

一株产柚苷酶菌株的 ARTP 诱变育种及培养基的优化

袁文博, 江波, 张涛*

(食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122)

摘要: 利用常温室压等离子体技术对一株产柚苷酶菌株互隔交链孢霉(*A. alternate*) SK.37001 进行快速诱变处理, 获得一株高产柚苷酶菌株 *A. alternate* SK.37002, 与野生菌株相比, 该菌株发酵酶活提高了 208%。通过单因素实验确定发酵产柚苷酶的最适碳源为蔗糖, 最适诱导物为柚皮苷, 最适氮源为硝酸钠, 利用 Plackett-Burman 试验筛选出影响液态摇瓶发酵酶产量的 3 个重要因素: 硝酸钠、氯化钙、磷酸氢二钾, 在此基础上运用最陡爬坡实验逼近最大响应值区域, 再利用 Box-Behnken 设计及响应面分析法进行回归分析, 获得最佳培养基配方为: 1 g/L 柚皮苷, 5 g/L 蔗糖, 5 g/L 硝酸钠, 0.8 g/L 磷酸氢二钾, 0.7 g/L 氯化钙, 0.5 g/L 氯化钾, 0.5 g/L 硫酸镁。采用优化后的培养基进行摇瓶发酵产柚苷酶酶活为 624.73 U/mL, 与模型预测接近, 发酵产酶量比优化前提高了 90%。

关键词: 柚苷酶; 互隔交链孢; 常温室压等离子体; 摇瓶发酵

中图分类号: TQ 925 文献标志码: A 文章编号: 1673-1689(2018)09-0962-09

ARTP Mutain Breeding of Naringinase-Producing Strains and Optimization of Fermentation Conditions

YUAN Wenbo, JIANG Bo, ZHANG Tao*

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Atmospheric and room temperature plasma (ARTP) was used to mutagenize *Alternaria alternate* which is a naringinase-producing strain. The naringinase activity of the mutagenized strain SK37.002 reached 327.32 U/mL, which was 208% higher than that of original strain. The optimum carbon sources for naringinase-producing is sucrose. The most suitable inducer is naringin and nitrogen sources being NaNO₃. According to Plackett-Burman design, NaNO₃, CaCl₂ and K₂HPO₄ were screened out of 8 factors as main affecting variables of naringinase production. Then steepest ascent method was used to approach the maximum response regions and it was followed by Box-Behnken and response surface analysis. As a result, the optimum medium formula (g/L) determined was composed of naringin 1, sucrose 5, NaNO₃ 5, K₂HPO₄ 0.8, CaCl₂ 0.7, KCl 0.5, MgCl₂

收稿日期: 2015-11-17

基金项目: 国家 863 计划项目(2013AA102102)。

* 通信作者: 张涛(1973—), 女, 陕西咸阳人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品功能配料的研究与开发、天然产物深度开发与利用等方面的研究。E-mail: zhangtao@jiangnan.edu.cn

引用本文: 袁文博, 江波, 张涛. 一株产柚苷酶菌株的 ARTP 诱变育种及培养基的优化[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(09): 962-970.

0.5. The resulting naringinase activity in fermentation broth reached up to 624.73 ± 30.33 U/mL and was 90% higher than before which was consistent with the predicted maximum value.

Keywords: *Alternaria alternate*, naringinase, atmospheric and room temperature, fermentation medium

柚苷酶是由 α -L-鼠李糖苷酶 (α -L-rhamnosidase, EC 3.2.1.40) 和 β -D-葡萄糖苷酶 (β -D-glucosidase, EC 3.2.1.21) 组成的酶复合体^[1]。它可作用于柚皮苷、槲皮苷、柴胡皂苷、芦丁、橘皮苷等架构末端有 α -鼠李糖和 β -葡萄糖的人工或天然的糖苷类化合物^[2]。柚苷酶可以将芸香科水果果汁中最主要的苦味物质柚皮苷分两步水解成鼠李糖、柚皮素和葡萄糖,以达到脱苦的目的^[3],这两种酶在参与反应过程中是先后起作用的,具体反应如下:

第一步:柚皮苷 $\xrightarrow{\alpha\text{-L-鼠李糖苷酶}}$ 普鲁宁+鼠李糖;

第二步:普鲁宁 $\xrightarrow{\beta\text{-D-葡萄糖苷酶}}$ 柚皮素+葡萄糖。

与其他脱苦方法相比,酶法脱苦具有效果好、无污染、成本低、工艺简单、专一性强、反应条件温和、不破坏果汁中的风味和营养成分等优点^[3],具有良好的应用前景。除此之外,柚苷酶在活性物质改性^[4]、增强物质生物学活性^[5]、葡萄酒的增香^[3]、物质的分离制备^[6]、制药工业^[7]等方面的应用也日益广泛。

柚苷酶的来源非常广泛,植物、动物和微生物中均有发现,现在柚苷酶的来源以微生物为主。例如胡奎^[8]从土壤中分离出了一株摇瓶产酶达 291 U/mL,经 NTG 诱变后可达 1 282 U/mL。文蓉^[9]在发霉的柚子皮上筛选到一株产柚苷酶的青霉菌,经诱变后酶活达 573.6 U/mL。据报道,国外已有少量的柚苷酶实现工业化生产,但价格昂贵,难以适应食品工业的需求。而在国内并没有实现柚苷酶的工业化生产,主要是缺乏适合工业化生产的高产菌株^[10];其次是缺少成熟的柚苷酶液态发酵生产工艺。因此,发现新的柚苷酶微生物来源,并研究其发酵柚苷酶的条件具有重要的科学研究及应用价值。

从自然界筛选出来的野生菌株通常具有遗传不稳定、性能和耐受性差等缺点,常常不能满足工业化生产的要求,因此采用不同的方法对分离出来的野生菌株进行诱变选育是不可或缺的^[11]。新型常压室温等离子体(ARTP)诱变系统,通过发射含有活

性粒子的等离子体,能够有效引起 DNA 的多样性损伤,最终导致微生物突变。ARTP 生物诱变育种技术与传统微生物诱变方法相比,具有安全性高、操作简易、成本低、快速有效等优势^[12-14],已经成为微生物诱变育种领域的一个新的研究热点。目前,尚未有使用常压室温等离子体诱变筛选柚苷酶高产菌株方法的报道。

作者以实验室筛选出的一株之前并未报道过的产柚苷酶菌株 *A. alternate* SK37.001 为出发菌株,通过常温室压等离子体诱变,发酵酶活大幅度提高。之后研究了碳源、氮源等因素对菌株产柚苷酶的影响,通过单因素、Plackett-Burman 试验、最陡爬坡试验、Box-Behnken 设计对菌株产柚苷酶的液态摇瓶发酵培养基进行了优化,目的在于获得菌株发酵产柚苷酶的最佳培养基,为进一步工业化生产柚苷酶提供了技术和理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株 互隔交链孢霉(*A. alternate*):保藏于中国典型培养物保藏中心,编号为 CCTCC NO:M 2015309。

1.1.2 培养基 斜面保藏培养基采用马铃薯培养基(g/L):马铃薯 200,蔗糖 20,琼脂 20;pH 自然,121 °C 灭菌 20 min。

种子培养基与初始发酵培养基(g/L):蔗糖 5、柚皮苷 5,NaNO₃ 2,K₂HPO₄ 1,KCl 0.5,MgSO₄ 0.5,FeSO₄ 0.1;pH 自然,121 °C 灭菌 20 min。

1.2 主要仪器

高效液相色谱仪:Agilent 1200;色谱柱:Sepax GP-C18 4.6 mm×250 mm;超声波细胞破碎仪:宁波新芝生物科技有限公司 SCIENTZ-II D;ARTP 微生物诱变育种机:北京思清源生物技术公司。

1.3 实验方法

1.3.1 柚苷酶粗酶液的制备 将菌株在种子培养基中培养 12 h,以 5%的接种体积分数接种在含 40

mL 发酵培养基的 250 mL 摇瓶中, 在 30 ℃、200 r/min 条件下摇瓶发酵 96 h, 取发酵液在常温下 10 000 r/min 离心 20 min 后收集菌体沉淀, 用 pH 4.0 的磷酸氢二钠(0.1 mol/L)-柠檬酸(0.05 mol/L)缓冲液洗涤菌体 3 次, 用与发酵液等体积的缓冲液溶解, 用 6 cm 的超声波探头超声破碎 10 min, 功率为 20%, 得到悬浮液在 10 000 r/min 下离心 10 min, 取上清液即为胞内粗酶液。

1.3.2 酶活测定方法

1) 样品的前处理: 取 2 mL 用缓冲液制备的 0.1% 柚皮苷标准溶液于小离心管中, 在 40 ℃ 的恒温振荡水浴中预热 5 min。接着用移液枪加入 0.1 mL 的粗酶液, 充分振荡混匀, 精确计时保温 10 min 后从恒温水浴中取出放入沸水浴中 10 min, 使酶失活, 加入 1.9 mL 的甲醇溶液, 经 10 000 r/min 离心 10 min 后取上清液。空白为加入灭活的粗酶液, 其他操作相同。

2) 柚皮苷和柚皮素的定性定量测定: 将处理后的反应液用 0.22 μm 的滤膜过滤, 用 HPLC (采用 Sepax C18 色谱柱) 检测柚皮苷和柚皮素的峰面积。色谱条件: 流动相组成为 $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=1:1$, 流速 1 mL/min, 柱温 35 ℃, 检测波长 280 nm, 进样量 10 μL。

3) 柚苷酶酶活力的定义: 在温度 40 ℃、pH 4.0 条件下, 每分钟消耗 1 μg 柚皮苷为 1 U。

1.3.3 互隔交链孢霉的常压室温等离子体诱变方法

1) 单孢子悬浮液的制备: 取活化好的 *A. alternata* SK37.001 斜面, 用无菌生理盐水冲洗, 将其装入含有无菌玻璃珠的摇瓶内振荡 15 min, 采用无菌双层擦镜纸过滤, 即得单孢子悬液。然后用血球计数板对悬液中的孢子进行镜检计数, 并将孢子浓度调整到 $10^6 \sim 10^7$ 个/mL。

2) ARTP 诱变操作: 将 10 μL 的孢子悬液均匀涂布于金属载片的表面上。采用氦气为工作气体, 设置处理功率为 120 W, 处理距离为 2 mm, 气流量为 10 SLM, 在此条件下对 *A. alternata* SK37.001 进行诱变处理。为了寻找最佳的诱变处理时间, 作者将孢子分别处理 0、20、30、40、50、60、80、100、120 s, 对处理过的样品在适当的稀释度下涂板, 通过 CFU 来计算致死率, 并绘出致死曲线^[15]。

$$\text{致死率}(\%) = ((U-T)/U) \times 100\%$$

式中, U 为不经诱变处理生长的菌落数; T 为经诱变处理后生长的菌落数。

1.3.4 生物量的测定 将摇瓶发酵液于 10 000 r/min 离心 10 min, 将沉淀用蒸馏水洗涤 3 次, 置于 105 ℃ 下烘干至恒重, 冷却后称重。

1.3.5 发酵培养基优化的试验设计 按照 1.3.1 的方法, 通过酶活的比较, 分别考察碳源的种类和最佳配比、氮源的种类对 *A. alternata* 发酵产柚苷酶的影响。在单因素实验结果的基础上采用 Plackett-Burman 试验筛选重要因子, 然后对重要因子进行最陡爬坡实验确定重要因子的最佳添加量, 最后根据 Box-Behnken 实验原理, 用 design expert 8.0.6 软件在最陡爬坡试验的基础上进行实验设计, 通过实验数据拟合得到响应面模型, 最终确定最优实验条件, 并进行验证。

2 结果与讨论

2.1 常温室压等离子体诱变对互隔交链孢产柚苷酶的影响

按方法 1.3.3 对 *A. alternata* SK37.001 诱变致死率进行计算, 得到致死率曲线, 见图 1。

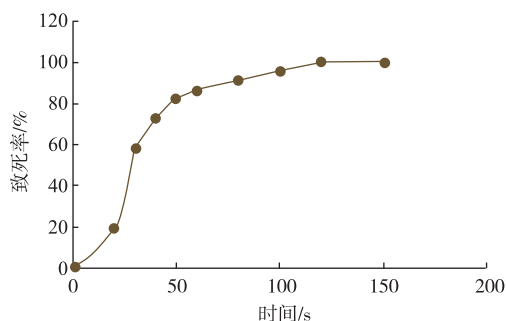


图 1 ARTP 诱变对互隔交链孢霉 SK37.001 的致死率曲线

Fig. 1 Lethality rate of *Alternaria alternata* 37.001 by ARTP

从图 1 可以看出, 等离子体对互隔交链孢霉 SK37.001 的致死率存在着显著的剂量效应关系, 诱变时间越长, 菌株的致死率越高。ARTP 对互隔交链孢霉具有很强的致死率, 当诱变时间为 80 s 时, 致死率就超过 90%, 而诱变时间达到 150 s 时, 几乎没有存活。由于诱变产生的正突变具有随机性, 为了保证筛选到正突变菌株, 同时也能够快速分离生存能力高的菌株, 故选取处理时间为 80、100、120 s, 三个不同致死率下的孢子悬液进行混合涂布。

通过涂布后生长菌株透明圈的大小进行初筛, 然后复筛得到了一株产酶能力达 327.32 U/mL 的菌株, 相比于野生菌株产酶能力提高了近 208%, 菌体

干重增长了 123.7%, 把此诱变后的菌株命名为 *Alternaria alternata* SK37.002, 通过遗传性状稳定性试验, *Alternaria alternata* SK37.002 在斜面培养基上连续培养 8 代, 菌株生长稳定, 其柚苷酶产量稳定在 316.14~331.23 U/mL 之间, 表明该菌株遗传性能稳定。

2.2 不同碳源对互隔交链孢产柚苷酶的影响

在预实验中发现当蔗糖或葡萄糖质量浓度大于 5 g/L 时, 会抑制柚苷酶的产生。所以分别选取柚皮苷和鼠李糖为诱导物, 选取最适诱导物的添加量, 同时寻找最适的碳源, 以下面 4 种情况探究最佳配比的碳源。

- 1) 以柚皮苷为惟一碳源: 分别配制含 0.5、1、1.5、2、2.5 g/L 的柚皮苷培养基;
- 2) 以鼠李糖为惟一碳源: 分别配制含 0.5、1、1.5、2、2.5 g/L 的鼠李糖培养基;
- 3) 以 5 g/L 葡萄糖为基础碳源: 分别配制含 0.5、1、1.5、2、2.5 g/L 的柚皮苷作为诱导物的培养基;
- 4) 以 5 g/L 的蔗糖为基础碳源: 分别配制含 0.5、1、1.5、2、2.5 g/L 的柚皮苷作为诱导物的培养基。

在相同培养条件下进行摇瓶发酵培养, 每种碳源做 3 次平行实验, 4 d 后用 HPLC 法测酶活, 取平均值, 以柚皮苷或鼠李糖添加量为横坐标, 柚苷酶酶活为纵坐标, 得到不同碳源对 *Alternaria alternata* SK37.002 产柚苷酶的影响见图 2。

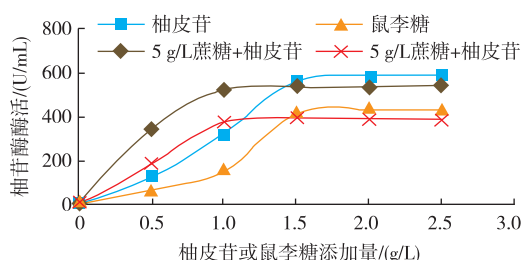


图 2 不同碳源对互隔交链孢酶 SK37.002 产柚苷酶的影响
Fig. 2 Effects of different carbon sources on naringinase productivity of *Alternaria alternata* SK37.002

微生物与糖利用有关的许多酶都是诱导性的, 柚苷酶也是诱导酶。由图 2 可以看出, 摇瓶发酵培养基中是否添加诱导物显著影响其产酶, 说明 *A. alternata* SK37.002 产柚苷酶需要诱导物诱导, 这与胡奎^[8]的研究结果相同。底物柚皮苷和产物鼠李

糖均有诱导作用, 其中柚皮苷诱导作用更好, 而且添加量为 1.5 g/L 时菌株产酶能力即达到顶点, 再继续添加柚皮苷酶活增加不明显。在以柚皮苷为诱导物时, 用蔗糖作为碳源比葡萄糖更适宜, 究其原因可能是因为葡萄糖作为碳源时, 会形成葡萄糖效应^[16]。同时含有一定量的蔗糖可以加快孢子萌发、加速菌丝生长^[17], 非常有助于胞内酶酶活的提高。最终选取 5 g/L 的蔗糖作为碳源, 1 g/L 的柚皮苷作为诱导物。

2.3 不同氮源对互隔交链孢 SK37.002 产柚苷酶的影响

在最适碳源和诱导物的基础上, 分别配制添加量为 4 g/L 的蛋白胨、酵母提取物、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、牛肉膏、 NaNO_3 、玉米浆这 6 种不同氮源的培养液, 以 1.3.1 的方法进行培养, 每种氮源做 3 次平行实验, 用 HPLC 法测酶活, 并取平均值, 结果见图 3。

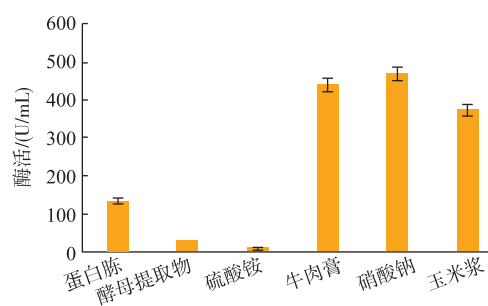


图 3 不同氮源对 *A. alternata* SK37.002 产柚苷酶的影响
Fig. 3 Effects of different nitrogen sources on naringinase productivity of *A. alternata* SK37.002

从图 3 可以看出, 氮源对互隔交链孢产柚苷酶的影响较大, 当以硫酸铵、酵母提取物、蛋白胨作为氮源时, 酶活偏低; 而硝酸钠作为氮源时, 柚苷酶酶活最高, 为 467.96 U/mL, 其次是牛肉膏、玉米浆。这可能是由于 *A. alternata* 能够更好地利用 NO_3^- 中的氮离子, 所以最后选择硝酸钠为 *A. alternata* SK37.002 菌株产柚苷酶的最佳氮源。

2.4 Plackett-Burman 试验设计

在优化发酵培养基成分的基础上, 选取柚皮苷质量浓度、硝酸钠质量浓度、温度、时间、氯化钙质量浓度、接种体积分数、硫酸镁、磷酸氢二钾质量浓度这 8 个可能影响互隔交链孢 SK37.002 发酵产柚苷酶的因素进行全面考察, 选用 $n=12$ 的 Plackett-Burman 设计。每个因素取高 (+1) 低 (-1) 两个水平, 其中低水平为未优化的原始培养基, 高水平为低水

平的 1.25 倍左右。PB 试验方案及试验测定柚苷酶活的结果见表 1。A、B、D、E、G、H、J、K 分别代表柚皮苷质量浓度、硝酸钠质量浓度、温度、时间、氯化钙质量浓度、接种体积分数、硫酸镁质量浓度和

磷酸氢二钾质量浓度,C、F、I 为虚拟项,用于估计误差,排除干扰。

用 Design-Expert 8.0.6 软件对表 1 的数据进行柚苷酶活影响因子的显著性分析,结果见表 2。

表 1 PB 试验设计方案及结果

Table 1 Design and results of the Plackett-Burman experiment

试验号	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	酶活/(U/mL)
1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	532.78±2.39
2	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	548.42±2.41
3	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	494.36±1.98
4	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	484.50±1.79
5	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	486.21±2.13
6	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	527.68±1.41
7	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	532.78±2.79
8	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	476.03±2.27
9	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	490.28±2.01
10	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	501.54±0.79
11	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	513.42±1.44
12	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	491.96±2.13

表 2 柚苷酶活影响因子的显著性分析

Table 2 Significant factor analysis of naringinase activity

代码	因素	低水平	高水平	回归系数	p 值	显著性
A	柚皮苷质量浓度/(g/L)	1	1.25	0.14	0.95	
B	硝酸钠质量浓度/(g/L)	2	2.5	17.77	0.003 7	**
D	温度/℃	28	30	5.92	0.07	
E	时间/h	108	120	0.085	0.97	
G	氯化钙质量浓度/(g/L)	1	1.25	-6.89	0.049	*
H	接种体积分数/%	5	6	0.25	0.91	
J	硫酸镁质量浓度/(g/L)	0.5	0.63	5.53	0.083	
K	磷酸氢二钾质量浓度/(g/L)	1	1.25	-8.3	0.031	*

注:“**”表示 p 值小于 0.01,显著性极高;“*”表示 p 值小于 0.05,显著性较高。

由表 2 可以看出,对 *A. alternata* SK37.002 产柚苷酶影响较大因素主要有硝酸钠($p=0.003\ 7$)、氯化钙($p=0.049$)、磷酸氢二钾($p=0.031$),这 3 个因素对产酶影响较为显著,其中硝酸钠的 p 值小于 0.01,可信度高于 99%,氯化钙和磷酸氢二钾 p 值小于 0.05,大于 0.01,可信度高于 95%。其中硝酸钠的回归系数为正数,为正效应,在设计响应面实验时要适当增加其添加量,氯化钙和磷酸氢二钾为负效应,设计试验时应适当减少其添加量。因此,选择这

三个因素做响应面实验。

2.5 最陡爬坡实验

由于响应面拟合方程只有在考察的附近区域里才充分接近实际的情形,因此应使得显著因素的水平尽量接近最大产酶区域再创建有效的拟合方程,最陡爬坡实验能够满足此要求。根据 PB 试验得到的结论,设定爬坡方向和步长,硝酸钠每次提高 0.5 个单位,氯化钙和磷酸氢二钾每次降低 0.1 个单位,结果见表 3。

表 3 最陡爬坡试验设计及结果

Table 3 Design and results of the steepest ascent experiment

水平	NaNO ₃ /(g/L)	CaCl ₂ /(g/L)	K ₂ HPO ₄ /(g/L)	柚苷酶酶活/(U/mL)
0	3	1	1	469.45±2.13
0+△1	3.5	0.9	0.9	528.65±2.37
0+△2	4	0.8	0.8	600.42±2.49
0+△3	4.5	0.7	0.7	589.42±2.24
0+△4	5	0.6	0.6	553.00±1.97
0+△5	5.5	0.5	0.5	520.78±2.01
0+△6	6	0.4	0.4	496.80±1.88
0+△7	6.5	0.3	0.3	467.31±1.94

由表 3 可知,0+△2 水平时柚苷酶酶活达到最大值,可以确定最佳发酵培养基在 0+△2 水平附近,故选此水平为中心点进行接下来的响应面设计。

2.6 Box-Behnken Design 试验设计及结果

Box-Behnken Design(BBD)法是响应面分析法中常用的设计方法之一,可以用较少的实验次数对实验进行全面研究,通过对几个响应过程变量进行数学建模和分析来定向优化分析的因素^[8]。作者依据 Plackett-Burman 试验确定的因素与最陡爬坡实验确定的范围,采用 BBD 实验设计 A. *alternate* SK37.002 发酵产柚苷酶培养基进行三因素三水平的响应面分析,各个因素与水平见表 4,BBD 实验设计及结果见表 5。

采用 Design-Expert 8.0.6 软件对表 5 中的数据进行二次回归分析,得到回归方程为: $Y=612.98+21.68X_1-9.23X_2+2.24X_3-6.06X_1X_2+1.31X_1X_3-$

$3.04X_2X_3-21.02X_1^2-24.14X_2^2-27.71X_3^2$,对二阶回归方程进行方差分析,结果见表 6。

表 4 BBD 试验影响因子和水平设计

Table 4 Factors and levels of the BBD experiment

因素	水平		
	-1	0	1
硝酸钠质量浓度/(g/L)	2	4	6
氯化钙质量浓度/(g/L)	0.4	0.8	1.2
磷酸氢二钾质量浓度/(g/L)	0.4	0.8	1.2

表 5 BBD 试验设计及结果

Table 5 Design and results of the BBD experiment

试验号	硝酸钠质量浓度/(g/L)	氯化钙质量浓度/(g/L)	磷酸氢二钾质量浓度/(g/L)	酶活/(U/mL)
1	0	1	1	550.31±2.47
2	0	0	0	605.52±2.13
3	0	0	0	609.29±1.97
4	-1	1	0	545.88±2.45
5	1	-1	0	601.90±2.41
6	0	0	0	618.07±2.32
7	0	0	0	617.18±1.77
8	0	1	-1	549.18±2.42
9	-1	0	1	541.38±2.39
10	1	1	0	575.64±2.09
11	0	-1	1	579.16±1.76
12	-1	-1	0	547.88±1.31
13	1	0	-1	584.50±2.44
14	0	0	0	615.03±2.53
15	-1	0	-1	542.27±1.89
16	1	0	1	588.84±1.73
17	0	-1	-1	565.86±1.96

表 6 二次回归方程的方差分析

Table 6 Analysis of variance for the second order equation

来源	平方和	自由度	均方	F	P-value Pr>F	显著性
模型	13 091.55	9	1 454.62	57.63	<0.000 1	**
X ₁	3 760.96	1	3 760.96	149.00	<0.000 1	**
X ₂	680.93	1	680.93	26.98	0.001 3	**
X ₃	39.99	1	39.99	1.58	0.25	
X ₁ X ₂	147.05	1	147.05	5.83	0.047	*
X ₁ X ₃	6.84	1	6.84	0.28	0.62	
X ₂ X ₃	37.02	1	37.02	1.47	0.27	
X ₁ ²	1 859.84	1	1 859.84	73.68	<0.000 1	**
X ₂ ²	2 453.38	1	2 453.38	97.20	<0.000 1	**
X ₃ ²	3 233.54	1	3 233.54	128.11	<0.000 1	**
残差	176.69	7	25.24			
失拟	56.76	3	18.92	0.63	0.63	
纯误差	119.93	4	29.98			
总和	13 268.24	16				

注:“**”表示 p 值小于 0.01,显著性极高;“*”表示 p 值小于 0.05,显著性较高。

从表 6 可以看出,模型回归极显著,其中方程的相关系数 $R^2=98.67\%$,说明回归方程的拟合程度很好。调整相关系数 $\text{Adj } R^2=97.05\%$,说明响应面 97.05% 的变化可以由此模型解释,模型与实际情况拟合得很好。硝酸钠和氯化钙对 *A. alternate* SK.37.002 菌株产柚苷酶的影响非常显著,并且二者之间有较为显著的交互作用。同硝酸钠和氯化钙之间的交互作用相比,硝酸钠与磷酸氢二钾、氯化钙与磷酸氢二钾之间的交互作用并不显著。这表明了各因素对柚苷酶酶活的影响并不是单纯的线性关系,二次项对柚苷酶活也有重要的影响。表格中失拟项 $P=0.63$,大于 0.05,表明试验数据正常,模型合适。

为了确定最佳液态发酵条件,用 Design-Expert 8.0.6 软件对回归模型进行响应面分析。绘制三维立体响应面图,其中每个响应面分析图分别代表着两个独立变量之间的相互作用,此时第三个变量保持在最佳水平,见图 4。

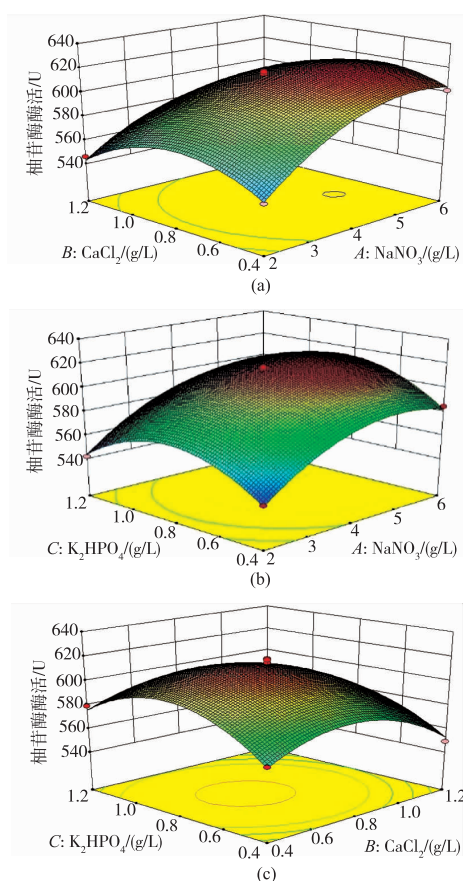


图 4 各因素交互作用的响应面图

Fig. 4 Response surface plots for the pairwise interactive effects of NaNO_3 , CaCl_2 and K_2HPO_4 on naringinase activity in final fermentation broth

从图 4 可以看出,硝酸钠、氯化钙、磷酸氢二钾添加量与酶活存在显著的相关性,回归方程存在最大值,为了求得 X_1 、 X_2 、 X_3 的最佳取值,对所得的回归拟合方程的变量求一阶偏导数,并令其为 0,得到三元一次方程组,求解得出该模型的极值点: $X_1=3.40$ 、 $X_2=-19.72$ 、 $X_3=1.20$,即硝酸钠、氯化钙、磷酸氢二钾的最佳质量浓度分别为 5.11、0.69、0.83 g/L 时,响应值 Y 达到最大值,即酶活最高为 620.31 U/mL,菌体干重比未优化前增长了 142.3%,表 7 为近 5 年柚苷酶发酵酶活的对比。

表 7 近 5 年柚苷酶发酵酶活对比

Table 7 Comparison of Naringinase activity in five years

年份	菌株	发酵酶活	参考文献
2011	青霉 1523	891.79	18
2012	黑曲霉 DB056	232.5	19
2012	黑曲霉 A13	365.31	20
2012	黑曲霉 C15	1395.9	21
2012	黑曲霉 TC-01	1216.7	22
2012	黑曲霉 3-9	1068.7	23
2013	黑曲霉 D7	291.41	24
2015	棘孢曲霉 LLB-40	264.07	25

为了检验模型的准确性,在预测最佳液态发酵培养基下进行发酵实验 3 次,为了方便操作,实验选择硝酸钠、氯化钙、磷酸氢二钾的质量浓度分别为 5、0.7、0.8 g/L,所得的实际酶活为 (624.73 ± 30.33) U/mL,与理论预测值 620.31 U/mL 接近,与初始酶活相比提高了 90%。由此可见,响应面优化得到的最佳培养基成分准确可靠,具有实际意义。

3 结 语

作者以实验室筛选得到的 *Alternaria alternate* 为出发菌株。通过常温室压等离子体 (ARTP) 诱变获得了一株发酵酶活达 327.32 U/mL 的菌株,产酶能力比野生菌株提高了 208%。可以看出 ARTP 诱变育种技术是一种新型、有效的微生物诱变育种方法,为柚苷酶的工业化生产提供了获得优良菌种的方法。通过单因素实验、Plackett-Burman 试验、最陡爬坡实验和 Box-Behnken 试验对该菌产柚苷酶的液态摇瓶发酵培养基成分进行优化,得到 *Alternaria alternate* 产柚苷酶的最佳条件:蔗糖 5 g/L、柚皮苷 1 g/L、硝酸钠 5 g/L、磷酸氢二钾 0.8 g/L、氯化钙 0.7 g/L、氯化钾 0.5 g/L、硫酸镁 0.5 g/L。在此条件

下,发酵酶活可达 624.73 ± 30.33 U/mL,比未优化之前增加了 90.86%。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] YADAV V, YADAV P K, YADAV S, et al. alpha-L-Rhamnosidase: A review[J]. **Process Biochemistry**, 2010, 45(8): 1226-35.
- [3] CUI Peiwu, LI Jilie, XIAO Zuwei, et al. Immobilization of *penicillium* sp. naringinase on epoxy resin[J]. **Food and Fermentation Industries Editorial Staff**, 2014(5): 87-92. (in Chinese)
- [4] LIU Ping, ZHENG Yaan, WANG Yisi, et al. Bioconversion of flavonoidal glycosides in the leaves of *hippophae rhamnoides* into aglycones[J]. **Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities**, 2007, 20(6): 996-1000. (in Chinese)
- [5] TSEN H Y, YU G K. Limonin and naringin removal from grapefruit juice with naringinase entrapped in cellulose triacetate fibers [J]. **Journal of Food Science**, 1991, 56(1): 31-34.
- [6] LI Yushan. Study on the extracting of L-rhamnose from the hydrolyzation liquid of rutinum by ferment[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009(4): 532-534. (in Chinese)
- [7] LIU Xin, CUI Yu, YANG Ling. Roles of glycosidase in drug discovery and development[J]. **Natural Product Research and Development**, 2009(4): 532-534. (in Chinese)
- [8] HU Kui, LI Bangxiu, WU Zhenling. Screening and cultivation of naringinase-producing fungus[J]. **Journal of Southwest Agricultural University**, 2003(2): 141-143. (in Chinese)
- [9] 文蓉. 柚苷酶生产菌株的选育及其酶学性质的研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2009.
- [10] SEKEROGU G, FADILGLOU S, GOGUS F. Immobilization and characterization of naringinase for the hydrolysis of naringin [J]. **European Food Research and Technology**, 2006, 224(1): 55-60.
- [11] CUI Peiwu, LI Jilie, WEN Rong, et al. Breeding of high-yield naringinase strain from *Penicillium* sp. P-M1 by UV mutation[J]. **Northern Horticulture**, 2009(2): 42-44. (in Chinese)
- [12] LU Y, WANG L, MA K, et al. Characteristics of hydrogen production of an *Enterobacter aerogenes* mutant generated by a new atmospheric and room temperature plasma (ARTP)[J]. **Biochemical Engineering Journal**, 2011, 55(1): 17-22.
- [13] ZONG H, ZHAN Y, LI X, et al. A new mutation breeding method for *Streptomyces albulus* by an atmospheric and room temperature plasma[J]. **Afr J Microbiol Res**, 2012, 6(13): 3154-3158.
- [14] JIANG P X, WANG L Y, HUANG Z L, et al. Studies on the mutation breeding mechanism of *Streptomyces avermitilis* by a novel atmospheric-pressure, low-temperature discharge plasma[J]. **Journal of Biotechnology**, 2008, 136: S22.
- [15] FAN Xinlei, XIAO Chengjian, GU Qiuya, et al. ARTP mutation breeding of glucose oxidase-producing strains and optimization of fermentation conditions[J]. **Industrial Microbiology**, 2015(1): 15-19. (in Chinese)
- [16] ZHANG Jialin, TAN Xiaofang, SUN Junshe, et al. Optimization of naringinase production by *Aspergillus niger* S-05 in liquid state fermentation[J]. **China Brewing**, 2008, 15: 19-22. (in Chinese)
- [17] ZHANG Chen, LIU Zhiwei, ZHENG Yantong, et al. Screening of naringinase-producing strain B04 and its properties of enzyme production[J]. **Industrial Microorganism**, 2007(5): 38-41. (in Chinese)
- [18] LI Jilie, CUI Peiwu, LU Yaobang, et al. Optimization of shaking-flask fermentation medium for naringinase production by *Penicillium* sp. 1523[J]. **Food Science**, 2011(9): 151-155. (in Chinese)
- [19] ZHANG Qibiao, XIAO Anfeng, NI Hui, et al. Effects of oxygen conditions on naringinase production in *Aspergillus niger* DB056 fermentation[J]. **Food Science And Technology**, 2012(6): 6-10. (in Chinese)
- [20] ZHANG Yi, ZENG Hongliang, YAO Hui, et al. Isolation and screening of naringinase producing strain and its identification[J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**, 2012(2): 196-201. (in Chinese)
- [21] LI Zhijian, TAN Xinghe, LI Gaoyang. Study on the optimum fermentation conditions of *Aspergillus niger* C-15 for the production of naringinase[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2012, 22: 229-233. (in Chinese)
- [22] DENG Yuan, MAO Yong, ZHANG Meili, et al. Optimization of culture conditions and characteristics of naringinase from *Aspergillus niger* TC-01[J]. **Academic Periodical of Farm Products Processing**, 2012(8): 28-35. (in Chinese)
- [23] LONG Junmin. Research of determination methods of naringinase's vigor[J]. **Jiangxi Forestry Science and Technology**, 2012

- (3):28-30,64.(in Chinese)
- [24] LIU Yiwen, LIU Suchun. Screening and preliminary identification of naringinase-producing strain[J]. **Food and Machinery**, 2013 (3):55-57,78.(in Chinese)
- [25] LU Langbo, DAN Yang, XIA Jinlan. Screening and identification of the strain for high-yield naringinase[J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**, 2015(5):206-212.

会 议 消 息

会议名称(中文):第 32 届欧洲食品科技联盟国际会议

会议名称(英文):32nd EFFoST International Conference

所属学科:农林基础,作物学及林木育种、生物学、公共卫生与预防医学

开始日期:2018-11-06

结束日期:2018-11-08

所在国家:法国

具体地点:南特

主办单位:欧洲食品科技联盟

会议网站:<http://www.effostconference.com/>

会议背景介绍:该会议由 EFFoST(European Federation of Food Science and Technology)主办,由艾斯维尔管理。欧洲食品科学与技术联盟(EFFoST)是一个以欧洲为基础的非政府组织,致力于促进食品科学和技术的发展。它由 21 个不同的欧洲国家的 80 个不同的社会组成。他们是国际食品科学与技术联盟的一个区域性组织。该会议已经举办了 30 届,每年在欧洲不同的国家举办。会议以口头报告和论文张贴为主要形式,出版会议论文集。会议主题为:食品卫生与安全、食品造假、减少废物和可持续性发展、先进分析技术、食品加工新技术、功能食品、营养和健康、美食、创业、开放创新与战略联盟。