

# 黑曲霉 DB056 产柚苷酶发酵条件初步优化

吴升山<sup>1,2</sup> 倪辉<sup>1</sup> 肖安风<sup>1</sup> 李利君<sup>1</sup> 蔡慧农<sup>1</sup> 苏文金<sup>1,2\*</sup>

(1. 集美大学生物工程学院 福建 厦门 361021)

(2. 厦门市食品生物工程技术研究中心 福建 厦门 361021)

**摘要:** 以  $\alpha$ -鼠李糖苷酶活力和柚苷酶活力为考察指标, 研究了发酵条件对黑曲霉 DB056 产柚苷酶的影响。结果表明: 发酵温度、菌丝形态、培养基初始 pH、接种量和装液量对黑曲霉 DB056 产柚苷酶都具有重要影响。初步优化得到黑曲霉 DB056 产柚苷酶的条件为: 培养基初始 pH 8.0, 玻璃珠添加个数 5 个, 装液量 45 mL, 接种量 7%, 发酵温度 34°C, 摇床转速 190 r/min。采用此条件进行发酵, 高效液相色谱法检测  $\alpha$ -鼠李糖苷酶活力最大可达 1076.32 U/mL, 柚苷酶活力最大可达 420.68 U/mL, 分别比初始条件提高了 72.35% 和 78.03%。黑曲霉 DB056 不仅在对数生长期能快速合成柚苷酶, 在稳定期及衰亡期也会不断地分泌柚苷酶。阐明了发酵条件对黑曲霉 DB056 产柚苷酶的影响并获得了经过初步优化的发酵条件, 为进一步优化发酵条件, 提高黑曲霉 DB056 产柚苷酶的产量奠定了良好的基础。

**关键词:** 黑曲霉, 发酵条件,  $\alpha$ -鼠李糖苷酶, 柚苷酶

## Preliminary Optimization of Fermentation Conditions for Production of Naringinase by *Aspergillus niger* DB056

WU Sheng-Shan<sup>1,2</sup> NI Hui<sup>1</sup> XIAO An-Feng<sup>1</sup> LI Li-Jun<sup>1</sup> CAI Hui-Nong<sup>1</sup>  
SU Wen-Jin<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Bioengineering, Jimei University, Xiamen, Fujian 361021, China)

(2. The Research Center of Food Biotechnology, Xiamen, Fujian 361021, China)

**Abstract:** In this study,  $\alpha$ -rhamnosidase activity and naringinase activity were adopted to evaluate effects of conditions on naringinase production by *Aspergillus niger* DB056. The results showed that fermentation temperature, mycelia morphology, initial pH, inoculation amount and medium volume had important impacts on naringinase production. Optimum conditions, including initial pH 8.0, adding 5 class beads, 45 mL medium in 250 mL flask, inoculation amount 7%, culture temperature 34°C and rotatory speed 190 r/min, were proved superior to get high  $\alpha$ -rhamnosidase and naringinase yield. Under these conditions, the enzyme activity detected by high performance liquid chromatography method were 1076.32 U/mL for  $\alpha$ -rhamnosidase and 420.68 U/mL for naringinase, which increased by 72.35% and 78.03% comparing with the initial condition. Furthermore, the results also showed *Aspergillus niger*

基金项目: 福建省科技计划重点项目(No. 2009N0044); 福建省青年人才创新基金(No. 2007F3073); 科技人员服务企业行动项目(No. 2009GJC40050); 集美大学中青年创新团队专项基金(No. 2008A002)

\* 通讯作者: Tel: 86-592-6182327; 信箱: wjsu@jmu.edu.cn

收稿日期: 2010-03-24; 接受日期: 2010-05-31

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

DB056 could synthesize naringinase not only rapidly in the logarithm grown phase, but also continuously in the stationary and death phase. The present study elucidated effects of fermentation conditions on naringinase production by *Aspergillus niger* DB056 and provided a preliminarily optimized conditions for naringinase fermentation. It set a basic foundation for further study to enhance the productivity of naringinase by *Aspergillus niger* DB056.

**Keywords:** *Aspergillus niger*, Fermentation condition,  $\alpha$ -rhamnosidase, Naringinase

柚苷酶(Naringinase)是一种以水解柚皮苷至柚皮素为特征的糖苷酶。相关研究表明,柚苷酶在柑桔类果汁的加工脱苦、鼠李糖和普鲁宁的工业制备、葡萄酒增香、黄酮类中药加工及甙体转化<sup>[1]</sup>等方面具有重要的应用价值。目前,柚苷酶制剂的价格十分昂贵,如, Sigma 柚苷酶制剂(N1385 Naringinase from *Penicillium decumbens*, 酶活力约为 300 U/g)的价格为 1623.9 元/kg<sup>[2]</sup>, 日本田边制药生产的酶活力为 150 U/g 柚苷酶制剂的售价约为 2600 元/kg。高昂的酶制剂价格限制了其应用技术的开发。因此,探索并建立柚苷酶的高产发酵技术具有重要的实用价值。

本实验室在前期研究过程中,分离获得了产柚苷酶的黑曲霉菌株<sup>[3-4]</sup>,选育获得了一株柚苷酶的高产菌株——黑曲霉 DB056,该菌种具有产量高、安全性好、发酵泡沫少等优点,显示出了较好的研究开发价值。优化发酵条件是提高柚苷酶发酵产量的重要方面,虽然国内有一些学者对黑曲霉产柚苷酶的发酵进行了研究<sup>[5-11]</sup>,但由于没有进行系统的发酵条件优化,发酵产量提高缓慢。因此,研究柚苷酶的发酵条件对于优化、建立柚苷酶的高产发酵技术具有重要的参考价值。

相关研究表明<sup>[12]</sup>,柚苷酶实际是由  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶(以下简称  $\alpha$ -鼠李糖苷酶)和  $\beta$ -D-葡萄糖苷酶组成的复合酶,这两种酶在水解柚皮苷反应过程中是先后起作用的,首先柚皮苷在  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶作用下水解产生普鲁宁(Prunin)和鼠李糖(Rhamnose),然后普鲁宁在  $\beta$ -D-葡萄糖苷酶作用下进一步水解成柚皮素(Naringenin)和葡萄糖(Glucose)。考虑到纤维素酶及其他一些大宗酶制剂中都含有丰富的  $\beta$ -D-葡萄糖苷酶, $\beta$ -D-葡萄糖苷酶的生产成本已经相对较低。因此,本研究以  $\alpha$ -鼠李糖苷酶活力为主要指标,柚苷酶活力为辅助指标,以黑曲霉 DB056 为对象,初步研究发酵条件对黑曲霉产柚苷酶的影响,为建立柚苷酶高产发酵技术提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与主要仪器

黑曲霉 DB056 (*Aspergillus niger* DB056)为集美大学生物工程学院发酵研究室选育的菌种,柚皮苷购自西安小草植物科技有限责任公司,乳化剂 Triton X-100 (商品名为乳化剂 OP-10)购自天津光复精细化工研究所。

1525 型高效液相色谱仪(美国 Waters Co., Ltd), ZHWY-2102 双层全温度恒温摇床(上海智城分析仪器制造有限公司), Unic7200 紫外可见分光光度计[尤尼柯(上海)仪器有限公司]。

### 1.2 培养基

**1.2.1 斜面培养基(g/L):** MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.5, KCl 0.5, KNO<sub>3</sub> 1.5, 无水 CaCl<sub>2</sub> 0.1, 酵母膏 2.0, 柚皮苷 2.69, 初始 pH 6.0, 琼脂 2.0%, 1 × 10<sup>5</sup> Pa 灭菌 20 min。

**1.2.2 发酵培养基(g/L):** MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 3.5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0, KCl 0.5, 无水 CaCl<sub>2</sub> 0.1, 柚皮苷 3.5, 玉米浆 4, 乳化剂 Triton X-100 1.0% (V/V), 初始 pH 6.0, 1 × 10<sup>5</sup> Pa 灭菌 20 min。

### 1.3 发酵初始条件

培养基初始 pH 6.0, 玻璃珠添加个数 5 个, 250 mL 锥形瓶的装液量 45 mL, 接种量 10%, 发酵温度 28°C、190 r/min 摇床中培养 72 h。

### 1.4 实验方法

**1.4.1 单孢子菌悬液的制备:** 将 4°C 贮藏的斜面菌种接种于斜面培养基上, 28°C 培养 3 d 得到成熟孢子, 用 0.75% 的无菌生理盐水洗下孢子, 放到装有 50 mL 无菌生理盐水的锥形瓶中, 充分振荡 30 min。待孢子充分打散后, 测菌悬液 OD<sub>600</sub> 值, 并用无菌生理盐水调整其 OD 值至 0.2, 即得单孢子菌悬液。

**1.4.2 接种及发酵:** 将制得的单孢子菌悬液于 4°C 冰箱中放置 1 h 使之同步培养, 然后取出升至室温, 以 10% 的接种量接种至装液量为 45 mL 的 250 mL

锥形瓶中, 在 28°C、190 r/min 的条件下培养 72 h 后取样。发酵液于室温下 3500 r/min 离心 10 min 后, 取上清液测定  $\alpha$ -鼠李糖苷酶活力和柚苷酶活力。

## 1.5 分析测定方法

**1.5.1  $\alpha$ -鼠李糖苷酶活力和柚苷酶活力的测定:** 样品的前处理: 取 1.9 mL pH 4.0 磷酸盐缓冲液 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  0.01 mol/L, 柠檬酸 0.005 mol/L) 于试管中, 加入 0.1 mL 发酵上清液混匀于 40°C 水浴中预热 5 min, 再加入 2 mL 柚皮苷标准液 (300 mg/L) 于 40°C 下反应 15 min, 后于 100°C 水浴加热 20 min 使酶失活, 取出后迅速冷却至室温, 空白为先将发酵上清液失活后再加入柚皮苷标准液, 其他操作相同。

反应底物和产物的定量: 经过酶反应后的溶液于室温下 13000 r/min 离心 15 min 后, 用高效液相色谱仪(采用 Waters Symmetry C18 色谱柱)检测柚皮苷和柚皮素的峰面积, 对照标准曲线, 求出对应的柚皮苷和柚皮素含量。色谱条件为: 流动相组成甲

醇: 超纯水=1:1 (V/V), 流速 0.7 mL/min, 进样量 20  $\mu\text{L}$ , 柱温 35°C, 检测波长 280 nm, 走样时间为 12 min<sup>[5,13]</sup>。

酶活力单位的定义: 在 40°C、pH 4.0 的条件下, 每分钟分解 1  $\mu\text{g}$  柚皮苷所需的酶量定义为 1 个  $\alpha$ -鼠李糖苷酶活力单位; 每分钟生成 1  $\mu\text{g}$  柚皮素所需的酶量定义为一个柚苷酶活力单位。

**1.5.2 生物量的测定:** 发酵液于室温下 3500 r/min 离心 10 min 后, 上清液转移保存测  $\alpha$ -鼠李糖苷酶活力和柚苷酶活力, 沉淀的菌体用蒸馏水洗涤 3 次后于 105°C 烘箱内烘至恒重, 称重, 计算生物量。

## 2 结果与分析

### 2.1 温度对黑曲霉 DB056 发酵的影响

保持其他初始发酵条件不变, 分别在 28°C、32°C、34°C、36°C 条件下培养黑曲霉 DB056, 比较不同温度条件下黑曲霉 DB056 发酵柚苷酶的的差异, 结果见表 1。

表 1 培养温度对黑曲霉 DB056 产  $\alpha$ -鼠李糖苷酶和柚苷酶发酵的影响

Table 1 Effects of culture temperature on the production of  $\alpha$ -rhamnosidase and naringinase by *Aspergillus niger* DB056

培养温度 Culture temperature (°C)	$\alpha$ -鼠李糖苷酶活力 $\alpha$ -rhamnosidase activity (U/mL)	柚苷酶活力 Naringinase activity (U/mL)	生物量 Biomass (g/L)	发酵液终止 pH 值 Final pH of fermentation broth
28	598.94 $\pm$ 14.48 c	240.94 $\pm$ 13.91 c	2.00 $\pm$ 0.06 a	7.14 $\pm$ 0.05 c
32	796.17 $\pm$ 1.00 b	322.24 $\pm$ 12.16 a	1.85 $\pm$ 0.06 ab	7.53 $\pm$ 0.06 a
34	848.48 $\pm$ 9.51 a	280.35 $\pm$ 16.21 b	1.78 $\pm$ 0.01 b	7.43 $\pm$ 0.11 ab
36	864.01 $\pm$ 10.18 a	190.04 $\pm$ 10.52 d	1.97 $\pm$ 0.12 a	7.40 $\pm$ 0.04 b

注: 同一列数值后面的不同字母表示 5% 显著水平上的不同数值。

Note: Different letters after the digital number in each column meant significant values at significant level 0.05.

从表 1 可以看出, 在 28°C–36°C 之间,  $\alpha$ -鼠李糖苷酶活力随着发酵温度的上升而增加, 柚苷酶活力随着发酵温度的上升呈现先增加后下降的趋势。当发酵温度上升至 34°C 时,  $\alpha$ -鼠李糖苷酶活力基本不再随温度的上升而增加, 此时,  $\alpha$ -鼠李糖苷酶活力为 848.48 U/mL, 柚苷酶酶活力为 280.35 U/mL, 比初始条件(28°C)分别提高了 41.66% 和 16.36%; 当发酵温度为 32°C 时柚苷酶酶活力可达到最大, 其酶活力比 28°C 时提高了 33.74%, 同时  $\alpha$ -鼠李糖苷酶活力也比 28°C 时提高了 32.93%。该结果表明, 黑曲霉 DB056 菌株发酵柚苷酶的最适温度在 32°C–34°C 之间, 而且  $\alpha$ -鼠李糖苷酶和柚苷酶的最适温度可能不一样; 以  $\alpha$ -鼠李糖苷酶活力作为发酵的主要指标, 兼顾柚苷酶酶活力, 选择 34°C 进一步开展实验。

### 2.2 菌丝形态对黑曲霉 DB056 发酵的影响

前期实验研究表明, 黑曲霉 DB056 发酵过程中容易有菌丝球生成(如图 1A 所示, 采用菌落计数器

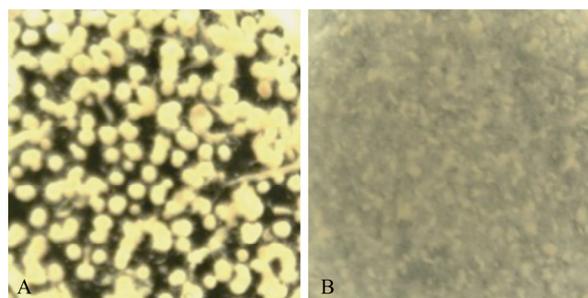


图 1 黑曲霉 DB056 培养 72 h 后的菌丝生长情况

Fig. 1 The mycelia morphology of *Aspergillus niger* DB056 cultivated after 72 h

注: A: 培养基中没有添加玻璃珠; B: 培养基中添加 5 个玻璃珠。

Note: A: Medium without beadings; B: Medium with 5 beadings.

拍照,放大倍数为1倍),这限制了营养物质的吸收及酶的分泌,不利于提高柚苷酶发酵的产量水平。在摇瓶中添加玻璃珠有利于使黑曲霉形成松散的菌丝(如图1B所示),当菌体形态由菌球变成菌丝后,发酵液中柚苷酶的活力会显著增加(表2)。

为了研究菌丝形态对黑曲霉 DB056 发酵柚苷酶的影响,在发酵摇瓶中分别添加2、5和8个直径

4 mm 的玻璃珠,以使产生不同的菌丝形态,考察其对产酶的影响。结果如表3所示。

从表3可以看出,当添加5个玻璃珠时, $\alpha$ -鼠李糖苷酶活力和柚苷酶活力都可达到最大值,酶活力分别为1066.59 U/mL和320.97 U/mL。因此,选择添加5个直径为4 mm的玻璃珠,以使黑曲霉的菌体保持在有利柚苷酶分泌的形态。

表2 菌丝形态对黑曲霉 DB056 产  $\alpha$ -鼠李糖苷酶和柚苷酶发酵的影响

玻璃珠个数 Amounts of beadings	$\alpha$ -鼠李糖苷酶活力 $\alpha$ -rhamnosidase activity (U/mL)	柚苷酶活力 Naringinase activity (U/mL)	生物量 Biomass (g/L)	发酵液终止 pH 值 Final pH of fermentation broth
0	584.54 $\pm$ 14.08	29.40 $\pm$ 8.76	1.86 $\pm$ 0.11	6.59 $\pm$ 0.02
5	680.32 $\pm$ 26.88	77.01 $\pm$ 7.48	1.29 $\pm$ 0.13	6.46 $\pm$ 0.04

注:此为前期预实验的结果,不同之处是采用的培养基为发酵初始培养基,其他条件相同。

Note: Table 2 was the result of the previous experiment. The condition was the same of the present experiment with one exception. The exception was the fermentation medium was the initial medium.

表3 菌丝形态对黑曲霉 DB056 产  $\alpha$ -鼠李糖苷酶和柚苷酶发酵的影响

Table 3 The effects of mycelial morphology on *Aspergillus niger* DB056 producing  $\alpha$ -rhamnosidase and naringinase

玻璃珠个数 Amounts of beadings	$\alpha$ -鼠李糖苷酶活力 $\alpha$ -rhamnosidase activity (U/mL)	柚苷酶活力 Naringinase activity (U/mL)	生物量 Biomass (g/L)	发酵液终止 pH 值 Final pH of fermentation broth
2	950.39 $\pm$ 18.82 c	240.71 $\pm$ 6.26 b	1.96 $\pm$ 0.05 a	6.96 $\pm$ 0.16 a
5	1066.59 $\pm$ 6.98 a	320.97 $\pm$ 14.32 a	1.88 $\pm$ 0.09 a	7.05 $\pm$ 0.04 a
8	1015.09 $\pm$ 16.84 b	244.77 $\pm$ 17.00 b	1.99 $\pm$ 0.07 a	6.58 $\pm$ 0.09 b

注:表中同一列数值后面的不同字母表示5%显著水平上的不同数值。

Note: Different letters after the digital number in each column meant significant values at significant level 0.05.

### 2.3 培养基初始 pH 值对黑曲霉 DB056 发酵的影响

pH 是影响微生物生长及产物的形成的重要的环境因素<sup>[14]</sup>。保持其他发酵条件不变,分别将培养基初始 pH 调节至 3.0、4.0、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0 进行发酵培养,比较不同培养基初始 pH 对黑曲霉 DB056 发酵柚苷酶的影响,结果如图2所示。

从图2可以看出, $\alpha$ -鼠李糖苷酶活力随着培养基初始 pH 值的增加呈现先上升后下降的趋势,柚苷酶活力也有类似的规律。当培养基初始 pH 为 8.0 时,黑曲霉 DB056 培养液中  $\alpha$ -鼠李糖苷酶活力和柚苷酶活力均达到最大,分别为 1077.11 U/mL 和 364.69 U/mL。从生物量来看,初始 pH 值对生物量也具有较大的影响,当培养基初始 pH 为 3.0 时,黑曲霉 DB056 的生物量最大;当培养基初始 pH 4.0–8.5 内,生物量不随初始 pH 改变而变化;而当培养基初始 pH 为 9.0 时,培养基变粘稠,呈果冻状,不利于黑曲霉 DB056 的生长,生物量最小。发

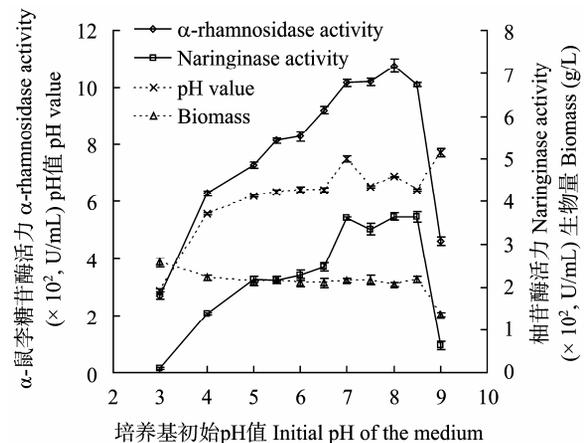


图2 培养基初始 pH 对黑曲霉 DB056 产  $\alpha$ -鼠李糖苷酶和柚苷酶发酵的影响

Fig. 2 Effects of initial pH of the medium on the production of  $\alpha$ -rhamnosidase and naringinase by *Aspergillus niger* DB056

酵结束时,发酵液的 pH 值随培养基初始 pH 的升高而升高;当培养基初始 pH 为 7.5、8.0 和 8.5 时,发酵液的 pH 值降到 6.4–6.8 左右;而当培养基初始 pH 为 9.0 时,发酵液的 pH 值为 7.70。综合黑曲霉 DB056

的生长及产酶状况, 确定培养基初始 pH 为 8.0 进行后续实验。

#### 2.4 接种量对黑曲霉 DB056 发酵的影响

保持其他发酵条件不变, 分别按 1%、4%、7%、10%、13%、16%、19% 的接种量进行发酵, 比较不同接种量对黑曲霉 DB056 产柚苷酶的影响, 结果如图 3 所示。

从图 3 可以看出,  $\alpha$ -鼠李糖苷酶活力和柚苷酶活力随着接种量的增大呈现先上升而后平稳的趋势, 当接种量低于 7% 时, 发酵液中柚苷酶活力和  $\alpha$ -鼠李糖苷酶活力随接种量的增大而增大, 而当接种量  $\geq 7\%$  后, 黑曲霉 DB056 培养液中  $\alpha$ -鼠李糖苷酶活力和柚苷酶活力基本均保持不变。接种量对生物量的影响不大, 但对发酵液的 pH 值具有一定影响, 发酵液的 pH 值随着接种量的增大呈现先上升而后平稳的趋势。综上所述, 选择接种量为 7% 来考察下一个条件。

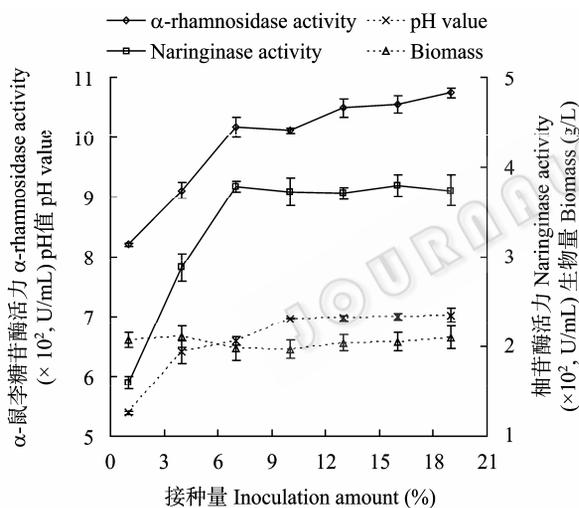


图 3 接种量对黑曲霉 DB056 产  $\alpha$ -鼠李糖苷酶和柚苷酶发酵的影响

Fig. 3 Effects of inoculation amount on the production of  $\alpha$ -rhamnosidase and naringinase by *Aspergillus niger* DB056

#### 2.5 装液量对黑曲霉 DB056 发酵的影响

黑曲霉 DB056 属于好氧菌, 溶氧对于菌体生长和产酶水平有较大的影响。为了研究溶氧对黑曲霉 DB056 发酵柚苷酶的影响, 固定摇床转速为 190 r/min, 在 250 mL 锥形瓶中分别装入 15、25、35、45、55、65、75 mL 液体发酵培养基, 比较不同装液量对黑曲霉 DB056 发酵柚苷酶的影响, 结果如图 4 所示。

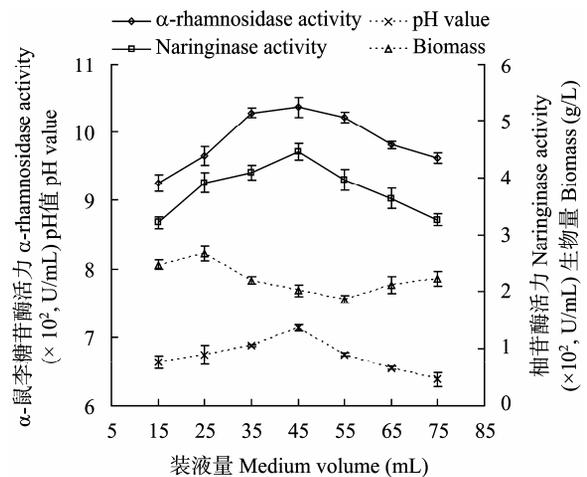


图 4 装液量对黑曲霉 DB056 产  $\alpha$ -鼠李糖苷酶和柚苷酶发酵的影响

Fig. 4 Effects of medium volume on the production of  $\alpha$ -rhamnosidase and naringinase by *Aspergillus niger* DB056

从图 4 可以看出,  $\alpha$ -鼠李糖苷酶活力和柚苷酶活力随着装液量的增加, 均呈现先上升而后下降的趋势。装液量为 45 mL 时,  $\alpha$ -鼠李糖苷酶活力和柚苷酶活力均达到最高, 分别为 1036.63 U/mL 和 445.48 U/mL, 分别比装液量为 15 mL 时增加了 12.06% 和 38.70%, 比装液量为 75 mL 时的酶活力分别高出 7.78% 和 36.57%。从生物量来看, 当装液量为 25 mL 时, 生物量最大; 发酵液 pH 值随着装液量的增加而呈现先上升后下降的趋势, 在装液量为 45 mL 时, 发酵液 pH 值达到最大(7.13)。由此可知, 当摇床转速为 190 r/min 时, 250 mL 锥形瓶中装液量为 45 mL 时的溶氧条件有利于黑曲霉 DB056 产柚苷酶。

#### 2.6 验证实验

通过以上试验, 初步优化得到了黑曲霉 DB056 产  $\alpha$ -鼠李糖苷酶和柚苷酶的条件: 培养基初始 pH 8.0, 玻璃珠添加个数为 5 个, 装液量 45 mL, 接种量 7%, 发酵温度 34°C。在此条件下进行验证试验, 结果见图 5。

从图 5 可以看出, 在优化条件下,  $\alpha$ -鼠李糖苷酶活力可达 1076.32 U/mL, 柚苷酶活力可达 420.68 U/mL, 比初始条件分别提高了 72.35% 和 78.03%。目前国内采用相同酶活力测定方法的研究者仅有郭倩<sup>[5]</sup>和陈华根<sup>[4,11]</sup>, 他们发酵的  $\alpha$ -鼠李糖苷酶活力分别为 100 U/mL 和 631.9 U/mL (柚苷酶活力水平均没有报道)。本研究获得  $\alpha$ -鼠李糖苷酶活力水平比国内采用相同酶活力测定方法报道的最高水平大约高出了 70.33%。

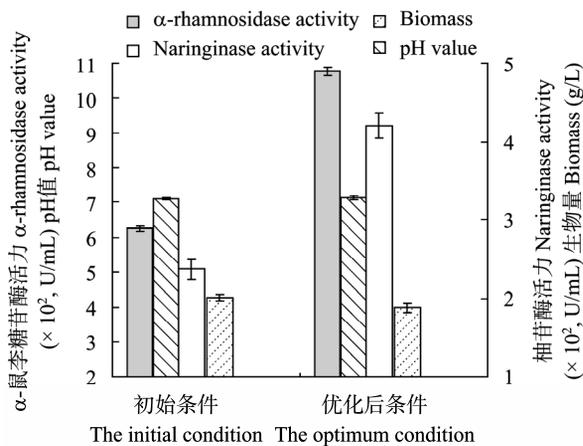


图5 初始条件与优化后条件的发酵结果比较  
Fig. 5 Comparisons of fermentation results between the initial condition and the optimized condition

## 2.7 发酵曲线

在培养基初始 pH 8.0, 装液量 45 mL, 接种量 7%, 发酵温度 34°C, 添加 5 个玻璃珠的条件下培养黑曲霉 DB056, 每 24 h 取样 1 次, 测定发酵液的 pH 值、生物量、柚皮苷含量、柚皮素含量,  $\alpha$ -鼠李糖苷酶活力和柚苷酶活力, 绘制发酵曲线, 结果见图 6 所示。

从图 6 可以看出, 前 24 h 生物量增长较慢, 菌体生长缓慢, 为细胞生长的延滞期, 此阶段菌体快速利用柚皮苷,  $\alpha$ -鼠李糖苷酶活力缓慢上升, 柚苷酶活力仍很低, 发酵液的 pH 呈略上升的趋势。24 h 后, 进入对数生长期, 菌体快速利用柚皮苷, 并将柚皮苷分解为柚皮素。0-48 h 主要是菌体生长阶段, 黑曲霉 DB056 菌体量快速增加, 酶的合成较缓慢。在发酵 48 h 时, 发酵液中柚皮苷基本被消耗完, 此时柚皮素的浓度达到最大。48-72 h, 黑曲霉 DB056 又进入一个快速生长的阶段, 此时酶的合成也得到了较大的提高,  $\alpha$ -鼠李糖苷酶活力和柚苷酶活力都有一个突跃上升的过程。第 72 小时柚皮素被利用完, 菌体停止生长, 细胞进入衰亡期, 但酶活力仍然缓慢地上升, 在第 168 h 时  $\alpha$ -鼠李糖苷酶活力和柚苷酶活力都达到最大, 分别为 1019.18 U/mL 和 321.13 U/mL。发酵过程中, pH 总体趋势为先下降而后上升的过程。当菌体量达到最大时, 发酵液 pH 值最低。

从发酵曲线可以看出, 黑曲霉 DB056 产  $\alpha$ -鼠李糖苷酶和柚苷酶活力的增加主要是在菌体的对数生长期(24-72 h)。0-48 h 随着菌体对营养物质的利用,

诱导物柚皮苷的浓度不断减少, 这个阶段  $\alpha$ -鼠李糖苷酶呈现不断上升的趋势, 而柚苷酶活力增长缓慢; 发酵 48 h 时, 柚皮苷浓度基本为 0; 48-72 h  $\alpha$ -鼠李糖苷酶仍然呈现不断上升的趋势, 此时的柚苷酶活力也开始有了较大的增加。在菌体自溶后(72 h), 产酶能力仅有小幅的上涨。因此, 提高黑曲霉 DB056 生长阶段的菌体量或者延长其对数生长期, 都有可能进一步提高其产酶能力。可以考虑在对数生长期(72 h 左右)通过补料, 增加柚皮苷的浓度来提高产酶水平。

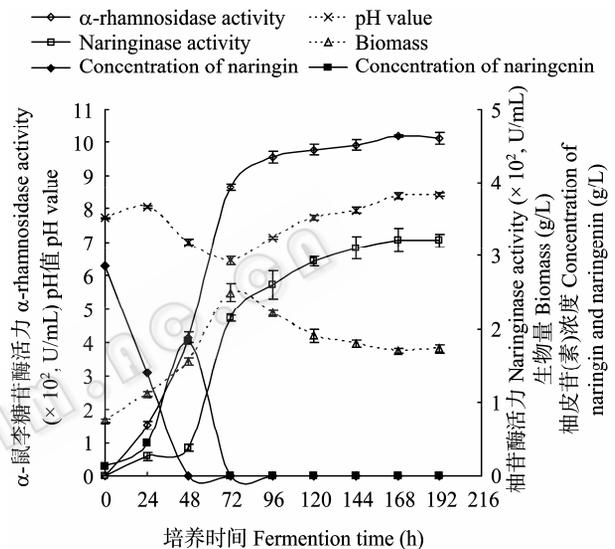


图6 黑曲霉 DB056 产  $\alpha$ -鼠李糖苷酶和柚苷酶摇瓶培养产酶曲线  
Fig. 6 Curve of the production of  $\alpha$ -rhamnosidase and naringinase by *Aspergillus niger* DB056 in flasks

## 3 讨论

### 3.1 发酵条件对黑曲霉产柚苷酶的影响

(1) 黑曲霉发酵柚苷酶的温度: 黑曲霉 DB056 发酵  $\alpha$ -鼠李糖苷酶和柚苷酶的最适发酵温度不一致, 这为选择合理的发酵温度提供了新的思路, 基于两者兼顾的原因, 本研究选择 34°C 作为黑曲霉 DB056 产酶的最适温度。另外还可以分别以提高  $\alpha$ -鼠李糖苷酶或柚苷酶总活力为目标, 有针对性地设置发酵温度, 探索采用变温发酵来提高柚苷酶的产量水平。

(2) 黑曲霉发酵柚苷酶的菌丝形态: 黑曲霉在培养过程中容易形成菌丝团或者贴壁生长, 通过工艺控制使其形成松散絮状的菌丝是提高黑曲霉胞外酶产量的一个重要措施。本研究通过在摇瓶中添加

少量的玻璃珠, 增加剪切力而调节黑曲霉的菌丝形态, 当摇瓶中添加 5 个玻璃珠时, 培养出的菌丝最有利于柚苷酶的分泌; 后续研究可针对此条件下菌丝形态进行针对性的研究, 为通过对工艺条件控制而产生松散的菌丝形态, 提高柚苷酶的产量提供了一种模型及方法。

(3) 黑曲霉发酵柚苷酶的最适 pH: 通过研究发现, 将培养基的初始 pH 控制在弱碱性的范围有利于(pH 8.0)提高黑曲霉 DB056 产酶的能力。仔细对比分析初始 pH 与各处理条件下发酵液最终的 pH 可以发现, 在较宽的初始 pH 范围内, 发酵液最终 pH 值相差都不大, 这说明黑曲霉具有较强的 pH 调节能力, 估计维持发酵 pH 值为 6.5–7.5 之间最有利于产酶, 而在发酵初始阶段将 pH 控制在弱碱性有利促进酶的产生。从发酵过程的产 pH 变化曲线(图 5)可知, 发酵后期 pH 会上升, 在后续研究中可以探讨对该过程的 pH 进行调控而进一步提高酶活力。

(4) 黑曲霉发酵柚苷酶的接种量: 综合比较不同接种条件下酶活力及生物量的变化可以推测, 接种量较小时(1%、4%), 酶活力较低的原因可能是由于接种量小而致使菌体生长周期延长, 产酶还未达到高峰(72 h)发酵就被停止了。因此, 如果适当地延长发酵时间, 则接种量对最大产酶的影响可能就不会像本试验这么显著。但考虑到缩短发酵时间有利于节省发酵成本、减少污染、降低风险等优点, 本研究选择 7% 的接种量进行后续试验。

(5) 黑曲霉发酵柚苷酶的装液量: 黑曲霉 DB056 属好氧菌, 装液量的多少在一定程度上反映了溶氧的水平。通过研究发现在所研究条件下, 装液量对  $\alpha$ -鼠李糖苷酶活力和柚苷酶活力的影响都较大。这说明  $\alpha$ -鼠李糖苷酶和柚苷酶在 250 mL 摇瓶发酵中对溶氧条件要求较高, 当装液量为 45 mL 时, 有利于黑曲霉 DB056 产  $\alpha$ -鼠李糖苷酶和柚苷酶。我们可以测定该条件下的溶氧值, 为后续的发罐放大试验提供参数指导。

### 3.2 初步优化了黑曲霉发酵柚苷酶的工艺条件

初步优化得到了黑曲霉 DB056 产柚苷酶的条件为: 培养基初始 pH 8.0, 玻璃珠添加个数为 5 个, 装液量 45 mL, 接种量 7%, 发酵温度 34°C, 摇床转速 190 r/min。在该工艺条件下,  $\alpha$ -鼠李糖苷酶活力可达 1076.32 U/mL, 柚苷酶活力可达 420.68 U/mL, 比初始条件分别提高了 72.35% 和 78.03%。与国内采用相

同酶活力测定方法的研究<sup>[4-5,11]</sup>相比,  $\alpha$ -鼠李糖苷酶活力有了较大幅度的提高。

### 3.3 黑曲霉产柚苷酶的规律

由发酵曲线(图 6)可知, 黑曲霉 DB056 不仅在对数生长期能快速合成柚苷酶, 在稳定期及衰亡期也会不断地分泌柚苷酶, 可以初步推测柚苷酶的合成动力学为部分生长关联型。

## 参 考 文 献

- [1] Puri M, Banerjee UC. Purification and characterization of the debittering enzyme naringinase. *Biotechnology Advances*, 2000, **18**(3): 207–217.
- [2] Sigma-Aldrich. N1385 Naringinase from *Penicillium decumbens*. [http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=N1385|SIGMA&N5=SEARCH\\_CONCAT\\_PNO|BRAND\\_KEY&F=SPEC](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=N1385|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC), 2009-08-19.
- [3] 郭倩, 邬应龙, 黄高凌, 等. 柚苷酶产生真菌的复筛及菌种初步鉴定. *食品科学*, 2008, **29**(2): 225–228.
- [4] 陈华根. 产柚苷酶的黑曲霉菌株的筛选、产酶特性及高产菌株选育的研究. 集美大学硕士生毕业论文, 2009.
- [5] 郭倩. 产柚苷酶高产菌株的筛选、鉴定及产酶特性研究. 四川农业大学硕士生毕业论文, 2008.
- [6] 胡奎, 李帮秀, 吴珍龄. 柚苷酶生产菌的选育. *西南农业大学学报*, 2003, **25**(2): 141–143.
- [7] 赖崇德, 蔡华静, 夏海林, 等. 一株产柚苷酶菌株黑曲霉的分离及菌种鉴定的初步研究. *江西农业大学学报*, 2005, **27**(5): 759–763.
- [8] 卢建明, 张晨, 刘志伟. 产柚苷酶菌株的初步筛选. *广东化工*, 2005, **32**(3): 15–16.
- [9] 陈玲, 涂晓嵘, 涂国全. NTG 诱变筛选高产柚苷酶抗性突变株. *江西农业大学学报*, 2007, **29**(4): 670–674.
- [10] 张晨, 刘志伟, 郑彦彤. 产柚苷酶菌株 B04 的分离及产酶特性研究. *工业微生物*, 2007, **37**(5): 38–41.
- [11] 陈华根, 倪辉, 李利君, 等. 黑曲霉  $\alpha$ -鼠李糖苷酶高产菌株的选育. *微生物学通报*, 2009, **36**(7): 1008–1012.
- [12] Şekeröglü G, Fadiloğlu S, Göğüş F. Immobilization and characterization of naringinase for the hydrolysis of naringin. *European Food Research and Technology*, 2006, **224**(1): 55–60.
- [13] Fisher JF, Wheaton TA. A high pressure liquid chromatographic method for the resolution and quantitation of naringin and naringenin rutinoside in grapefruit juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1976, **24**(6): 898–899.
- [14] 陈坚, 李寅. 发酵过程优化原理与实践. 北京: 化学工业出版社, 2003: 247.