

研究报告

棘孢曲霉固态发酵柚皮产柚苷酶的条件优化

王耸¹ 刘艳苓¹ 姜泽东^{1,2,3} 倪辉^{1,2,3} 蔡慧农^{1,2,3} 肖安风^{1,2,3} 朱艳冰^{1,2,3} 李利君^{1,2,3*}

(1. 集美大学 食品与生物工程学院 福建 厦门 361021)

(2. 福建省食品微生物与酶工程重点实验室 福建 厦门 361021)

(3. 厦门市食品与生物工程技术研究中心 福建 厦门 361021)

摘要:【目的】以柚皮为原料,优化棘孢曲霉利用柑橘加工副产物固态发酵柚苷酶的条件。【方法】采用高效液相色谱法检测酶活力,通过单因素试验考察固水比、装样量、接种量、温度对柚苷酶发酵的影响,用正交试验优化发酵条件。【结果】单因素试验结果的显著性分析表明培养基的固水比、装样量和培养温度对柚苷酶产量有显著性影响,而接种量影响不显著;经正交试验确定的优化条件是:固水比 1:1(质量体积比),装样量 5 g/250 mL 三角瓶,温度为 30 °C,接种 1 mL 孢子悬浮液,发酵 8 d。在此优化条件下,柚苷酶活力为 8.19 IU/g 干物质,比初始培养基产柚苷酶活力提高 7.38 倍。【结论】通过对固水比、装样量和发酵温度进行优化,大幅度提高了棘孢曲霉固态发酵柑橘加工副产物的柚苷酶产量,为柚苷酶的生产提供了一种高产发酵工艺。

关键词: 柚苷酶, 棘孢曲霉, 柚皮, 固态发酵, 发酵条件

The optimization of pomelo peel solid-state fermentation condition by *Aspergillus aculeatus* for naringinase

WANG Song¹ LIU Yan-Ling¹ JIANG Ze-Dong^{1,2,3} NI Hui^{1,2,3} CAI Hui-Nong^{1,2,3}
XIAO An-Feng^{1,2,3} ZHU Yan-Bing^{1,2,3} LI Li-Jun^{1,2,3*}

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

(2. Fujian Provincial Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering, Xiamen, Fujian 361021, China)

(3. Research Center of Food Biotechnology of Xiamen City, Xiamen, Fujian 361021, China)

Abstract: [Objective] The study aims to optimize solid-state fermentation conditions of citrus processing by-products with *Aspergillus aculeatus* for naringinase production. [Methods] The naringinase activity was detected by a high performance liquid chromatography method. The effects of solid water ratio, loaded sample, inoculation quantity and culture temperature were investigated on producing naringinase by single factor experiments and the fermentation conditions were further optimized with 3 factors at 3 levels in an orthogonal experimental design. [Results] Single factor experiments showed that solid water ratio, loaded sample and culture temperature had significant effects on the yield of naringinase, while inoculation quantity has no significant effect. The optimized

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31371751); 集美大学科研创新团队基金项目(No. 2010A006)

*通讯作者: ✉: ljli@jmu.edu.cn

收稿日期: 2014-11-25; 接受日期: 2015-05-11; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-05-21

fermentation conditions for *A. aculeatus* are: solid water ratio of 1:1 (*W/V*), loaded sample of 5 g/250 mL triangular flask, inoculation quantity of 1 mL at 30 °C for 8 days. Under optimal culture conditions, the activity of naringinase reached 8.19 IU/g dry substrate, which was 7.38-fold higher than that achieved before optimization. **[Conclusion]** There is significant improvement in naringinase production in pomelo peel solid-state fermentation by *A. aculeatus* after optimization. This study established a high-efficiency fermentation process for naringinase production.

Keywords: Naringinase, *Aspergillus aculeatus*, Pomelo peel, Solid-state fermentation, Fermentation conditions

酶是重要的生物催化剂, 研究新型酶制剂的生产技术有助于推动食品工业技术进步。酶的发酵方法有固态发酵和深层液态发酵 2 种。相比传统液态发酵生产技术, 利用农副产物进行酶的固态发酵具有培养基成本低、供氧充足、能量消耗低、有机废液少、对环境污染小等优点, 是生产食品酶制剂的重要途径。

柚苷酶是一种在食品工业中具有重要应用价值的新型酶, 它具有 α -L-鼠李糖苷酶和 β -D-葡萄糖苷酶 2 种酶的活性, 可特异性水解柚皮苷^[1]。柚苷酶对于去除柑橘类果汁中柚皮苷的苦味具有显著效果^[2]。除此之外, 柚苷酶还可用于改善酿造酒的香味^[3]和生物制备普鲁宁^[4]。国内外学者对柚苷酶的发酵生产技术进行了较长时间的研究。1955 年 Kishi^[5]首次利用微生物发酵产柚苷酶, 并确定黑曲霉是产柚苷酶的最佳菌株。1970 年 Ito 和 Takiguchi^[6]申请了一项日本专利: 在黄豆饼粉上, 25 °C 条件下, 利用菌株 *Phanopsis citri*、*Rhizoctonia solani* 以及 *Cochiobolus miyabeanus* 发酵 5 d 生产柚苷酶。2010 年, Puri 等^[7]通过分子学鉴定了一株木聚葡萄糖球菌 *Staphylococcus xylosus* MAK2, 此菌种可产生胞外柚苷酶, 最高柚苷酶活力可达 8.45 IU/mL。2012 年, Ni 等^[8]从腐烂的柚皮中分离得到一株柚苷酶高产菌株——黑曲霉 *Aspergillus niger* DB056, 并在 200 L 发酵罐中进行发酵, 检测柚苷酶活力达 2.5 IU/mL。汪钊等^[9]用多种方法从 153 株黑曲霉中筛选得到高产柚苷酶的 ZG86 菌株(酶活力高达 1 124 U/mL), 并对其培养条件及产酶条件进行了优

化。2014 年, Shanmugaprakash 等^[10]研究利用 Plackett-Burman 设计(PBD)和响应面法(RSM)筛选及优化巴西曲霉 1344 固态发酵产柚苷酶培养基成分。2011 年, Shanmugaprakash 等^[11]研究以廉价的工业废渣, 如米糠、麦麸、甘蔗渣和柑橘皮等提高 *Aspergillus niger* MTCC 1344 固态发酵(SSF)产柚苷酶水平, 并发现在发酵过程中向培养基中添加柚皮苷等营养物质可提高柚苷酶水平。尽管柚苷酶的发酵生产已取得重要进展, 但目前工业柚苷酶制剂的价格仍十分昂贵, 限制了柚苷酶在食品工业中的应用。因此, 开发更高效的柚苷酶发酵生产技术、降低其生产成本具有重要意义。

柑橘加工副产物(果皮、果渣)是柑橘果汁生产剩余的副产物, 其价格低廉、产量大, 含有丰富的纤维素、果胶成分, 可作为固态发酵的碳源被微生物生长利用^[12]。此外, 这类农副产物中还含有丰富的类黄酮物质, 如柚皮苷和橙皮苷等, 可作为柚苷酶合成所必需的诱导物^[13]。Mendoza 等^[14]对 12 株丝状真菌利用橘皮及葡萄柚皮固态发酵产柚苷酶进行了研究。Abbate 等^[12]研究证实对柑橘类废渣进行固态发酵可生产柚苷酶。这些研究表明, 用柑橘加工副产物进行固态发酵是降低柚苷酶生产成本的潜在途径。本研究小组在前期试验中分离得到一株棘孢曲霉菌株^[15], 其柚苷酶具有良好的应用性质^[16], 且在柑橘副产物上固态发酵能高产柚苷酶^[17]。因此, 本论文在国内外相关研究的基础上, 以柚皮为基质进行固态发酵研究, 优化该棘孢曲霉在柑橘副产物上固态发酵生产柚苷酶的条件, 为建

立高产柚苷酶的固态发酵工艺提供技术参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 棘孢曲霉 JMUdb058^[15]菌株, 集美大学食品与生物工程学院食品微生物与酶工程重点实验室筛选保存菌种。

1.1.2 培养基: 斜面培养基(g/L): (NH₄)₂SO₄ 1.50, MgSO₄·7H₂O 1.00, KH₂PO₄ 1.00, KCl 0.50, KNO₃ 1.50, CaCl₂ 0.10, 酵母膏 2.00, 柚皮苷 2.69, 调节 pH 至 6.0, 琼脂 20.00, 1×10⁵ Pa 灭菌 20 min^[17]。固态发酵培养基(g/L): 柚皮粉 5.0, 磷酸氢二铵添加量为 10.0%(质量比), 酵母浸膏添加量为 1.5%(质量比), 根据不同的试验加入一定量的蒸馏水混合均匀。

1.1.3 试剂: 甲醇(色谱纯)、乙腈(色谱纯), 美国 TEDIA 公司; 柠檬酸、磷酸氢二钠、H₂SO₄、乙酰丙酮、对二氨基苯甲醛、3,5-二硝基水杨酸、苯酚、无水亚硫酸钠、氢氧化钠、酒石酸钾钠, 均为上海国药集团有限公司分析纯; 柚皮苷、柚皮素标准品, 中国陕西小草植物科技有限责任公司。

1.1.4 主要仪器与设备: pH211C 酸度计, 北京哈纳科仪科技有限公司; MJX 智能型霉菌培养箱, 上海博迅实业有限公司医疗设备厂; UNIC-7200 紫外可见分光光度计, 尤尼柯(上海)仪器有限公司; HH-4 数显恒温水浴锅, 国华电器有限公司; Symmetry C₁₈ 反相柱(4.6 mm×150 mm, 3.5 μm), E2695-2489 高效液相色谱分析仪, 美国 Waters 有限公司。

1.2 方法

1.2.1 发酵流程: 将贮藏在 4 °C 的斜面菌种接种于斜面培养基上, 于 28 °C 培养 3 d, 得到成熟孢子。用 0.75% 无菌生理盐水洗下孢子, 转移至装有 50 mL 无菌生理盐水中充分振荡 30 min, 再用无菌生理盐水调整其 OD₆₀₀ 值至 2.0 (1×10⁸ 个孢子/mL)。取一定量孢子悬液 (OD₆₀₀ 为 2.0) 接种于装有发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, 搅拌均匀, 置于一定

的温度下静置培养 8 d。

1.2.2 固水比对固态发酵产酶的影响: 保持发酵培养基其他成分不变, 改变加水量, 制备固水比(质量体积比)分别为 1:0.8、1:1.0、1:1.2、1:1.6、1:2.0 的发酵培养基, 接入 1 mL 孢子悬液, 在 30 °C 条件下按照 1.2.1 所示的试验流程进行发酵试验, 发酵结束后测定各试验组的生物量、还原糖含量和柚苷酶活性。

1.2.3 装样量对固态发酵产酶的影响: 固定发酵培养基的基本比例不变, 保持固水比含量 1:1 (质量体积比), 在 250 mL 的三角瓶中分别装入 4、5、6、8 和 10 g 培养基, 接入 1 mL 孢子悬液在 30 °C 按照 1.2.1 所示的试验流程进行发酵试验, 发酵结束后测定各试验组的生物量、还原糖含量和柚苷酶活性。

1.2.4 接种量对固态发酵产酶的影响: 在 250 mL 的三角瓶中装入 5 g 发酵培养基及 5.75 mL 水, 分别接入 0.5、1.0、1.5 和 2.0 mL 孢子悬液, 在 30 °C 按照 1.2.1 所示的试验流程进行发酵试验, 发酵结束后测定各试验组的生物量、还原糖含量和柚苷酶活性。

1.2.5 发酵温度对固态发酵产酶的影响: 在 250 mL 的三角瓶中装入 5 g 发酵培养基及 5.75 mL 水, 接入 1 mL 的孢子悬液, 发酵温度分别为 27、30 和 33 °C, 按照 1.2.1 所示的试验流程进行实施, 发酵结束后测定各试验组的生物量、还原糖含量和柚苷酶活性。

1.2.6 正交优化试验: 在单因素的基础上, 固定接种量为 1 mL, 选择固水比、装样量以及温度 3 个因素按照表 1 所示的因素水平表设计 3 因素 3 水平正交试验组合, 按照 1.2.1 所示的试验流程进行发酵, 发酵结束后测定各试验组的柚苷酶活性。

1.3 检测方法

1.3.1 柚苷酶活力的测定: 在每个发酵三角瓶中加入 0.02 mol/L pH 5.0 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液 100 mL, 30 °C、200 r/min 振荡浸提 1 h, 用定性滤纸过滤, 滤液经 4 °C、13 000 r/min 离心 20 min 即

表 1 固态发酵柚苷酶正交试验因素水平
Table 1 Different levels of factors on the solid-state fermentation of naringinase

水平 Level	固水比(A, 质量体 积比) Solid water ratio (W/W)	装样量(B, g) Loaded sample (g)	温度(C, °C) Temperature (°C)
1	1:0.5	2.5	25
2	1:1.0	5.0	30
3	1:1.5	7.5	35

得发酵提取液。参照 Ni 等^[8]采用高效液相色谱法测定柚苷酶活力。先将 300 mg/L 柚皮苷标准液 2 mL 与 0.02 mol/L pH 5.0 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液 1.9 mL 混合, 置于 50 °C 水浴锅温浴 15 min 后, 迅速加入 0.1 mL 粗酶液并摇匀, 50 °C 反应 15 min, 置于 100 °C 沸水浴中 30 min 使酶失活, 再迅速冷却。空白反应是在酶灭活冷却后再加入 300 mg/L 柚皮苷标准液 2 mL。将反应后的样品溶液过 0.22 μm 滤膜, 用液相色谱测定柚皮苷和柚皮素含量的变化, 液相色谱条件为: 紫外检测波长 280 nm, 柱温 35 °C, 上样体积 20 μL, 流速 0.4 mL/min, 流动相为水(A)、甲醇(B)、乙腈(C), 洗脱条件为 0–7 min, A:B:C=62:12:26; 7–9 min, A:B:C=15:35:50; 9–15 min, A:B:C=15:35:50; 15–17 min, A:B:C=62:12:26; 17–20 min, A:B:C=62:12:26; 进行梯度洗脱。将一个柚苷酶活力单位(IU)定义为: 在 50 °C、pH 5.0 的条件下, 每 min 生成 1 μmol 柚皮素所需的酶量。

1.3.2 还原糖含量的测定: 参照张龙翔等^[18]采用 3,5-二硝基水杨酸比色法(DNS 法)测定粗酶液中还原糖含量。取发酵提取液 0.2 mL, 加入 DNS 溶液 0.6 mL, 摇匀, 沸水浴 5 min, 取出后迅速冷却, 蒸馏水定容至 5 mL, 于 520 nm 处测定 OD_{600} 值, 与标准曲线对比分析还原糖的浓度。

1.3.3 生物量的测定: 参照魏培莲等^[19]测定氨基葡萄糖的方法估测生物量。精密称取干发酵样品 0.30 g, 加 60% H_2SO_4 2 mL, 在 25 °C 恒温箱中浸

泡 24 h 后, 将 H_2SO_4 稀释至终浓度为 1 mol/L, 至 250 mL 三角瓶中, 9.8×10^4 Pa 高压加热 1 h, 冷却后用 1 mol/L NaOH 调至中性, 定容至 100 mL。取样液 2 mL (空白为蒸馏水 2 mL) 各加乙酰丙酮试剂 1 mL, 混合均匀后沸水浴加热 30 min, 冷却后加入无水乙醇 2 mL、对二氨基苯甲醛 1 mL, 振荡混匀, 再加入无水乙醇 4 mL, 60 °C 保温 1 h, 530 nm 处测定吸光度值, 根据菌体(液态发酵所得)干重对氨基葡萄糖含量的标准曲线计算生物量。

1.3.4 数据处理与分析: 实验数据为 3 次平行试验的平均值, 一次参数用 Excel 软件计算平均值和标准偏差, 并在作图时添加误差线。用 SPSS 17.0 软件进行正交试验设计和单因素试验及正交试验结果的显著性分析。

2 结果与分析

2.1 固水比对固态发酵产酶的影响

对棘孢曲霉发酵柚苷酶的固水比进行试验, 结果如图 1 所示, 固水比对柚苷酶的发酵具有重要的影响, 在固水比为 1:1 时, 柚苷酶活力达到最大值为 11.10 IU/g 干物质, 此时, 剩余还原糖含量较低, 同时生物量含量比较高; 当固水比大于 1:1 时, 随固水比的减少, 柚苷酶活力缓慢增加; 当固水比小于 1:1 时, 随着固水比减小, 发酵产物中柚苷酶的活力快速减少。该结果与王欣等^[20]报道的微生物生长及产酶要求培养基具有适宜的水分含量相一致, 当培养基含水量高于或低于微生物生长和产酶的最适含水量时, 微生物的生长和酶合成速度都将下降。将各含水量条件下的酶活性用 SPSS 17.0 作单因素方差分析, 结果表明 5 种不同固水比含量产柚苷酶活力差异显著(显示 $F > F_{0.05}(4,10) = 17.767$, $P < 0.05$)。进行多重比较发现当固水比处于 1:0.8、1:1.0、1:1.2 之间的酶产量水平差异不显著, 其他水平间的差异显著。该结果说明柚苷酶固态发酵的适宜含水量范围在固水比 1:1 附近。

2.2 装样量对固态发酵产酶的影响

对棘孢曲霉发酵柚苷酶的装样量进行试验, 结

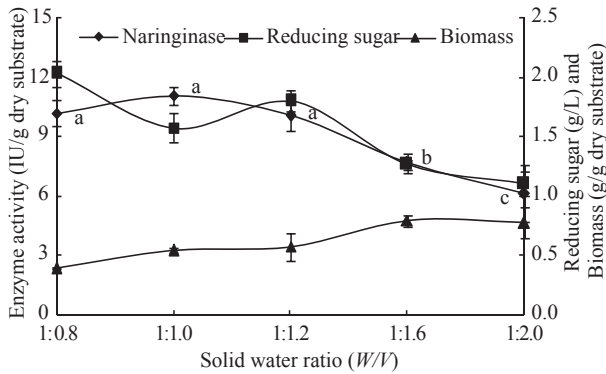


图1 固水比对固态发酵柚苷酶的影响

Figure 1 The effect of solid water ratio on the solid-state fermentation of naringinase

注: 图中柚苷酶曲线上的上标字母 a、b 和 c 表示不同固水比含量之间酶活力具有显著性差异($P<0.05$).

Note: The superscript letters a, b, c on naringinase curve indicate that there is a significant difference among content of various solid water ratio ($P<0.05$).

果如图2所示,装样量对柚苷酶的发酵具有重要的影响,当250 mL三角瓶装样量为4 g时柚苷酶的活力达到最大,酶活力为11.41 IU/g干物质;装样量为5 g仅次于,酶活力为11.10 IU/g干物质,此时的剩余还原糖含量较高,同时生物量含量比较低。随着装样量的增多,酶活力逐渐降低,该结果与王欣等^[20]报道一致,其原因是固体物料的厚度会影响培养基的透气性及氧气在培养基中的分布,从而影响微生物的生长和酶的产生。将各装样量条件下的酶活性测定值用SPSS 17.0作单因素方差分析,结果表明5种不同装样量产柚苷酶活力差异显著(显示 $F>F_{0.05}(4,10)=357.638$, $P<0.05$)。进行多重比较发现装样量4 g与5 g之间差异不显著,装样量8 g与10 g之间差异不显著,其余的差异达到显著水平。该结果说明柚苷酶固态发酵的适宜装样量范围在装样量4 g附近。

2.3 接种量对固态发酵产酶的影响

接种量试验结果如图3所示,在培养基中接种量为1 mL时柚苷酶的活力达到最大,酶活力为11.10 IU/g干物质。当培养基接种量大于或小于1 mL时,柚苷酶酶活力均下降。生物量和残糖的

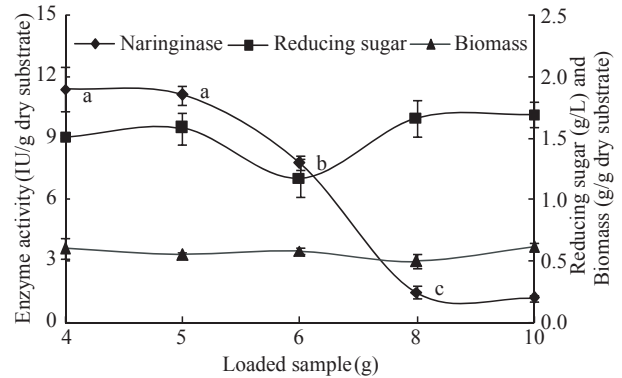


图2 装样量对固态发酵柚苷酶的影响

Figure 2 The effect of loaded sample on the solid-state fermentation of naringinase

注: 图中柚苷酶曲线上的上标字母 a、b 和 c 表示不同装样量之间酶活力具有显著性差异($P<0.05$).

Note: The superscript letters a, b, c on naringinase curve indicate that there is a significant difference among content of various loaded sample ($P<0.05$).

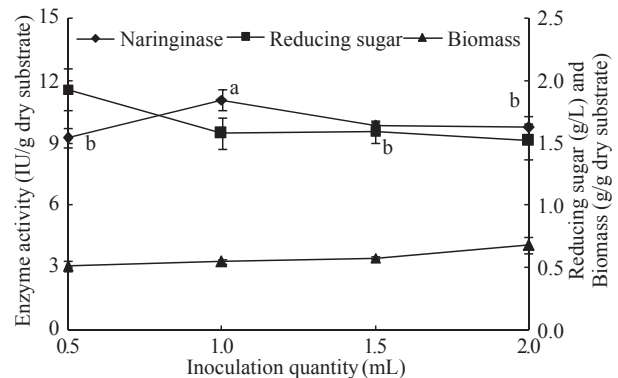


图3 接种量对固态发酵柚苷酶的影响

Figure 3 The effect of inoculation quantity on the solid-state fermentation of naringinase

注: 图中柚苷酶曲线上的上标字母 a 和 b 表示不同接种量之间酶活力具有显著性差异($P<0.05$).

Note: The superscript letters a, b, c on naringinase curve indicate that there is a significant difference among content of various inoculation quantity ($P<0.05$).

含量在接种量大于1 mL以后差别不大。相关研究表明,接种量太小,生物量不足,导致柚苷酶产量下降;接种量太大,导致发酵初期营养消耗过快和缺乏氧气,影响柚苷酶产量^[21]。该结果与Ramachandran等^[22]报道的“接种量过大或者过小,

均会影响发酵”的结论相一致。将各接种量条件下的酶活性测定值用 SPSS 17.0 作单因素方差分析, 结果表明 5 种不同接种量产柚苷酶活力差异显著(显示 $F > F_{0.05}(4,10) = 8.993$, $P < 0.05$)。进行多重比较发现, 接种量 0.5、1.5、2.0 mL 之间差异不显著, 但接种量为 1 mL 的柚苷酶产量显著高于其他接种量时所获得的柚苷酶产量。该结果说明在本试验条件下, 最适接种量应该为 1 mL。

2.4 温度对固态发酵产酶的影响

对棘孢曲霉发酵柚苷酶的培养温度进行试验, 结果如图 4 所示, 当培养温度为 30 °C 时柚苷酶的活力和生物量都达到最大值。在试验的温度范围内, 残糖含量随发酵温度升高不断降低。该结果与 Puri 等^[21]报道固态发酵产柚苷酶的最适温度为 30 °C 相一致。其原因是温度是调节控制发酵的最重要因素之一, 发酵温度过高或过低不仅影响菌体的生理状态, 还影响酶的分泌及酶变性的速度^[23]。将不同培养温度下的酶活性测定值用 SPSS 17.0 作单因素方差分析, 结果表明 3 种不同培养温度产柚苷酶活力差异显著(显示 $F > F_{0.05}(2,6) = 272.864$, $P < 0.05$)。进行多重比较发现, 温度 27、30、33 °C 之间差异达到显著水平。由于在 30 °C 时酶活性最

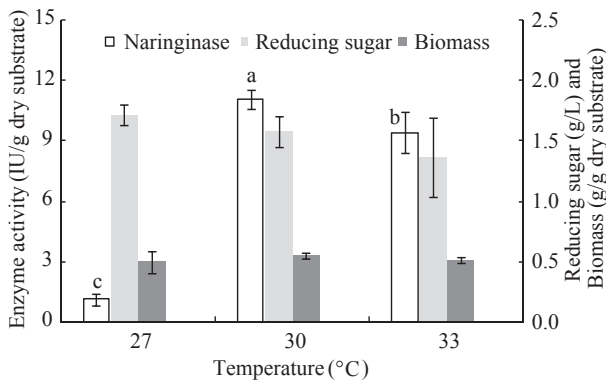


图 4 培养温度对固态发酵柚苷酶的影响

Figure 4 The effect of culture temperature on the solid-state fermentation of naringinase

注: 图中柚苷酶活力柱形图上的上标字母 a、b 和 c 表示不同温度之间酶活力具有显著性差异($P < 0.05$)。

Note: The superscript letters a, b, c on naringinase curve indicate that there is a significant difference among content of various temperature.

高, 因此固态发酵柚苷酶的适宜温度范围在 30 °C 附近。

2.5 正交试验优化发酵条件

在单因素试验结果的基础上, 选择固水比、装样量以及温度 3 个因素采用 $L_9(3^4)$ 表进行 3 因素 3 水平的正交实验, 以柚苷酶活力为研究指标。结果如表 2 所示, 各因素对柚苷酶活力影响的大小顺序为固水比(A) > 温度(C) > 装样量(B); 对正交试验结果进行极差分析可知, 最佳的配比为 $A_2B_1C_2$, 即固水比 1:1 (质量体积比), 装样量为 2.5 g, 温度 30 °C。经显著性分析可知(表 3), 固水比和温度对酶活力具有显著的影响, 而装样量对酶活力影响差异不显著; 由于在单因素试验中发现装样量 4 g 与 5 g 之间差异不显著(图 2), 装样量 8 g 与 10 g 之间差异不显著, 其余之间的差异达到显著水平, 考虑实际设备的利用率, 发酵过程中选择装样量为 5.0 g/250 mL 三角瓶比较合适。因此, 确定了固态发酵的优化条件为: 固水比 1:1 (质量体积比), 培养温度 30 °C, 250 mL 三角瓶中装样量 5.0 g。采用该条件进行验证试验, 柚苷酶活力为 8.19 IU/g 干物质(表 4), 比初始条件的柚苷酶活力(1.11 IU/g 干物质)提高 7.38 倍($P < 0.05$)。

与国内外柚苷酶研究的结果相比较, 本研究优化条件下获得的酶发酵产量高于王迪等^[15]报道的棘孢曲霉固态发酵 8 d 的柚苷酶酶活力(7.12 IU/g 干物质)、陈红等^[17]报道的棘孢曲霉固态发酵柚皮粉 8 d 产的柚苷酶酶活力(5.81 IU/g 干物质)、吴升山等^[24]报道的黑曲霉 DB056 液态发酵 3 d 产的柚苷酶酶活力(276 U/mL)和 Ni 等^[8]报道的黑曲霉 DB056 液态发酵 7 d 产的柚苷酶酶活力(2.5 IU/mL), 高于 Mendoza 等^[14]报道的丝状真菌利用橘皮及葡萄柚皮固态发酵 8 d 产的柚苷酶酶活力(2.58 IU/mL), 高于 Kumar^[25]报道的对柚皮苷诱导 *Aspergillus niger* 1344 发酵 7 d 产的柚苷酶酶活力(7.48 IU/mL), 与 Puri 等^[7]报道的木聚葡萄糖菌 MAK2 液态培养 36 h 产的柚苷酶酶活力(8.45 IU/mL)相当。这些结果表明本研究优化的固态发酵条件能大幅度提高柚苷酶的发

表 2 固态发酵柚苷酶的正交试验设计及结果
Table 2 Orthogonal experiments for improving naringinase production using solid-state fermentation

实验号 Number	A 固水比 Solid water ratio	B 装样量 Loaded sample	C 温度 Temperature	D 空列 Blank	柚苷酶活力 Enzyme activity (IU/g dry substrate)
1	1	1	1	1	1.86
2	1	2	2	2	4.15
3	1	3	3	3	0.05
4	2	1	2	3	11.12
5	2	2	3	1	8.03
6	2	3	1	2	4.75
7	3	1	3	2	3.17
8	3	2	1	3	3.61
9	3	3	2	1	6.69
K ₁	2.02	6.05	3.41	5.53	K _{A2} >K _{C2} >K _{B1}
K ₂	7.97	5.26	7.32	4.69	
K ₃	5.16	3.83	4.42	4.93	
R	5.95	2.22	3.91	0.84	

注: K₁: 水平 1 所对应的试验指标之和; K₂: 水平 2 所对应的试验指标之和; K₃: 水平 3 所对应的试验指标之和; R: 极差, 可以判断各因素对试验指标的影响主次。

Note: K₁: The sum of test index which is corresponding to the level one; K₂: The sum of test index which is corresponding to the level two; K₃: The sum of test index which is corresponding to the level three; R: Rang, it can be used to judge the primary and secondary influence of various factors on the test index.

表 3 正交试验结果因素显著性分析
Table 3 Significant analysis of the factors of the orthogonal experiment

因素 Factor	偏差平方和 Sum of Square	自由度 Degree of freedom	F 比 F-ratio	F 临界值 F critical value	显著性 Significance
固水比 Solid water ratio	53.10	2	47.58	19.00	*
装样量 Loaded sample	7.60	2	6.81	19.00	
温度 Temperature	24.76	2	22.19	19.00	*
误差 Error	1.12	2			

表 4 验证实验结果
Table 4 The result of Verification test

项目 Project	发酵条件 Fermentation conditions	柚苷酶活力 Enzyme activity (IU/g dry substrate)
初始条件 Initial medium	接种量: 1 mL, 固水比: 1:1 (质量体积比), 装样量: 5.0 g/250 mL 三角瓶, 培养温度: 27 °C	1.11 ^b
优化条件 Optimize medium	接种量: 1 mL, 固水比: 1:1 (质量体积比), 装样量: 5.0 g/250 mL 三角瓶, 培养温度: 30 °C	8.19 ^a

注: 本实验采用的培养基组成为: 柚皮粉: 5 g, 磷酸氢二铵: 10% (质量比), 酵母浸膏: 1.5% (质量比)。表中酶活力后面的上标字母 a 和 b 表示这两个酶活力具有显著性差异($P<0.05$)。

Note: Culture conditions: Pomelo peel: 5 g, Diammonium hydrogen phosphate: 10% (W/W), Yeast extract: 1.5% (W/W). The superscript letters a and b on enzyme activity indicate that there is a significant difference among content ($P<0.05$).

酵产率, 对于后续建立柚苷酶的高效发酵工艺提供了重要的工艺参数信息。

3 结论

在前期研究的基础上, 以柚皮为原料, 通过单因素试验和正交试验优化了棘孢曲霉利用柑橘加工副产物固态发酵产生柚苷酶的条件。结果表明固水比、装样量和培养温度对柚苷酶产量有显著性影响, 而接种量影响不显著; 通过控制固水比、装样量和发酵温度能够大幅度提高柑橘加工副产物固态发酵产生柚苷酶的产率。优化得到的固态发酵工艺为: 固水比 1:1 (质量体积比), 装样量 5 g/250 mL 三角瓶, 温度为 30 °C。在此条件下接种 1 mL 孢子悬浮液并发酵 8 d 后, 柚苷酶酶活力为 8.19 IU/g 干物质, 比初始培养基产柚苷酶活力提高 7.38 倍。

参考文献

- [1] Norouzi D, Hosseinzadeh A, Inanlou DN, et al. Production and partial purification of naringinase by *Penicillium decumbens* PTCC 5248[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2000, 16(5): 471-473
- [2] Ribeiro IA, Ribeiro MH. Kinetic modelling of naringin hydrolysis using a bitter sweet alfa-rhamnopyranosidase immobilized in k-carrageenan[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2008, 51(1/2): 10-18
- [3] Spagna G, Barbagallo RN, Martino A, et al. A simple method for purifying glycosidases: α -l-rhamnopyranosidase from *Aspergillus niger* to increase the aroma of Moscato wine[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2000, 27(7): 522-530
- [4] Roitner M, Schalkhammer T, Pittner F. Preparation of prunin with the help of immobilized naringinase pretreated with alkaline buffer[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1984, 9(5/6): 483-488
- [5] Kishi K. Production of naringinase from *Aspergillus niger*[J]. Kagaku to Kogyo (Chemistry and Industry, Japan), 1955, 29: 140
- [6] Ito T, Takiguchi Y. Naringinase production by *Cochiobolus miyabeanus*: Japan, 7014875[P]. 1970
- [7] Puri M, Kaur A, Sindh RS, et al. Response surface optimization of medium components for naringinase production from *Staphylococcus xylosus* MAK2[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010, 162(1): 181-191
- [8] Ni H, Chen F, Cai HN, et al. Characterization and preparation of *Aspergillus niger* naringinase for debittering citrus juice[J]. Journal of Food Science, 2012, 77(1): C1-C7
- [9] Wang Z, Mao FG. Breeding producing strains and Fermentation Condition of Naringinase[J]. Microbiology China, 1995, 22(1): 18-22 (in Chinese)
汪钊, 毛富根. 柚苷酶产生菌的选育及发酵条件研究[J]. 微生物学通报, 1995, 22(1): 18-22
- [10] Shanmugaparakash M, Kirthika J, Ragupathy J, et al. Statistical based media optimization and production of naringinase using *Aspergillus brasiliensis* 1344[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 64: 443-452
- [11] Shanmugaparakash M, Vinoth KV, Hemalatha M, et al. Solid-state fermentation for the production of debittering enzyme naringinase using *Aspergillus niger* MTCC 1344[J]. Engineering in Life Sciences, 2011, 11(3): 322-325
- [12] Abbate E, Palmeri R, Todaro A, et al. Production of a α -L-Rhamnosidase from *Aspergillus terreus* using citrus solid waste as inducer for application in juice industry[J]. Chemical Engineering Transactions, 2012, 27: 253-258
- [13] Mukund P, Belur PD, Saidutta M. Production of naringinase from a new soil isolate, *Bacillus methylotrophicus*: isolation, optimization and scale-up studies[J]. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 2014, 44(2): 146-163
- [14] Mendoza CA, Cuevas GL, Lizama UG, et al. Naringinase production from filamentous fungi using grapefruit rind in solid state fermentation[J]. African Journal of Microbiology Research, 2010, 4(19): 1964-1969
- [15] Wang D, Ni H, Li LJ, et al. Identification and characterization of *Aspergillus aculeatus* JMUdb058 for naringinase production[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2013, 53(7): 691-701 (in Chinese)
王迪, 倪辉, 李利君, 等. 一株棘孢曲霉的鉴定及其柚苷酶合成规律[J]. 微生物学报, 2013, 53(7): 691-701
- [16] Chen YL. Structure and characterization of the naringinase from *Aspergillus aculeatus* JMUdb058 for the Hydrolysis of Naringin[D]. Xiamen: Master's Thesis of Jimei University, 2012

- (in Chinese)
陈月龙. 棘孢曲霉 JMUdb058柚苷酶的结构及其水解柚皮苷的特性研究[D]. 厦门: 集美大学硕士学位论文, 2012
- [17] Chen H, Ni H, Li LJ, et al. Solid-state fermentation of pomelo peel using *Aspergillus aculeatus* for producing naringinase and its application of the enzyme in debittering citrus juice[J]. *Mycosystema China*, 2013, 32(6): 1034-1045 (in Chinese)
陈红, 倪辉, 李利君, 等. 棘孢曲霉固态发酵柚皮产柚苷酶及其在柑橘果汁脱苦中的应用[J]. *菌物学报*, 2013, 32 (6): 1034-1045
- [18] Zhang LX, Zhang TF, Li LY. *Biochemical Experiment Method and Technology*[M]. Beijing: Higher Education Press, 1997 (in Chinese)
张龙翔, 张庭芳, 李令媛. *生化实验方法和技术*[M]. 北京: 高等教育出版社, 1997
- [19] Wei PL, Cen PL, Sheng CQ. Comparison of three biomass estimation methods in solid-state fermentation[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2006, 25(1): 60-69 (in Chinese)
魏培莲, 岑沛霖, 盛春琦. 三种固态发酵生物量测定方法的比较[J]. *食品与生物技术学报*, 2006, 25(1): 60-69
- [20] Wang X, Cai YJ, Liao XR, et al. Effect of culture condition on laccase production of *Trametes versicolor* SYBC L3 by using solid state fermentation[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2009, 18(6): 174-179 (in Chinese)
王欣, 蔡宇杰, 廖祥儒, 等. 培养条件对 *Trametes versicolor* SYBC L3 固态发酵产漆酶的影响[J]. *西北农业学报*, 2009, 18(6): 174-179
- [21] Puri M, Kaur A, Barrow CJ, et al. Citrus peel influences the production of an extracellular naringinase by *Staphylococcus xylosum* MAK2 in a stirred tank reactor[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 89(3): 715-722
- [22] Ramachandran S, Singh SK, Larroche C, et al. Oil cakes and their biotechnological applications—a review[J]. *Bioresource Technology*, 2007, 98(10): 2000-2009
- [23] Xiao AF, Ni H, Wu SS, et al. Optimization of fermentation conditions for producing naringinase by *Aspergillus niger*[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2011, 11(6): 89-97 (in Chinese)
肖安凤, 倪辉, 吴升山, 等. 黑曲霉产柚苷酶的发酵条件优化[J]. *中国食品学报*, 2011, 11(6): 89-97
- [24] Wu SS, Cai HN, Su WJ, et al. Optimization of culture medium for producing α -rhamnosidase and naringinase by *Aspergillus niger* DB056[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2010, 10(4): 193-201 (in Chinese)
吴升山, 蔡慧农, 苏文金, 等. 黑曲霉 DB056 发酵 α -鼠李糖苷酶和柚苷酶培养基的优化研究[J]. *中国食品学报*, 2010, 10(4): 193-201
- [25] Kumar VV. Comparative studies on inducers in the production of naringinase from *Aspergillus niger* MTCC 1344[J]. *African Journal Biotechnology*, 2010, 9(45): 7683-7686

编辑部公告

《微生物学通报》英文刊名

《微生物学通报》之前使用的英文刊名“Microbiology”因在国际上有重名,造成了本刊在被国内外作者引用以及国外数据库收录时英文刊名的混乱,这大大影响了本刊在国际上的传播,也不利于对我刊引用数据的统计。经本刊编委会讨论,以及主办单位批准,本刊英文刊名自2010年起变更为“Microbiology China”,缩写为“Microbiol. China”,请各位作者、读者和数据库引用时注意使用。