

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2021.11.001

皮落青霉产聚半乳糖醛酸酶酶学性质及其应用研究

郭莉¹, 谈安群¹, 谭祥¹, 黄学根¹,
窦华亭¹, 黄林华¹, 张玉²

1. 西南大学柑桔研究所, 重庆 400712; 2. 西南大学食品科学与工程国家实验教学示范中心, 重庆 400715

摘要: 聚半乳糖醛酸酶是水解果胶主要成分聚半乳糖醛酸的水解酶, 具有广泛应用. 本研究从柑桔果园土壤中筛选得到一株产聚半乳糖醛酸酶(PG)的菌株 GYS-6, 经鉴定为皮落青霉(*Penicillium crustosum*). 以聚半乳糖醛酸酶活力为指标, 单因素试验优化聚半乳糖醛酸酶酶活可达 3.59 U/mL; 该酶最适温度为 45 °C, 最适 pH 值为 5.0, 在 pH 值 2.2~8.0 稳定 30 min 酶活达 80% 以上, 具有较强的耐酸性. K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} 离子对酶有一定激活作用, Cu^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} , Al^{3+} 离子对该酶有抑制作用. 硫酸铵分级沉淀在 60%~80% 段酶活最高; 经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)及酶谱分析, 该聚半乳糖醛酸酶活性部分分子量主要分布在 48 kDa 左右; 薄层色谱和高效液相色谱分析结果显示该酶解果胶可以高效制备果胶低聚糖.

关键词: 皮落青霉; 菌种鉴定; 聚半乳糖醛酸酶; 果胶低聚糖; 酶学性质

中图分类号: S38

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



文章编号: 1673-9868(2021)11-0001-08

Study on the Enzymatic Properties of a Polygalacturonase Produced by *Penicillium crustosum* and Its Application

GUO Li¹, TAN Anqun¹, TAN Xiang¹, HUANG Xuegen¹,
DOU Huating¹, HUANG Linhua¹, ZHANG Yu²

1. Citrus Research Institute, Southwest University, Chongqing 400712, China;

2. National Experimental Teaching Demonstration Center of Food Science and Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: Polygalacturonase is a hydrolase that can enzymatically hydrolyze polygalacturonate, which is the main component of pectin. In this study, a strain (GYS-6), which can produce polygalacturonase (PG), was isolated from the soil of a citrus orchard and was identified as *Penicillium crustosum*. In a single factor experiment, in which polygalacturonase activity was used as the indicator, the highest PG activi-

收稿日期: 2021-08-02

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(31601396).

作者简介: 郭莉, 助理研究员, 博士研究生, 主要从事柑桔资源化利用.

通信作者: 黄林华, 副教授.

ty was optimized to reach 3.59 U/mL. The optimum temperature and pH of this enzyme were 45 °C and 5.0, respectively. The PG activity remained above 80% in pH 2.2–8.0 for 30 minutes, which showed a very strong acid resistance. K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} and Mn^{2+} ions could enhance the enzyme activity, while Cu^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} and Al^{3+} had an inhibitory effect on the enzyme. The enzyme activity was the highest at 60%–80% of ammonium sulfate fractional precipitation. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and zymogram analysis showed that the partial molecular weight of galacturonase activity was mainly distributed around 48 kDa. TLC and HPLC analysis demonstrated that pectin oligosaccharides could be prepared using the PG from *P. crustosum* via enzymatic hydrolysis of citrus pectin.

Key words: *Penicillium crustosum*; strain identification; polygalacturonase; pectin oligosaccharide; enzymatic property

果胶酶广泛存在动植物和微生物中,其中聚半乳糖醛酸酶(Polygalacturonase, PG)是最早发现且应用广泛的一种果胶水解酶,可通过水解作用切断果胶酸分子的 α -1,4糖苷键,将果胶降解为小分子^[1].微生物由于生长速度快,常用于酶的生产.已报道的产聚半乳糖醛酸酶的菌种主要为曲霉^[1-2]、木霉^[3]和青霉^[4-5],也有细菌^[6]和酵母菌^[7]等. PG可用于果汁和果酒生产,Patil等^[8]用分离的拟青霉发酵生产PG,显著降低了果汁样品的黏度,在果汁澄清中有重要作用.柑桔加工会产生大量的皮渣,产果胶酶和纤维素酶的菌株可以用于降解柑桔皮渣^[9]以及发酵生产柠檬酸^[10].柑桔果皮因富含果胶被较多用于提取柑桔果胶^[11].柑桔果胶可以通过果胶酶酶解生产果胶低聚糖^[12],也可利用PG通过水解作用切断果胶酸分子的 α -1,4糖苷键,将果胶降解为分子量较小的低聚糖类,得到果胶低聚糖.果胶低聚糖具有低热量、抗肿瘤、抗氧化、抑菌等作用^[13],具有较好的应用价值. Olano-martin等^[14]、丁长河等^[15]用PG分别水解柑桔果胶、苹果果胶等可得到果胶低聚糖.虽然PG产酶菌种和酶学性质研究较多,但聚焦于挖掘适用于利用柑桔皮渣果胶制备果胶低聚糖的新型耐酸性PG及其产酶菌株的研究较少.

根际土壤中富含微生物^[16],本研究从柑桔果园土壤中筛选到能产聚半乳糖醛酸酶的一株真菌GYS-6,经分子生物学和形态学鉴定为皮落青霉,对发酵条件进行优化以充分发挥菌株的产酶性能,对该酶的酶学性质及酶谱特性进行研究,并将该酶用于酶解柑桔果胶,经薄层层析和高效液相色谱分析确定可得到果胶低聚糖,以为聚半乳糖醛酸酶和果胶低聚糖的生产提供研究基础.

1 材料与方法

1.1 菌株

菌株GYS-6,从柑桔的土壤中分离筛选获得,中国微生物菌种保藏中心登记号为CGMCC 3.15886.

1.2 试剂与培养基

试验用到的试剂与培养基主要有:D-半乳糖醛酸、聚半乳糖醛酸,美国sigma;柑桔果胶,上海阿拉丁;PDA培养基、酵母膏、NaCl、 KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 、 $MgSO_4$ 、蔗糖、葡萄糖、硫酸铵、氯化铵、硝酸铵、尿素、Tris、HCl、SDS、考马斯亮蓝R-250、甲醇、冰乙酸,均为国产分析纯;乙腈,Sigma-Aldrich.

菌种的鉴定采用麦芽汁培养基,菌种的活化采用PDA培养基,菌种的发酵采用发酵培养基:桔皮粉10 g/L、酵母膏10 g/L、NaCl 2.0 g/L、 KH_2PO_4 0.3 g/L、 K_2HPO_4 1.0 g/L、 $MgSO_4$ 0.3 g/L,自然pH值.

1.3 仪器与设备

光学显微镜,日本Olympus公司生产;PCR仪easycycler 96,德国耶拿分析仪器股份公司生产;紫外分光光度计TU-1901,北京普析通用仪器有限责任公司生产;高速冷冻离心机TGL-20M,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司生产;电泳仪Bio-Rad,美国伯乐公司生产;透析袋:MD1425-5m 8000-14000,上海源叶生物科技有限公司生产;高效液相色谱仪,美国DIONEX公司生产.

1.4 试验方法

1.4.1 聚半乳糖醛酸标准曲线

以D-半乳糖醛酸含量(μ mol)为横坐标 x ,吸光值为纵坐标 y ,所得标准曲线为 $y = 0.5863x - 0.366$,

$R^2=0.9966$.

1.4.2 聚半乳糖醛酸酶活力测定方法

发酵后产物过滤后经冷冻离心机 1 000 r/min 离心 20 min, 取上清液测定聚半乳糖醛酸酶活力^[17].

酶活力测定^[18-19]: 采用改良后的 DNS 法, 以 D-半乳糖醛酸做标准曲线; 以灭菌后酶液作为对照, 540 nm 比色, 每分钟催化底物产生 1 μg 半乳糖醛酸所需酶量定义为 1 个酶活力单位, 以 U/mL 表示.

1.4.3 菌种的鉴定

将菌种在麦芽汁培养基中培养 10 d, 观察菌落形态、菌丝、分生孢子等, 根据《真菌鉴定手册》进行形态学的鉴定^[20].

β -微管蛋白(TUB)测定基因序列. 上游引物: 5'-AAT1'GGTGCCGCTTTCTGG-3', 下游引物: 5'-AGTTGTCGGGACGGAATAG-3'. PCR 体系: 总体积 30 μL , 其中 2 \times easyTaqSuperMix 15 μL , 上、下游引物各 1 μL (10 pmol/ μL), 模板(提取的真菌 DNA)3 μL (100~120 ng/ μL), 加双蒸水补至 30 μL . 反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 预变性, 然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 共 35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min. 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并切取目标片段, 送华大基因测序, 将测序所得序列在 NCBI 上进行 BLASTS 比对分析^[21-22].

1.4.4 酶的初步纯化及酶谱分析

酶的初步纯化采用硫酸铵分级沉淀及盐析^[23]. 将粗酶液缓缓加入硫酸铵粉末至饱和度 0%~20%, 20%~40%, 40%~60%, 60~80%. 沉淀过夜后冷冻离心机 12 000 r/min 离心 30 min, 收集沉淀, 用 0.2 mol/L 醋酸(pH 值 5.0)缓冲液复溶, 用透析袋(8 000~14 000)透析, 缓冲液做透析液, 定期更换透析液, 直至氯化钡检测透析液中无沉淀为止, 透析袋内液体即为初步纯化酶, 测定其聚半乳糖醛酸酶活力, 计算盐析后各段酶活占总酶活的比例.

采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)^[24], 酶谱样品不加热, 并且在分离胶中加入 0.1% 聚半乳糖醛酸. 电泳完成后, 用 2.5% 的 Triton X-100 缓冲液浸泡 1 h, 再 37 $^{\circ}\text{C}$ 缓冲液孵化 24 h, 用蒸馏水漂洗后, 用 0.05% 钒红染色 1 h, 蒸馏水漂洗.

1.4.5 酶的最适温度及温度稳定性^[25]

将初步纯化聚半乳糖醛酸酶在不同温度(25~70 $^{\circ}\text{C}$)下测定酶活, 以酶活最大值时酶活力定义为 100%, 计算不同温度下的相对酶活力(即不同温度条件下的酶活性占最高酶活性的百分比). 将酶液在不同温度(25~55 $^{\circ}\text{C}$)条件下保温 30 min 后立即冰浴, 待冷却后测定酶活, 计算剩余酶活性与未处理时酶活性比值作为相对酶活力.

1.4.6 酶的最适 pH 值及 pH 值稳定性^[25]

在温度 45 $^{\circ}\text{C}$ 时, 将酶液置于不同 pH 值缓冲液(pH 值 3.0~8.0)下测定酶活, 以酶活最大值时酶活定义为 100%, 计算不同 pH 值条件下相对酶活力(即不同 pH 值条件下的酶活性占最高酶活性的百分比). 将酶液置于不同 pH 值缓冲液(pH 值 2.2~10.86)下保持 30 min 后, 测定酶活, 计算剩余酶活性与未处理时酶活性比值作为相对酶活力.

1.4.7 金属离子及其浓度对酶的活力影响^[26]

在 0.1 mmol/L, 0.5 mmol/L, 1 mmol/L, 5 mmol/L 和 10 mmol/L 下, 测定金属离子(K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} , Al^{3+})对聚半乳糖醛酸酶活性的影响, 以不添加金属离子时的酶活计为 100%, 计算添加金属离子后的相对酶活力.

1.4.8 果胶水解制备低聚糖应用

酶解果胶生产果胶低聚糖: 用醋酸缓冲液(pH 值 4.5)配置 2.0% 的果胶溶液和 1 U/mL 初步纯化酶液, 体积比按 2:3, 在 40 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴磁力搅拌下进行酶解, 分别酶解 0 min, 5 min, 10 min, 30 min, 60 min, 90 min, 270 min 后, 立即取出沸水浴灭活 15 min, 流动水冷却.

酶解产物经氮吹仪浓缩后进行薄层色谱分析(TLC), 在距离薄层板 0.5 cm 高度处点样, 展开剂为正丁醇-乙酸-水(体积比 4:3:1)混合液, 展至距上沿 0.5 cm 处停止. 染色剂为乙醇-硫酸(体积比 9:1), 薄层板吹干后, 放入 110 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱烘烤 5 min, 冷却观察.

将果胶酶解 270 min 后样品, 用 80% 乙醇沉淀多糖, 上清液真空浓缩后进行真空冷冻干燥, 得到果胶低聚糖样品, 并进行高效液相色谱(HPLC)分析, 示差检测器, 色谱柱为氨基柱, 流动相为 70 : 30(乙腈 : 水), 流速 1.3 mL/min, 柱温 44 °C, 进样量 10 μ L.

1.5 数据处理

本试验所有样品平行测定 3 次, 结果以平均值 \pm 标准差表示. 数据用 SPSS 17.0 进行统计学分析, 多组间采用 One way ANOVA 进行 Duncan 法比较, $p < 0.05$ 时认为差异有统计学意义. 折线图和柱状图用 origin 8.5 进行绘制.

2 结果与分析

2.1 产酶条件及菌种鉴定结果

通过单因素优化试验发现最佳碳源为柑桔果皮胶, 说明该菌株产酶为诱导型, 优化后聚半乳糖醛酸酶活力从 0.79 U/mL 提高至 3.59 U/mL. 菌种在麦芽汁培养基上生长较快, 25 °C 黑暗条件下培养 10 d, 菌落直径 35~40 mm, 边缘白色, 中部灰绿色, 平铺, 气生菌丝稀少; 分生孢子结构大量产生, 质地绒兼粉末状或近颗粒状, 后期层状脱落; 背面浅黄褐色, 色素不溶于培养基中. 分生孢子结构大量, 帚状枝多见 3 轮生, 排列紧密. 分生孢子梗壁粗糙, 无色; 瓶梗柱状, 颈部明显, (7.5~12.3) μ m \times (2.0~3.5) μ m; 分生孢子球形或近球形, 光滑, 串生, 2.8~4.0 μ m(图 1).

β -微管蛋白(TUB)测定基因序列, 基因序列测定结果为: 5'AAAGCTTGCCGAAGGGACCGGAGCGGACAGCGTCCATGGTACCAGGCTCCAAATCGACGAGAACGGCACGGGGAACGTACTTGTACCCGCTGGCCTAGATTATCAAGGAAAACATCCGATCAGATGATGCACTATTATTTCGGTTTCCTGTCTGTTGGACTCACATGGTTGAAGTAGACGTTTCATACGCTCGAGCTGGAGGTCGGAGGTACCATTGTACCTAGGAAGATATCAGATGTGTAATCCACCGGAAACCCCTATCACTGTTAAAACCTACTGTCCATCGCCATCGAGACCGTGCTCGCCAGAGATGGTTTGCCTGTAATCCAGTTAGGAACCTGTCAATTGATACCCAACGCGAAAAAAGCTCGGCACTTACCAGAAAGCAGCACC-3'. 将序列在 NCBI 上进行 BLASTS 比对分析^[21-22], 结合形态结构^[20], 该产聚半乳糖醛酸酶的菌种鉴定为皮落青霉(*Penicillium crustosum*).

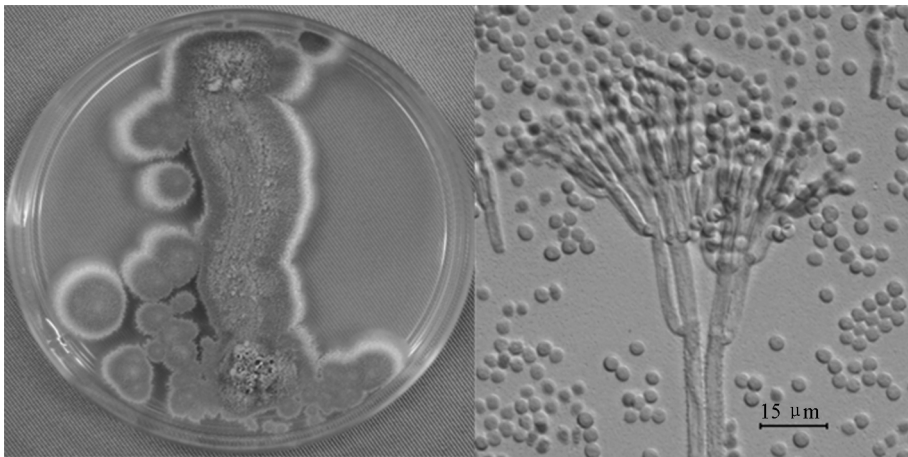
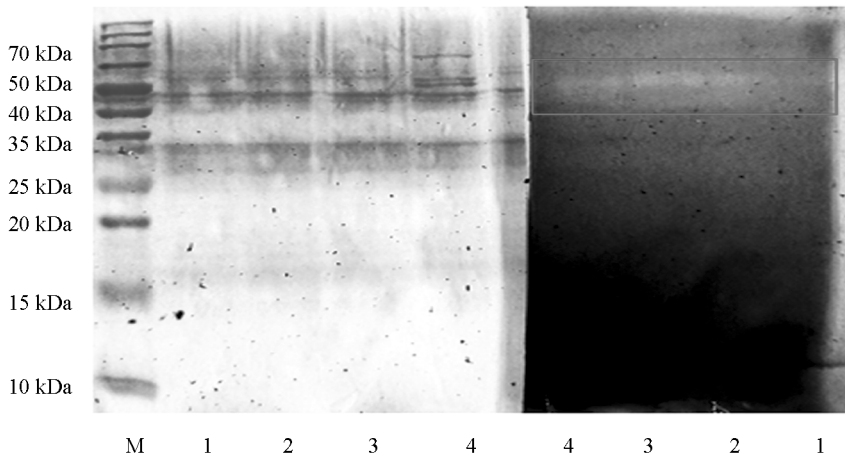


图 1 皮落青霉的菌落形态及显微特征

2.2 硫酸铵分级沉淀及酶谱分析

硫酸铵百分比在 0%~20%, 20%~40%, 40%~60%, 60%~80% 时, 酶活比例分别为 (2.58 \pm 0.02)%, (2.89 \pm 0.01)%, (30.46 \pm 1.04)%, (64.06 \pm 1.01)%; 可见硫酸铵比例低于 40% 时, 聚半乳糖醛酸酶酶活所占比例很低, 仅占总酶活的 5.47%, 聚半乳糖醛酸酶活力以硫酸铵沉淀 40%~80% 较高, 尤其是比例为 60%~80% 时表现为更高的活力. 皮落青霉产聚半乳糖醛酸酶与商业果胶酶在 48 kDa 处有明显聚半乳糖醛酸酶活性(图 2). Kester 等^[27] 从黑曲霉中发酵分离得到的 2 种多聚半乳糖醛酸酶分子量分别为 55 kDa 和 38 kDa, 倪鸿静^[28] 从皮落青霉发酵液中分离得到的聚半乳糖醛酸酶分子量为 38 kDa.

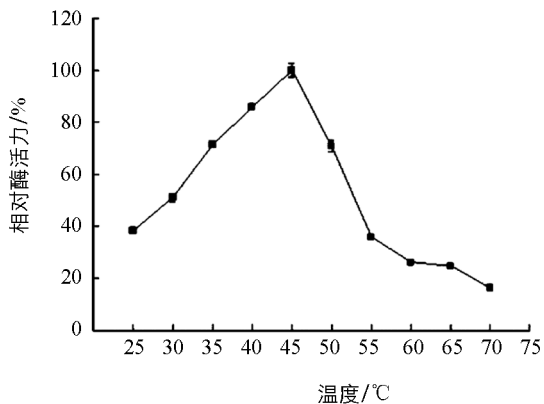


M 为标准蛋白, 1 为商业果胶酶, 2, 3 为 60%~80% 硫酸铵沉淀, 4 为 40%~60% 硫酸铵沉淀。

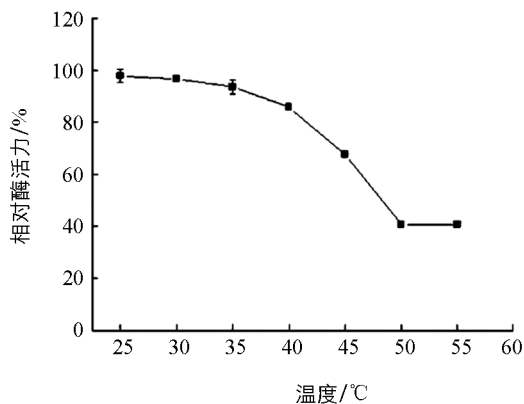
图 2 聚半乳糖醛酸酶的 SDS-PAGE 及酶谱分析

2.3 酶的最适温度和热稳定性、最适 pH 值和稳定性

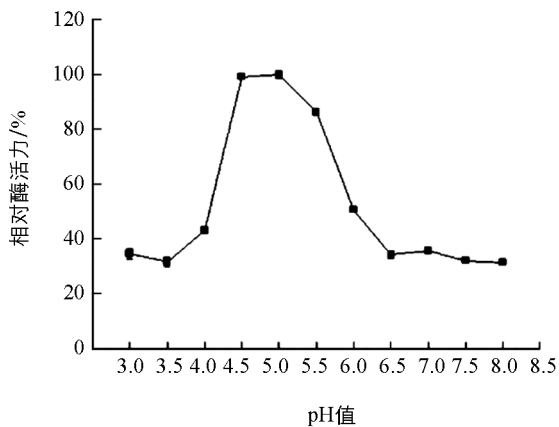
从图 3a 可知, 皮落青霉产聚半乳糖醛酸酶的最适反应温度为 45 °C。从图 3b 可知, 在 25~40 °C 下, 稳定性较好, 40 °C 保温 30 min 仍能保持 85.79% 的酶活, 45 °C 下保温 30 min 能保持 67.53% 的酶活。从图 3c 可知聚半乳糖醛酸酶最适 pH 值为 5.0, 其次为 4.5。张名爱等^[29]从草酸青霉中分离的 PG 酶最适温度 40 °C, 最适 pH 值 5.0。Kester 等^[27]研究发现黑曲霉产生的 5 种聚半乳糖醛酸酶的最适 pH 值在 4.3~4.9 的范围内。从图 3d 可知在 pH 值 2.2~8.0 保持 30 min, 聚半乳糖醛酸酶酶活保留率都在 80% 以上, 表明此酶耐酸性好, 可适用于苹果、柑桔等酸性果汁加工生产。



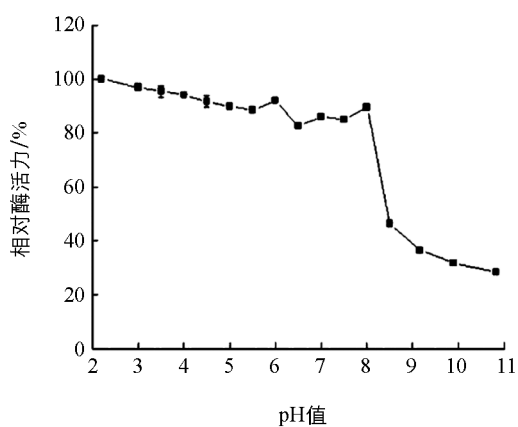
a. 温度对酶活性的影响



b. 温度对酶稳定性的影响



c. pH值对酶活性的影响



d. pH值对酶稳定性的影响

图 3 温度和 pH 值对酶活性和稳定性的影响

2.4 金属离子对酶活的影响

在 0.1 mmol/L, 0.5 mmol/L 下, K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} 对聚半乳糖醛酸酶有激活效果, K^+ 激活作用最强, 0.1 mmol/L, 0.5 mmol/L 相对酶活力为 118.70%, 115.72%。在 1 mmol/L, 5 mmol/L, 10 mmol/L 下, 各金属离子均呈抑制作用, 其中 Fe^{2+} 在 10 mmol/L 呈现激活表现, 分析可能跟 Fe^{2+} 在高浓度有颜色有关(图 4)。唐湘华等^[30]对米曲霉产果胶酶添加金属离子浓度 5 $\mu\text{g/g}$, 50 $\mu\text{g/g}$, 500 $\mu\text{g/g}$, 1 000 $\mu\text{g/g}$, 发现 Pb^{2+} 和 Ag^+ 严重抑制该酶活力, Cu^{2+} 抑制此酶, 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。Kanga 等^[31]从蜗牛消化液中提取纯化出的 2 种多聚半乳糖醛酸酶(46 kDa 和 86 kDa)发现 Ba^{2+} 是 PG2 的激活剂, Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 是抑制剂。

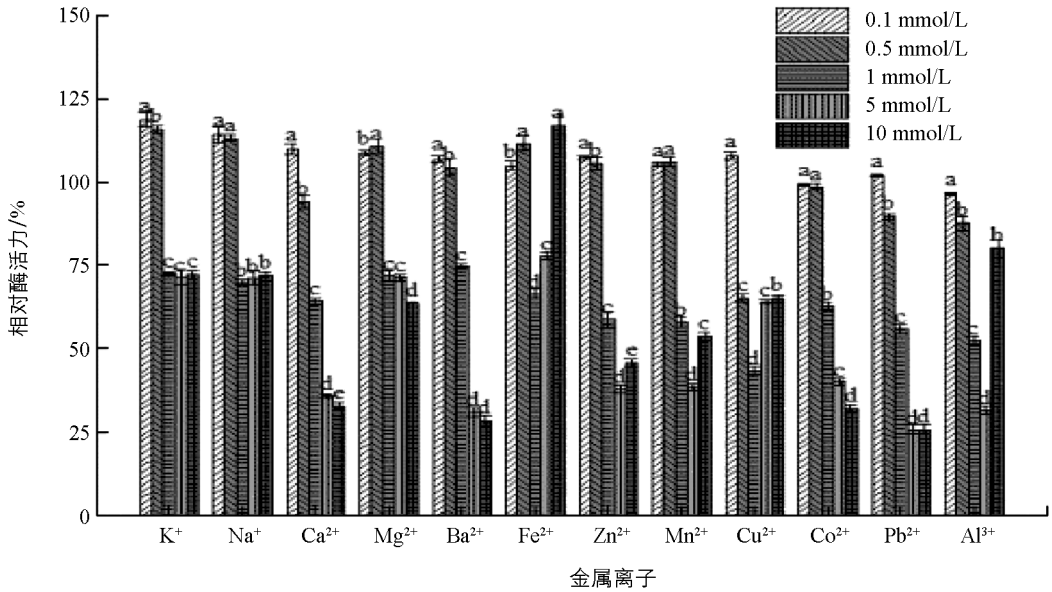


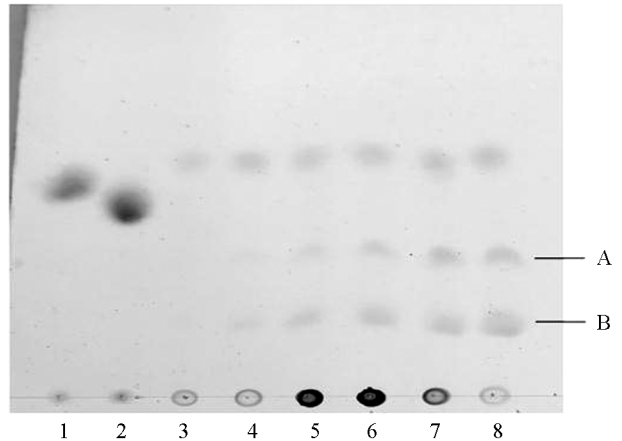
图 4 金属离子对酶活性的影响

2.5 聚半乳糖醛酸酶解果胶

分子量越小, 在薄层板上移动越快, 试验结果看出, A 和 B 的分子量高于半乳糖和蔗糖, 判断其为低聚糖, 表明皮落青霉所产聚半乳糖醛酸酶可用于生产果胶低聚糖。1 号为单糖半乳糖, 2 号为双糖蔗糖, 3~8 号样品为低聚糖, 酶解时间分别为 5 min, 10 min, 30 min, 60 min, 90 min, 270 min。随着酶解时间延长, A 和 B 颜色也逐渐加深, 表明随着酶解时间的延长, 低聚糖的产量逐渐增加(图 5)。

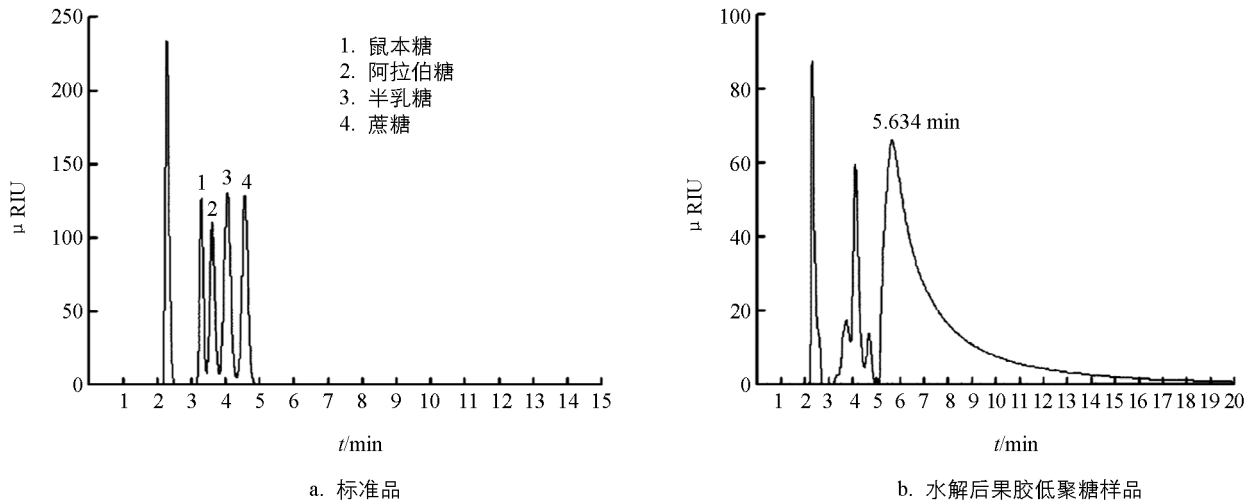
鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖为单糖, 蔗糖为双糖, 在氨基柱上, 随着分子量的增大, 流出时间延长。4 种标样的流出时间分别为: 1-鼠李糖 4.252 min, 2-阿拉伯糖 4.664 min, 3-半乳糖 5.241 min, 4-蔗糖 5.901 min, 见图 6a。

柑桔果胶经 270 min PG 酶酶解, 除去多糖后液相色谱图见图 6b, 有 3 个单糖小峰, 其余峰主要集中在 5.634 min 后, 双糖蔗糖的峰在 5.901 min, 表明所得糖主要为二糖以上的低聚糖。



1 表示单糖半乳糖; 2 表示双糖蔗糖; 3~8 号样品酶解时间分别为 5 min, 10 min, 30 min, 60 min, 90 min, 270 min; A, B 为不同分子量的果胶低聚糖。

图 5 果胶酶解果胶获得的果胶低聚糖薄层色谱



a 为标准品, 其中 1 为鼠李糖, 2 为阿拉伯糖, 3 为半乳糖, 4 为蔗糖; b 为水解后果胶低聚糖样品。

图 6 果胶酶酶解果胶获得的果胶低聚糖液相色谱

3 结论与讨论

本研究通过菌种的产酶筛选、菌种鉴定、发酵条件优化、酶学特性、酶谱分析及酶的应用等分析, 获得一株新型产聚半乳糖醛酸酶菌株皮落青霉 GYS-6, 经过柑桔果胶诱导可以生产耐酸性较强的聚半乳糖醛酸酶。单因素试验优化发酵条件将聚半乳糖醛酸酶活力从 0.79 U/mL 提高至 3.59 U/mL。后期若要重复使用提高工业化应用, 可采用海藻酸钙包覆的聚吡咯/银纳米复合材料固定 PG 的方法^[32]。将粗酶用硫酸铵沉淀并用透析袋进行透析后得到初步纯化酶, 对其酶学特性进行研究, 发现该酶最适温度 45 °C, 最适 pH 值为 5.0, 低浓度的 K⁺ 等离子对酶活有一定激活作用, 浓度高于 1 mmol/L 对酶活有抑制作用。该酶在 pH 值 2.2~8.0 保持 30 min, 酶活保留率都在 80% 以上, 表明此酶耐酸性好, 可较好的应用于苹果、柑桔等酸性果汁生产。经 SDS-PAGE 和酶谱分析, 发现本试验所得 PG 有聚半乳糖醛酸酶活性的酶活部分为 48 kDa 左右, 有别于已报道的聚半乳糖醛酸酶^[27]。本研究获得的聚半乳糖醛酸酶用于酶解柑桔果胶, 通过薄层层析和液相色谱法分析表明可以得到柑桔果胶低聚糖, 这为制备功能性果胶低聚糖奠定了基础, 为柑桔的综合利用提供了新的途径。

参考文献:

- [1] 张媛媛, 郝林, 王倩. 产聚半乳糖醛酸酶的黑曲霉诱变育种 [J]. 食品科学, 2013, 34(7): 231-233.
- [2] GOMES J, ZENI J, CENCE K, et al. Evaluation of Production and Characterization of Polygalacturonase by *Aspergillus Niger* ATCC 9642 [J]. Food and Bioproducts Processing, 2011, 89(4): 281-287.
- [3] 王恒震, 李化强, 吴菲菲, 等. 棘孢木霉 (*Trichoderma asperellum*) 产聚半乳糖醛酸酶的特性 [J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(16): 99-104.
- [4] YUAN P, MENG K, HUANG H Q, et al. A Novel Acidic and Low-Temperature-Active Endo-Polygalacturonase from *Penicillium* sp. CGMCC 1669 with Potential for Application in Apple Juice Clarification [J]. Food Chemistry, 2011, 129(4): 1369-1375.
- [5] CHENG Z, CHEN D, WANG Q Y, et al. Identification of an Acidic Endo-Polygalacturonase from *Penicillium Oxalicum* CZ1028 and Its Broad Use in Major Tropical and Subtropical Fruit Juices Production [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2017, 123(6): 665-672.
- [6] RAMAKANTH N V, ANURADHA K, PADMA P N. Alkaline Polygalacturonases from Thermotolerantpectinolytic Bacteria from Diverse Sources [J]. International Journal of Scientific and Research Publications, 2014, 4(5): 1-3.
- [7] SCHWAN R F, COOPER R M, WHEALS A E. Endopolygalacturonase Secretion by *Kluyveromyces Marxianus* and

- other Cocoa Pulp-Degrading Yeasts [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1997, 21(4): 234-244.
- [8] PATIL N P, PATIL K P, CHAUDHARI B L, et al. Production, Purification of Exo-Polygalacturonase from Soil Isolate *Paecilomyces Variotii* NFCCI 1769 and Its Application [J]. *Indian Journal of Microbiology*, 2012, 52(2): 240-246.
- [9] 李治玲, 李 勇, 李世忠, 等. 柑橘皮渣降解菌的筛选及产酶条件优化 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2016, 38(1): 159-164.
- [10] 黄 健, 张迎君, 武 峥, 等. 柑橘皮渣发酵生产柠檬酸工艺参数优化研究 [J]. *西南师范大学学报(自然科学版)*, 2007, 32(3): 106-110.
- [11] 余 歆, 张晓楠, 赵晓春. 柑橘果皮的生物活性物质和重要园艺性状 [J]. *园艺学报*, 2021, 48(4): 825-836.
- [12] 王志云, 罗会颖, 姚 斌, 等. *Bispora* sp MEY-1 来源嗜酸果胶甲酯酶性质分析及其应用研究 [J]. *中国农业科技导报*, 2020, 22(5): 60-70.
- [13] 黄林华, 吴厚玖, 马亚琴, 等. 果胶低聚糖的研究进展 [J]. *食品科学*, 2015, 36(19): 277-281.
- [14] OLANO-MARTIN E, MOUNTZOURIS K C, GIBSON G R, et al. Continuous Production of Pectic Oligosaccharides in an Enzyme Membrane Reactor [J]. *Journal of Food Science*, 2001, 66(7): 966-971.
- [15] 丁长河, 鲁慧芳, 张建华, 等. 双歧因子果胶低聚糖的研究进展 [J]. *现代食品科技*, 2005, 21(4): 80-82, 79.
- [16] 颜 朗, 张义正, 方志荣, 等. 不同马铃薯基因型对根际细菌群落结构的影响 [J]. *四川大学学报(自然科学版)*, 2020, 57(2): 383-390.
- [17] 管梦华. 黑曲霉 SH312-26-19 产聚半乳糖醛酸酶的分离纯化及鉴定 [D]. 太谷: 山西农业大学, 2016: 10-21.
- [18] MILLER G L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar [J]. *Analytical Chemistry*, 1959, 31(3): 426-428.
- [19] SOHAIL M, LATIF Z. Phylogenetic Analysis of Polygalacturonase-Producing *Bacillus* and *Pseudomonas* Isolated from Plant Waste Material [J]. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 2016, 9(1): e28594.
- [20] 魏景超. 真菌鉴定手册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [21] 朱 敏, 耿佳靖, 王 玫, 等. ITS 和 β -微管蛋白基因序列鉴定曲霉菌的临床应用 [J]. *中华检验医学杂志*, 2011, 34(4): 353-357.
- [22] 侯 康, 王 帆, 胡军华, 等. 石棉县黄果柑果实病斑致病菌的分离鉴定 [J]. *中国南方果树*, 2018, 47(2): 46-49, 53.
- [23] CHEONG KIT LEONG, 谢顺歆, 黄雪松. 大蒜果聚糖外切酶的一些酶学特征研究 [J]. *食品科学*, 2010, 31(11): 128-131.
- [24] 汪家政, 范 明. 蛋白质技术手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2000: 79-92.
- [25] 贾瑞博, 胡荣康, 周文斌, 等. 米曲霉(*Aspergillus oryzae* FAFU)淀粉酶的分离纯化及其酶学性质研究 [J]. *食品与发酵工业*, 2016, 42(11): 71-76.
- [26] 胡慧磊. 产聚半乳糖醛酸酶菌株的筛选、发酵条件及酶学性质的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.
- [27] KESTER H, VISSER J. Purification and Characterization of Polygalacturonases Produced by the Hyphal Fungus *Aspergillus niger* [J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 1990, 12(2): 150-160.
- [28] 倪鸿静. 果胶酶皮落青霉的分离纯化及其特性 [J]. *云南化工*, 1993, 20(1): 7-10.
- [29] 张名爱, 王宝维, 岳 斌, 等. 草酸青霉果胶酶分离纯化工艺及酶学性质研究 [J]. *食品科学*, 2013, 34(9): 175-179.
- [30] 唐湘华, 许锁链, 慕跃林, 等. 米曲霉 ASP-m21 产果胶酶及其酶学性质 [J]. *食品与生物技术学报*, 2008, 27(2): 112-116.
- [31] KANGA A K, KOFFI D M, SEA B T, et al. Biochemical Characterization of Two Polygalacturonases Purified from the Digestive Juice of the Snail *Limnicolaria flammea* [J]. *Biotechnology Journal International*, 2021: 41-54.
- [32] ALMULAIKY Y Q, AL-HARBI S A. Preparation of a Calcium Alginate-Coated Polypyrrole/Silver Nanocomposite for Site-Specific Immobilization of Polygalacturonase with High Reusability and Enhanced Stability [J]. *Catalysis Letters*, 2021: 1-15.