

# 利用柚皮高效发酵生产柚苷酶的研究

郭小红<sup>1</sup>, 刘艳苓<sup>1</sup>, 姜泽东<sup>1,2,3</sup>, 李利君<sup>1,2,3</sup>, 朱艳冰<sup>1,2,3</sup>, 倪辉<sup>1,2,3</sup>, 蔡慧农<sup>1,2,3</sup>

(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] 以棘孢曲霉为菌种, 以磷酸氢二铵为氮源固态发酵柚皮生产柚苷酶, 结果表明, 在以柚皮为碳源和磷酸氢二铵为氮源的发酵体系中, 添加疏松剂和豆饼粉对柚苷酶发酵没有显著影响, 而磷酸氢二铵添加量和水分质量分数对柚苷酶合成具有显著影响. 当无水柚皮粉中磷酸氢二铵和水分质量分数分别为 32.4% 和 170.0% 时, 有利于提高柚苷酶发酵活力. 在接种量为 7.1%、发酵温度为 30 ℃ 的情况下发酵 6 d, 柚苷酶比合成速率与棘孢曲霉的生长速率符合模型  $Y_{\text{柚苷酶}} = 6.2677X - 0.0381$ , 其中  $Y$  代表柚苷酶的比合成速率,  $X$  代表比生长速率. 用 Davis 法测得柚苷酶活力为 94.61 IU/g, 酶发酵的培养基成本 ( $5 \times 10^{-5}$  元/IU) 远远低于其他同类研究, 酶的纯度远高于用豆饼粉为氮源所获得的酶纯度.

[关键词] 柚皮; 柚苷酶; 固态发酵; 成本估算; 比活力

[中图分类号] S 216.2

[文献标志码] A

## Utilization of Pomelo Peel for Effective Production of Naringinase During Solid-state Fermentation

GUO Xiao-hong<sup>1</sup>, LIU Yan-ling<sup>1</sup>, JIANG Ze-dong<sup>1,2,3</sup>, LI Li-jun<sup>1,2,3</sup>,  
ZHU Yan-bing<sup>1,2,3</sup>, NI Hui<sup>1,2,3</sup>, CAI Hui-nong<sup>1,2,3</sup>

(1. College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China;

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

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

**Abstract:** The naringinase production from *Aspergillus aculeatus* was investigated using  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  as nitrogen source in pomelo peel fermentation. The results showed that naringinase activity did not significantly increase by adding loosening agents and soybean meal powder, while the content of diammonium hydrogen phosphate and water had significant influence on naringinase production. The composition of the optimal medium included anhydrous citrus peel powder, the percentage rates for other ingredients in anhydrous citrus peel powder were as follow: diammonium hydrogen phosphate, 32.4%; water, 170.0%. By using the fermentation condition of inoculum size 7.1% and fermentation temperature 30 ℃, the naringinase fermentation was estimated to have a naringinase synthesis model  $Y_{\text{naringinase}} = 6.2677X - 0.0381$ , where  $Y$  represented the enzymatic specific synthetic rate and  $X$  was the specific growth rate. After fermentation for 6 days, naringinase activity attained 94.61 IU/g by Davis method analysis, higher than most research before reported. In addi-

[收稿日期] 2015-02-10

[修回日期] 2015-04-02

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(31271914); 福建省自然科学基金资助项目(2011J01225); 集美大学科研创新团队基金资助项目(2010A006)

[作者简介] 郭小红(1990—), 女, 硕士生, 从事食品生物技术研究. 通信作者: 蔡慧农(1957—), 男, 教授, 主要从事食品生物技术研究, E-mail: huinongcai@sina.com.cn.

tion, the medium cost was merely  $5 \times 10^{-5}$  Yuan/IU naringinase, much lower than those previous studies. Furthermore, the enzyme extract revealed higher purity than that in our previous study.

**Key words:** pomelo peel; naringinase; solid-state fermentation; cost estimation; specific activity

0 引言

柑橘类水果是世界上最大宗的水果, 无论是种植面积还是产量都远远大于其他种类的水果<sup>[1]</sup>, 它不仅可以直接鲜食, 还是果汁加工的主要原料. 柑橘类水果经人们食用或加工后约产生 40% 的副产物, 包括果皮和果渣<sup>[2]</sup>. 因此, 对柑橘加工副产物进行高值化利用是柑橘产业发展的重要研究领域. 传统研究表明, 柑橘加工副产物可用于提取果胶、膳食纤维、香精油和黄酮等<sup>[3]</sup>. 近年研究表明, 柑橘加工副产物也是发酵食品生产酶制剂的原料, 如可以作为果胶酶和纤维素酶的良好原料<sup>[4-5]</sup>.

柚苷酶 (EC 3. 2. 1. 40) 是  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶和  $\beta$ -D-葡萄糖苷酶的复合酶, 它不仅能够将柑橘类水果中具有苦味的柚皮苷水解成柚皮素, 达到脱苦的效果, 还可用于改善酿造酒香味以及制备抗生素、鼠李糖和普鲁宁等活性物质<sup>[6-9]</sup>, 是一种应用前景良好的新型酶制剂. 相关研究表明, 柑橘果皮中含有丰富的橙皮苷和柚皮苷, 能作为柚苷酶的诱导物<sup>[10-12]</sup>. Puri 等<sup>[13]</sup>发现, 添加柚皮粉可以提高 *Staphylococcus xylosus* MAK2 产柚苷酶; Mendoza-Cal 等<sup>[14]</sup>利用橙皮和柚皮作为发酵底物, 优选出产柚苷酶的菌株和发酵条件; 王迪等<sup>[15]</sup>和陈红等<sup>[16]</sup>发现用棘孢曲霉 (*Aspergillus aculeatus*) 固态发酵柚皮可高产柚苷酶. 这些研究结果表明, 作为柚苷酶发酵生产原料是柑橘加工副产物综合利用的一种新途径.

在前期研究<sup>[15-16]</sup>中, 本实验室分离得到了一株高产柚苷酶的棘孢曲霉菌株, 发现其在柑橘加工副产物中进行固态发酵可产生大量的柚苷酶. 酶发酵需要大量氮源, 相关研究<sup>[13,17]</sup>表明, 采用豆饼粉、蛋白胨等有机氮源对柚苷酶合成具有促进作用. 但是, 有机氮源含有丰富蛋白质, 加入到酶发酵体系中, 将大大增加酶分离纯化的难度. 最近, 笔者发现, 在固态发酵体系中, 用磷酸氢二铵作为氮源也可以高产柚苷酶, 与有机氮源相比, 不会因为引入杂蛋白质而导致柚苷酶分离纯化困难的问题. 因此, 为进一步优化用磷酸氢二铵作为氮源的柑橘加工副产物固态发酵体系, 进一步提高柚苷酶产量, 本研究拟建立一种高产、高纯度的柚苷酶发酵生产技术, 以柚子加工副产物柚皮为研究对象, 对固水比、疏松剂、磷酸氢二铵和豆饼粉添加量进行优化, 研究酶合成动力学, 分析酶生产培养基本成本及酶纯度, 为柚苷酶的高效发酵及柑橘副产物的高值化利用提供试验依据.

1 材料与方法

1.1 原料与药品

原料: 柚子外果皮由福建省国农农业发展有限公司提供, 经 50 ℃ 烘干、粉碎过 40 目筛备用.

药品: 柚皮苷和柚皮素 (纯度均  $\geq 98\%$ ) 购于中国陕西小草植物科技有限责任公司; 甲醇和乙腈 (均为色谱纯) 购于美国 TEDIA 公司; 其他试剂 (分析纯) 均购于上海国药集团有限公司.

1.2 菌种与培养基

棘孢曲霉 JMUdb058 菌株<sup>[18]</sup>由集美大学生物工程学院发酵工程研究室选育保存.

斜面培养基<sup>[19]</sup> (g/L):  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.5, KCl 0.5,  $\text{KNO}_3$  1.5, 无水  $\text{CaCl}_2$  0.1, 酵母膏 2.0, 柚皮苷 2.69, 琼脂 20, 初始 pH=6.0, 121 ℃ 灭菌 20 min.

固态发酵初始培养基: 在柚皮粉 (水分质量分数为 7.4%) 中加入磷酸氢二铵 10% (质量分数), 并加入与柚皮粉同质量的蒸馏水.

1.3 仪器设备

Waters 2695 高效液相色谱分析仪和 Symmetry C18 反相柱 (4.6 mm  $\times$  150 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ ) 购于美国 Waters 有限公司; SHZ-III D 型循环水式多用真空泵购于上海亚荣生化仪器厂; ALP-高压蒸汽灭

菌器购于日本 ALP 公司; SW - CJ - 2FD 型双人单面净化工作台购于苏州净化设备有限公司; 数显恒温水浴锅购于常州国华电器有限公司; 霉菌培养箱购于上海博迅实业有限公司医疗设备厂; pH211C 酸度计购于北京哈纳科仪科技有限公司; UV - 7200 型可见分光光度计购于尤尼柯仪器有限公司; 101 - 3B 型电热鼓风干燥箱购于上海市实验仪器总厂。

## 1.4 实验方法

### 1.4.1 菌种活化及发酵操作

将 4 ℃ 下贮藏的菌种接种于斜面培养基上, 28 ℃ 下培养 4 d 得到成熟孢子, 用 0.75% (体积分数) 无菌生理盐水洗下孢子, 转移至装有 50 mL 无菌生理盐水和无菌玻璃珠的三角瓶中, 将孢子充分打散后, 用无菌生理盐水调整其  $OD_{600}$  值至 2.0 (孢子  $1 \times 10^8$  个/mL), 即得孢子悬液。为了优化发酵培养基, 进行以下试验: 在 250 mL 三角瓶中装入用 5 g 柚皮粉加入其他成分配成的培养基, 灭菌冷却后按照总装样量的 7.1% 接种上述孢子悬液, 搅拌均匀后于 30 ℃ 静置培养 8 d。

### 1.4.2 加水量对柚皮固态发酵产酶的影响

保持发酵初始培养基的其他成分不变, 分别按照柚皮粉与水的质量比为 1:1、1:1.5、1:2、1:2.5 和 1:3 配制培养基, 接种发酵后, 测定酶活力、生物量以及还原糖含量。

### 1.4.3 疏松剂对柚皮固态发酵产酶的影响

以柚皮粉与水的质量比为 1:1.5 的比例混合, 分别加入以下 3 种成分配制培养基: (A) 按柚皮粉质量的 10% 添加  $(NH_4)_2HPO_4$ ; (B) 分别按柚皮粉质量的 10% 添加  $(NH_4)_2HPO_4$  和麸皮; (C) 分别按柚皮粉质量的 10% 添加  $(NH_4)_2HPO_4$  和甘蔗渣。其中, A 为对照, B 为添加 10% 麸皮作为疏松剂的培养基, C 为添加 10% 甘蔗渣为疏松剂的培养基。接种发酵后, 分别测定酶活力、生物量以及还原糖含量。

### 1.4.4 磷酸氢二铵添加量对发酵产酶的影响

固定培养基中柚皮粉和水的质量比为 1:1.5, 分别按照柚皮粉质量的 0%、10%、20%、30%、40% 和 50% 添加磷酸氢二铵, 配制培养基, 接种发酵后, 分别测定酶活力、生物量以及还原糖含量。

### 1.4.5 豆饼粉添加量对发酵产酶的影响

固定每份培养基中添加柚皮粉质量的 30%  $(NH_4)_2HPO_4$ , 以柚皮粉与水的质量比为 1:1.5 的比例加水, 分别按柚皮粉质量的 0%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5% 和 3.0% 添加豆饼粉, 配制培养基, 接种发酵后, 分别测定酶活力、生物量以及还原糖含量。

### 1.4.6 柚苷酶动态规律及酶合成动力学

采用优化后的培养基 (在柚皮粉中加入 30% (质量分数) 磷酸氢二铵, 并加入柚皮粉质量 1.5 倍的蒸馏水), 接种发酵, 每隔 2 d 取样一次, 分别测定各样品的酶活力、生物量及还原糖含量, 分析柚苷酶活性、生物量和还原糖含量随发酵时间变化的动态规律, 计算比速率, 并拟合柚苷酶合成及生长的关系动力模型。

### 1.4.7 柚苷酶活力测定

为了快速获得优化效果, 在大部分试验中, 参照 Ni 等<sup>[20]</sup> 的液相色谱法 (HPLC) 测定柚苷酶活力。取样后, 在每个发酵三角瓶中加入 100 mL pH = 5.0 的柠檬酸 (0.01 mol/L) - 磷酸氢二钠 (0.02 mol/L) 缓冲液, 30 ℃、200 r/min 振荡浸提 1 h, 用定性滤纸过滤, 滤液经 4 ℃、13000 r/min 离心 20 min 即得粗酶液。取 2 mL 柚皮苷标准液 (300  $\mu$ g/mL) 与 1.9 mL pH = 5.0 缓冲液混合, 50 ℃ 恒温保温 15 min, 加入 0.1 mL 粗酶液, 50 ℃ 反应 15 min, 置于 100 ℃ 加热 30 min 使酶失活, 迅速冷却后过 0.45  $\mu$ m 滤膜, 用 HPLC 测定反应液中柚皮苷和柚皮素含量的变化。空白对照以灭活的酶液代替酶溶液, 其他方法条件相同。液相色谱条件为: 流动相流速 0.4 mL/min, 柱温 35 ℃, 上样体积 20  $\mu$ L, 走样时间 20 min, 紫外检测波长 280 nm, 梯度洗脱程序见表 1。根据柚皮素的生产量计算柚苷酶活力, 酶活力单位 (IU) 定义为: 在 50 ℃、pH = 5.0 的条件下, 每分钟生成 1  $\mu$ mol 柚皮素

所需柚苷酶的量定义为一个柚苷酶活力单位.

表1 用于柚苷酶活力检测的高效液相色谱流动相梯度  
Tab.1 Mobile phase composition and gradient for measuring naringinase activity

时间 Time/min	流速 Flow rate /( mL · min <sup>-1</sup> )	w( 超纯水 Ultrapure water ) /%	w( 甲醇 Methanol ) /%	w( 乙腈 Acetonitrile ) /%
初始 Initial	0.4	62	12	26
7	0.4	62	12	26
9	0.4	15	35	50
15	0.4	15	35	50
17	0.4	62	12	26
20	0.4	62	12	26

为了对比本研究 and 国内外同类研究的酶产量水平, 在验证试验中, 除 HPLC 法外, 还参照 Puri 等<sup>[17]</sup>用 Davis 法测定柚苷酶活力, 具体操作是: 取 0.9 mL 0.05% 柚皮苷标准溶液 (pH =4.0 醋酸 – 醋酸钠缓冲溶液) 与 100 μL 粗酶液混合均匀, 置于 50 ℃ 恒温箱保温 60 min, 迅速吸取100 μL反应液并加入 90% 一缩二乙二醇 5 mL、4 mol/L NaOH 溶液 100 μL, 摇匀后于 28 ℃ 保温10 min, 在 420 nm 下测定吸光度值. 根据柚皮苷标准曲线计算反应后消耗的柚皮苷量, 以此为依据计算柚苷酶活力, 每个柚苷酶活力单位 (IU) 定义为在此反应体系下消耗 1 μmol 柚皮苷所需的柚苷酶量.

1.4.8 生物量测定

参考魏培莲等<sup>[21]</sup>提供的方法测定氨基葡萄糖含量, 用以计算固态发酵产物中的菌体量. 称取干发酵样品 0.300 g, 加 2 mL 60% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 25 ℃ 恒温箱浸泡 24 h, 加入 28 mL 蒸馏水稀释 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>至浓度为 1 mol/L, 置于 250 mL 三角瓶中, 沸水浴加热 1 h, 冷却后用 1 mol/L NaOH 中和至 pH =7.0, 定容至 100 mL. 取 2 mL 样液加 1 mL 乙酰丙酮试剂, 沸水浴加热 0.5 h, 冷却后加入 2 mL 无水乙醇、1 mL 对二氨基苯甲醛试剂振荡, 再加入 4 mL 无水乙醇, 60 ℃ 保温 1 h, 测定 OD<sub>530</sub>, 对照组将样液替换成水, 根据菌体干重对氨基葡萄糖含量的标准曲线计算生物量.

1.4.9 还原糖含量测定

参考张龙翔等<sup>[22]</sup>的方法, 取 1 mL 粗酶液用 3, 5 – 二硝基水杨酸比色法 (DNS 法) 测定其中还原糖含量.

1.4.10 蛋白质含量测定

参考陈钧辉等<sup>[23]</sup>的考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度, 配制 1 g/L 的牛血清标准蛋白, 分别取 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1 mL, 加入蒸馏水至 0.1 mL, 再分别加入 5 mL 配制好的考马斯亮蓝 G – 250, 震荡均匀后放置 5 min, 测定 595 nm 下的吸光度值. 取 0.1 mL 样品, 按上述方法测定吸光度值, 根据标准曲线计算酶液中的蛋白质含量.

1.4.11 发酵产物 SDS – PAGE 蛋白质电泳

分别配制 10% 分离胶和 5% 浓缩胶, 灌胶, 待胶凝固后, 取待测酶液 30 μL, 加入 4 × SDS 上样缓冲液 10 μL, 混匀, 沸水浴处理 5 min, 迅速冷却, 离心后取 12 μL 上清液加入到加样孔中, 往电泳槽中倒入 1 × SDS 缓冲液, 在电流 12 mA 的条件下电泳 120 min 后进行银染显色.

1.5 数据处理与分析

试验数据取 3 次平行测定的平均值, 应用 Excel 软件计算平均值和标准偏差, 应用 SPSS 软件对结果进行差异显著性分析 (P < 0.05).



2 结果与分析

2.1 柚皮粉和水的比例对发酵产酶的影响

在固态发酵过程中，初始含水量是影响发酵成败的关键因素之一。据相关研究报道<sup>[24]</sup>，含水量过高，不仅会降低氧的扩散和交换，而且稀释了营养物质，从而影响菌体生长以及产酶；当含水量较低时，培养基中糖浓度较高，导致产生营养物阻遏并增大了培养基渗透压，也会影响微生物生长和产酶量。

图 1 显示，还原糖含量随水的比例增加而下降；生物量和柚苷酶活力随水的比例增加先增加后减少，当柚皮粉和水的质量比为 1:2.5 时，生物量达到最大；当柚皮粉和水的质量比为 1:1.5 时，柚苷酶活力达到最大。因此，在下面的试验中按柚皮粉和水 1:1.5 的质量比加水。

2.2 疏松剂对发酵产酶的影响

柚皮中含有大量的果胶<sup>[25]</sup>，灭菌后容易导致培养基黏度增大及通透性降低而影响微生物生长。甘蔗渣和麸皮含有丰富的纤维素，能增加固态发酵培养基的疏松透气性，提高菌丝体生长<sup>[26]</sup>。在柚子果皮中添加一定量的甘蔗渣和麸皮（增加柚苷酶固态发酵培养基的通透性）进行发酵试验，结果（见图 2）显示，添加麸皮和甘蔗渣后产酶量下降，生物量和还原糖含量变化不大。进一步进行方差分析发现，添加疏松剂后对产酶量、还原糖、生物量含量均没有显著性影响，出现该现象的可能原因是添加疏松剂后培养基总量增加，但柚皮粉在培养基中的含量降低了，营养物质降低与通气量增加的效应相互抵消。针对该现象，在后续发酵中不添加疏松剂。

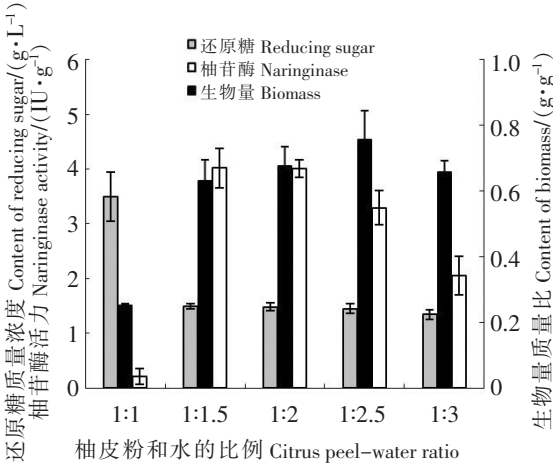


图 1 柚皮粉和水的比例对柚苷酶固态发酵的影响

Fig.1 Effect of citrus peel-water ratio on the solid-state fermentation of naringinase

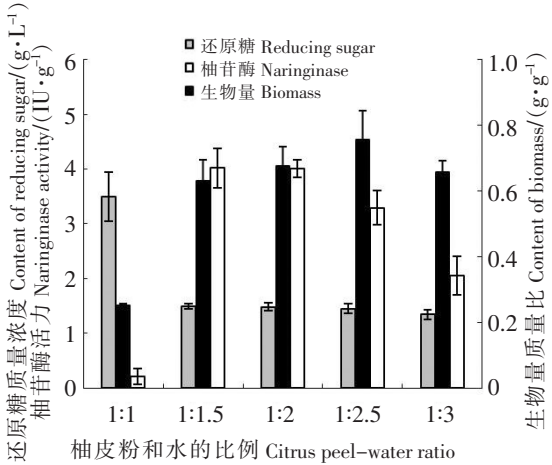


图 2 添加疏松剂对柚苷酶固态发酵的影响

Fig.2 Effect of loosening agents on solid-state fermentation of naringinase

2.3 磷酸氢二铵对发酵产酶的影响

前期研究<sup>[27]</sup>结果表明，以铵盐或尿素为氮源，可以消除葡萄糖、果糖和淀粉等对柚苷酶发酵的分解代谢阻遏作用，从而提高柚苷酶的发酵产量。考虑到铵盐利用后残留的磷酸盐可能影响培养基 pH 值，从而影响柚苷酶的发酵，因此，研究了磷酸氢二铵的添加量对柚苷酶固态发酵的影响。结果如图 3 所示，当磷酸氢二铵添加量从 0 增加到 10% 柚皮粉时，还原糖迅速降低，生物量大幅度上升，之后还原糖含量随磷酸氢二铵添加量增大趋于平稳，而生物量随添加量增大而降低。当磷酸氢二铵为 30% 柚皮粉时，柚苷酶活力达到最大，之后随着添加量的增大而减少。该现象可能是由于棘孢曲霉的生长及酶分泌所需的最适 pH 值不一致所引起的；当磷酸氢二铵添加量为 10% 柚皮粉时，其培养基的 pH 值最适合于微生物生长，此时营养物质大量用于生长菌体，体现出生物量最大，而酶活力不是最大；当磷酸氢二铵添加量为 30% 柚皮粉时，培养基的 pH 值最适于酶合成，营养物质大量流向酶蛋白合成，体现出生物量减小，而酶合成量最大。由于本研究是以提高柚苷酶产量为试验目的，因此后期

试验添加磷酸氢二铵的量为 30% 柚皮粉.

2.4 豆饼对发酵产酶的影响

豆饼粉来源稳定, 价格低廉, 含有丰富的微量氨基酸、蛋白质、维生素等营养物质, 是发酵工业中常用的氮源及生长因子. 大量添加豆饼粉作为氮源, 由于其中淀粉分解 (产生葡萄糖) 会对诱导酶产生阻遏<sup>[17,28]</sup>, 但相关研究表明豆饼粉是柚苷酶发酵的良好氮源<sup>[13]</sup>, 但添加豆饼粉会导致发酵产物中杂蛋白质含量偏高, 影响对酶进行分离纯化. 本研究采用磷酸氢二铵为氮源配制培养基, 并在其中添加不同量豆饼粉进行发酵, 结果显示, 豆饼粉的添加量对生物量、还原糖含量和柚苷酶活力的影响不明显 (见图 4). 用 SPSS 17.0 软件进行方差分析, 进一步证实了添加豆饼粉对生物量、还原糖含量和柚苷酶活力均无显著性影响. 该结果与相关研究<sup>[13]</sup>报道在培养基中添加豆饼粉可以大幅度提高柚苷酶产量明显不同, 原因主要有: 1) 磷酸氢二铵和豆饼粉都是柚苷酶发酵优良氮源, 在培养基中含有充足磷酸氢二铵的情况下, 再补充氮源豆饼粉已经没有必要; 2) 柑橘副产物中可能含有丰富的生长因子, 不需要额外补充豆饼粉、蛋白胨等物质就能提供棘孢曲霉生长及其酶合成需要的生长因子. 考虑到本研究柚皮粉含有 7.4% 的水分, 因此优化培养基的组成为: 在无水柚皮粉中添加 32.4% 的磷酸氢二铵和 170% 的水 (此比例均为与无水柚皮粉的质量比).

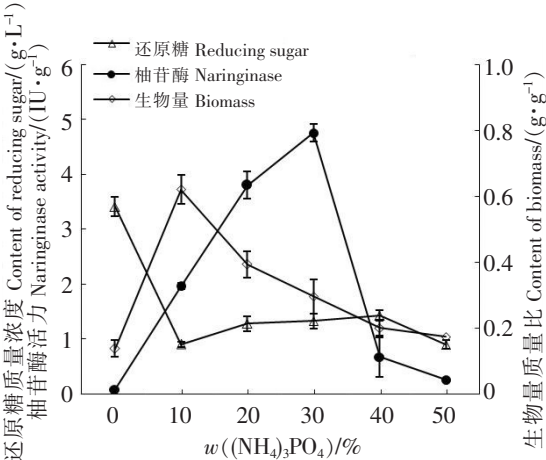


图 3 磷酸氢二铵添加量对柚苷酶固态发酵的影响

Fig.3 Effect of addition of  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  on solid-state fermentation of naringinase

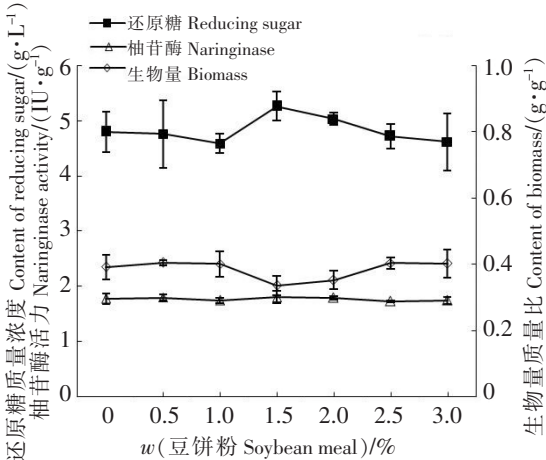


图 4 豆饼粉添加量对柚苷酶固态发酵的影响

Fig.4 Effect of addition of soybean meal on solid-state fermentation of naringinase

2.5 柚苷酶固态发酵的动态规律及酶合成动力学

如图 5a 所示, 随发酵时间增加, 还原糖含量逐渐降低, 生物量和酶活性先快速增加后趋于平稳; 生物量和酶活力曲线变化趋势高度一致, 发酵 6 d 时, 生物量和柚苷酶活性同时出现最大值. 图 5b 显示, 比生长速率  $X$  (以菌体干重的含量表征, 单位为  $\text{d}^{-1}$ ) 和柚苷酶的比合成速率  $Y$  (单位为  $\text{IU}/(\text{g}\cdot\text{d})$ ) 随发酵时间的增加呈现同步降低趋势. 进一步拟合柚苷酶比合成速率与棘孢曲霉比生长速率的关系, 得到它们的回归关系模型为  $Y_{\text{柚苷酶}} = 6.2677 X - 0.0381$ . 该模型显示, 棘孢曲霉柚苷酶的合成似乎符合部分生长关联型模型, 每生长 1 g 的菌体就会合成约 6.27 IU 的柚苷酶, 在菌体生长停止后, 柚苷酶以  $0.038 \text{ IU}/(\text{g}\cdot\text{d})$  的速度缓慢下降. 进一步分析发现, 0.0381 仅相当于 6.2677 的 0.61%, 而图 5a 显示, 菌体生物量与酶活力测定的误差均在 5% 左右, 该分析结果说明 0.0381 这个数值可能是由于测量误差引起, 而不是实际差异引起的, 由此推测该柚苷酶合成属于生长关联型. 相关研究<sup>[29]</sup>表明, 产物合成生长关联型的特征是产物合成曲线与生长曲线高度一致. 图 5 中棘孢曲霉生物量和柚苷酶活性曲线随时间变化趋势的高度一致性也进一步证明该柚苷酶合成属于生长关联型, 该结果与陈红等<sup>[27]</sup>用豆饼粉为氮源研究的柚苷酶合成动力学规律相一致, 但与张晨等<sup>[29]</sup>研究结论 (B04 菌株产柚苷酶的合成属于非生长关联型) 不一致, 其主要原因可能是菌株、发酵条件及发酵状态不同所致.

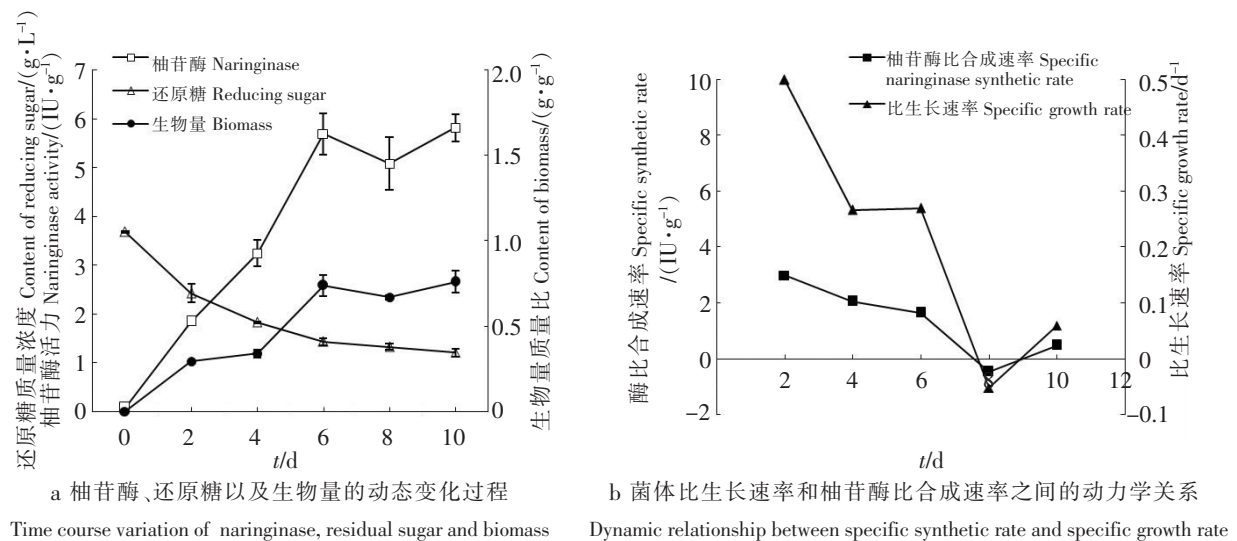


图 5 柚苷酶合成的动态规律及酶合成动力学分析

Fig.5 Dynamic process and kinetic analysis of naringinase during production

2.6 用柚皮为碳源、磷酸氢二铵为氮源发酵柚苷酶的成本分析

目前，国内柚苷酶的研究都停留在实验室研究阶段，商品酶制剂在国内没有生产，市场上尚属空白。国外只有美国、日本等少数国家生产，价格昂贵，如 2009 年美国 Sigma 公司出品的柚苷酶制剂（酶活力约为 300 U/g），价格为 1623.9 元/kg，日本田边制药生产的柚苷酶制剂（酶活力为 150 U/g）售价高达 2600 元/kg，因此限制了柚苷酶在食品工业中的应用。本研究柚苷酶活力达到 94.61 IU/g（用 Davis 法测定），高于 Mendoza – Cal（2.58 U/mL）<sup>[14]</sup>、张晨等（342 U/mL）<sup>[29]</sup>报道的酶活力，同样高于用王迪<sup>[15]</sup>和陈红<sup>[16]</sup>的方法发酵所获得的柚苷酶活力（见表 2）。计算柚苷酶发酵培养基成本，并与各报道提供的柚苷酶生产培养基成本进行对比，结果（见表 2）显示，本研究生产柚苷酶的成本仅为 5 × 10<sup>-5</sup>元/IU，远远低于本实验室前期研究<sup>[15-16]</sup>和国内同类研究<sup>[14,29-30]</sup>的生产培养基成本。

表 2 柚苷酶生产成本估算

Tab. 2 Cost evaluation for naringinase production

相关研究 Related research	报道或测定活力 Reported or determined activity	转换成本研究 酶活定义后的 酶活力 Converted activity	发酵体积 或质量 Volume or mass of fermentation	发酵体系总酶 活力 Total enzyme activity of fermentation system/IU	发酵原料 总成本/元 Cost of materials /Yuan	拟核算价格 /(10 <sup>-3</sup> 元· IU <sup>-1</sup> ) Accounting prices /(10 <sup>-3</sup> Yuan· IU <sup>-1</sup> )
LAI CD <sup>[30]</sup>	955.6 U/mL* (Davis method)	1.65 U/mL	30 mL	49.38	0.055	1.11
MENDOZA- CAZ A <sup>[14]</sup>	2.58 U/mL# (Davis method)	2.58 U/mL	75 mL	193.50	0.261	1.35
ZHANG C <sup>[29]</sup>	342.00 U/mL* (Davis method)	0.59 U/mL	40 mL	23.56	0.394	16.72
WANG DI <sup>[15]</sup>	80.01 IU/g# (Davis method)	80.01 IU/g	1000 g	80010.00	6.800	0.08
CHEN H	61.42 IU/g# (Davis method)	61.42 IU/g	5 g	307.10	0.050	0.16
本研究 This research	94.61 IU/g# (Davis method)	94.61 IU/g	5 g	473.05	0.025	0.05
日本田边制药 Tian Bian pharma- ceutical in Japan	150.00 U/g	—	—	—	—	17.33
美国 Sigma 公司 Sigma in USA	300.00 U/g	—	—	—	—	5.41

说明：\* 表示酶活力单位定义为水解 1 μg 柚皮苷所需的酶量；# 表示酶活力单位定义为水解 1 μmol 柚皮苷所需的酶量。  
Notes：\* Enzyme activity was defined as 1 μg of naringin hydrolyzed under assay condition；# Enzyme activity was defined as 1 μmol of naringin hydrolyzed under assay condition.

2.7 用柚皮为碳源、磷酸氢二铵为氮源发酵柚苷酶的纯度分析

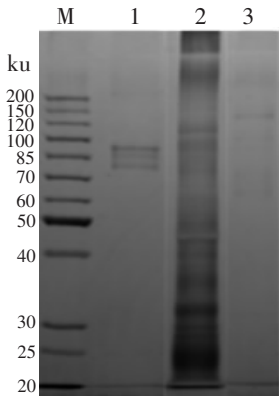
酶的纯度是影响酶工业化制备及应用的关键因素之一, 发酵产物中酶的纯度越高, 提纯应用的可能性也越高. 由表 3 可得, 添加磷酸氢二铵作为氮源, 酶的比活力为 16.47 IU/mg, 远高于以豆饼粉为氮源所获得的比活力 (7.01 IU/mg). 分别浸提以磷酸氢二铵和豆饼粉为氮源获得的粗酶液, 稀释到相同的酶活性, 进行 SDS - PAGE 电泳分析 (见图 6) 发现, 以豆饼粉为氮源的发酵产物中杂蛋白质明显比用磷酸氢二铵为氮源发酵的粗酶液多. 这两个结果说明, 用磷酸氢二铵为氮源发酵所获得的柚苷酶比用豆饼粉为氮源发酵的柚苷酶的纯度高, 有利于进一步纯化利用.

表 3 两种培养基对产柚苷酶的影响

Tab.3 Comparison of two media for the production of naringinase by *A. aculeatus*

培养基 Media	总蛋白量 Total protein /( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )	Davis 法测柚苷酶活力 Naringinase activity /( $\text{IU} \cdot \text{g}^{-1}$ )	比活力 Specific activity /( $\text{IU} \cdot \text{mg}^{-1}$ )
I	574.46 ± 158.90	94.61 ± 10.08	16.47
II	876.32 ± 99.92	61.42 ± 12.32	7.01

说明: I—柚皮粉 5 g, 磷酸氢二铵 1.5 g; II—柚皮粉 5 g, 豆饼粉 1.5 g.  
Notes: I—citrus peel 5 g, diammonium hydrogen phosphate 1.5 g; II—citrus peel 5 g, soybean meal 1.5 g.



说明: M—标准蛋白; 1—实验室前期纯化后的柚苷酶; 2—添加柚皮粉 5 g, 豆饼粉 1.5 g 发酵的酶液; 3—添加柚皮粉 5 g, 磷酸氢二铵 1.5 g 发酵的酶液.  
Notes: M—protein marker; 1—purified naringinase in previous study; 2—medium with citrus peel powder 5 g, soybean meal 1.5 g; 3—medium with citrus peel 5 g, diammonium hydrogen phosphate 1.5 g.

图 6 不同粗酶液的 SDS-PAGE 图

Fig.6 SDS-PAGE of different crude enzymes

3 结论

- 1) 初步优化获得以柚皮为碳源, 磷酸氢二铵为氮源产柚苷酶的培养基为: 在无水柚皮粉中添加质量分数 32.4% 磷酸氢二铵和 170.0% 的水.
- 2) 用柚皮为碳源, 磷酸氢二铵为氮源培养棘孢曲霉, 柚苷酶合成符合模型  $Y_{\text{柚苷酶}} = 6.2677 X - 0.0381$ , 属于生长关联型.
- 3) 用柚皮为碳源, 磷酸氢二铵为氮源培养棘孢曲霉, 柚苷酶活力与同类研究报道相当, 酶发酵成本远远低于其他同类研究, 酶纯度高于用豆饼粉为氮源所获柚苷酶的纯度.

[ 参 考 文 献 ]

[1] 蒋业裕. 我国柑橘产业发展现状及对广西的启示 [J]. 现代农业科技, 2010(14): 377-379.  
[2] 方政, 高彦祥. 柑橘加工副产物中有效成分开发利用的研究进展 [J]. 中国食品添加剂, 2005(4): 9-13.  
[3] BAMPIDIS V A, ROBINSON P H. Citrus by-products as ruminant feeds: a review [J]. Animal Feed Science Technology, 2006, 128(3/4): 175-217.  
[4] DARAH I, TAUFIQ M M J, LIM S H. Pomelo *Citrus grandis* (L.) osbeck peel as an economical alternative substrate for fungal pectinase production [J]. Food Science and Biotechnology, 2013, 22(6): 1683-1690.  
[5] TANAKA M, TAKAMIZU A, HOSHINO M, et al. Extraction of dietary fiber from *Citrus junos* peel with subcritical water [J]. Food and Bioproducts Processing, 2012, 90(2): 180-186.  
[6] SANKYO. Preparation of antibiotic chloropolysporin-C: Japanese, 63146797 [P]. 1988.  
[7] MANZANARES P, OREJAS M, GIL J V, et al. Construction of a genetically modified wine yeast strain expressing the *Aspergillus aculeatus* rhaA gene, encoding an  $\alpha$ -L-rhamnosidase of enological interest [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(12): 7558-7562.  
[8] SAERENS K, BOGAERT I V, SOETAERT W, et al. Production of glucolipids and specialty fatty acids from sophorolipids by *Penicillium decumbens* naringinase: optimization and kinetics [J]. Biotechnology Journal, 2009, 4(4): 517-524.  
[9] GIAVASIS I, HARVEY L M, MCNEIL B. Gellan gums [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2000, 20(3): 177-



211.

- [10] PURI M, BANERJEE U C. Production, purification, and characterization of the debittering enzyme naringinase [J]. *Biotechnology Advances*, 2000, 18(3): 207-217.
- [11] PICHAIYONGVONGDEE S, HARUENKIT R. Comparative studies of limonin and naringin distribution in different parts of pummelo [*Citrus grandis* (L.) Osbeck] cultivars grown in Thailand [J]. *Kasetsart Journal Natural Science*, 2009, 43(1): 28-36.
- [12] FUKUMOTO J, OKADA S. Naringinase production by fermentation [J]. *Japanese Patent*, 1973, 7(306): 554.
- [13] PURI M, KAUR A, BARROW C J, et al. Citrus peel influences the production of an extracellular naringinase by *Staphylococcus xyloso* MAK2 in a stirred tank reactor [J]. *Application Microbiology and Biotechnology*, 2011, 89(3): 715-722.
- [14] MENDOZA-CAL A, CUEVAS-GLORY L. Naringinase production from filamentous fungi using grapefruit rind in solid state fermentation [J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2010, 4(19): 1964-1969.
- [15] 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] 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.
- [17] PURI M, BANERJEE A, BANERJEE U C. Optimization of process parameters for the production of naringinase by *Aspergillus niger* MTCC 1344 [J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40(1): 195-201.
- [18] CHEN Y L, NI H, CHEN F, et al. Purification and characterization of a naringinase from *Aspergillus aculeatus* JMudb058 [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(4): 931-938.
- [19] PATIL S R, DAYANAND A. Optimization of process for the production of fungal pectinases from deseeded sunflower head in submerged and solid-state conditions [J]. *Bioresource Technology*, 2006, 97(18): 2340-2344.
- [20] NI H, CHEN F, CAI H, et al. Characterization and preparation of *Aspergillus niger* naringinase for debittering citrus juice [J]. *Journal of Food Science*, 2012, 77(1): 1-7.
- [21] 魏培莲, 岑沛霖, 盛春琦. 3 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): 60-63.
- [22] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术 [M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 1997.
- [23] 陈钧辉, 陶力, 朱婉华, 等. 生物化学实验 [M]. 北京: 科学出版社, 2007: 63-64.
- [24] 汪钊, 毛富根. 柚苷酶固体发酵及消除桔子汁苦味的研究 [J]. *食品科学*, 1996, 17(6): 17-19.
- [25] 徐泽敏, 殷涌光. 柚皮的综合利用 [J]. *食品研究与开发*, 2007, 128(1): 176-178.
- [26] 武宽, 刘云龙, 徐同, 等. 木霉生物农药的制备工艺: 中国, CN101028006 [P]. 2007-09-05.
- [27] 陈红, 倪辉, 肖安风, 等. 一种柚苷酶发酵培养基: 中国, CN103060287A [P]. 2013-04-24.
- [28] VINOTHKUMAR D, REVATHIBABU P K S. Optimization of fermentation parameters for enhanced production of naringinase by soil isolate *Aspergillus niger* VB07 [J]. *Food Science and Biotechnology*, 2010, 19(3): 827-829.
- [29] 张晨, 刘志伟, 郑彦彤, 等. 产柚苷酶菌株 B04 的分离及产酶特性研究 [J]. *工业微生物*, 2007, 37(5): 38-41.
- [30] 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 [J]. *江西农业大学学报*, 2005, 27(5): 759-763.

(责任编辑 马建华 英文审校 曹敏杰)