

熊进,何顺荣,吴鑫颖,等.黑曲霉液态发酵制备没食子酸的工艺研究[J].江苏农业科学,2015,43(5):250-253.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.05.083

# 黑曲霉液态发酵制备没食子酸的工艺研究

熊进<sup>1,2</sup>,何顺荣<sup>1,2</sup>,吴鑫颖<sup>1,2</sup>,邱树毅<sup>1,2</sup>,简辉<sup>1,2</sup>,马威<sup>1</sup>

(1. 贵州大学酿酒与食品工程学院,贵州贵阳 550025; 2. 贵州省发酵工程与生物制药重点实验室,贵州贵阳 550025)

**摘要:**采用高效液相色谱测定黑曲霉 B0201 制备的没食子酸,对底物添加方式、底物浓度、转化方式及转化条件等因素进行研究。最终确定较佳工艺条件为:用五倍子直接作为产酶的诱导物及转化底物,底物分 4 次添加,每次间隔 12 h,最终总浓度达 6%,转化过程中搅拌速度优化为 200 r/min,温度为 35 ℃,没食子酸浓度可达到 39.78 mg/mL,转化率达最大值 73.05%。在对菌丝重复转化试验过程中补充营养物质及调节 pH 值均能提高转化产物浓度。

**关键词:**黑曲霉;液态发酵;五倍子;生物转化;没食子酸;工艺优化

**中图分类号:** TQ920.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)05-0250-04

没食子酸(gallic acid,GA)又名五倍子酸,为白色或淡黄色针状结晶<sup>[1]</sup>,化学性质活泼,能形成多种酯类、酰卤和酰胺,可以通过氧化耦合反应制得鞣花酸、脱氢二鞣花酸等联苯型化合物<sup>[2]</sup>,是一种重要的精细化学品,广泛应用于矿产、化工、农业、食品、制药等行业<sup>[3]</sup>。目前,没食子酸的制备方法可分为化学法与生物法,工业上没食子酸主要是由化学法经酸或碱水解五倍子制得,其工艺存在对环境污染严重、副反应多、杂质含量较高等问题。而生物法因具有反应条件相对温和、对设备要求低、副产物较少、对环境友好以及后续提纯工艺较为简单等诸多优点,近年来受到国内外相关学者的广泛关注<sup>[4-5]</sup>。五倍子富含单宁酸,研究表明单宁酸诱导黑曲霉液态发酵产胞内单宁酶,单宁酶可高效、专一、定向裂解单宁酸分子,生成没食子酸<sup>[6-8]</sup>;故直接将五倍子投入发酵系统中,利用菌体内的单宁酶将之转化为没食子酸。当转化趋于平衡后,分离菌丝体并洗涤,可反复转化五倍子制备没食子

酸。此过程不需要将酶从菌体中分离,将酶的生成与五倍子单宁酸转化没食子酸的过程相耦合,简化了没食子酸的生物转化过程。与酶法转化相比,此方法转化底物浓度有很大倍数的提高,产物浓度也有很大提高。同时,分光光度法与高效液相色谱法相比,测定没食子酸是前者由于单宁酸和没食子酸结构相近,最大吸收峰波长也较近产生累加效应,因此产生的干扰比较大,实际测量值会偏大。本试验通过对底物添加方式、底物浓度、转化方式及转化条件等因素进行研究,以提高没食子酸相对于五倍子中单宁酸的转化率,为生物法制备没食子酸的工业化应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料与仪器

1.1.1 菌株 黑曲霉 B0201 (*Aspergillus niger*),由笔者所在实验室保藏。

1.1.2 培养基 斜面培养基:察氏培养基;液态基础培养基:蔗糖 2.0 g,NaNO<sub>3</sub> 0.2 g,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 3H<sub>2</sub>O 0.1 g,KCl 0.05 g,MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.05 g,FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.001 g,溶于 100 mL 蒸馏水中,pH 值自然。

1.1.3 主要试剂 五倍子,购于贵州省遵义市余庆县;单宁酸 C<sub>76</sub>H<sub>32</sub>O<sub>46</sub>,分析纯,购于天津福晨化学试剂厂;没食子酸 C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub> · H<sub>2</sub>O,分析纯,购于贵州迪大生物有限公司,其他化学试剂均为国产分析纯。

收稿日期:2015-03-02

基金项目:国家“863”计划(编号:2014AA021802)。

作者简介:熊进(1989—),男,硕士研究生,研究方向为制药与发酵工艺。E-mail:591538059@qq.com。

通信作者:吴鑫颖,硕士,副教授,研究方向为酶工程及发酵工艺,E-mail:2513331885@qq.com;邱树毅,博士,教授,研究方向为应用生物技术,E-mail:syqiu@gzu.edu.cn。

## 参考文献:

- [1]王贺祥.食用菌学[M].北京:中国农业大学出版社,2004:25-31.
- [2]沈雪亮,夏黎明.产纤维素酶细菌的筛选及酶学特性研究[J].林产化学与工业,2002,22(1):47-51.
- [3]潘迎捷,伯海英,沈宗英.香菇单核原生质体的制备[J].食用菌,1992(3):14-15.
- [4]樊晓琳,叶绿笋,边银丙.双孢蘑菇菌株 As2796 的提纯复壮[J].食用菌学报,2010,17(3):20-24.
- [5]赵爽,陈杰,许峰,等.北京地区几种人工栽培食用菌生物指标的测定[J].江苏农业科学,2013,41(9):293-295.

- [6]姜心,陈伟,周波,等.纤维素酶活测定影响因素的研究[J].食品工业科技,2010,23(5):65-68.
- [7]谭琦,潘迎捷,汪昭月,等.原生质体单核化技术在香菇育种中的应用[J].园艺学报,1999,26(4):271-272.
- [8]谢天娇.杏鲍菇液体培养微量元素对其菌丝生物量的影响[J].安徽农业科学,2012,40(21):10757-10758.
- [9]赵爽,刘宇,许峰,等.姬松茸 4 个品种菌丝体的生物酶活性测定[J].中国食用菌,2010,29(3):32-33.
- [10]吴小平,刘方,谢玉荣,等.灵芝原生质体单核化杂交育种[J].中国农学通报,2009,25(23):64-69.
- [11]江玉姬,吴文礼,谢宝贵.金针菇的原生质体单核化[J].福建农业大学学报:自然科学版,2001,30(1):44-47.

1.1.4 主要试验仪器 722S 分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);FA-1004 电子天平(上海良平仪器仪表有限公司);MJ-160B-II 霉菌培养箱(上海跃进医疗器械厂);Anke TDL-5 离心机(上海安亭科学仪器厂);XMTD-204 双功能蒸汽振荡器(金坛市文华仪器制造有限公司);岛津 LC-10AVP 高效液相色谱仪(岛津有限公司)。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 产酶

1.2.1.1 菌种的活化 将保存的黑曲霉 B0201 转接到察氏斜面培养基后,放入霉菌培养箱中,于 30 ℃ 条件下培养 3 ~ 4 d 后,保存备用。

1.2.1.2 种子悬浮液的制备 斜面试管加入 10 mL 生理盐水,洗脱并充分振荡、稀释后获得  $10^8$  个/mL 左右的孢子悬浮液。

1.2.1.3 黑曲霉 B0201 发酵产酶 在灭菌的液态基础培养基中添加 4% 的五倍子,接种量 2%,装液量 100 mL/250 mL,摇匀后用纱布封口置于 140 r/min、30 ℃ 的摇床中培养 72 h,完成发酵产酶过程。

1.2.2 没食子酸的制备 在产酶系统中直接添加底物转化五倍子单宁酸制备没食子酸。

### 1.2.3 单宁酸转化率的测定

#### 1.2.3.1 没食子酸相对于单宁酸的转化率计算

$$\text{转化率} = \frac{\text{没食子酸的生成量}}{\text{五倍子中单宁酸的投入量}} \times 100\%。$$

1.2.3.2 单宁酸的测定 参考国家标准 GB/T 15686—1995,用紫外分光光度法测定单宁酸含量<sup>[9]</sup>。(1)单宁酸标准曲线的绘制<sup>[10-11]</sup>。配制不同浓度的标准溶液,再加入 2.0 mL 磷钼钨酸试液和 10.0 mL 饱和碳酸钠溶液,定容到 50 mL,静置 30 min 后于 4 000 r/min 离心 5 min,720 nm 下光谱扫描。以吸收峰值  $D$  为纵坐标,样品浓度  $C$  (mg/mL) 为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程为:  $D = 1.325C + 0.113$ ,  $r = 0.9990$ 。(2)五倍子中单宁酸含量的测定。取 10.0 g 五倍子于三角瓶中,按 1:12 的比例加入蒸馏水,于 140 r/min、40 ℃ 下振荡浸提,每隔 12 h,取少量浸提液,过滤后按照单宁酸的测定方法测定其含量,最后计算五倍子中单宁酸总的浸出量。

1.2.3.3 没食子酸的测定<sup>[12-13]</sup> (1)液相色谱条件。色谱柱为 Waters Symmetry C<sub>18</sub> (5 μm, 4.6 mm × 150 mm);流动相: A 相甲醇 (85%), B 相 0.5% 乙酸溶液 (15%);检测波长: 273 nm;柱温: 40 ℃;流速: 0.8 mL/min。(2)没食子酸标准曲线的绘制。配制不同浓度的标准溶液,在上述液相色谱条件下,各进样 20 μL,平行测定 5 次。以峰面积  $A$  为纵坐标,样品浓度  $C$  (μg/mL) 为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程为:  $A = 65453.13C - 163771.09$ ,  $r = 0.9998$ 。说明没食子酸在 0.0506 ~ 0.406 μg/mL 范围内有良好的线性关系。(3)样品中没食子酸含量的测定<sup>[14]</sup>。取 1 mL 样品滤液,稀释到适当倍数,在上述液相色谱条件下进样 20 μL,平行测定 5 次,根据回归方程计算没食子酸的平均含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 单宁酸浸提率与浸提时间的关系

按照五倍子中单宁酸含量的测定方法,所得到单宁酸的

浸提率(浸提液中单宁酸的生成量与五倍子的添加量的比值)与浸提时间的关系见图 1。由图 1 看出,随着浸提时间的不断延长,单宁酸不断从五倍子中浸提出来,浸提时间 72 h 时,浸提率达到 55%,之后浸提率达到平稳。这说明单宁酸随浸提时间的延长,不断从五倍子中浸提出来,最终达到稳定值 55% 左右。单宁酸的浸提曲线可以反映实际可利用的单宁酸量,故可为单宁酸转化率的计算提供依据。

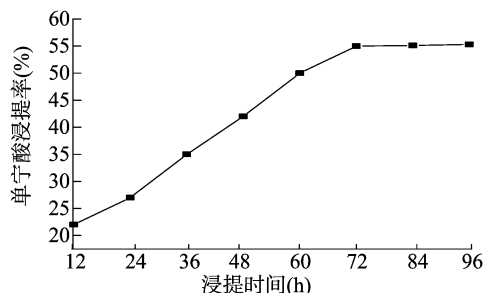


图1 五倍子单宁酸浸提率与浸提时间的关系

### 2.2 不同转化方式对转化率的影响

转化方式分 2 种:(1)将产酶菌丝分离,并用蒸馏水反复洗涤后,转入 100 mL 含 4% 五倍子的溶液中,140 r/min、30 ℃ 条件下转化,一定时间后测定转化液中没食子酸含量。(2)直接在发酵产酶系统中补加 4% 的五倍子,140 r/min、30 ℃ 条件下继续转化,测定转化液中没食子酸的含量。按不同的转化方式,在 120 h 和 170 h 时没食子酸含量见表 1。从表 1 可以看出,用相同量的诱导物和转化底物,转化 120 h 和 170 h 时菌丝球转化产物总质量分别为 3.553 7、3.294 3 g,而直接转化产物总质量分别为 3.659 8、3.388 8 g。2 种转化方式所得到的没食子酸总质量差别不大。故从节省操作工序的角度考虑,选择直接添加五倍子粉转化的方式。

表 1 不同的转化方式对没食子酸浓度的影响

培养时间 (h)	没食子酸含量(mg/mL)	
	菌丝球转化(累计浓度)	直接转化
72	16.967	16.967
120	35.537	36.598
170	32.934	33.888

### 2.3 不同的诱导物、底物形式对转化率的影响

分别在液态基础培养基加入 4% 五倍子和 2% 单宁酸(相当于 4% 的五倍子中单宁酸量),培养产酶结束后,再分别在相应的培养基中添加 4% 五倍子和 2% 单宁酸作为底物,于 140 r/min、30 ℃ 条件下转化,然后每隔 8 h 测定转化液中没食子酸的含量,结果见图 2。由图 2 看出,利用五倍子作为诱导物和底物时,转化到 120 h 时趋于平衡,转化率可以达到 73% 以上;而利用单宁酸作为诱导物和底物时,刚开始得率相对较高,转化到 90 h 时,转化趋于平衡,转化率为 63.5%,平衡时用五倍子转化转化率明显偏高。这可能是由于用单宁酸转化时底物与酶结合空间阻碍小,转化速度快,其先达到底物饱和和浓度,过量的单宁酸又会抑制产物的生成;而用五倍子作为底物时单宁酸是缓慢浸提出来的,前期转化速度慢,且低浓度的底物不会产生抑制效应,一定时间后才会达到饱和和浓度,同时也能减少单宁酸制备过程。故选用五倍子作为诱导物和底物。

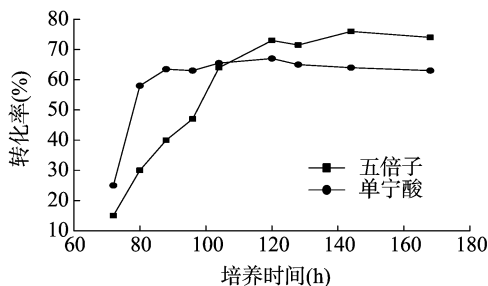


图2 不同诱导物和底物形式对没食子酸转化率的影响

## 2.4 底物添加方式对转化率的影响

培菌产酶结束后,采用分批补料方式,在上述相同的转化条件下转化,在转化过程中每隔 12 h 添加 2.0% 的五倍子,与在相同的转化时间内一次性补料添加相同量的五倍子对照,2 种底物的添加方式对没食子酸生产的影响情况见图 3。在分批添加底物的过程中,pH 值的变化情况见图 4。由图 3 和图 4 可以看出,对于相同的转化时间分批补料有利于提高没食子酸的产量,随着转化时间延长,没食子酸浓度增大,最高达 43.85 mg/mL;但转化率先增大后降低,浓度最大时转化率只有 56.95%,且 pH 值不断降低,最后都趋于稳定。这可能是因为分批补料有利于底物的持续供给,有利于转化,且 pH 值的下降可能对酶活起抑制作用,不利于转化。故分批补料对转化起积极作用;需在转化过程中加强调节 pH 值,以利于酶的稳定及作用的发挥。

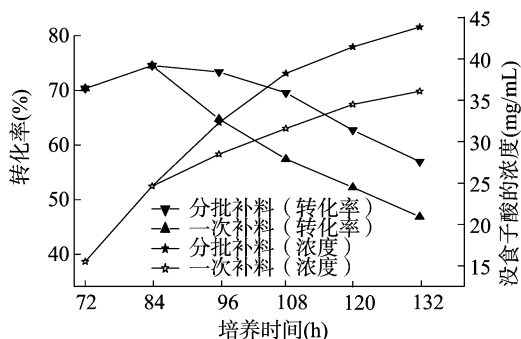


图3 底物添加方式对没食子酸浓度和转化率的影响

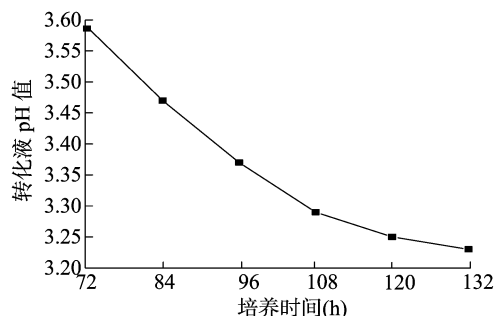


图4 转化过程中 pH 值的变化趋势

## 2.5 底物分批添加累积浓度对转化率的影响

培菌产酶结束后,按每隔 12 h 分别添加 1.0%、1.5%、2.0%、2.5% 的五倍子底物,共添加 4 次,考察五倍子累积添加量分别为 4.0%、6.0%、8.0%、10.0% 时对没食子酸产量的影响,不同底物浓度对产物浓度及转化率的影响见图 5 和图 6。由图 5 和图 6 可以看出,随着底物浓度增大,没食子酸

浓度从 32.29 mg/mL 增加到 41.46 mg/mL;转化率从 75.64% 降低到 58.56%。底物浓度累积量为 4% 和 6% 时,两者转化率相差不大,但后者没食子酸浓度较前者高出很多,最大浓度为 39.78 mg/mL 时,转化率为 73.05%。故选择最佳终浓度为 6%,添加 4 次,每次 1.5%,浓度为 39.78 mg/mL 时,转化率为 73.05%。

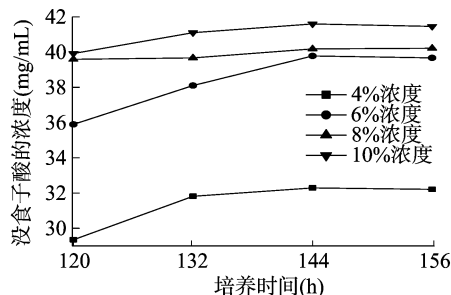


图5 分批添加底物的浓度对没食子酸浓度的影响

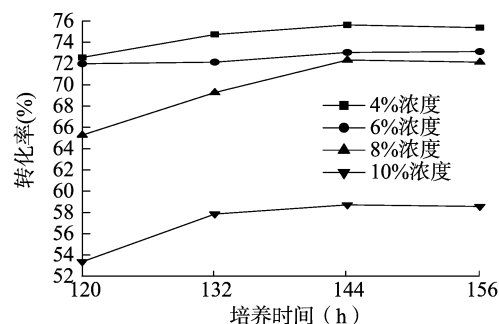


图6 分批添加底物的浓度对转化率的影响

## 2.6 转化条件对转化率的影响

培菌产酶结束后,在分批补料的条件下,转化过程中采用不同的转速 140、160、180、200、220 r/min,对没食子酸的影响见图 7;采用不同的转化温度 25、30、35、40、45 °C,对没食子酸产量的影响见图 8。由图 7 可知,随着转速提高,转化率先增加后降低,当达到 200 r/min 时转化率达到最大值。主要原因可能是转速直接影响发酵环境均匀性,转速太小,原料沉降与菌体分离,酶与底物结合空间受阻碍不利于转化;转速过大,对菌丝的剪切力较大,损伤菌丝,不利于菌丝的稳定生长及产酶。故 200 r/min 是最佳的转化转速。由图 8 可知,温度对转化率的影响不显著,在 30 ~ 40 °C 均有较高的转化率。温度对转化率的影响主要体现在 2 个方面:其一可能是温度升高时有利于单宁酸的提取溶出;其二酶是具有生物活性的大分子,在酶的最适作用的温度范围内,较高温度有利于提高酶反应速度。故选用 35 °C 作为转化温度。

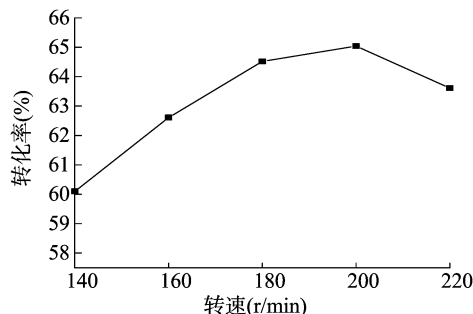


图7 不同搅拌转速对转化率的影响

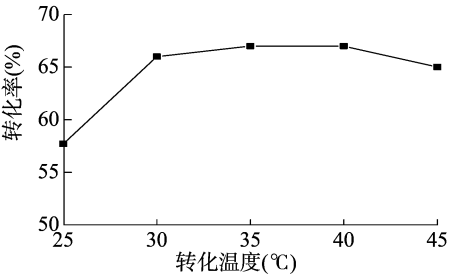


图8 不同温度对转化率的影响

2.7 菌丝转化次数对转化率的影响

培养产酶结束后,按上述优化条件进行第一次转化结束后,即最后一次投料后继续转化 12 h,将菌丝球分离洗涤,重新按上述方法添加五倍子粉重复 4 次转化试验;并直接将菌丝转移到含有 50% 剂量的察氏培养基中添加五倍子粉进行转化或用稀氨水调节 pH 值,使之维持在 4.5 左右的方式来考察对转化率的影响,其转化情况见表 2。由表 2 可以看出,随着转化次数的增加,相同的底物所得到的没食子酸的浓度越来越低。这可能是由于洗涤过程中导致酶的损失,使酶量减少,导致转化率不断下降。同时可以看出,添加少量的营养物质和调节 pH 值条件下没食子酸的浓度都比对照高。这可能是因为转化过程中更换发酵培养基,菌体环境变化,补充营养物质有利于维持菌体活性,保证酶活;随着没食子酸的不断积累 pH 值下降,添加氨水保证了酶作用的 pH 值,提高了酶活,同时也为菌体补充氮源,从而提高了转化率,且效果比单纯添加营养物质的好。故在对菌丝重复转化试验过程中补充营养物质及调节 pH 值使转化产物浓度均有所提高。

表 2 增加营养和调节 pH 值对没食子酸浓度的影响

转化次数	没食子酸浓度 (mg/mL)		
	调节 pH	补充培养基	对比曲线
1	35.00	35.00	35.00
2	27.32	23.36	21.51
3	20.9	16.89	14.44
4	12.73	8.35	3.89

3 结论

目前,有关生物法制备没食子酸的报道,国内外都取得了一定的进展。杨亚力等以五倍子为底物用黑曲霉进行转化试验,其发酵液中没食子酸累积浓度达到 25.6 mg/mL,以五倍子中提取物单宁酸来计算没食子酸相对转化率为 51.1%<sup>[15]</sup>; Beena 等报道了以单宁酸作为诱导物,利用菌株 (*Aspergillus awamori* BTMFW032) 进行深层液态发酵,通过发酵 84 h,没食子酸的浓度可以达到 372.6 μg/mL<sup>[4]</sup>; Seth 等以单宁酸作为底物,利用 *Aspergillus awamori*,持续发酵 60 h,没食子酸的浓度可以达到 19 g/L,发酵作用 100 h 左右,所积累的没食子酸浓度达到最大,为 40.3 g/L<sup>[16]</sup>。

本试验利用黑曲霉 B0201 菌株产单宁酶,研究在不同条件下转化五倍子制备没食子酸,最终确定液态发酵产酶转化没食子酸的工艺条件为:采用不分离菌体直接转化方式,将五

倍子作为产酶的诱导物及转化底物,采用分批补料方式,分 4 次添加,每次间隔 12 h,底物累积浓度 6%,转化过程搅拌速度为 200 r/min,转化温度为 35℃,该试验在转化液中没食子酸浓度达到 39.78 mg/mL 时,没食子酸相对于单宁酸的得率达到最高(73.05%),与以上报道的相比,在现有的报道中最高。但菌丝连续多次转化后转化能力下降,添加少量营养物质和调节 pH 值对菌丝球重复转化起积极作用,调节 pH 值的积极转化效果比添加少量营养物质的转化效果明显。

参考文献:

[1] Kar B, Banerjee R, Bhattacharyya B C. Microbial production of gallic acid by modified solid state fermentation[J]. Microbiol Biotechnol, 1999, 23(3): 173-177.

[2] 孙达旺. 植物单宁化学[M]. 北京:中国林业出版社,1992.

[3] 毕良武, 吴在嵩. 五倍子系列有机化学品综述[J]. 化工时刊, 1997, 11(10): 11-16.

[4] Beena P S, Basheer S M, Bhat S G, et al. Propyl gallate synthesis using acidophilic tannase and simultaneous production of tannase and gallic acid by marine *Aspergillus awamori* BTMFW032[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2011, 164(5): 612-628.

[5] Raghuvanshi S, Dutt K, Gupta P, et al. *Bacillus sphaericus*: the highest bacterial tannase producer with potential for gallic acid synthesis[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2011, 111(6): 635-640.

[6] Wu X Y, Qiu S Y, Li Y Z, et al. Research on conditions of solid-state fermentation and characters of tannase by *Aspergillus niger* B0201 with gallnut[J]. Advanced Materials Research, 2011, 236/237/238(5): 1029-1038.

[7] 李秋针, 邱树毅, 保玉心, 等. 黑曲霉 B0201 利用五倍子固体发酵产单宁酶的条件研究[J]. 微生物学通报, 2009, 36(8): 1123-1129.

[8] He S R, Wu X Y, Qiu S Y, et al. Study on immobilization of tannase[J]. Advanced Materials Research, 2013, 781/782/783/784(9): 774-778.

[9] 霍权恭, 范璐, 周展明, 等. GB/T 15686—1995 高粱中单宁含量的测定[S]. 北京:中国标准出版社,1995.

[10] 李鹏, 张海生, 牛国霞. 柿叶单宁提取技术研究[J]. 食品工业科技, 2009, 30(6): 220-222.

[11] 张宗和, 闵凡芹, 秦清, 等. 超声波辅助提取五倍子单宁酸的响应面优化实验[J]. 生物质化学工程, 2012, 46(6): 12-16.

[12] 刘起中, 张可可. HPLC 法测定五倍子中没食子酸的含量[J]. 中草药, 2002, 33(5): 427.

[13] 任源, 堵年生. HPLC 测定没食子中没食子酸的含量[J]. 华西药杂志, 2005, 20(1): 71-72.

[14] 曹建兰, 王广莉, 王晓丹, 等. 黑曲霉 B0201 产单宁酶生物转化没食子酸工艺研究[J]. 中国酿造, 2013, 32(7): 68-70, 97.

[15] 杨亚力, 杨顺楷. 黑曲霉单宁酶法水解制取没食子酸的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2002, 14(2): 58-60.

[16] Seth M, Chand S. Biosynthesis of tannase and hydrolysis of tannins to gallic acid by *Aspergillus awamori* - optimisation of process parameters[J]. Process Biochemistry, 2000, 36(1/2): 39-44.