

黑曲霉 YY-22 产酸性果胶酶的分离纯化

康晶, 刘晓兰, 郑喜群, 田英华, 邓永平

(齐齐哈尔大学食品与生物工程学院, 齐齐哈尔大学农产品加工黑龙江省普通高校重点实验室, 黑龙江齐齐哈尔 161006)

摘要: 本文研究了从黑曲霉 YY-22 发酵产酸性果胶酶粗酶液中分离出较高纯度果胶裂解酶 (PL)、聚半乳糖醛酸酶 (PG)、果胶酯酶 (PE) 的方法, 同时考察了主要组分 PL 在各分离阶段的纯化效果。依次采用硫酸铵盐析、疏水相互作用层析及离子交换层析对果胶酶 PG、PE、PL 进行分离。结果表明: 果胶酶粗酶液中硫酸铵饱和浓度为 65% 时, 沉淀中 PL 回收率最大, 部分杂蛋白在盐析过程中被分离出来; 沉淀复溶后经 Phenyl-Sepharose FF 疏水相互作用层析首先分离出 PE 活性组分, 又经 Q-Sepharose HP 强阴离子交换层析分别得到 PG 和 PL 活性组分。果胶酶粗酶液中主要组分 PL 经三步纯化后的比活力达到 79.37 U/mg 蛋白, 纯化倍数为 13.30, 活力回收为 33.05%。较高纯度 PL、PG、PE 的获得, 为进一步研究酶的基本性质及其在果蔬加工和葡萄酒中的应用奠定基础。

关键词: 果胶裂解酶; 聚半乳糖醛酸酶; 果胶酯酶; 分离纯化

文章编号: 1673-9078(2014)5-191-195

Purification of Acidic Pectinases Produced by *Aspergillus niger* YY-22

KANG Jing, LIU Xiao-lan, ZHENG Xi-qun, TIAN Ying-hua, DENG Yong-ping

(College of Food and Bioengineering, Qiqihar University, Key Laboratory of Processing Agricultural Products of Heilongjiang Province, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China)

Abstract: Purification of pectin lyase (PL), polygalacturonase (PG), and pectin esterase (PE) from the fermentation culture supernatant of *Aspergillus niger* YY-22 was investigated. All the three enzymes PL, PG and PE were precipitated by ammonium sulfate precipitation (0~65%). PE was further purified by hydrophobic interaction chromatography using Phenyl-Sepharose FF, while PG and PL were purified by Q-Sepharose HP ion exchange chromatography. The highest recovery of PL was obtained with 65% ammonium sulfate saturation precipitation. After three steps of separation, PL was purified 13.30 folds with a recovery of 33.05% and a specific activity of 79.37 U/mg.

Key words: pectin lyase; polygalacturonase; pectin esterase; purification

果胶酶自二十世纪三十年代开始应用于商业领域, 是最早得到应用的酶类之一。到了五十年代, 果胶酶制剂开始规模化生产^[1]。在此后的几十年间, 学者们对果胶酶的分离纯化、酶学特性及其蛋白质结构特征等方面的研究获得了突破性的进展。果胶酶源自植物、动物和微生物, 但由于动、植物来源的果胶酶产量低且提取困难, 不能满足现代应用的需求, 而微生物因生长速度快, 生长条件简单和分布广泛等优势成为果胶酶的重要来源^[2]。近年来, 果胶酶已广泛应用于果蔬加工、酿酒、纺织和造纸等行业中。目前, 随着我国果汁果酒业的迅猛发展, 对微生物果胶酶的需求量也呈上升趋势。因此, 开发活力高、稳定性好、

收稿日期: 2013-12-23

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目 (B201213)

作者简介: 康晶 (1986-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 微生物发酵与酶制剂纯化

通讯作者: 刘晓兰 (1962-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 发酵工程与应用酶学研究

专一性强的果胶酶制剂成为研究果胶酶的必然要求。

果胶酶是分解果胶类物质的一类多酶复合体系, 它可瓦解植物细胞的细胞壁, 使高分子的半乳糖醛酸降解为半乳糖醛酸和果胶酸小分子物质, 从而快速彻底的脱除果胶。根据分解糖苷键反应的性质或降解物的性质, 果胶酶可分为 3 大类: 聚半乳糖醛酸酶 (polygalacturonase, PG)、果胶裂解酶 (pectin lyase, PL) 和果胶酯酶 (pectin esterase, PE)^[3]。PG 对酯化度低的果胶作用容易, 切开 α -1, 4-半乳糖苷键, 生成寡聚糖及半乳糖醛酸, 使果胶或果胶酸的黏度下降, 还原性显著增强^[4-5]。PL 作用于底物经历一个 β -消除反应, 使底物生成非还原末端 C4 和 C5 之间带有双键的产物, 即 β -4, 5 不饱和半乳糖醛基, 其产物在 235 nm 处具有最大紫外吸收波长^[6-7]。PE 简称羧酸酯水解酶, 随机切除甲酯化果胶中的甲氧基, 产生甲醇和游离羧基, 使溶液酸性增强^[8]。

果胶酶按其最适作用 pH 分为酸性果胶酶和碱性果胶酶。目前, 世界范围内研究和应用较多的是酸性

果胶酶^[9], 为探求 *Aspergillus niger* YY-22 发酵产酸性果胶酶的基本性质, 本文研究了采用多种色谱分离纯化技术从其中分离出 PG、PE、PL 的方法, 为进一步研究酶的基本性质及其在的蔬菜和水果加工、果汁澄清及葡萄酒中的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

黑曲霉 (*Aspergillus niger*) YY-22 由齐齐哈尔大学食品与生物工程学院提供。聚半乳糖醛酸, 购自天津阿法埃莎化学有限公司; 果胶, 购自 sigma 公司, Q-Sepharose HP 和 Phenyl-Sepharose FF 色谱填料, 购自美国 GE 公司; 其余试剂均为进口或国产色谱或分析纯试剂。AKTA prime 蛋白质纯化系统, 购自美国 GE 公司。

1.2 方法

1.2.1 聚半乳糖醛酸酶活力测定

PG酶活测定采用3,5-二硝基水杨酸(DNS)法^[10], 底物为0.2% (m/V) 聚半乳糖醛酸 (用pH 5.5醋酸-醋酸钠缓冲液配制), 反应时间为30 min。酶活力单位定义: 在45 °C pH 5.5条件下, 每分钟水解聚半乳糖醛酸产生1 μmol半乳糖醛酸所需的酶量。

1.2.2 果胶裂解酶活力测定

0.4 mL 0.5% (m/V) 果胶溶液在40 °C水浴中保温5 min后, 加入0.1 mL待测酶液恒温水浴反应10 min, 加4.5 mL 0.05 mol/L HCl终止反应, 在235 nm波长下测定其吸光值^[11-12]。酶活力单位定义: 每分钟裂解果胶产生1 μmol的不饱和半乳糖醛酸所需的酶量。

1.2.3 果胶酯酶定性测定

取1 mL 0.5%果胶于试管中, 用0.1 mol/L NaOH溶液校正pH 5.0, 加入一滴溴甲酚绿, 再加30 μL待测酶液, 35 °C水浴2 h, 如果反应混合液由蓝色变为黄色, 则证明酶液中含有果胶酯酶。

1.2.4 蛋白质浓度测定

蛋白质浓度测定采用Folin-酚法^[13], 以牛血清白蛋白为标准蛋白。

1.2.5 主要组分 PL 的硫酸铵盐析条件的确定

离心管中加入8 mL果胶酶粗酶液, 再使各管中硫酸铵饱和度分别为10%、20%、30%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、80%、90%和100%, 置4 °C冰箱过夜, 12000 r/min离心20 min, 将上清液与沉淀分离。分别用8 mL 0.02 mol/L 醋酸—醋酸钠缓冲液 (pH 5.5) 溶解沉淀, 测定各管上清和沉淀中 PL

酶活性。

1.2.6 Phenyl-Sepharose FF 疏水层析

收集经硫酸铵盐析制备得到的沉淀, 用0.02 mol/L 醋酸—醋酸钠缓冲液 (pH 5.5) 溶解, 样品初始硫酸铵饱和浓度为30% (40%), 上样到用相同硫酸铵饱和度的上述缓冲液平衡的 Phenyl-Sepharose FF 疏水层析柱上, 线性梯度洗脱至盐浓度为0, 流速2 mL/min, 用AKTA prime 蛋白纯化仪的自动部分收集器定时收集洗脱液 (8 mL/管), 同时检测 (280 nm) 蛋白质含量, 测定 PG、PL、PE 酶活, 收集含 PL 和 PG 活性组分, 透析除去硫酸铵, 以备进一步分离使用。

1.2.7 Q-Sepharose HP 离子交换层析

平衡液为 pH 5.5 0.02 mol/L 醋酸—醋酸钠缓冲液, 洗脱液为含 0.6 mol/L NaCl 的平衡液, 疏水层析收集的样品上样到离子交换柱后进行线性梯度洗脱, 流速2 mL/min, 自动部分收集器定时收集洗脱液 (8 mL/管), 280 nm 处检测蛋白质含量, 测定 PG、PL 酶活, 收集 PL 活性组分。

1.3 数据处理

实验中数据为三次测定的平均值, 采用 IBM SPSS Statistics 软件进行数据的统计分析, 根据 Duncan 多范围检验进行差异显著性分析 (P < 0.05)。

2 结果与讨论

2.1 主要组分 PL 的硫酸铵盐析条件的确定

前期研究发现, *Aspergillus niger* YY-22 发酵产生的果胶酶粗酶液中主要组分为 PL。因此, 以 PL 的活性为检测指标, 研究了硫酸铵盐析的条件。盐析是用中性盐类使蛋白质从溶液中沉淀析出的过程, 是一种简单温和的分离方法, 适用于蛋白质的初期分离, 常用溶解度大、不易引起蛋白质变性的硫酸铵为最佳盐类。

粗酶液的硫酸铵盐析曲线如图1所示。硫酸铵饱和和浓度在10%~40%时, 上清液中 PL 酶活性变化不大; 硫酸铵饱和和浓度达到50%时, 析出的沉淀中开始有 PL 酶活性, 且上清液中 PL 酶活力下降明显; 当硫酸铵饱和和浓度达到65%时, 沉淀中 PL 的回收率达到最大为97.74%, 纯化倍数仅为1.16 (见表1); 继续提高硫酸铵的饱和度, PL 的回收率有下降, 沉淀量增加, 在此过程中部分杂蛋白被分离出来。确定主要组分 PL 盐析的适宜硫酸铵饱和度为65%, 收集沉淀, 用0.02 mol/L 醋酸—醋酸钠缓冲液 (pH 5.5) 溶解, 进行下一

步的疏水层析分离。

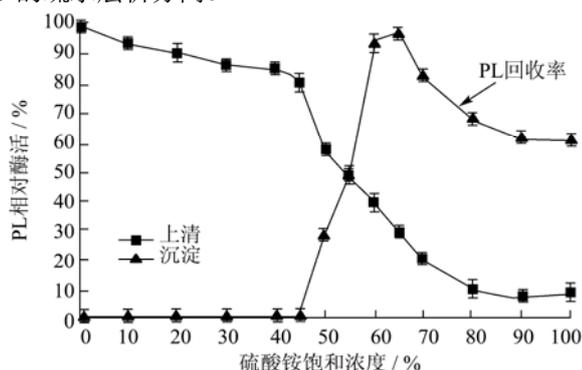


图1 果胶酶PL 硫酸铵盐析曲线

Fig.1 Profile of ammonium sulfate precipitation of pectin lyases

2.2 疏水层析

疏水相互作用层析根据蛋白质表面疏水性的不同,利用蛋白质和疏水层析介质疏水表面可逆的相互作用来分离蛋白。在高盐浓度时,蛋白质会吸附在疏水色谱填料上,逐渐降低洗脱液的盐离子浓度,蛋白质分子依次按疏水性弱和强的顺序被洗脱出来。此法适于安排在蛋白质盐析之后,可以省去脱盐的操作过程。

2.2.1 样品初始硫酸铵饱和度对疏水层析分离果胶酶效果的影响

为了探索疏水色谱分离果胶酶的操作条件,使用GE公司生产的1 mL Phenyl-Sepharose FF疏水层析预装柱,研究样品初始硫酸铵饱和度对分离果胶酶效果的影响。这种疏水填料表面带有低密度苯基疏水基团,不易使蛋白质变性,其非有机流动相也有利于保护蛋白质的固有活性。因此,当样品初始硫酸铵饱和度为30%的时候,经Phenyl-Sepharose FF疏水层析预装柱分离得到结果如图2所示。

在硫酸铵30%饱和度时,梯度洗脱前的洗脱液中检测到PE活性的组分,该组分疏水基团暴露不充分,未全部与层析填料结合;在梯度洗脱阶段具有PE、PL、PG活性的组分被同时洗脱出来,且峰与峰之间的分离度较差。可能因为30%盐饱和度时,三种酶的疏水基团暴露程度相似,与疏水填料结合不牢固,以致分离度较低,分离效果不理想,下一步拟考虑将硫酸铵饱和浓度调到40%。

随硫酸铵饱和度增加,目标蛋白暴露的疏水性基团增多,与疏水填料结合得就越充分。因此,疏水层析其他条件不变,将硫酸铵饱和浓度提高到40%,同时梯度洗脱体积增加至50 mL,洗脱结果如图3所示。三种待分离酶与填料的疏水结合能力增强,疏水性相对较弱的PE在梯度洗脱中期被洗脱出柱,而在梯洗

后期疏水性相近的PG和PL被同时洗脱下来,分离效果较好。因此,确定样品初始硫酸铵饱和度为40%。

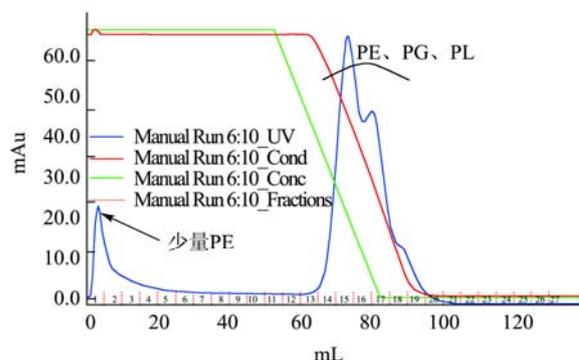


图2 样品初始硫酸铵饱和度为30%的疏水层析分离果胶酶色谱图

Fig.2 Hydrophobic interaction chromatography under the start condition of 30% ammonium sulfate

注: 蛋白浓度: 8.71 mg/mL; 平衡液: 含30% (NH₄)₂SO₄的0.02 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液 (pH 5.5); 洗脱液: 0.02 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液 (pH 5.5), 洗脱体积 30 mL

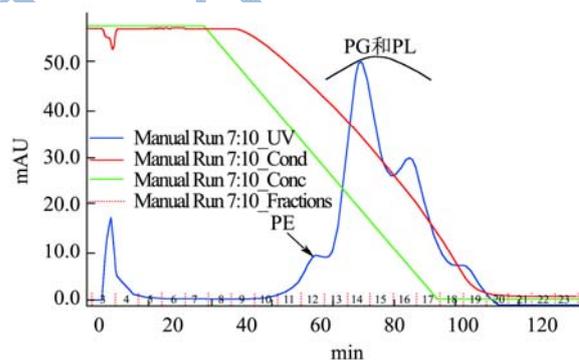


图3 样品初始硫酸铵饱和度为40%的疏水层析分离果胶酶色谱图

Fig.3 Hydrophobic interaction chromatography under the start condition of 40% ammonium sulfate

2.2.2 Phenyl-Sepharose FF 疏水层析

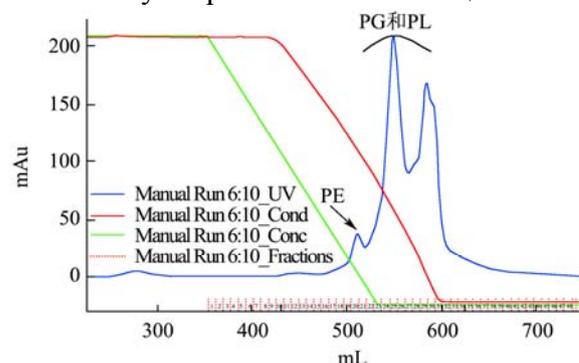


图4 Phenyl-Sepharose FF 疏水层析洗脱色谱图

Fig.4 Phenyl-Sepharose FF hydrophobic interaction chromatography

依据1 mL小柱确定的上样条件,改用φ2.6×20 cm

的柱子对样品进行分离和制备。梯度洗脱体积增加至 150 mL, 洗脱结果如图 4 所示。图 4 与图 3 层析曲线相似, 其中 PL 纯化了 5.44 倍, 酶回收率达到 67.01% (见表 1)。收集 PG 与 PL 的混合组分进行下一步的分离。

2.3 Q-Sepharose HP 强阴离子交换层析

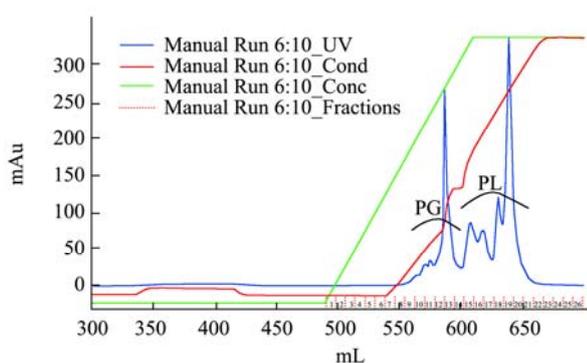


图 5 Q-Sepharose HP 强阴离子交换层析洗脱色谱图

Fig.5 Q-Sepharose HP ion exchange chromatography

注: 蛋白浓度: 0.32 mg/mL; 平衡液: 0.02 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液 (pH 5.5); 洗脱液: 含 0.6 mol/L NaCl 的平衡液, 洗脱体积 150 mL。

表 1 果胶裂解酶 PL 的分离纯化结果

Table 1 Summary of purification steps of pectin lyases

纯化步骤	总活力/U	总蛋白 /mg	比活力 / (U/mg)	活力回收/%	纯化倍数
原酶液	3100.64	518.91	5.97	100	1
盐析	3030.57	435.90	6.95	97.74	1.16
Phenly-Sepharose FF	2077.96	63.95	32.49	67.01	5.44
Q-Sepharose HP	1024.83	12.91	79.38	33.05	13.30

注: ①Phenly-Sepharose FF 洗脱条件: 0.02 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液 (pH 5.5); ②Q-Sepharose HP 洗脱条件: 含 0.6 mol/L NaCl 的 0.02 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液 (pH 5.5)。

离子交换层析是根据蛋白质所带的电荷不同进行分离, 不同蛋白质分子所带电荷的种类和数量不同, 与离子交换填料的静电吸附能力亦不同。通过逐步增强洗脱液的离子强度, 可将结合在离子交换填料上的蛋白质依据其静电吸附能力由弱到强的顺序而分离开来。离子交换色谱要求上样条件为低离子强度状态。

前期实验摸索发现, 待分离三种酶的等电点相近, 分离过程中易产生重叠峰。所以选择颗粒尺寸小 (34 μm)、分辨率高、吸附能力强、物理化学稳定性好, 同时保证样品高加载量及高流速条件下的快速结合分离的 Q-Sepharose HP 填料。

经疏水层析分离得到 PG 与 PL 的混合组分在 4 °C

进行透析除盐, 将透析 6 h 后的酶液上样到 Q-Sepharose HP 强阴离子交换柱 (φ2.6×20 cm) 上, 其洗脱结果如图 5 所示。PG 带负电量相对少, 与离子交换填料结合力较弱, 在梯洗前期被先洗脱出来; 而在梯洗后期, 随着洗脱液离子强度的增加, 洗脱液中的 Cl⁻逐步将与填料结合力强的 PL 组分置换下来, 进而达到分离效果。其主含组分 PL 纯化倍数达到 13.30, 回收率达到 33.05% (见表 1), 比活力为 79.37 U/mg。与已报道从日本曲霉 (30 U/mg)^[14]和变灰青霉 (27.2 U/mg)^[11]发酵液中得到纯化的酸性果胶裂解酶相比, 比活力高出后两者 2~3 倍。

3 结论

本文以黑曲霉 YY-22 发酵产生的酸性果胶酶为粗酶原料, 确立了果胶酶 PG、PL、PE 的分离纯化路线, 同时考察了主要组分 PL 在各分离阶段的纯化效果。果胶酶粗酶液经过 65%硫酸铵盐析, 其主要组分 PL 回收率最大值为 97.74%。经 Phenyl-Sepharose FF 疏水层析得到 PE 活性组分, 最后经过 Q-Sepharose HP 强阴离子交换层析分别得到 PG 和 PL 活性组分。主要组分 PL 的活力回收达到 33.05%, 纯化了 13.30 倍, 比活力为 79.37 U/mg。

参考文献

- [1] 李鸿玉, 李祖明. 果胶酶及其应用[M]. 北京: 知识产权出版社, 2010
LI Hong-yu, LI Zu-ming. Pectinase and application [M]. Beijing: Intellectual Property Press, 2010
- [2] Kashyap DR, Vohra PK, Tewari R. Application of pectinases in the commercial sector: a review [J]. Bioresour. Technol., 2001, 77: 215-227
- [3] Semenova MV, Sinitsyna OA, Morozova VV, et al. Use of a preparation from fungal pectin lyase in the food industry [J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2006, 42(6): 598-602
- [4] Jacob N, Asha Poorna C, Prema P. Purification and partial characterization of polygalacturonase from *Streptomyces Lydicus* [J]. Bioresource Technology, 2008, 99: 6697-6701
- [5] 张跃, 钟芳, 麻建国. 商品果胶酶中 PE 和 PG 的生化分离[J]. 中国食品工业, 2010, 3: 57-59
ZHANG Yue, ZHONG Fang, MA Jian-guo. Biochemical purification of PE and PG from pectinase [J]. Chinese Food Industry, 2010, 3: 57-59
- [6] Hamdy HS. Purification and characterization of the pectin lyase produced by *Rhizopus oryzae* grown on orange peels[J].

- Annals of Microbiology, 2005, 55: 205-211
- [7] Yadav S, Yadav PK, Yadav D, et al. Purification and characterization of pectin lyase produced by *Aspergillus terricola* and its application in retting of natural fibers [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2009, 159(1): 270-283
- [8] 汤鸣强. 黑曲霉 SL2-111 产果胶酯酶的纯化与性质[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(1): 39-43
TANG Ming-jiang. Purification and characterization of pectin esterase produced by *Aspergillus niger* SL2-111 [J]. Food and Fermentation Industries, 2010, 36 (1): 39-43
- [9] Gummadi SN, Panda T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases-a review [J]. Process Biochemistry, 2003, 38: 987-996
- [10] Contreas Esquivel JC, Voget CE. Purification and partial characterization of an acid polygalacturonase from *Aspergillus kawakii* [J]. Journal of Biotechnology, 2004, 110: 21-28
- [11] Sinitsyna OA, Fedorova EA, Semenova MV, et al. Isolation and characterization of extracellular pectin lyase from *Penicillium canescens* [J]. Biochemistry, 2007, 72(5): 565-571
- [12] Yadav S, Yadav PK, Yadav D, et al. Purification and characterization of an acidic pectin lyase produced by *Aspergillus ficuum* strain MTCC 7591 suitable for clarification of fruit juices [J]. Annals of Microbiology, 2008, 58: 61-65
- [13] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the folinn phenol reagent [J]. Journal of Biological Chemistry, 1951, 193: 265-275
- [14] Semenova MV, Grishutin SG, Gusev AV, et al. Isolation and properties of pectinases from the fungus *Aspergillus japonicus* [J]. Biochemistry, 2003, 68(5): 559-569