

# 超声对黑曲霉产菊粉酶的影响

罗登林, 袁海丽, 王 斐, 黄明丽

(河南科技大学食品与生物工程学院, 河南洛阳 471003)

**摘要:** 为了探索超声提高黑曲霉产菊粉酶的可能, 考察了超声处理时间、超声频率和不同发酵时期超声处理等参数的影响。试验发现在黑曲霉的延滞期和对数增长期的初期阶段(<30 h), 40 kHz 和 59 kHz 的超声处理均抑制了黑曲霉产菊粉酶的活力, 高频超声的抑制效果更明显, 菊粉酶活力降低了 47.4%。在黑曲霉的对数增长期的后期阶段(>36 h), 这两种频率的超声处理均促进了黑曲霉产菊粉酶的活力, 低频超声的促进作用更明显, 菊粉酶活力提高了 29.3%。结果表明, 在一定条件下, 超声能够促进微生物的发酵产酶。

**关键词:** 超声; 菊粉酶; 黑曲霉; 发酵

中图分类号: Q681

文献标识码: A

文章编号: 1000-3630(2012)-05-0502-04

DOI 编码: 10.3969/j.issn1000-3630.2012.05.011

## Effect of ultrasound on inulinase production from *Aspergillus niger* fermentation

LUO Deng-lin, YUAN Hai-li, WANG Fei, Huang Ming-li

(Food & Bioengineering College, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, Henan, China)

**Abstract:** To improve the inulinase yield from *Aspergillus niger* by using ultrasound irradiation, the irradiation time, ultrasound frequency and different fermentation periods are examined. In the postponing phase and the first logarithmic growth phase (<30 h) of *Aspergillus niger*, the ultrasound of 40 kHz or 59 kHz has a marked inhibition on the inulinase produce from *Aspergillus niger*, and the higher frequency shows more stronger influence with a decrease of 47.1%. In the late logarithmic growth phase (>36 h) of *Aspergillus niger*, on the contrary, the ultrasound of the two frequencies has a remarkable promotion on the inulinase produce, and the lower frequency shows more stronger influence with an increase of 29.3%. The results implied that ultrasound could promote enzymes production with microorganism fermentation under a certain condition.

**Key words:** ultrasound; inulinase; *Aspergillus niger*; fermentation

## 0 引言

菊粉酶(inulinase)学名  $\beta$ -2,1-D-果聚糖酶, 是指能够水解  $\beta$ -2,1-D-果聚糖果糖苷键的一类水解酶, 它可以在分子内部随机切断某个  $\beta$ -2,1 糖苷键(内切酶活性), 或从果糖的非还原端逐个切下单个果糖(外切酶活性)<sup>[1]</sup>。近年来发现, 利用菊粉酶水解菊粉生产高纯度的低聚果糖和超高果糖浆, 与传统淀粉转化法相比, 具有明显的优势<sup>[2,3]</sup>。菊粉酶的来源主要通过微生物发酵获得, 而目前利用微生物生产菊粉酶的主要瓶颈问题是酶的产率低, 制约了工业化应用。

声是指频率为  $20 \sim 1 \times 10^6$  kHz 的声波, 其作用日益受到各行业的重视<sup>[4]</sup>。超声常作为细胞破碎的手段, 还可用于钝化某些酶<sup>[5,6]</sup>。近年来的研究表明, 一定条件下超声可提高微生物的产酶量, 增强酶的催化活性<sup>[7]</sup>。当短杆菌经过超声诱变后其产酶活力比出发菌株提高了 31.74%; 而用超声处理胰蛋白酶可提高酶活力 45.4%<sup>[8]</sup>。

目前关于超声对微生物产菊粉酶的影响还未见相关报道, 为了探索超声技术应用于菊粉酶生产的可能途径, 推动该技术的实际应用, 论文以诱变后的黑曲霉为研究对象, 考察了超声处理时间、超声频率和不同发酵时期超声处理等对黑曲霉产菊粉酶的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 黑曲霉菌种

黑曲霉菌种为实验室保藏经微波诱变后的菌

收稿日期: 2011-11-02; 修回日期: 2012-02-13

基金项目: 河南省教育厅自然科学计划项目(2008B550002), 河南科技大学 SRTTP(2010042)

作者简介: 罗登林(1976—), 男, 湖北麻城人, 博士, 副教授, 研究方向为超声技术与食品加工。

通讯作者: 罗登林, E-mail: luodenglin@sohu.com

株<sup>[9]</sup>, 测得诱变后的菌株所产菊粉酶活力为 15.61 U/mL, 比初始菌株的酶活力提高了 62.09%。根据该菌株的生长特性, 按曲霉属(*Aspergillus*)分群检索表可判断为黑曲霉属, 命名为 *Aspergillus niger* X-6。

## 1.2 菊粉

粗制菊粉, 用于培养基的配置; 精制菊粉, 昆山拓丰贸易有限公司, 菊粉含量>92%, 用于测酶活力的底物; 其它试剂均为分析纯。

## 1.3 发酵培养基

液体发酵培养基: 麸皮 4%, 蛋白胨 4%, 粗制菊粉 2%, 酵母膏 0.4%, NaCl 0.5%,  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  0.3%, 初始 pH 值 6.5, 接种量 5%。

## 1.4 菊粉酶活力的测定

取 0.5 mL 经适当稀释的酶液, 加入 4 mL、2% 的精制菊粉溶液(0.1 mol、pH 4.5 的醋酸-醋酸钠缓冲液配制)中, 54℃ 保温 10 min, 沸水浴 10 min 灭活终止反应(在完全相同的条件下灭活酶底物对照), 快速冷却后, 测定还原糖产量<sup>[10]</sup>。菊粉酶活力定义为在上述条件下每分钟产生 1 μmol 还原糖的酶量为 1 个菊粉酶活力单位( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ )。

## 1.5 黑曲霉发酵曲线的测定

用 10 mL 生理盐水洗涤斜面活化黑曲霉菌种, 然后梯度稀释到  $10^{-3}$  倍, 接种到装有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, 接种量为 6%, 置于摇床 28℃、160 rpm 恒温培养。收集发酵不同时期培养物, 用纱布过滤, 在 10000 rpm 离心 15 min, 取上清液, 在 600 nm 处测定其吸光度。每试验点重复测定 3 次, 取平均值。

## 1.6 超声处理

超声设备为“弘祥隆”DCTZ-2000 三频多用途恒温超声设备, 该设备具有体积小、提取温度恒温可控等优点。设备有效容积为 2 L, 温度在 5~80( $\pm 0.2$ )℃ 范围内可调控。

### 1.6.1 超声处理时间的影响

黑曲霉 28℃ 恒温震荡培养到 36.5 h 时, 选用频率为 40 kHz、功率为 200 W 的超声条件处理培养物, 处理时间分别为 5 min、10 min、20 min、30 min、1 h、1.5 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h、7 h、8 h, 超声处理之后继续培养至 84 h, 发酵液离心, 收集上清液, 测定菊粉酶活力, 同时进行没加超声的黑曲霉发酵产菊粉酶试验, 计算出菊粉酶活力的变化。每个试验点重复测定 3 次, 取平均值, 考察超声处理

时间对黑曲霉发酵产菊粉酶的影响。

### 1.6.2 不同超声频率的影响

固定超声处理时间 4 h、功率 200 W, 在不同发酵时期, 分别考察频率为 59 kHz、40 kHz 的超声对黑曲霉发酵产菊粉酶的影响。每个试验点重复测定 3 次, 取平均值。

## 2 结果与讨论

### 2.1 黑曲霉发酵曲线

由图 1 可知, 黑曲霉发酵过程中出现明显的延滞期、对数增长期、稳定期、衰亡期。0~16 h 为延滞期, 16~88 h 为对数增长期, 88~112 h 为稳定期, 超过 112 h 后为衰亡期。

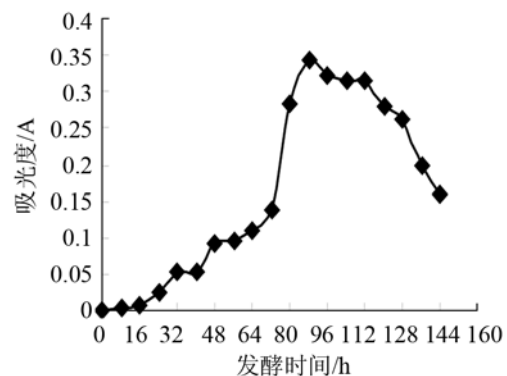


图 1 不同发酵时间发酵液吸光度变化  
Fig.1 Variation of absorbance over fermentation time

### 2.2 超声处理时间的影响

超声处理时间所得结果如表 1 所示。由表 1 可知, 超声处理时间为 1/12 h 和 1/6 h 时, 菊粉酶活力分别提高了 11.43% 和 15.74%, 但多次重复试验, 菊粉酶活力变化不稳定; 超声时间分别为 1/3 h、1.5 h 时, 酶活力均降低; 超声时间分别为 1 h、2 h、3 h 时, 菊粉酶活力有所提高, 但提高幅度不大; 4 h 时, 菊粉酶活力的提高幅度最大, 比对照组所得菊粉酶活力提高了 17.46%, 且多次重复结果稳定; 继

表 1 不同超声处理时间对菊粉酶活力变化的影响

Table 1 Influence of ultrasonic irradiation time on variation of inulinase activity

超声处理时间/h	酶活力变化/%	超声处理时间/h	酶活力变化/%
1/12	11.43	3	6.55
1/6	15.74	4	17.46
1/3	-8.50	5	-4.62
1/2	7.57	6	-7.36
1	4.42	7	-1.53
1.5	-3.00	8	-33.61
2	4.91		

续延长超声处理时间则所得菊粉酶活力呈下降趋势。综合考虑,在以后的试验中采用超声处理时间为 4h。

### 2.3 不同超声频率的影响

#### (1) 59 kHz 超声处理

59kHz 超声处理所得菊粉酶活力变化规律如图 2 所示。由图 2 可知,在延滞期及对数增长期的初级阶段(0~30h),超声处理导致菊粉酶活力均降低。这可能是因为在微生物生长的初期阶段,对不良环境敏感,例如 pH、盐溶液浓度和温度等,此时如附加超声辐照,则会进一步增加微生物的敏感性,导致黑曲霉细胞受损或细胞的调亡,微生物的生长受到抑制,产酶能力降低。而在对数增长期的后期(>36 h),超声处理促进了黑曲霉的产酶活力。这可

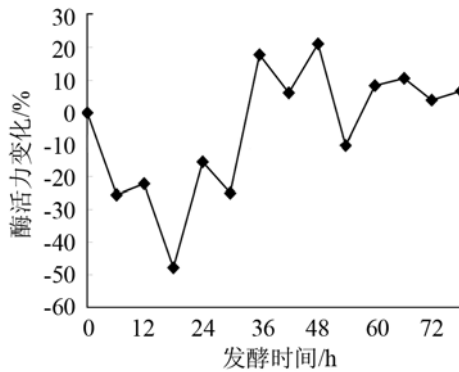


图 2 59 kHz 超声处理后菊粉酶活力变化

Fig.2 Variation of inulinase activity under 59 kHz ultrasonic treatment

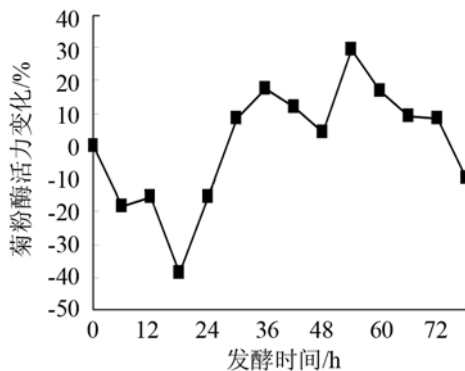


图 3 40 kHz 超声处理后菊粉酶活力变化

Fig. 3 Variation of inulinase activity under 40 kHz ultrasonic treatment

能归因于在发酵后期阶段,一方面微生物抗外界环境刺激的抵抗力增加,另一方面细胞内积累了大量的胞内酶,对细胞的生长产生了反馈抑制,而超声处理则可促进溶液中悬浮固体颗粒及小液滴移动,从而可以促进环境中低溶解度基质的形成,并间接地增加了培养基的生物量,同时超声的空化效应增加了细胞膜的通透性,提高了胞内外物质的交换速率,促进了微生物的细胞代谢,加快了胞内酶释放到胞外的速率,提高了产酶量和酶活力<sup>[9]</sup>。随着发酵时间的延长(>48 h),溶液中积累了大量的菊粉酶,并且溶液黏度迅速下降,超声的空化作用效应增加,使大分子物质(酶)的结构被破坏,同时由空化效应所产生的大量·OH 攻击菊粉酶大分子,改变了酶的分子构象,使酶活力的增加幅度下降。

#### (2) 40kHz 超声处理

40 kHz 超声处理所得菊粉酶活力变化规律与 59 kHz 相似(见图 3),主要区别在于超声对其影响的程度不同(见表 2)。在延滞期及对数增长期的初期阶段,40 kHz 和 59 kHz 的超声处理均表现出对黑曲霉产菊粉酶活力的负效应。两种频率的超声均是在发酵 18h 表现出最大的负效应,但高频(59kHz)比低频(40 kHz)影响大,高频处理的酶活力降低率是低频的 1.22 倍。超声在液体中传播时会产生三种效应,热效应、空化效应和机械波动效应。由于发酵过程中温度是恒定的,超声的热效应可以忽略。从空化效应方面分析,40kHz 比 59kHz 的空化效应强,但由于发酵初期溶液黏度较大,高分子类物质(如蛋白质、多糖)含量高,减弱了空化效应对微生物细胞的破坏作用;从机械波动效应方面分析,59 kHz 超声所产生的溶液质点振动效应比 40 kHz 强,对发酵液的脱气效果强,而在延滞期及对数增长期的初期阶段微生物需氧量较高,因此高频超声对微生物的生长抑制作用更强。在对数增长期的后期阶段,黑曲霉对氧的需求量减少,细胞内积累了大量的菊粉酶,在相同声功率下 40kHz 超声所产生的空化效应要强于 59 kHz 的,因此低频超声更有利于加快胞内酶向胞外的释放速率,酶活力的增加幅度相应提高<sup>[12]</sup>。

表 2 不同发酵时期超声频率对菊粉酶活力的影响比较

Table 2 Effects of ultrasound frequency on inulinase activity during different fermentation periods

超声频率 /kHz	菊粉酶活力的变化/%												
	不同发酵时期/h=6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	66	72	78
40	-18.4	-15.5	-38.9	-15.6	8.46	17.5	11.9	4.11	29.3	16.6	9.25	8.23	-10.2
59	-25.6	-21.9	-47.4	-15.2	-24.9	17.9	5.69	20.8	-10.1	8.46	10.4	3.78	6.39



### 3 结 论

(1) 在黑曲霉的延滞期和对数增长期的初期阶段(<30 h), 两种频率的超声处理均抑制了黑曲霉产菊粉酶的活力, 且在发酵 18 h 后超声辐照 4 h 下表现出最大的抑制作用。相比 40kHz 的低频超声, 59 kHz 的高频超声对菊粉酶活力的降低更明显, 降低率达 47.4%。

(2) 在黑曲霉的对数增长期的后期阶段(>36 h), 两种频率的超声处理均促进了黑曲霉产菊粉酶的活力。相比 59kHz 的高频超声, 40kHz 的低频超声对菊粉酶活力的提高更明显, 提高率达 29.3%。

#### 参 考 文 献

- [1] Chen H Q, Chen X M, Li Y, et al. Purification and characterisation of exo- and endo-inulinase from *Aspergillus ficuum* JNSP5-06[J]. *Food Chemistry*, 2009, **115**(4): 1206-1212.
- [2] Catana R, Ferreira B S, Cabral J M S, et al. Immobilization of inulinase for sucrose hydrolysis[J]. *Food Chemistry*, 2005, **91**: 517-520.
- [3] 罗登林, 袁海丽, 曾小宇, 等. 高压 CO<sub>2</sub>-水混合体系水解菊粉制备果糖工艺[J]. *农业机械学报*, 2009, **40**(8): 130-133.  
LUO Denglin, YUAN Haili, ZENG Xiaoyu, et al. High pressure CO<sub>2</sub>-water system for inulin hydrolysis to produce fructose[J]. *Journal of Agricultural Machinery*, 2009, **40**(8): 130-133.
- [4] 方祥, 唐焕武. 超声波对几种常见肠道致病菌杀灭效果及其作用机理探讨[J]. *声学技术*, 2009, **28**(4): 491-494.  
FANG Xiang, TANG Huanwu. Killing effect of ultrasonic cleaner on several intestinal pathogens and its mechanism[J]. *Technical Acoustics*, 2009, **28**(4): 491-494
- [5] Lin L D, Wu J Y. Enhancement of shikonin production in single and two-phase suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon* cells using low-energy ultrasound[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2002, **78**(1): 81-88.
- [6] 周红生, 许小芳, 王欢, 等. 超声波灭菌技术的研究进展[J]. *声学技术*, 2010, **29**(5): 498-502.  
ZHOU Hongsheng, XU Xiaofang, WANG Huan, et al. Research progress on ultrasonic sterilization technique[J]. *Technical Acoustics*, 2010, **29**(5): 498-502.
- [7] 梁春虹, 黄惠华. 超声波场致效应对酶的影响[J]. *食品与机械*, 2007, **23**(2): 133-136.  
LIANG Chunhong, HUANG Huihua. A review on effects of ultrasound treatment on enzymes[J]. *Food & Machinery*, 2007, **23**(2): 133-136.
- [8] 黄卓烈, 陈小丽, 巫光宏, 等. 超声波对胰蛋白酶活力影响的机理研究[J]. *中国生化药物杂志*, 2009, **30**(4): 230-238.  
HUANG Zhuolie, CHEN Xiaoli, WU Guanghong, et al. Study of the effect and action mechanism of ultrasonic on the activity of trypsin[J]. *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*, 2009, **30**(4): 230-238.
- [9] 曾小宇. 产菊粉酶菌株的选育及其产酶条件的研究[D]. 洛阳: 河南科技大学, 2010, 32-38.  
ZENG Xiaoyu. Research on inulinase strains breeding and its fermentation[D]. Luoyang: Hennan University of Science and Technology, 2010, 32-38.
- [10] Skowronek M, Fiedurek J. Inulinase biosynthesis using immobilized mycelium of *Aspergillus niger*[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, **38**: 162-167.
- [11] Yusuf C. Sonobioactors: using ultrasound for enhanced microbial productivity[J]. *Trends in Biotechnology*, 2003, **21**(2): 89-93.
- [12] Dai C Y, Wang B C, Duan C R, et al. Low ultrasonic stimulates fermentation of riboflavin producing strain *Ecemothecium ashbyii* [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2003, **30**(1-2): 37-41.