chemical Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** The optimal medium for polygalacturonase were studied. The results of the experiment show that the optimal medium are (g/L): wheat bran 40, fresh apple residue 20,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  20, NaCl 1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  6,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1. Other fermentation conditions are: pH 3.5, inoculation amount 3%, liquid volume flask 50 mL and fermentation time 3 days. Under these conditions, the enzyme activity of polygalacturonase reaches 1 505.8 U. Using the polygalacturonase to treat DCS water of BCTMP, the CD value of DCS water decrease 27% after reacting 30 min.

**Keywords:** *Aspergillus niger*; polygalacturonase; liquid-state fermentation; DCS

果胶酶可分为果胶水解酶 (pectin hydrolases)、果胶裂解酶 (pectin lyases, PL)、果胶酯酶 (pectin esterases, PE) 和原果胶酶等, 其中果胶水解酶又可分为聚半乳糖醛酸酶 (polygalacturonases, PG)、聚半乳糖醛酸甲酯水解酶 (polymethylgalacturonases, PMG)、聚鼠李半乳糖醛酸酶 (RHG)、阿拉伯聚糖酶、半乳聚糖酶、木糖基半乳糖醛酸酶 (xylogalacturonase) 等<sup>[1]</sup>.

近年来, 不少学者把果胶酶应用于制浆造纸工业中. Thornton<sup>[2]</sup>报道, 果胶酶处理可以降低热磨机械

浆 (TMP) 中 40% 的阳离子需求. Reid<sup>[3]</sup>等人发现, 在工厂实验中经过果胶酶处理的 TMP 循环水的阳离子需求可降低 28% ~ 60%. 李宗全<sup>[4]</sup>等人研究表明, 果胶酶能够降解溶解物质和胶体物质 (DCS) 中产生阴离子垃圾的主要物质果胶酸. DCS 经果胶酶处理后, 阳电荷需要量明显降低, 与不用果胶酶处理相比, 在相同阳离子助留剂加入量下, 细小纤维的留着率明显提高. 因此, 使用果胶酶处理机械浆或白水, 可以减少其中的阴离子垃圾, 降低阳离子聚合物的加入量, 提高细小纤维的留着率. 但是, 由于之前的学

收稿日期: 2008-04-10; 修回日期: 2008-05-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30771694); 天津市科技发展计划项目 (06TXTJJC14302)

作者简介: 胡惠仁 (1947—), 男, 天津人, 教授, 博士生导师.

者均采用商品果胶酶处理,导致处理 DCS 成本偏高<sup>[5]</sup>. 所以,本文通过对发酵条件的研究,探讨黑曲霉菌株产聚半乳糖醛酸酶培养基的优化,确定最优的培养基组成,以提高聚半乳糖醛酸酶的产量及其稳定性,并用此控制造纸白水中的 DCS.

## 1 材料与方法

### 1.1 原料

黑曲霉菌种由天津科技大学食品工程实验室提供. 漂白化学热磨机械浆 (BCTMP) 购于山东某纸厂.

### 1.2 培养基

斜面培养基为 PDA 培养基.

摇瓶种子培养基 (g/L): 麸皮 20; 葡萄糖 30;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  15;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5, pH 5.0.

培养方法: 接一环生长良好的黑曲霉于装有种子培养基 50 mL 的 250 mL 三角瓶中, 在 30 °C、120 r/min 的条件下摇瓶培养 36 h. 按 3% 的接种量接入摇瓶发酵培养基中, 250 mL 三角瓶的装液量为 50 mL, 在 30 °C、120 r/min 的条件下摇瓶培养 48 h.

### 1.3 聚半乳糖醛酸酶活性的测量方法

将酶液稀释一定倍数, 吸取 1.5 mL 0.5% 的果胶 (用 pH 4.8 的醋酸-醋酸钠缓冲液配制) 至比色管中, 预热 5 min, 再加入 0.5 mL 稀释后的酶液, 于 50 °C 恒温水浴中反应 30 min, 然后加入 3 mL 的 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 试剂, 煮沸 5 min, 使其发生显色反应. 加蒸馏水至刻度, 采用分光光度计的方法于 560 nm 处测吸光度. 用灭活的酶液作参比.

酶活力的定义: 1 mL 酶液在 pH 4.8、温度 50 °C 的条件下, 1 min 分解果胶产生 1  $\mu\text{g}$  半乳糖醛酸为一个酶活单位 (U).

### 1.4 DCS 水的制备

将 BCTMP 用蒸馏水稀释至 2%, 在 60 °C 的恒温水浴中以 100 r/min 搅拌 3 h, 然后过滤浓缩至浓度 45%, 为得到更高浓度的 DCS 水, 将此过程循环 1 次, 即用得到的滤液再稀释新的 BCTMP, 再过滤浓缩得滤液. 滤液经过 2 000 r/min 离心 20 min 后得到 DCS 水.

### 1.5 酶处理 DCS

加入一定量聚半乳糖醛酸酶液至盛有 DCS 水的 250 mL 三角瓶中, 把三角瓶放入摇床中, 设定转速 150 r/min, 温度为 50 °C 处理一定时间, 然后煮沸

5 min, 使酶失活. 用加有失活酶液的 DCS 水作空白对照.

### 1.6 阳离子需求量的测定

DCS 水的阳电荷需求量 (CD) 用 MütekPCD 电荷滴定仪测定, 标准阳离子物质为聚二烯丙基二甲基氯化铵 (PDADMAC).

## 2 结果与分析

### 2.1 不同碳源对产酶的影响

在培养基中加入不同碳源 (用 50 g/L 麸皮并辅以适量氮源和少量无机盐作为基础培养基), 附加碳源对酶活的影响见表 1. 结果表明, 不同的附加碳源对聚半乳糖醛酸酶的酶活有不同的影响. 添加果胶含量丰富的桔皮粉和鲜苹果渣能明显提高聚半乳糖醛酸酶的活力, 且添加鲜苹果渣比添加桔皮粉效果要好. 所以选用鲜苹果渣为附加碳源.

表 1 附加碳源对酶活的影响

Tab. 1 Effect of appendant carbon on enzymatic activity

附加碳源	添加量/(g·L <sup>-1</sup> )	酶活/U
蔗糖	30	320.6
无水葡萄糖	30	310.1
麦芽糖	30	370.6
桔皮粉	30	400.5
稻草粉	30	350.2
鲜苹果渣	30	418.5
玉米淀粉	30	320.4

确定选用鲜苹果渣后, 考察鲜苹果渣的添加量对产聚半乳糖醛酸酶的影响, 结果见图 1. 由图 1 可以看出, 最佳添加量为 20 g/L.

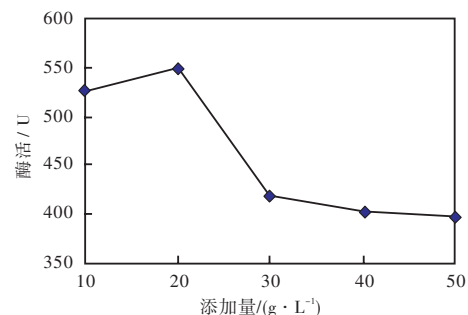


图 1 鲜苹果渣添加量对酶活的影响

Fig. 1 Effect of fresh apple residue addition on enzymatic activity

### 2.2 不同氮源对产酶的影响

以 50 g/L 麸皮和 20 g/L 鲜苹果渣为碳源, 分别加入 20 g/L 的硫酸铵、硝酸铵、脲素、蛋白胨、牛肉

膏、酵母粉进行发酵产酶实验,考察不同氮源对产聚半乳糖醛酸酶的影响,结果见表2。结果表明,添加无机氮源硫酸铵时,聚半乳糖醛酸酶的活力最高。添加有机氮源的效果不如添加无机氮源好。

表2 不同氮源对酶活的影响

Tab. 2 Effect of nitrogen source on enzymatic activity

氮源	添加量/(g · L <sup>-1</sup> )	酶活/U
硫酸铵	20	550.2
硝酸铵	20	462.8
脲素	20	340.6
蛋白胨	20	310.6
牛肉膏	20	326.8
酵母粉	20	319.8

确定添加硫酸铵后,考察硫酸铵的不同添加量对产酶的影响,实验结果见图2。结果表明,硫酸铵添加量为20 g/L时,最有利于产聚半乳糖醛酸酶。

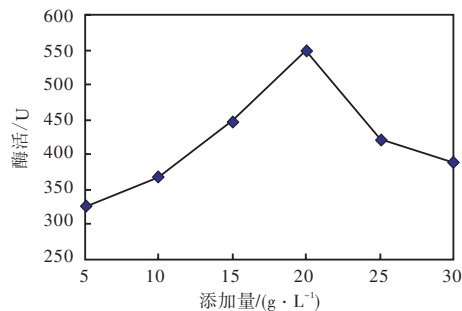


图2 硫酸铵添加量对酶活的影响

Fig. 2 Effect of addition on enzymatic activity

### 2.3 不同无机盐对产酶的影响

以50 g/L的麸皮、20 g/L鲜苹果渣、20 g/L硫酸铵为基础培养基,分别加入不同种类和不同添加量的无机盐作为发酵培养基,以考察无机盐的种类和添加量对产酶的影响。实验结果见表3。

结果表明, Ca<sup>2+</sup>的存在不利于产酶,氯化钠、硫酸镁、硫酸亚铁、磷酸二氢钾和磷酸氢二钾均有利于产酶,且磷酸二氢钾比磷酸氢二钾效果好。氯化钠的最佳添加量为3 g/L;硫酸镁的最佳添加量为5 g/L;硫酸亚铁的最佳添加量为0.05 g/L;磷酸二氢钾的最佳添加量为1 g/L。

表3 无机盐对酶活的影响

Tab. 3 Effect of inorganic salt on enzymatic activity

无机盐	加入量/(g · L <sup>-1</sup> )	酶活/U	酶活变化
空白		550.5	
CaCl <sub>2</sub>	1	443.8	-
CaCl <sub>2</sub>	2	430.6	-
CaCl <sub>2</sub>	3	418.5	-
CaCO <sub>3</sub>	1	529.5	-
CaCO <sub>3</sub>	2	539.5	-
CaCO <sub>3</sub>	3	511.4	-
NaCl	1	590.5	+
NaCl	3	670.2	+
NaCl	5	642.7	+
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1	571.4	+
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2	593.3	+
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	5	658.2	+
FeSO <sub>4</sub>	0.05	589.2	+
FeSO <sub>4</sub>	0.10	525.7	-
FeSO <sub>4</sub>	0.20	500.9	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	770.8	+
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2	620.7	+
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5	589.6	+
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	625.3	+
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2	606.8	+
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5	548.2	-

注: +表示加入无机盐后酶活比空白样高; -表示加入无机盐后酶活比空白样低。

### 2.4 聚半乳糖醛酸酶发酵培养基的正交实验

确定培养基中硫酸铵含量为20 g/L,选择磷酸二氢钾(A)、氯化钠(B)、硫酸镁(C)、麸皮(D)、空白(E)5因素4水平,按因素水平变化表4设计正交实验。

根据正交实验结果可知,4种因素影响黑曲霉产聚半乳糖醛酸酶能力的主次顺序为D>C>A>B,即麸皮的加入量对产酶影响最大,麸皮加入量为40 g/L时酶活最高。这是由于培养基的碳源如果过多,容易在发酵时形成较低的pH。另外,碳氮比也会影响菌体按比例地吸收营养物质,直接影响菌体的生长和产物的形成。其次是MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O。计算各个因素水平的K值,得到A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>4</sub>D<sub>2</sub>为优势组合。经实验证明,培养基为A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>4</sub>D<sub>2</sub>时,聚半乳糖醛酸酶的酶活为1307.3 U。

表4 聚半乳糖醛酸酶因素水平的设计

Tab. 4 Factor Levels of polygalacturonase

因素	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /(g · L <sup>-1</sup> ) (A)	NaCl/(g · L <sup>-1</sup> ) (B)	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O/(g · L <sup>-1</sup> ) (C)	麸皮/(g · L <sup>-1</sup> ) (D)	空白 (E)
水平1	0.5	1	4.5	30	
水平2	1.0	2	5.0	40	
水平3	1.5	3	5.5	50	
水平4	2.0	4	6.0	60	

### 2.5 培养基初始 pH 对酶活的影响

考察初始 pH 对酶活的影响,实验结果如图 3 所示. 由图可见,初始 pH 为 3.5 时,聚半乳糖醛酸酶酶活最高达到 1 348.5 U.

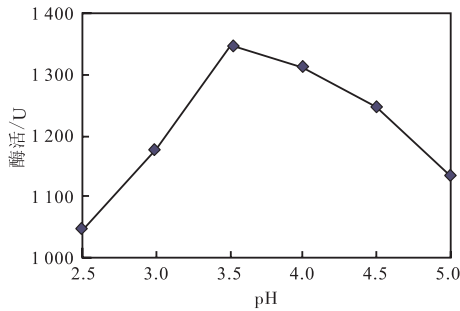


图 3 培养基初始 pH 对酶活的影响

Fig. 3 Effect of initial pH on enzymatic activity

### 2.6 接种量对酶活的影响

在 250 mL 的三角瓶中装入 50 mL 培养基,接入不同量的种子进行摇瓶实验,接种量对酶活的影响见图 4. 结果表明,接种量为 3% 时酶活最高,为 1 362.7 U.

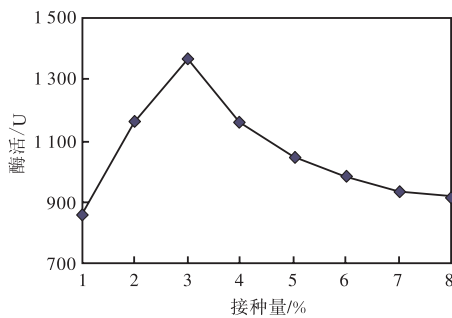


图 4 接种量对酶活的影响

Fig. 4 Effect of inoculation volume on enzymatic activity

### 2.7 培养基装液量对酶活的影响

摇瓶内培养基通气程度与装入的培养基体积成反比,故在三角瓶中装入不同体积的最适培养基进行产酶实验,结果如表 5 所示. 结果表明:黑曲霉产酶对通气量较为敏感,装液量为 50 mL 时可以获得较高酶活. 因此,在以霉菌生产果胶酶时,需要通入适当的通气量.

表 5 装液量对酶活的影响

Tab. 5 Effect of volume of fermentation liquid on enzymatic activity

装液量/mL	酶活/U
30	936.2
50	1 320.6
75	1 189.4
100	965.2

### 2.8 发酵时间对酶活的影响

将已接种的最适培养基在 30 °C 下振荡培养不同时间,发酵时间对酶活的影响见图 5. 由图可见,发酵时间为 3 d 时酶活最高,达到 1 505.8 U.

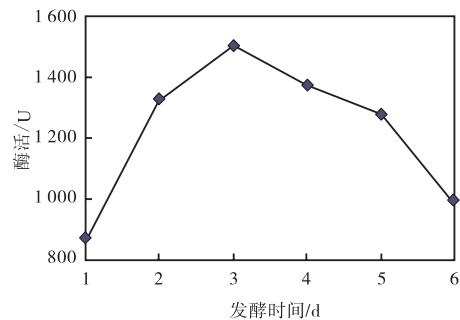


图 5 发酵时间对酶活的影响

Fig. 5 Effect of fermentation time on enzymatic activity

### 2.9 聚半乳糖醛酸酶处理 DCS 水

取 BCTMP 的 DCS 水 100 mL 置于 250 mL 三角瓶中,加入 40 U 酶液,放入摇床中反应. 摇床转速设定为 150 r/min,温度为 50 °C. 用加入已灭活的酶液 DCS 水作为空白对照. 实验结果见图 6. 结果表明:用果胶酶处理 DCS 水 30 min 时,DCS 水的 CD 值有了明显下降,由 323.3 μeq/L 下降到 237.2 μeq/L. 延长处理时间,CD 值基本不变,说明在 30 min 时果胶酶与 DCS 的反应基本结束.

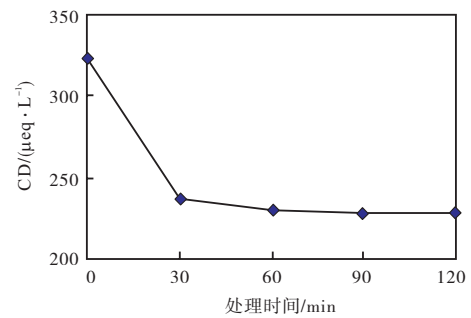


图 6 酶处理时间对 CD 的影响

Fig. 6 Effect of treating time on CD value

酶液加入量对 CD 的影响见图 7. 由图可见,随着酶液加入量的增加,白水的 CD 有所回升. 这可能是由于加入量为 30 U 时,白水里的果胶类物质已经全部被降解,继续加入酶液,酶液本身的 CD 使得测定结果有所回升.

处理前后白水的粒径变化如图 8 所示. 可以看出,经过酶处理 30 min 后,白水里的粒度较大的颗粒分布减少. 这表明 DCS 水里果胶类物质被果胶酶降解.

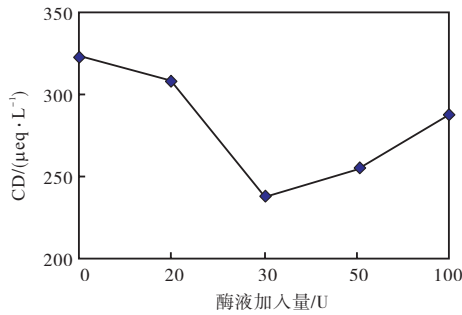
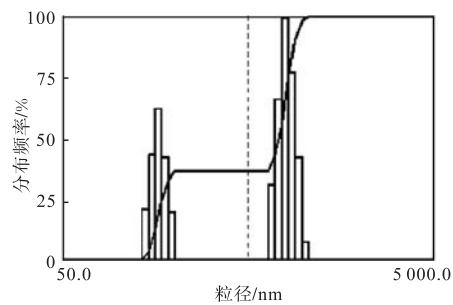
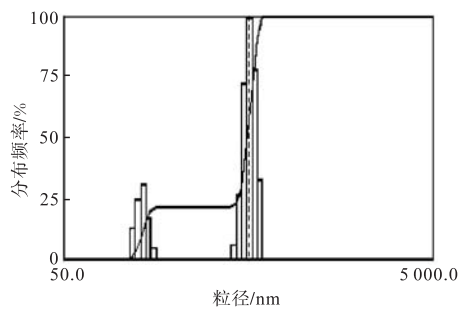


图 7 酶液加入量对 CD 的影响

Fig. 7 Effect of addition amount of PG on CD value



(a) 酶处理前



(b) 酶处理后

图 8 酶处理前后 DCS 水粒径分布

Fig. 8 Partial size distribution of DCS water before and after PG treating

### 3 结 论

聚半乳糖醛酸酶的最佳培养基组成为 (g/L): 麸皮 40, 鲜苹果渣 20,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  20, NaCl 1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  6,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1, 最佳初始 pH 3.5, 最适接种量 3%, 发酵时间 3 d. 经过培养基优化, 酶活可达到 1 505.8 U.

聚半乳糖醛酸酶处理 BCTMP 中的 DCS 时, 最佳处理时间 30 min, 最佳添加量 30 U. 经处理, 白水的 CD 下降 27%.

### 参 考 文 献:

- [1] Henk A Sehols, Edwin J Bekx, Dick Schipper, et al. A xylogalacturonan subunit present in the modified hairy regions of apple pectin [J]. Carbohydrate Research, 1995, 27 (9): 265—279.
- [2] Thornton J W. Enzymatic degradation of polygalacturonic acids released from mechanical pulp during peroxide bleaching [J]. Tappi, 1994, 77 (3): 161—167.
- [3] Ian Reid, Michelle Ricard. Pectinase in papermaking: Solving retention problems in mechanical pulps bleached with hydrogen peroxide [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2000, 26 (2): 115—123.
- [4] 李宗全, 詹怀宇, 秦梦华. 果胶酶处理 BCTMP 中 DCS 及其对阳离子助剂作用效果的影响 [J]. 中国造纸, 2006, 25 (8): 23—26.
- [5] Kenneth E Sundberg, Anna C Sundberg, Jeffrey W T, et al. Pectin acids in the Production of wood containing paper [J]. Tappi, 1998, 81 (7): 131—140.

### 《天津科技大学学报》变更刊期的启事

为了增加信息量, 缩短论文出版周期, 进一步适应现代化期刊的发展要求, 自 2009 年起, 本刊由原季刊变更为双月刊. 欢迎广大作者踊跃投稿.

本刊编辑部