

黑曲霉菌发酵产柚苷酶培养基配方的优化研究

张桃桃, 张萍, 石彦鹏, 牛春* (宁夏泰瑞制药股份有限公司, 宁夏银川 750002)

摘要 [目的] 筛选出黑曲霉菌发酵产柚苷酶的最优培养基。[方法] 以沙氏琼脂培养基、马铃薯葡萄糖琼脂培养基、察氏琼脂培养基作比较; 选出最适黑曲霉菌生长的固体培养基, 对固体培养基进行优化, 得出最佳固体培养基; 通过对发酵培养基不同碳源种类、氮源种类和无机盐的筛选和优化, 确定黑曲霉生长和发酵的最适培养基, 再通过正交试验确定黑曲霉固态发酵产柚苷酶最优培养基。[结果] 黑曲霉固态发酵产柚苷酶最优培养基组成为 0.1% 磷酸二氢钾, 4% 鼠李糖, 1% 葡萄糖, 0.2% 无水 CaCl_2 , 0.2% 七水硫酸镁, 0.1% 硫酸铵, 0.2% 柚皮苷, 2% 豆粉。优化后的培养基 (618 U/g) 比优化前的基础培养基 (401 U/g) 的酶活提高了 54.1%。[结论] 该研究为后续进行菌种遗传改造与分子育种提供了原材料, 并为大规模商业化生产奠定了良好的基础。

关键词 黑曲霉; 发酵培养基; 单因素试验; 正交试验

中图分类号 TS 201.3 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2021)07-0170-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2021.07.049



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Uniform Design and Optimization of Naringinase Medium for *Aspergillus niger* Fermentation

ZHANG Tao-tao, ZHANG Ping, SHI Yan-peng et al (Ningxia Tere Pharmaceutical Co. Ltd., Yinchuan, Ningxia 750002)

Abstract [Objective] To screen out the optimal medium for producing naringinase by *Aspergillus niger* fermentation. [Method] Sartre's AGAR medium, potato glucose AGAR medium and Tsar AGAR medium were compared. The best solid medium for *Aspergillus niger* growth was selected and optimized to obtain the best solid medium. Through selection and optimization of different types of carbon source, nitrogen source and inorganic salts in the fermentation medium, to determine the optimal culture medium for growth and fermentation of *Aspergillus niger*, the optimum medium for producing naringinase by solid fermentation of *Aspergillus niger* was determined by orthogonal experiment. [Result] The optimal culture medium was: 0.1% potassium dihydrogen phosphate, 4% sugar lee, 1% glucose, 0.2% anhydrous CaCl_2 , 0.2% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1% ammonium sulfate, 0.2% naringin, 2% soybean meal. The enzyme activity of optimized medium (618 U/g) was 54.1% higher than the optimized base medium (401 U/g). [Conclusion] It provided raw materials for genetic modification and molecular breeding, and laid a good foundation for large-scale commercial production.

Key words *Aspergillus niger*; Fermentation medium; Single factor test; Orthogonal test

柚汁是一种老少皆宜的饮品, 味苦, 具有很好的保健作用, 其苦味的成分是柚皮苷。柚皮苷是一种二氢黄酮类化合物, 由 α -L-鼠李糖苷和 β -D-葡萄糖苷组成。柚苷酶由 α -L-鼠李糖苷酶和 β -D-葡萄糖苷酶组成的一种复合酶系^[1], 利用酶脱法可使柚苷酶和柚皮苷发生反应去除苦味。柚苷酶通常是由黑曲霉或青霉产生的可水解柚皮苷的糖苷酶^[2], 柚苷酶不仅在食品行业中应用于果汁脱苦^[3]、葡萄酒增香, 而且在黄酮类药品加工和转化过程中具有重要的应用价值。然而, 柚苷酶的来源主要从国外进口, 价格昂贵, 国内没有工业化生产, 其原因主要是缺少适合工业化生产的高产柚苷酶菌株^[4]。

黑曲霉(*Aspergillus niger*)是半知菌亚门丝孢纲丝孢目丛梗孢科曲霉属中的常见种。黑曲霉孢子梗自基质中伸出, 直径 15~20 mm, 长 1~3 mm, 壁厚而光滑。顶部形成球形顶囊, 其上全面覆盖一层梗基和一层小梗, 小梗上长有成串褐黑色的球状分生孢子。孢子直径 2.5~4.0 μm 。分生孢子头球状, 直径 700~800 μm , 褐黑色。黑曲霉具有高效的蛋白表达和修饰能力, 在酶制剂工业上常用来生产蛋白酶、纤维素酶、糖化酶和脂肪酶。黑曲霉在浸没条件发酵可通过悬浮菌丝或菌丝球存在^[5], 在菌丝球形成过程中, 大多数丝状真菌以凝集型和非凝集型 2 种方式形成菌丝球。黑曲霉以凝集型方式形成菌丝球的过程中, 培养初期孢子通过聚集形成孢

子团, 孢子团萌发的菌丝进一步交织缠绕形成菌丝球^[6]。为此, 笔者对实验室筛选的产柚苷酶的黑曲霉发酵条件进行了优化研究^[7], 确定黑曲霉生长和发酵的最适培养基。

1 材料与方法

1.1 菌种与试剂 黑曲霉菌: 中国普通微生物菌种保藏中心购买; 豆粉, 宁夏泰瑞制药股份有限公司; 柚皮苷(标准品)、柚皮素(标准品), 含量均 $\geq 99\%$, 美国 Sigma 公司提供; 柚皮苷(对照品)、鼠李糖(对照品), 含量均 $> 98\%$, 宝鸡市方晟生物开发有限公司; 其他试剂均为国产常用 AR 试剂。

1.2 培养基

1.2.1 固体培养基。①沙氏琼脂培养基: 葡萄糖 4.00%, 酪蛋白胰酶消化物、动物组织的胃胰消化物等量混合 1.00%, 琼脂 1.50%, 氯霉素 0.01%^[7-8]; ②马铃薯葡萄糖琼脂培养基: 马铃薯 20.0%, 葡萄糖 2.0%, 琼脂 1.5%~2.0%, pH 自然^[2]; ③察氏琼脂培养基: 硝酸钠 0.300%, 磷酸氢二钾 0.100%, 七水硫酸镁 0.050%, 氯化钾 0.050%, 硫酸亚铁 0.001%, 蔗糖 3.000%, 琼脂 1.500%~2.000%, pH 7.0~7.2 或自然。

1.2.2 发酵培养基。葡萄糖 1.00%, 豆粕 2.00%, 七水硫酸镁 0.50%, 磷酸氢二钾 0.10%, 柚皮苷 0.05%, 300 mL 三角瓶装量 50 mL, 0.11 MPa 高温灭菌 30 min^[7]。

1.3 方法

1.3.1 固体培养基的初筛。在超净台用无菌水冲洗购买的 黑曲霉菌冻干管, 并用涂布器轻刮表面, 将菌体分别接种到 固体培养基①、②、③上, 并涂满培养基表面, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 每天

作者简介 张桃桃(1990—), 女, 宁夏银川人, 助理工程师, 从事生物制药研究。* 通信作者, 助理工程师, 从事微生物发酵菌种选育、菌种管理工作。

收稿日期 2020-08-10

观察黑曲霉菌在不同培养基上的生长情况。

1.3.2 固体培养基碳源的优化。在固体培养基②中分别加入 1.0%蔗糖、可溶性淀粉、葡萄糖、丙三醇并混匀,分设平行试验组($n=3$);高温灭菌(121 °C 灭菌 30 min),观察记录生长状况。

1.3.3 发酵培养基中不同碳源对产酶的影响。以选定的发酵培养基为基础,其他条件不变,选择葡萄糖、蔗糖、柚皮苷、葡萄糖+柚皮苷(3+1)、蔗糖+柚皮苷(3+1)、淀粉、鼠李糖、乳糖 8 种不同碳源,以不同的添加量添加到摇瓶培养基中,设计单因素试验,在超净台中用无菌水冲洗培养好的黑曲霉菌平板或斜面,并用涂布器轻刮表面,使菌体充分刮落,分别按 10%接种量接种到发酵培养基中,28 °C、220 r/min 摇床培养。每种碳源进行 3 次平行试验,72 h 后测酶活,取平均值。

1.3.4 发酵培养基中不同氮源对产酶的影响。以选定的发酵培养基为基础,其他条件不变,分别以豆粕粉、蛋白胨、酵母膏、硫酸铵、磷酸氢二铵、硝酸铵、氯化铵、 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 8 种

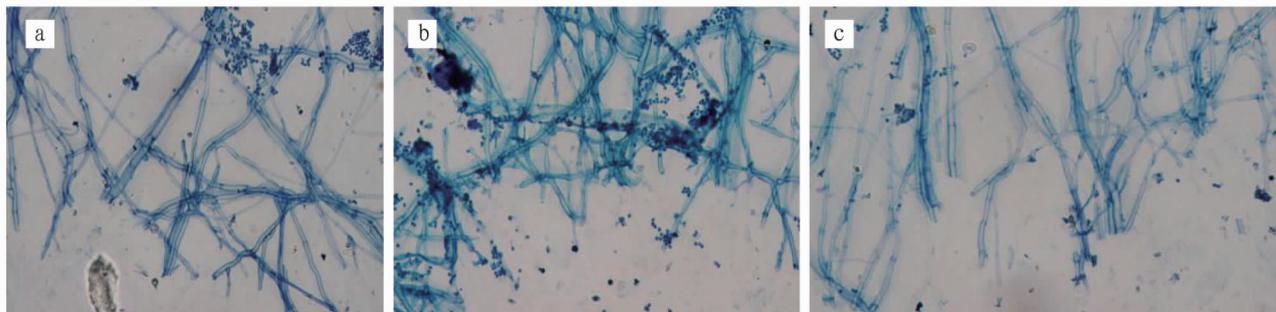
不同含氮物质作为氮源。试验设计与酶活测定同“1.3.3”。

1.3.5 发酵培养基中添加不同无机盐对产酶的影响。以选定的发酵培养基为基础,其他条件不变,按照不同的添加量分别添加无水 CaCl_2 、硫酸锌、七水硫酸亚铁、硝酸钠、氯化钠、五水硫酸铜、四水硫酸锰、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾。试验设计与酶活测定同“1.3.3”。

1.4 酶活测定方法 酶活测定采用参考文献[9-10]方法。

2 结果与分析

2.1 固体培养基的初筛 2 d 后菌体在固体培养基①、②上呈白色绒毛状,相比较固体培养基①、②,菌体在固体培养基③上生长较为缓慢。3 d 后固体培养基①上菌落中央出现淡黄色,随后变成粗绒毛状黑褐色放射状。而菌体在固体培养基②上接近固体培养基①,但是比固体培养基①上更粗壮。镜检观察菌群呈黑褐色,菌丝发达,内含颗粒状物质,有隔膜多分枝。因此,选用固体培养基②为初筛培养基(图 1)。



注:a,b,c 分别为沙氏琼脂培养基(①)、马铃薯葡萄糖琼脂培养基(②)和察氏琼脂培养基(③)

Note: a,b,c stands for Sartre's AGAR medium(①),potato glucose AGAR medium(②) and Tsar AGAR medium(③)

图 1 不同固体培养基上菌体生长情况镜检对比

Fig.1 Comparison of microscopic examination of bacteria growth in different solid medium

2.2 不同碳源固体培养基对酶活力的影响 分别加入 1.0%蔗糖、可溶性淀粉、葡萄糖、丙三醇并混匀,接入到发酵培养基中,测定酶活力。最终发现当用丙三醇作为迟效碳源时,产酶最高(图 2),选择的固体培养基为马铃薯 20.0%、葡萄糖 2.0%、丙三醇 1.0%、琼脂 1.5%~2.0%,pH

自然。

2.3 不同碳源及配比对产酶的影响 在以上初选出发酵培养基的基础上,设计碳源单因素水平(表 1),液体发酵结果表明,影响酶活力的最佳碳源和最佳碳源比为 2%鼠李糖,酶活力达到 588 U/g(图 3)。

表 1 碳源单因素水平设计

Table 1 Single factor level design of carbon sources

水平 Level	因素 Factor								
	葡萄糖 Glucose	蔗糖 Sucrose	柚皮苷 Naringin	葡萄糖+柚皮苷 Glucose+naringin	蔗糖+柚皮苷 Sucrose+naringin	淀粉 Starch	鼠李糖 Rhamnose	乳糖 Lactose	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	
2	2	2	2	2	2	2	2	2	
3	3	3	3	3	3	3	3	3	

2.4 不同氮源及比对产酶的影响 在以上初选出发酵培养基的基础上,设计氮源单因素水平(表 2),液体发酵结果表明,影响酶活力的最佳氮源为 4%豆粉,酶活力达到 487 U/g,其次是 2%硫酸铵(图 4)。

2.5 不同无机盐及比对产酶的影响 在以上初选出发酵培养基的基础上,设计无机盐单因素水平(表 3),液体发酵结果表明,影响酶活力的无机盐表现为 0.2%七水硫酸镁>

0.1%七水硫酸镁,0.1%无水 CaCl_2 >0.2%无水 CaCl_2 ,其他影响不大(图 5)。

2.6 最佳培养基的筛选 在单因素试验的基础上,设计了正交试验,因素与水平见表 4,结果见表 5。由表 5 可知,影响发酵培养基产柚苷酶酶活的因素从大到小依次为磷酸二氢钾、鼠李糖、葡萄糖、无水 CaCl_2 、七水硫酸镁、硫酸铵、柚皮苷、豆粉。因此,培养基的最优因素水平组合为 0.1%磷酸二氢钾,4%鼠

表4 正交试验因素水平
Table 4 Factor level of orthogonal test

水平 Level	因素 Factor							
	无水 CaCl ₂ Anhydrous CaCl ₂	豆粉 Bean flour	七水硫酸镁 Magnesium sulfate hep- tahydrate	硫酸铵 Ammonium sulfate	鼠李糖 Rhamnose	柚皮苷 Naringin	磷酸二氢钾 Potassium dihydrogen phosphate	葡萄糖 Glucose
1	0.1	2	0.2	0.1	2	0.1	0.1	1
2	0.2	4	0.4	0.2	4	0.2	0.2	2

表5 正交试验的结果与分析
Table 5 Orthogonal test result and analysis

编号 No.	因素 Factor//%								酶活力 Enzyme activity//U/g
	无水 CaCl ₂ Anhydrous CaCl ₂	豆粉 Bean flour	七水硫酸镁 Magnesium sulfate hep- tahydrate	硫酸铵 Ammonium sulfate	鼠李糖 Rhamnose	柚皮苷 Naringin	磷酸二氢钾 Potassium dihydrogen phosphate	葡萄糖 Glucose	
1	0.1	2	0.2	0.1	2	0.1	0.10	1	498
2	0.1	2	0.2	0.1	2	0.2	0.20	2	457
3	0.1	2	0.4	0.2	4	0.1	0.10	1	512
4	0.1	4	0.2	0.2	4	0.1	0.20	2	476
5	0.1	4	0.4	0.1	4	0.2	0.10	2	503
6	0.1	4	0.4	0.2	2	0.2	0.20	1	431
7	0.2	2	0.4	0.2	2	0.1	0.20	2	435
8	0.2	2	0.4	0.1	4	0.2	0.20	1	521
9	0.2	2	0.2	0.2	4	0.2	0.10	2	500
10	0.2	4	0.4	0.1	2	0.1	0.10	2	476
11	0.2	4	0.2	0.2	2	0.2	0.10	1	530
12	0.2	4	0.2	0.1	4	0.1	0.20	1	495
CK	—	2	0.5	—	—	0.1	0.05	1	401
k ₁	479	487	493	492	471	482	503	498	
k ₂	493	485	480	481	501	490	469	474	
r	14	2	13	11	30	8	34	24	

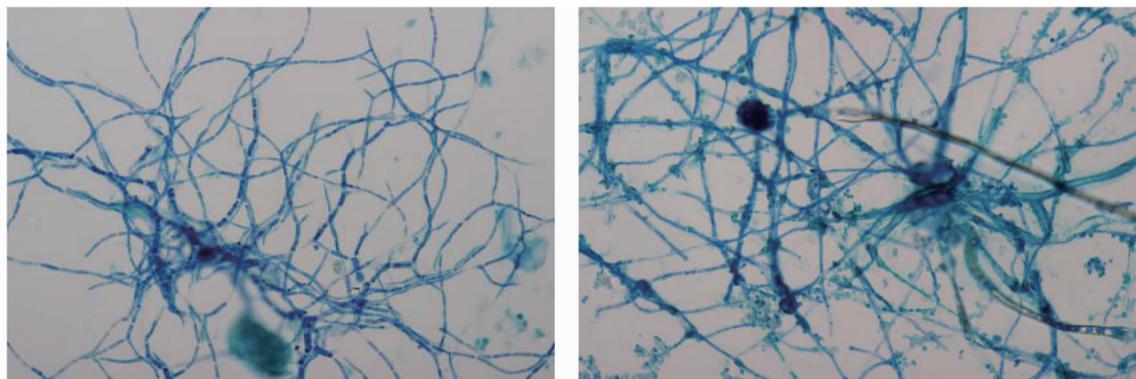


图6 发酵培养基镜检结果

Fig. 6 Microscopic examination of fermentation medium

3 结论

从3个初选培养基中筛选出最佳培养基进行优化,确定最优固体培养基为马铃薯20.0%,葡萄糖2.0%,丙三醇1.0%,琼脂1.5%~2.0%,pH自然。以发酵培养基为初始培养基,通过单因素试验确定了影响黑曲霉产柚苷酶的主要发酵培养基成分,再通过正交试验确定了黑曲霉固态发酵产柚苷酶最优培养基组成为0.1%磷酸二氢钾,4%鼠李糖,1%葡萄糖,0.2%无水CaCl₂,0.2%七水硫酸镁,0.1%硫酸铵,0.2%柚皮苷,2%豆粉。经过优化后的培养基(618 U/g)比优化前

的基础培养基(401 U/g)酶活提高了54.1%。

参考文献

- [1] 李志坚,谭兴和,李高阳. *Aspergillus niger* C15 产柚苷酶发酵条件的优化研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(22): 229-233.
- [2] 钱伟,黄元杰,王先锋,等. 黑曲霉固态发酵产柚苷酶培养基的优化[J]. 安徽工程大学学报, 2016, 31(1): 16-20.
- [3] 夏辛珂,张媛娥,雷生姣,等. 柚苷酶高产菌株选育及其产酶在蜜橘果汁脱苦中的应用[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(2): 226-232.
- [4] 邓媛,毛勇,张美丽,等. 柚苷酶生产菌 TC-01 发酵培养条件的优化及其酶学性质的初步研究[J]. 农产品加工(学刊), 2012(8): 28-32, 35.

(下转第176页)

CFU/mL($P>0.05$)。但是乳酸菌菌数 3.04 log CFU/mL 高于热巴氏杀菌后的乳酸菌菌数 2.93 log CFU/mL($P>0.05$)。在该条件下处理后,样品中检测不到金黄色葡萄球菌。

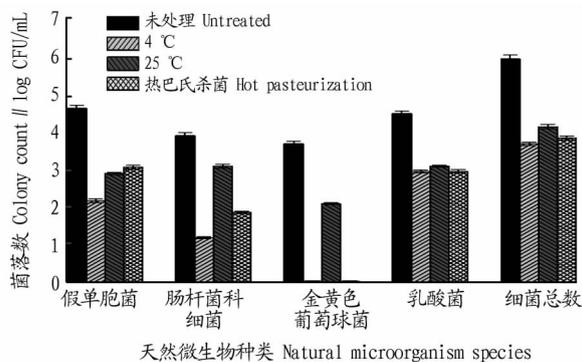


图3 加压 CO₂ 不同处理温度对原料乳中天然微生物失活的影响

Fig.3 The effects of pressurized CO₂ treatment temperature on the inactivation of natural microorganisms in the raw milk samples

与 25 °C 处理相比,4 °C 处理能够更好地杀灭原料乳样品中的天然微生物。在 4 °C 下,假单胞菌、肠杆菌科细菌、乳酸菌、细菌总数和金黄色葡萄球菌的菌数分别降低了 2.44、2.69、1.54、2.25 和 3.39 log CFU/mL。在 25 °C 处理后,假单胞菌、肠杆菌科细菌、乳酸菌、细菌总数、金黄色葡萄球菌的菌数分别降低了 0.72、1.89、0.13、0.45 和 1.81 log CFU/mL。在 4 °C 时微生物新陈代谢较慢,生长受到抑制。综上,4 °C 处理的杀菌效果优于 25 °C 处理以及热巴氏杀菌。

3 结论

加压 CO₂ 处理可使原料乳中假单胞菌、肠杆菌科细菌、乳酸菌和金黄色葡萄球菌菌数和细菌总数降低,且 CO₂ 压力、加压时间以及温度的改变对杀菌效果影响较大。当压力为 7 MPa、温度为 4 °C、时间为 60 min 时,杀菌效果最佳,原料乳中各细菌数量均下降,且未检测出金黄色葡萄球菌。因此,在对牛乳进行冷藏前,与传统巴氏杀菌相比,加压 CO₂ 处理可使原料乳的保藏期更长,为乳制品的灭菌处理方式提供了更多有效的选择。

(上接第 173 页)

- [5] 赵成萍,上官李娜,张沛然,等.不同培养基对黑曲霉菌丝生长影响的研究[J].中国酿造,2019,38(8):36-40.
- [6] 丁涛,倪辉,蔡慧农,等.黑曲霉 DB056 发酵产柚苷酶中试放大研究[J].中国食品学报,2011,11(5):114-119.
- [7] 邓媛,毛勇,杨国武,等.黑曲霉 TC-01 产柚苷酶分离纯化及其降解内

参考文献

- [1] POSSAS A, PÉREZ-RODRÍGUEZ F, VALERO A, et al. Modelling the inactivation of *Listeria monocytogenes* by high hydrostatic pressure processing in foods: A review[J]. Trends in food science & technology, 2017, 70: 45-55.
- [2] PANIAGUA-MARTÍNEZ I, MULET A, GARCÍA-ALVARADO M A, et al. Orange juice processing using a continuous flow ultrasound-assisted supercritical CO₂ system: Microbiota inactivation and product quality[J]. Innovative food science & emerging technologies, 2018, 47: 362-370.
- [3] 孙彦琳,苏树朋,韩立英,等.高压 CO₂ 与超高压均质协同杀菌装置的研发[J].食品与机械,2017,33(1):84-86.
- [4] FERRENTINO G, PLAZA M L, RAMÍREZ-RODRIGUES M, et al. Effects of dense phase carbon dioxide pasteurization on the physical and quality attributes of a red grapefruit juice [J]. Journal of food science, 2009, 74(6): E333-E341.
- [5] SPILIMBERGO S, CIOLA L. Supercritical CO₂ and N₂O pasteurisation of peach and kiwi juice [J]. International journal of food science & technology, 2010, 45(8): 1619-1625.
- [6] RAO L, BI X F, ZHAO F, et al. Effect of high-pressure CO₂ processing on bacterial spores[J]. Critical reviews in food science and nutrition, 2016, 56(11): 1808-1825.
- [7] PRAMUDITA I E, NOVIANA M L, MULJANA H. Study of pretreatment and enzymatic hydrolysis on microcrystalline cellulose and HVS A4 paper in pressurized CO₂ media [J]. Modern applied science, 2015, 9(7): 16-23.
- [8] LI H, ZHAO L, WU J H, et al. Inactivation of natural microorganisms in litchi juice by high-pressure carbon dioxide combined with mild heat and nisin [J]. Food microbiology, 2012, 30(1): 139-145.
- [9] 周先汉,张安,曾庆梅,等.超临界 CO₂ 杀灭芽孢工艺条件的优化[J].安徽农业科学,2010,38(17):9201-9203.
- [10] 王桂楨,陈忠泽.巴氏杀菌工艺的改进研究[J].中国乳业,2017(3):61-65.
- [11] 高璇.市售鲜牛奶中金黄色葡萄球菌的分离鉴定及耐药性分析[J].安徽农业科学,2018,46(27):173-175.
- [12] AMARAL G V, SILVA E K, CAVALCANTI R N, et al. Dairy processing using supercritical carbon dioxide technology: Theoretical fundamentals, quality and safety aspects [J]. Trends in food science & technology, 2017, 64: 94-101.
- [13] GARCIA-GONZALEZ L, GEERAERD A H, SPILIMBERGO S, et al. High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: The past, the present and the future [J]. International journal of food microbiology, 2007, 117(1): 1-28.
- [14] GARCIA-GONZALEZ L, GEERAERD A H, ELST K, et al. Inactivation of naturally occurring microorganisms in liquid whole egg using high pressure carbon dioxide processing as an alternative to heat pasteurization [J]. The journal of supercritical fluids, 2009, 51(1): 74-82.
- [15] ILLERA A E, SANZ M T, TRIGUEROS E, et al. Effect of high pressure carbon dioxide on tomato juice: Inactivation kinetics of pectin methylesterase and polygalacturonase and determination of other quality parameters [J]. Journal of food engineering, 2018, 239: 64-71.
- [16] 祖林林.高压 CO₂ 对全蛋液的杀菌效果及机理的初探[D].武汉:华中农业大学,2018.
- 毒素研究初探[J].中国食品添加剂,2018(1):80-86.
- [8] 嗜盐糖单孢菌 FIMSY00011 次级代谢产物的研究[EB/OL]. [2020-04-15]. <http://www.doc88.com>.
- [9] 赖崇德,祝福元,张智平,等.黑曲霉产柚苷酶的分离纯化工艺研究及分子量的测定[J].食品科技,2010,35(10):11-14,19.
- [10] 陈月龙,倪辉,蔡慧农,等.利用高效液相色谱测定柚苷酶水解食品糖苷[J].中国食品学报,2013,13(7):207-214.