

张玉千,周学,夏文静,等. 棘孢曲霉液体发酵产 β -葡萄糖苷酶培养基的优化[J]. 江苏农业科学,2021,49(11):208-212.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.11.036

棘孢曲霉液体发酵产 β -葡萄糖苷酶培养基的优化

张玉千¹,周学¹,夏文静¹,郑丹¹,许晓风^{1,2}

(1. 南京师范大学泰州学院化学与生物工程学院,江苏泰州 225300; 2. 南京师范大学生命科学学院,江苏南京 210046)

摘要:以棘孢曲霉为生产菌株进行液态发酵生产 β -葡萄糖苷酶,优化产酶培养基成分。采用单因素法对发酵培养基的碳源、氮源、碳氮比、磷酸盐的含量及吐温-80 的浓度进行初步探索,借助正交设计试验法确定棘孢曲霉液态发酵产 β -葡萄糖苷酶最优培养基组成。结合单因素试验和正交试验得到最优的培养基成分为 2% 蔗糖、0.16% 尿素、碳氮比为 30:1、0.2% KH_2PO_4 、0.125% 吐温-80。利用优化后的培养基成分进行发酵产酶, β -葡萄糖苷酶的酶活力达到 29.23 U/mL,是初始产酶培养基产酶活力的 8.21 倍。通过对培养基成分的优化,大幅度提高了 β -葡萄糖苷酶的产量,为 β -葡萄糖苷酶的生产提供了新的菌株,为提高槐角异黄酮的转化研究提供了新的途径及数据参考。

关键词:棘孢曲霉; β -葡萄糖苷酶;培养基优化;正交试验;单因素试验

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)11-0208-05

棘孢曲霉是曲霉属真菌,具有球形或椭圆形的顶囊,分生孢子为淡褐色球状,表面有刺突^[1]。棘孢曲霉在自然界中分布广泛,常见于粮食、植物和土壤中。棘孢曲霉具有丰富的酶系,可分泌淀粉酶、酸性蛋白酶、纤维素酶、葡萄糖氧化酶、柠檬酸、葡糖酸和没食子酸等产物,是一种重要的工业发酵微生物,被广泛应用于生产工业酶制剂、产品发酵等方面^[2-3]。

目前,关于棘孢曲霉的研究主要集中在产酶条件的优化,尤其是产果胶酶和柚苷酶的研究。何海燕等从蚕沙堆积地土壤中筛选出产果胶酶的优良菌株,经过微波诱变得到稳定菌株,所产酶活性可达 10.17 U/mL^[4]。王耸等以柚皮为原料优化棘孢曲霉产柚苷酶的固体发酵条件,产酶量提高了 7.38 倍^[5]。据报道,棘孢曲霉所产的 β -葡萄糖苷酶活性较强,在微生物转化中尤其是对苷类物质糖苷键的水解反应中效果较好。Treebupachatsakul 等发现棘孢曲霉产 β -葡萄糖苷酶可以将糖转化为乙醇,

为工业生物乙醇的生产提供较好的途径^[6]。马迎迎等发现,棘孢曲霉可以将甜菊糖苷转化为甜菊醇,为甜菊醇的制备提供一种新的方法^[7]。试验组在槐角黄酮苷的转化过程中发现,棘孢曲霉可以将染料木苷、槐角苷转化为 5,7,8,4'-四羟基异黄酮^[8-9],后者是一种高效的酪氨酸酶抑制剂^[10-11],在医药、美容、食品等领域具有广阔的应用前景^[12]。在棘孢曲霉转化槐角黄酮苷的过程中, β -葡萄糖苷酶是关键酶,提高该酶的产量可以增加产物得率。本试验在国内外相关研究的基础上进行液态发酵研究,通过优化培养基成分提高 β -葡萄糖苷酶的产量。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂 试验菌种为棘孢曲霉,笔者所在实验室筛选鉴定,菌种保藏号为 CCTCC NO: M2011264。斜面培养基(20% 土豆、2% 葡萄糖、2% 琼脂、pH 值自然)、种子培养基[1% (NH_4)₂SO₄、0.5% KH_2PO_4 、0.1% MgSO_4 、6% 葡萄糖]、发酵基础培养基[2% 蔗糖、0.16% (NH_4)₂SO₄、0.2% KH_2PO_4 、0.02% MgSO_4 、0.001% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.05% 吐温-80、pH 值自然]。

水杨苷(湖北帝柏化工有限公司)、无水乙醇、苯酚亚硫酸氢钠、酒石酸钾钠、3,5-二硝基水杨酸、冰醋酸、无水乙酸钠均为分析纯,购自国药集团上海有限公司。

收稿日期:2020-09-23

基金项目:江苏省大学生创新创业训练计划一般项目(编号:201913843026Y);南京师范大学高等教育改革研究课题(编号:2018JG07042、2019JG09001)。

作者简介:张玉千(1985—),男,山东济宁人,硕士研究生,讲师,主要从事天然产物的分离纯化及微生物转化研究。E-mail: zqw12000@163.com。

通信作者:许晓风,博士,教授,博士生导师,主要从事植物保护、分子遗传与分子生态方面的研究。E-mail: xuxiaofeng@njnu.edu.cn。

1.1.2 仪器与设备 试验主要仪器有 ZHJH - C1214B 超净工作台(上海智城分析仪器制造有限公司)、MLS - 3780 高压蒸汽灭菌器[致微(厦门)仪器有限公司]、FA2204 电子分析天平(上海方瑞仪器有限公司)、HZQ - X100 恒温振荡培养箱(太仓市实验设备厂)、WFZ UV - 2000 紫外可见分光光度计[尤尼柯(上海)仪器有限公司]。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种活化及发酵培养 将 4 ℃ 保藏的菌种转接至斜面培养基上,28 ℃ 培养 2 ~ 3 d,用无菌水冲洗斜面孢子,做成 1×10^8 CFU/mL 的孢子悬液,充分振荡 30 min。按 10% 接种量接入到 100 mL 液体发酵培养基中,30 ℃ 150 r/min 摇床培养 72 h。

取发酵液 8 000 r/min 离心 10 min,取上清加无水乙醇,使乙醇浓度为 70% ~ 75%,放于 4 ℃ 冰箱中沉淀过夜。10 000 r/min 离心 15 min,沉淀用 0.2 mol/L pH 值为 4.6 的乙酸 - 乙酸钠的缓冲液重新溶解,即得酶液,测定酶活力。

1.2.2 单因素试验

1.2.2.1 碳源的优化 发酵基础培养基中去掉碳源,分别加入 2% 的葡萄糖、蔗糖、麸皮、稻糠、玉米粉、麸皮 + 稻糠(1 : 1)、麸皮 + 玉米粉(1 : 1)作为唯一碳源,其他成分保持不变,配制液体培养基各 100 mL,装入 250 mL 锥形瓶中,灭菌,按 10% 接种量加孢子悬液,30 ℃,150 r/min 摇床培养 72 h,按“1.2.1”节方法提取酶液,测酶活力。

1.2.2.2 氮源的优化 发酵基础培养基中去掉氮源,分别以 0.16% 的硫酸铵(无机氮源)、酵母浸膏、豆粕粉、蛋白胨、尿素为氮源,其他成分保持不变,配制液体培养基各 100 mL,装入 250 mL 锥形瓶中,灭菌,按 10% 接种量加孢子悬液,30 ℃,150 r/min 摇床培养 72 h,按“1.2.1”节方法提取酶液,测酶活力。

1.2.2.3 碳氮比的优化 以蔗糖为碳源,硫酸铵为氮源,控制碳氮比分别为 5 : 1、10 : 1、20 : 1、30 : 1、40 : 1,其他成分和发酵基础培养基一致,配制液体培养基各 100 mL,装入 250 mL 锥形瓶中,灭菌,按 10% 接种量加孢子悬液,30 ℃,150 r/min 摇床培养 72 h,按“1.2.1”节方法提取酶液,测酶活力。

1.2.2.4 磷酸盐对产酶的影响 去除发酵基础培养基中的磷酸盐,分别加入 KH_2PO_4 ,使质量分数为 0、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%,其他成分保持不变,配制液体培养基各 100 mL,装入 250 mL 锥形

瓶中,灭菌,按 10% 接种量加孢子悬液,30 ℃,150 r/min 摇床培养 72 h,按“1.2.1”节方法提取酶液,测酶活力。

1.2.2.5 吐温 - 80 对产酶的影响 去除发酵基础培养基中的吐温 - 80,分别加入吐温 - 80,使质量分数分别为 0.050%、0.075%、0.100%、0.125%、0.150%,其他成分保持不变,配制液体培养基各 100 mL,装入 250 mL 锥形瓶中,灭菌,按 10% 接种量加孢子悬液,30 ℃,150 r/min 摇床培养 72 h,按“1.2.1”节方法提取酶液,测酶活力。

1.2.3 正交试验 在单因素试验的基础上,固定接种量为 10%,装液量为 100 mL,选择碳源、氮源、磷酸盐用量、吐温 - 80 质量分数 4 个因素,按照表 1 所示的因素水平设计 4 因素 3 水平正交试验组合,按照“1.2.1”节的方法进行发酵,测酶活力。

表 1 产 β - 葡萄糖苷酶正交试验因素水平

水平	A:碳源	B:氮源	C:磷酸盐 用量(%)	D:吐温 - 80 质量分数(%)
1	玉米	尿素	0.1	0.075
2	蔗糖	硫酸铵	0.2	0.100
3	葡萄糖	豆粕粉	0.3	0.125

1.2.4 酶活力测定方法 根据文献[13]的方法,采用 3,5 - 二硝基水杨酸(DNS)法测定 β - 葡萄糖苷酶酶活:取 0.2 mL 水杨苷加 0.2 mL 酶液,在 60 ℃ 的水浴锅里加热 10 min,取出,向反应液里加入 1 mL DNS 试剂,放入沸水中加热 5 min,冷却,定容至 10 mL,540 nm 下测定吸光度,根据葡萄糖标准曲线计算。

酶单位定义(U/mL):在 60 ℃、pH 值 = 4.6 的条件下,每 1 mL 酶液 1 min 水解底物产生 1 μmol 还原糖(以葡萄糖计)所需的酶量为 1 个酶活力单位(U/mL)。

葡萄糖苷酶活力单位(U/mL) = $1\,000 \times N \times (D_{540\text{ nm}} + 0.012\,8) / (180 \times 0.816\,9 \times 0.2)$, N 表示稀释倍数。

2 结果与分析

2.1 碳源对产酶的影响

碳源为微生物新陈代谢提供所需的能源和合成产物的碳骨架,是微生物正常生长分裂的物质基础。碳源过多,在发酵过程中容易形成较低的 pH 值;碳源不足,容易使菌体过快衰老和自溶,不同的

微生物所需要的碳源种类不同,需要通过试验进行优化。试验选用葡萄糖、蔗糖、麸皮、玉米粉、稻糠、麸皮+玉米粉(1:1)、麸皮+稻糠(1:1)等农副产品为碳源进行研究。由图 1 可知,蔗糖作为碳源时,最有利于产酶,酶活力最高为 12.09 U/mL,其次是葡萄糖和玉米粉。蔗糖作为碳源时,分解率等于利用率,没有葡萄糖的积累,可以避免葡萄糖对 β -葡萄糖苷酶的抑制作用。葡萄糖的效果仅次于蔗糖,可能是该菌体已经部分解除了葡萄糖的抑制。以麸皮、稻糠及其组合为碳源的 β -葡萄糖苷酶活力较低,说明在液态发酵培养中,可溶性碳源容易被菌体吸收利用,见效较快。

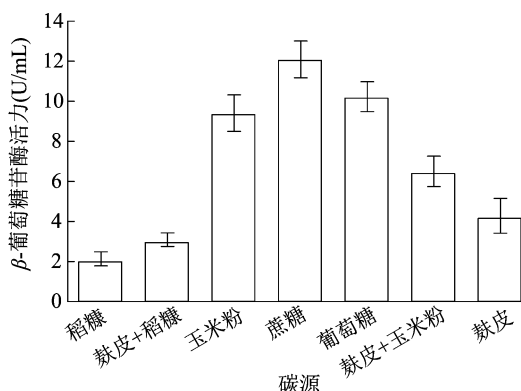


图1 碳源对棘孢曲霉产酶的影响

2.2 氮源对产酶的影响

氮源对微生物的生长发育有着重要意义,微生物利用它在细胞内合成氨基酸和碱基,进而合成蛋白质、核酸等细胞成分^[14]。氮源过多,会使菌体生长过于旺盛,体系 pH 值偏高,不利于代谢产物的积累;氮源不足,则菌体繁殖量少,生物量少,产物的生产量减少。分别以尿素、硫酸铵(无机氮源)、蛋白胨、酵母浸膏、豆粕粉为氮源进行发酵产酶。由图 2 可知,在以硫酸铵为氮源时,测得的酶活力最高,为 12.88 U/mL,因此优选硫酸铵为氮源。

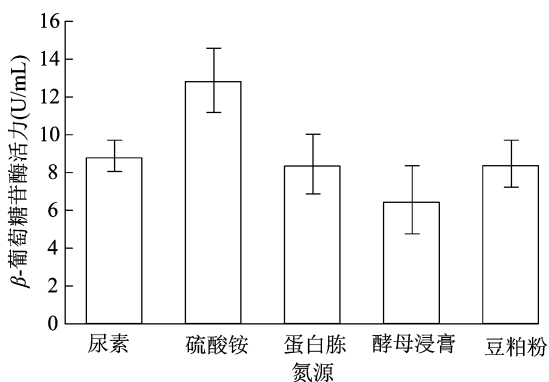


图2 氮源对棘孢曲霉产酶的影响

2.3 碳氮比对产酶的影响

碳氮比不当会影响菌体按比例吸收营养物质,直接影响菌体的生长和产物的形成。碳氮比过高和过低均不利于细胞生长和外源蛋白表达与积累,过低导致菌体提早自溶;过高导致细菌代谢不平衡,最终不利于产物的积累。一般碳源因为既作碳架又作能源,因此用量要比氮多。由图 3 可知,碳氮比为 30:1 时酶活力最高,为 11.55 U/mL,因此优选碳氮比为 30:1。

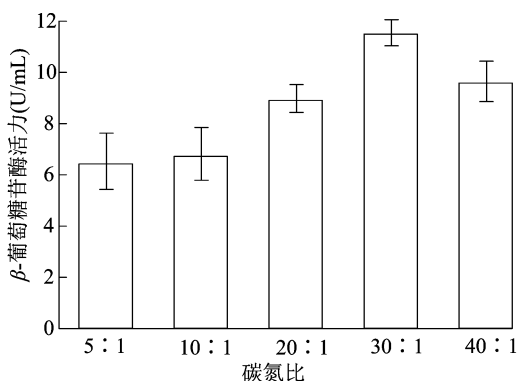


图3 碳氮比对棘孢曲霉产酶的影响

2.4 磷酸盐对产酶的影响

钾和磷都是微生物生长所必需的营养素,培养基中的 KH_2PO_4 既能提供氮磷元素又可以缓冲发酵液的 pH 值,保持微生物生长所需的酸碱度。本试验将 KH_2PO_4 浓度分别设为 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%,结果如图 4 所示,0.2% 和 0.3% 这两个浓度对应的酶活力较高,当磷酸盐浓度为 0.2% 时,测得最大酶活力为 12.55 U/mL。因此 KH_2PO_4 的浓度选择 0.2%。

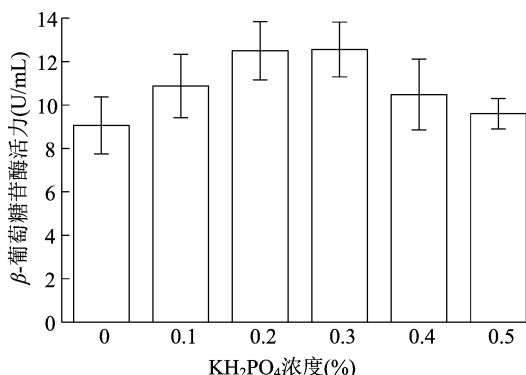


图4 KH_2PO_4 浓度对棘孢曲霉产酶的影响

2.5 吐温-80 对产酶的影响

吐温-80 为非离子型表面活性剂,可以增强细胞膜的通透性,能促进胞外酶的分泌,但浓度太大也会影响培养基中的溶氧,进而影响菌体生长和产

酶。试验考查了不同吐温-80 浓度对产酶的影响,由图 5 可知,控制的碳氮源分别是蔗糖和硫酸铵,当吐温-80 质量分数为 0.100% 时,测得的酶活最大,为 11.49 U/mL。

2.6 正交试验设计

通过表 2 对比 4 种因素对棘孢曲霉产酶的影响,结果表明 $R_A > R_C > R_B > R_D$,碳源种类对棘孢曲霉产酶的影响最大,其次是磷酸盐浓度、氮源,影响最小的是吐温-80 的浓度。通过比较 k 值,得到最优水平为 $A_2B_1C_2D_3$,即 2% 蔗糖、0.16% 尿素、0.2% KH_2PO_4 、0.125% 吐温-80。

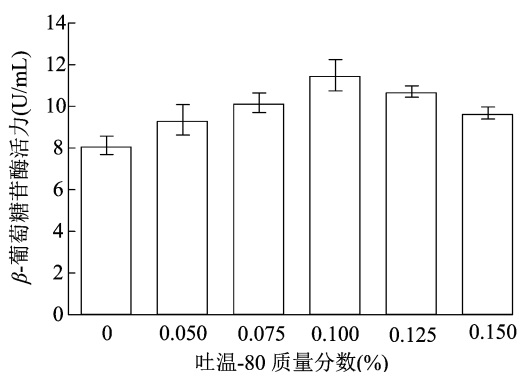


图5 吐温-80 浓度对棘孢曲霉产酶的影响

表2 产 β -葡萄糖苷酶正交试验设计及结果

编号	A:碳源	B:氮源	C:磷酸盐用量 (%)	D:吐温 80 质量分数 (%)	酶活力 (U/mL)
1	1	1	1	1	13.34
2	1	2	2	2	13.31
3	1	3	3	3	10.12
4	2	1	2	3	26.19
5	2	2	3	1	7.88
6	2	3	1	2	17.85
7	3	1	3	2	8.29
8	3	2	1	3	5.91
9	3	3	2	1	10.73
K_1	36.77	47.82	37.10	31.95	
K_2	51.92	27.10	50.23	39.45	
K_3	24.93	38.70	26.29	42.22	
k_1	12.26	15.94	12.37	10.65	
k_2	17.31	9.03	16.74	13.15	
k_3	8.31	12.90	8.76	14.07	
R	9.00	6.91	7.98	3.42	

注: K 值表示各因素同一水平的酶活力之和; k 值表示各因素同一水平的酶活力平均值; R 值决定因素对试验结果影响的大小。

2.7 重复验证试验

为确定正交试验结果的优劣及稳定性,利用最优培养基组分进行 3 批重复验证试验,结果表明,平均酶活力为 29.23 U/mL,均高于正交试验表中的 9 个试验中的酶活力,相当于初始培养基酶活力 (3.56 U/mL) 的 8.21 倍。因此,确定 $A_2B_1C_2D_3$ 为最优组合且具有一定的稳定性。

3 结论与讨论

以前期筛选的棘孢曲霉为出发菌株,通过单因素试验和正交试验优化棘孢曲霉液态发酵培养基组分。结果表明,碳源、氮源对产酶的影响最大,优化得到的液态培养基的组分为 2% 蔗糖、0.16% 尿

素、0.2% KH_2PO_4 、0.125% 吐温-80。在此基础上进行发酵产酶, β -葡萄糖苷酶活力为 29.23 U/mL,是基础初始培养基的酶活的 8.21 倍。

β -葡萄糖苷酶广泛存在于植物、动物、微生物中,其中来源于微生物的酶活性较高,研究报道较多。 β -葡萄糖苷酶可水解 β -D-糖苷键,解除纤维二糖对纤维素酶的抑制,在纤维素水解的过程中是关键的一步^[15-17],目前在生物能源、食品工程、过程转化等领域被广泛应用^[18]。在产纤维素酶的菌株中, β -葡萄糖苷酶含量普遍较低。但黑曲霉除外,目前工业中也主要利用黑曲霉生产 β -葡萄糖苷酶,通过培养基、培养条件的优化及诱变育种等方法提高 β -葡萄糖苷酶的产量^[15]。棘孢曲霉可

分泌淀粉酶、纤维素酶、果胶酶、柚苷酶、鼠李糖苷酶等多种酶^[2,4,19-20],其中柚苷酶的研究较多, β -葡萄糖苷酶的研究较少。棘孢曲霉经过优化后 β -葡萄糖苷酶的酶活力有了明显提高,从而为 β -葡萄糖苷酶的生产提供了新的菌株。

槐角是一种常用的中药材,富含黄酮异黄酮类化合物^[21],利用微生物的甲基化、羟基化、甲氧基化、水解等反应可以提高活性成分的含量、获得高附加值的代谢产物^[22]。Wu 等利用 *Schizophyllum commune* 转化槐角苷得到羟基化、甲基化等多种有价值代谢产物^[23]。槐角中的染料木苷含量较高,但生物活性没有苷元染料木素的活性高。Chang 等以槐角粉末为原料利用黑曲霉和酵母联合发酵培养,使染料木素的含量增加了 34.45 倍^[20,24]。刘姜华利用米根霉 LJH3 将槐角苷转化成染料木素,转化率达 80.2%^[25]。在棘孢曲霉转化槐角的过程中, β -葡萄糖苷酶水解染料木苷分子中的糖苷键生成染料木素和葡萄糖,染料木素又被细胞色素 P450 酶羟基化形成 5,7,8,4'-四羟基异黄酮^[8,26]。通过优化棘孢曲霉产酶培养基提高酶活力,可提高染料木苷的转化效率,最终提高 5,7,8,4'-四羟基异黄酮的收率。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 刘艳苓.棘孢曲霉发酵柚皮产多酶组分分析及产柚苷酶工艺优化[D].厦门:集美大学,2015:1-2.
- [3] 王亚林,严建芳,吴灵英,等.稻草发酵菌种的筛选与组配研究[J].饲料研究,2001(10):24-25.
- [4] 何海燕,覃拥灵,陆世则,等.产果胶酶棘孢曲霉的筛选鉴定及微波诱变育种[J].中国饲料,2015,2(2):20-22.
- [5] 王耸,刘艳苓,姜泽东,等.棘孢曲霉固态发酵柚皮产柚苷酶的条件优化[J].微生物学通报,2015,42(10):1936-1944.
- [6] Treebupachatsakul T, Nakazawa H, Shinbo H, et al. Heterologously expressed *Aspergillus aculeatus* β -glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae* is a cost-effective alternative to commercial supplementation of β -glucosidase in industrial ethanol production using *Trichoderma reesei* cellulases[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2016, 121(1):27-35.
- [7] 马迎迎,陈育如,张伟娜,等.棘孢曲霉转化甜菊糖为甜菊醇及纯化莱鲍迪苷 A[J].微生物学报,2014,54(1):62-68.
- [8] 陈育如,张玉千,玄燕,等.一株棘孢曲霉菌株及用该菌株制备 5,7,8,4'-四羟基异黄酮的方法:ZL2011102258550[P]. 2011-12-14.
- [9] Zhang Y Q, Zhao Y C, Lu Y Y, et al. Bioconversion of fructus sophorae into 5,7,8,4'-tetrahydroxyisoflavone with *Aspergillus*

- aculeatus*[J]. PLoS One, 2019, 14(3):e0211613.
- [10] Chang T S, Ding H Y, Tai S K, et al. Mushroom tyrosinase inhibitory effects of isoflavones isolated from soygerm koji fermented with *Aspergillus oryzae* BCRC 32288[J]. Food Chemistry, 105(4):1430-1438.
- [11] Chang T S. Two potent suicide substrates of mushroom tyrosinase: 7,8,4'-trihydroxyisoflavone and 5,7,8,4'-tetrahydroxyisoflavone[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(5):2010-2015.
- [12] 闫军,陈声利,李春阳.酪氨酸酶抑制剂及对黑素生物合成的影响[J].国外医学:皮肤性病学分册,2003,29(4):250-253.
- [13] 刘虎,陈育如,姜中玉.固定化 β -葡萄糖苷酶转化甜菊糖的研究[J].食品工业科技,2011,32(4):170-172,176.
- [14] 李涛,张朝辉,郭雅雯,等.国内外微生物肥料研究进展及展望[J].江苏农业科学,2019,47(10):37-41.
- [15] 石彩蕊.黑曲霉诱变育种产 β -葡萄糖苷酶研究[D].长沙:中南林业科技大学,2011:11-12.
- [16] 常治帅,兰辉,包亚莉,等.微生物产 β -葡萄糖苷酶研究进展[J].微生物前沿,2018,7(2):79-86.
- [17] 倪嘉璐,张琪琳,沈利峰,等. β -葡萄糖苷酶产生菌的筛选及发酵培养基优化[J].浙江树人大学学报,2010,10(1):22-26.
- [18] Singh G, Verma A K, Kumar V. Catalytic properties, functional attributes and industrial applications of β -glucosidases[J]. 3 Biotech, 2016, 6(1):3.
- [19] 刘艳苓,肖安凤,李利君,等.棘孢曲霉固态发酵 α -L-鼠李糖苷酶调控机制及培养基优化[J].中国食品学报,2015,15(7):10-17.
- [20] 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.
- [21] Chang L, Ren Y, Cao L, et al. Simultaneous determination and pharmacokinetic study of six flavonoids from *Fructus sophorae* extract in rat plasma by LC-MS/MS[J]. Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2012, 904(1):59-64.
- [22] Das S, Rosazza J P. Microbial and enzymatic transformations of flavonoids[J]. Journal of Natural Products, 2006, 69(3):499-508.
- [23] Wu J G, Yang X L, Ge J, et al. Biotransformation of sophoricoside in *Fructus sophorae* by the fungus *Schizophyllum commune*[J]. Bioresource Technology, 2012, 111:496-499.
- [24] Feng C, Jin S, Xia X X, et al. Effective bioconversion of sophoricoside to genistein from *Fructus sophorae* using immobilized *Aspergillus niger* and Yeast[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2015, 31(1):187-197.
- [25] 刘姜华.微生物转化槐角苷制备染料木素的研究[D].杭州:浙江工业大学,2017.
- [26] Androutsopoulos V P, Ruparelia K, Arroo R R, et al. CYP1-mediated antiproliferative activity of dietary flavonoids in MDA-MB-468 breast cancer cells[J]. Toxicology, 2009, 264(3):162-170.