DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20251118007
引用格式: 姚博伟, 陈璐, 高红亮. 高产 α-葡萄糖苷酶黑曲霉菌株的发酵条件优化[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(7): 101–109.
YAO BW, CHEN L, GAO HL. Optimization of fermentation conditions for *Aspergillus niger* strains with high-yield α-glucosidase [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(7): 101–109. (in Chinese with English abstract).

高产 α-葡萄糖苷酶黑曲霉菌株的发酵条件优化

姚博伟[1*], 陈　璐[2,3], 高红亮[2*]

(1. 宁夏计量质量检验检测研究院, 银川　750200; 2. 华东师范大学生命科学学院, 上海　200241;
3. 宁夏师范大学资源环境与生命科学学院, 固原　756000)

摘　要: 目的　优化高产 α-葡萄糖苷酶黑曲霉菌株的发酵条件。**方法**　以黑曲霉为发酵菌种, 以 α-葡萄糖苷酶酶活为评价指标, 利用单因素优化考察温度、转速、接种量等发酵条件, 应用正交试验优化发酵培养基成分。**结果**　黑曲霉发酵产 α-葡萄糖苷酶最优发酵条件: 麦芽浸粉 4%, 酵母蛋白胨 3%, 曲拉通 X-100 0.10%, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.5%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, 初始发酵 pH 5.9, 接种量 2%。此条件下 α-葡萄糖苷酶酶活为 0.530 U/mL, 较优化前酶活提升 28%。**结论**　本研究所优化得到的黑曲霉产 α-葡萄糖苷酶发酵培养条件及发酵培养基成分, 与优化前相比, 显著地提高了 α-葡萄糖苷酶酶活(P<0.05), 简便易行, 可为 α-葡萄糖苷酶进一步工业化应用和产业化开发奠定理论基础。

关键词: α-葡萄糖苷酶; 黑曲霉; 发酵优化; 正交试验

Optimization of fermentation conditions for *Aspergillus niger* strains with high-yield α-glucosidase

YAO Bo-Wei[1*], CHEN Lu[2,3], GAO Hong-Liang[2*]

(1. *Ningxia Academy of Metrology & Quality Inspection*, *Yinchuan* 750200, *China*; 2. *School of Life Sciences*, *East China Normal University*, *Shanghai* 200241, *China*; 3. *College of Resources and Environmental Sciences and Life Sciences*, *Ningxia Normal University*, *Guyuan* 756000, *China*)

ABSTRACT: Objective　To optimize the fermentation conditions for *Aspergillus niger* strains with high-yield α-glucosidase. **Methods**　Using *Aspergillus niger* as the fermentation strain and α-glucosidase activity as the evaluation index, single-factor optimization was employed to investigate fermentation conditions including temperature, rotation speed and inoculum size. Orthogonal experiment was applied to optimize the components of the fermentation medium. **Results**　The optimal fermentation conditions for α-glucosidase production by *Aspergillus niger* were as follows: Malt extract powder 4%, yeast peptone 3%, Tween X-100 0.10%, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.5%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, initial fermentation pH 5.9 and inoculum size 2%. Under these conditions, the α-glucosidase activity reached 0.530 U/mL, which was 28% higher than that before optimization.

收稿日期: 2025-11-18
基金项目: 2023 年度宁夏回族自治区青年科技托举人才培养项目(宁科协发组字〔2024〕6 号); 宁夏科技惠民项目(2024CMG03049)
第一作者/*通信作者: 姚博伟(1993—), 女, 硕士, 工程师, 主要研究方向为应用微生物及食品质量安全。E-mail: ybw2016@sina.com
***通信作者:** 高红亮(1973—), 男, 博士, 副教授, 主要研究方向为应用微生物与酶学研究。E-mail: hlgao@bio.ecnu.edu.cn

Conclusion The optimized fermentation conditions and medium components for α-glucosidase production by *Aspergillus niger* in this study significantly enhance the α-glucosidase activity compared with the unoptimized ones (P<0.05). The optimized strategy is simple and feasible, which lays a theoretical foundation for the further industrial application and commercial development of α-glucosidase.

KEY WORDS: α-glucosidase; *Aspergillus niger*; fermentation optimization; orthogonal experiment

0 引 言

α-葡萄糖苷酶(EC3.2.1.20)又称作 α-转移葡萄糖苷酶(EC2.4.1.24)是淀粉水解酶类中的一种, 主要在细胞外起作用[1–5]。它可以从多糖的非还原末端水解底物的 α-(1,4)-糖苷键, 生成 α-*D*-葡萄糖, 从而引发血糖上升[6–9]。通常把 α-葡萄糖苷酶归类于第 3 类水解酶, 主要水解二糖如麦芽糖、低聚糖、芳香糖苷, 能以蔗糖和多聚糖为底物[10]。同时, 它还具有转糖苷作用, 可将低聚糖中的 α-1,4-糖苷键转化成 α-1,6-糖苷键或其他形式的链接, 从而得到非发酵性的低聚异麦芽糖(isomaltose, IMO)(包括异麦芽糖、潘糖、异麦芽三糖、异麦芽四糖等)或糖酯、糖肽等[11–14]。

α-葡萄糖苷酶在自然界分布十分广泛, 种类繁多, 性质各异, 几乎存在于所有生物体内[15]。在生物机体的新陈代谢过程中起着非常重要的作用, 它可将食物中的多糖转化为单糖, 使其被机体在代谢过程中利用[16]。它同时也参与了机体内糖脂和糖蛋白的合成以及代谢过程[17]。目前已经进行研究的 α-葡萄糖苷酶, 只有少数来源于植物和动物, 绝大多数来自微生物。目前产酶较高的为黑曲霉(*Aspergillus niger*)和米曲霉以及酵母, 其中以黑曲霉来源的 α-葡萄糖苷酶转糖苷作用最为突出, 大多数工业化应用的 α-葡萄糖苷酶也来自于黑曲霉[18]。

α-葡萄糖苷酶是一种具有转糖苷作用的外切型糖苷酶, 在工业上主要应用于 IMO 的生产[19–20]。IMO 是一种公认的有效的双歧杆菌生长的促进因子, 具有优良的耐酸耐热性、保湿吸水性、预防龋齿性及难发酵性和低热值[21], 且细菌和有害菌对异麦芽糖利用较低, 因此被广泛的应用于医疗、保健和食品添加剂行业中。除生产 IMO 外, α-葡萄糖苷酶还可改善啤酒的口感和风味, 用于啤酒的酿造[22]; 与 α-淀粉酶一起用于提升葡萄糖浆生产时葡萄糖的出产率[23]。在医学诊断上, α-葡萄糖苷酶可作为 II 型糖尿病治疗抑制剂筛选模型的主要反应试剂[24]。

IMO 安全无毒, 热量低, 具有多种优良特性, 被广泛地应用于保健、医疗、食品、饲料行业中[25]。作为 IMO 合成的关键酶, 为了满足我国日益增长的异麦芽糖市场以及基础科研需求, 实现 α-葡萄糖苷酶自给非常必要。近年来, 有学者通过在大肠杆菌和毕赤酵母[15,26–27]中异源表达 α-葡萄糖苷酶基因从而提高产量, 但这种方法仍需通过安全性审查方可在食品工业中应用。相对于异源表达, 传统诱变是一种安全、稳定的提高产量的方式。它在黑曲霉育种中得到了广泛的应用和验证[28], 所以本研究主要通过传统诱变的方法来提高黑曲霉菌株产 α-葡萄糖苷酶的酶活力。

因此, 为提升 α-葡萄糖苷酶产量, 本研究以本课题组前期诱变筛选得到的高产 α-葡萄糖苷酶为发酵菌种, 利用单因素试验结合正交试验, 以 α-葡萄糖苷酶酶活为指标, 对黑曲霉产 α-葡萄糖苷酶发酵条件进行优化, 以期为 α-葡萄糖苷酶研究及工业化应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

高产 α-葡萄糖苷酶黑曲霉菌株 ASP004-G 由华东师范大学生命科学学院微生物实验室保存。

麦芽糖、蔗糖、葡萄糖、可溶性淀粉、马铃薯淀粉、乳糖、$NaNO_3$、马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar, PDA)、$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$、KCl、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$、$FeCl_3 \cdot 6H_2O$、$MnCl_2$、$CaCl_2$、$FeCl_3$、NaCl、NH_4Cl、$(NH_4)_2SO_4$、Na_2CO_3、3,5-二硝基水杨酸、醋酸、醋酸钠、尿素、吐温 80、曲拉通 X-100、司班 80、琼脂粉、孟加拉红(分析纯, 国药集团上海试剂有限公司); 4-硝基苯基-α-吡喃葡萄糖苷 (4-nitrophenyl-α-*D*-galactopyranoside, PNPG)、α-甲基葡萄糖(α-*D*-methylglucoside, α-MG)(分析纯, 德国达姆施塔特默克集团); 麦芽浸粉(生化试剂, 美国赛默飞世尔科技有限公司); 酵母浸粉、酵母蛋白胨、小麦蛋白胨、鱼粉蛋白胨(生化试剂, 安琪酵母有限公司); 玉米淀粉、玉米浆(生化试剂, 上海阿拉丁生物试剂有限公司)。

1.2 仪器与设备

PB-10 型 pH 计、SQP 型电子天平(精度 0.0001 g)(德国赛多利斯公司); DKY-II型恒温调速回转式摇床(上海知楚设备有限公司); SW-CJ-2D 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); R1-250 型低温恒温培养箱、SorvallRC-6plus 型冷冻离心机(美国赛默飞世尔科技有限公司公司); Milli-Q 去离子水发生器(德国达姆施塔特默克集团); Cytation1 型酶标分析仪(美国安捷伦科技有限公司); HJJF-136 型电热恒温鼓风干燥箱(上海跃进医疗器械厂)。

1.3 培养基配制

固体斜面及平板培养基: PDA; 液体发酵培养基: 麦

芽浸粉 40 g/L, 酵母浸粉 20 g/L, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 5 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, pH 5.9; 以上培养基均为 121 ℃灭菌 20 min。

1.4 实验方法

1.4.1 黑曲霉菌株的活化与培养

使用接种环从实验室保藏的高产黑曲霉菌株 ASP004-G 斜面上刮取孢子并接种于新鲜 PDA 斜面, 30 ℃培养 60 h 后, 于 4 ℃冰箱中保存。

1.4.2 黑曲霉孢子悬液的制备

在 1.4.1 划线得到的 PDA 试管斜面中加入 15 mL 0.1%的无菌吐温 80 水溶液, 用灭菌过的接种环刮取孢子, 倒入装有玻璃珠的小三角瓶中, 30 ℃、200 r/min 摇床振荡 30 min 后, 于超净工作台中使用已灭菌脱脂棉过滤, 将过滤后的孢子使用血球计数板于显微镜下计数, 稀释到适当的浓度。

1.4.3 摇瓶发酵方法

制备数量级为 10^7 CFU/mL 的孢子悬液, 以 2%接种量接种于装有 50 mL 液体发酵培养基的 250 mL 摇瓶中, 每个实验条件设置 3 个平行, 30 ℃, 200 r/min 振荡培养 5 d 后测定 α-葡萄糖苷酶酶活。

1.4.4 酶活测定方法

α-葡萄糖苷酶可催化底物 PNPG 释放对硝基苯酚(p-nitrophenol, pNP), pNP 在碱性条件下显黄色, 可通过比色法测定 pNP 的产量来表示酶活的高低[29]。吸取 10 μL 经适当稀释的粗酶液于 96 微孔板中, 加入 20 μL 底物 PNPG (5 mmol/L)、70 μL 醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 5.5, 0.1 mol/L)于 50 ℃恒温培养箱中反应 15 min 后立即加入 100 μL Na_2CO_3 (1 mol/L)终止反应并显色。使用酶标分析仪于 405 nm 下测定吸光度值。酶活单位定义为: 在 pH 5.5, 50 ℃条件下, 每分钟催化生产 1 μmol pNP 的酶的量为一个标准酶活力单位(U)。

1.4.5 生物量测定方法

将滤纸置于 80 ℃恒温鼓风干燥箱中烘干至恒重, 然后用滤纸过滤发酵液, 用蒸馏水冲洗菌体 3 次, 将滤纸连同菌体置于 80 ℃恒温鼓风干燥箱中过夜烘干, 称量烘干后滤纸和菌体重量, 减去滤纸重量即为菌体生物量[30]。

1.4.6 还原糖测定方法

根据 3,5-二硝基水杨酸法[31]测定还原糖。

1.4.7 发酵工艺优化

以 α-葡萄糖苷酶酶活为指标, 采用单因素试验对黑曲霉产 α-葡萄糖苷酶发酵培养条件进行优化, 包括接种量(0.1%、0.5%、1.0%、2.0%、3.0%、4.0%、8.0%), 固定发酵初始 pH 为 5.9; 发酵初始 pH (3.9、4.4、4.9、5.4、5.9、6.4、6.9、7.4), 固定接种量为 2%。每个实验处理重复 3 次, 结果取平均值。

1.4.8 单因素试验优化发酵培养基成分

以 α-葡萄糖苷酶酶活为指标, 对培养基中的碳源氮源种类和浓度进行优化。以麦芽浸粉、麦芽糖、葡萄糖、蔗糖、可溶性淀粉、马铃薯淀粉、玉米淀粉为单一碳源, 以酵母浸粉、鱼粉蛋白胨、酵母蛋白胨、小麦蛋白胨、玉米浆、硝酸钠、硫酸铵、氯化铵和尿素为氮源。在一定浓度下, 用相应的成分替换发酵培养基的成分。确定最优碳源后, 分别以 2%、3%、4%、5%、6%的最优碳源添加量配制培养基, 培养基其他成分不变。以原始培养基为对照, 接种高产菌株孢子悬液(5×10^7 CFU/mL), 按照 1.4.3 发酵方法发酵, 测定酶活。确定最优氮源后, 分别以 1%、2%、3%、4%、5%的最优碳源添加量配制培养基, 培养基其他成分不变。以原始培养基为对照, 接种高产菌株孢子悬液, 按照 1.4.3 中发酵方法发酵, 测定酶活。

分别向发酵培养基中添加 0.10%、0.25%、0.50%含量的吐温 80、司班 80 和曲拉通 X-100 3 种表面活性剂, 以原始培养基为对照, 接种高产菌株孢子悬液, 按照 1.4.2 中发酵方法发酵, 测定酶活。

分别对发液体发酵培养基中添加 0.5%的 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$、$FeCl_3$、$MnCl_2$、NaCl、$CaCl_2$, 培养基其他成分不变。以原始培养基为对照, 接种高产菌株孢子悬液, 按照 1.4.2 中发酵方法发酵, 测定酶活。

1.4.9 正交试验优化发酵培养基成分

通过单因素实验结果分析确定对产酶影响最大的 3 个因素为碳源麦芽浸粉浓度(*A*)、氮源酵母蛋白胨浓度(*B*)及表面活性剂曲拉通 X-100 浓度(*C*) 3 个因素。每个因素选取 3 个水平进行 3 因素 3 水平($L_9 3^3$)正交试验, 按照各实验组合配制培养基, 其余成分不变, 测定各实验组合所产 α-葡萄糖苷酶酶活, 正交试验因素水平表见表 1。

表 1　正交试验因素水平表

Table 1　Factors and leves table of the orthogonal test

水平	因素		
	A/%	*B*/%	*C*/%
1	4	2	0.10
2	5	3	0.25
3	6	4	0.50

1.4.10 高产菌株 ASP004-G 的代谢曲线测定

制备高产菌株孢子悬液(数量级 5×10^7 CFU/mL), 以 1.4.8 中优化得到的最优接种量接种于正交试验得到的最优发酵产酶培养基中, 按照 1.4.3 中所述方法进行发酵, 分别于 0、9、12、18、24、36、42、48、60、72、84、96、108、120、144、168 h 时取样, 测定酶活、生物量、pH 及还原糖含量。

1.5 数据处理

采用正交试验设计助手、Excel 2013、SPSS 22.0 统计软件进行数据处理，分别采用独立样本 t 检验和单因素方差分析来评估不同样本之间的显著差异，以 $P<0.05$ 为有显著性差异，$P<0.01$ 为有极显著性差异。采用 GraphPad prism 7.0 进行图表绘制。

2 结果与分析

2.1 发酵条件优化

发酵时不同接种量对 α-葡萄糖苷酶酶活的影响如图 1(A)所示。由图 1(A)可见，随着接种量的增加，酶活先上升后下降，当接种量在 0.5%~4.0%时，对高产菌株产酶能力影响不大。当接种量为 2.0%时，酶活达到最高值为(0.383±0.026) U/mL，因此最优接种量为 2.0%。

将 1.3 中所述液体发酵培养基中初始 pH 分别调整为 3.9、4.4、4.9、5.4、5.9、6.4、6.9、7.4，以原始培养基为对照，接种高产菌株孢子悬液，按照 1.4.3 中发酵方法发酵，测定 α-葡萄糖苷酶酶活，结果如图 1(B)所示。图 1(B)表明，发酵培养基初始 pH 对 ASP004-G 产酶能力影响较大，随着初始 pH 的增大，酶活先上升后下降，当初始 pH 范围在 4.9~5.9 时，ASP004-G 产酶较高，当发酵初始 pH 为 5.4 时，酶活达到最高值为(0.411±0.017) U/mL。因此，ASP004-G 产酶的最优初始 pH 范围为 4.9~5.9，所以选择 5.9 为液体发酵培养基的初始 pH。

2.2 单因素试验优化发酵培养基成分结果

2.2.1 不同碳源对 α-葡萄糖苷酶酶活的影响

分别以麦芽糖、葡萄糖、蔗糖、可溶性淀粉、马铃薯淀粉、玉米淀粉为碳源，以原始发酵培养基为对照，研究不同碳源及其浓度对黑曲霉 ASP004-G 产 α-葡萄糖苷酶的影响，结果如图 2 所示。

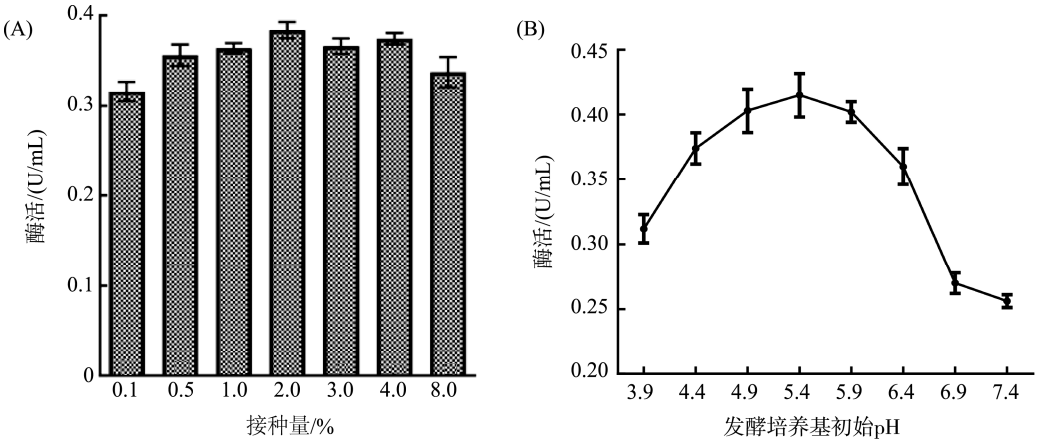
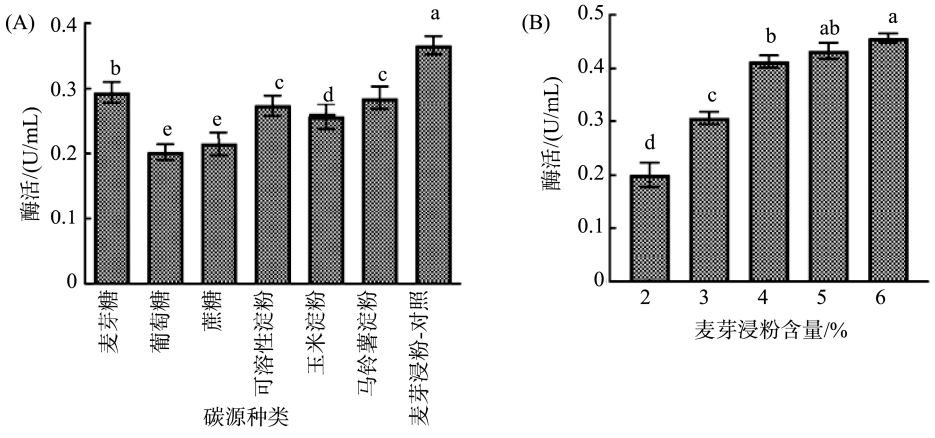


图 1 接种量和发酵初始 pH 对高产菌株 ASP004-G 产酶的影响

Fig.1 Effects of inoculation and initial pH of fermentation on enzyme production of high-yield strain ASP004-G



注：不同字母表示差异显著($P<0.05$)，图 3 同。

图 2 碳源种类(A)及麦芽浸粉浓度(B)对 AP004-G 产酶的影响

Fig.2 Effects of carbon source species (A) and maltextract concentration (B) on the enzyme production of AP004-G

图 2(A)表明, 不同碳源对 ASP004-G 产酶能力影响较大, 以麦芽糖和麦芽浸粉为碳源时, 酶活较高, 与其他碳源相比, 具备显著性差异(P<0.05)。以麦芽浸粉为碳源时, 酶活达到最高值(0.366±0.008) U/mL, 这可能是因为麦芽糖和麦芽浸粉作为 α-葡萄糖苷酶的作用底物, 起到了诱导菌株产酶的作用, 诱导酶是在环境中存在诱导物的情况下(一般是酶的作用底物), 由诱导物诱导而生成的酶, 大多数微生物产生的水解酶都属于诱导酶[32]。对以麦芽糖和麦芽浸粉为碳源培养基产酶酶活进行单因素方差分析, 具备显著差异(P<0.05)。这可能是因为与麦芽糖相比, 麦芽浸粉除了含有 70%的还原糖外, 还含有 1.6%的总氮和 0.6%的氨基氮以及一些维生素和氨基酸及多种矿物质等。陈艳娟[33]对臭曲霉发酵产 α-葡萄糖苷酶培养基成分进行优化时, 确定麦芽浸粉为最优碳源。图 2(B)表明, 酶活随着麦芽浸粉浓度升高而上升, 在浓度为 6%时达到最高值(0.456±0.006) U/mL。本研究表明, 麦芽浸粉是 ASP004-G 的最优碳源, 最佳添加浓度为 6%。

2.2.2　不同氮源对 α-葡萄糖苷酶酶活的影响

分别以酵母浸粉、鱼粉蛋白胨、酵母蛋白胨、小麦蛋白胨、玉米浆、硝酸钠、硫酸铵、氯化铵和尿素为氮源, 以原始发酵培养基为对照, 研究不同氮源及其浓度对黑曲霉 ASP004-G 产 α-葡萄糖苷酶的影响, 结果如图 3 所示。

图 3(A)表明, 不同氮源对 ASP004-G 产酶能力影响较大, 其中无机氮源产酶较低, 以酵母浸粉和酵母蛋白胨为氮源时, 酶活较高。其中以酵母蛋白胨为氮源时, 酶活达到最高值 0.406 U/mL, 较对照培养基产酶提高 10.9%, 对以酵母蛋白胨和酵母浸粉为氮源培养基产酶活力进行单因素方差分析, 与其他氮源相比, 具有显著性差异(P<0.05)。图 3(B)表明, 酶活随着酵母蛋白胨浓度升高而上升, 在浓度为 4%时达到最高值 0.412 U/mL, 且 4%和 5%无显著性差异, 考虑经济因素, 选择 2、3、4 为正交试验因素。

本研究表明, 酵母蛋白胨是菌株 ASP004-G 产 α-葡萄糖苷酶的最优氮源, 最佳添加浓度为 4%。

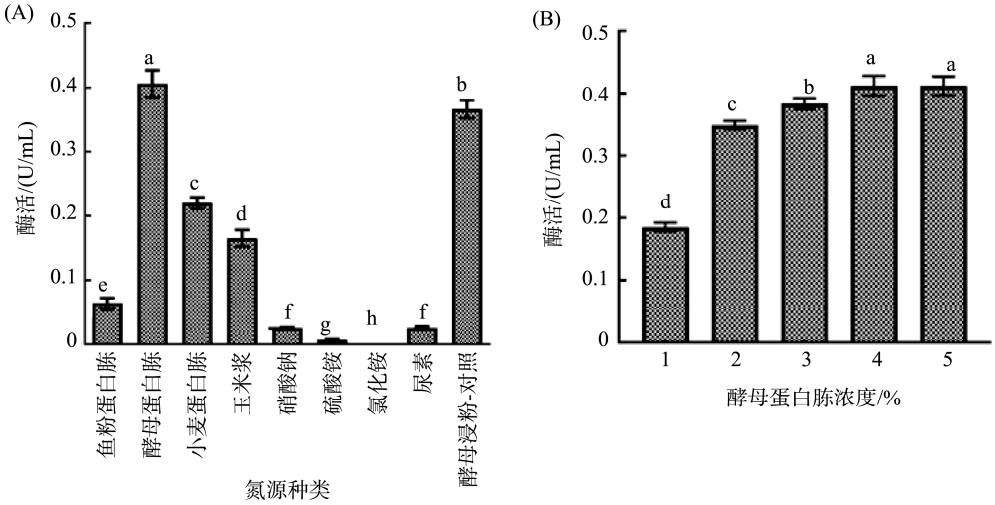
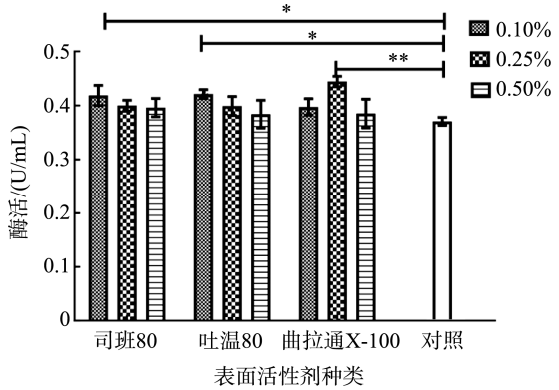


图 3　氮源种类(A)和酵母蛋白胨浓度(B)对 AP004-G 产酶的影响

Fig.3　Effects of nitrogen source species (A) and yeast peptone concentrationon (B) the enzyme production of AP004-G

2.2.3　不同表面活性剂对 α-葡萄糖苷酶酶活的影响

按照 1.4.8 所述实验方法对 ASP004-G 进行添加表面活性剂的实验, 结果如图 4 所示。图 4 表明, 添加表面活性剂对 ASP004-G 产酶能力影响较大, 使用 SPSS 22.0 软件对添加各表面活性剂不同添加量产酶酶活与原始培养基酶活进行单因素方差分析。发现当吐温 80、司班 80 在添加量为 0.10%时, 与原始培养基酶活相比具备显著性差异(P<0.05), 能提高 ASP004-G 的产酶能力。当曲拉通 X-100 添加量为 0.25%时, 与原始培养基酶活相比具备极显著性差异(P<0.01), 能显著提高 ASP004-G 的产酶能力, 为 0.444 U/mL, 较对照培养基产酶(0.370 U/mL)提高 20%。而其余添加量的表面活性剂产酶与原始培养基相比, 无显著性差异(P>0.05)。由于黑曲霉所产 α-葡萄糖苷酶为胞内酶和胞外酶均有, 胞外酶是由细胞原生质体合成后由细胞膜释放出来[31], 推测可能是表面活性剂使得细胞膜通透性增加, 从而使得胞内酶更容易释放出来, 从而使得产酶增加。



注: *表示具有显著性差异(P<0.05); **表示具有极显著性差异(P<0.01)。

图 4　不同种类表面活性剂及其浓度对 ASP004-G 产酶的影响

Fig.4　Effects of different kinds of surfactants and their concentration on the enzyme production of ASP004-G

2.2.4 不同种类无机盐对 α-葡萄糖苷酶酶活的影响

按照 1.4.8 中所述实验方法进行添加无机盐实验，实验结果如表 2 所示。从表 2 中可以看出，添加 0.5% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$、NaCl、$MnCl_2$ 对菌株 ASP004-G 产酶并无影响(P>0.05)；添加 0.5% $FeCl_3$、$CaCl_2$ 对菌株 ASP004-G 产酶有较强抑制作用(P<0.01)。因此，无需在发酵培养集中添加其他无机盐成分。

表 2 不同种类无机盐对 ASP004-G 产酶的影响

Table 2 Effects of different kinds of inorganic salts on the enzyme production of ASP004-G

无机盐种类	酶活/(U/mL)	相对酶活/%
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.351±0.009	92
$FeCl_3$	0.315±0.015	82**
NaCl	0.384±0.017	99
$MnCl_2$	0.380±0.007	99
$CaCl_2$	0.297±0.009	77**
对照	0.383±0.008	100

注：**表示与对照相比具有极显著性差异(P<0.01)。

2.3 正交试验优化发酵培养基成分结果

根据 2.1 的实验结果确定对菌株 ASP004-G 产酶影响最大的 3 个因素分别是碳源麦芽浸粉、氮源酵母蛋白胨、表面活性剂曲拉通 X-100。对这 3 个因素按照表 1 使用正交设计助手软件进行 3 因素 3 水平正交试验设计，正交试验设计与结果及方差分析见表 3、表 4。

由表 3 正交实验分析结果中极差的值可知，影响 ASP004-G 发酵产酶的因素依次为麦芽浸粉浓度>酵母蛋白胨浓度>曲拉通 X-100 浓度。根据 K 大小最优组合为 $A_1B_2C_1$，但该组合并未在表 3 中出现。正交试验得到的最优组合为 $A_1B_2C_2$，此条件下酶活为(0.441±0.014) U/mL，较 2.2.3 中初始液体发酵培养基酶活(0.350±0.009) U/mL 提高 26%。由表 4 方差分析结果可知，麦芽浸粉对酶活力影响显著，酵母蛋白胨和对曲拉通 X-100 对酶活影响不显著。比较 $A_1B_2C_1$ 和 $A_1B_2C_2$ 两组合，其差距在于曲拉通 X-100 的浓度，由于曲拉通 X-100 对酶活影响不显著，为了节约试剂成本，选择最优组合为 $A_1B_2C_1$。

因此，根据单因素优化发酵条件和单因素正交优化发酵培养基成分结果，菌株 ASP004-G 产 α-葡萄糖苷酶最适条件为：麦芽浸粉 4%，酵母蛋白胨 3%，曲拉通 X-100 0.10%，$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.5%，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%，初始发酵 pH 5.9，接种量 2.0%。

2.4 高产菌株 ASP004-G 代谢曲线的测定结果

按照优化得到的最优发酵条件和最适发酵培养基对高产菌株 ASP004-G 进行代谢曲线测定，结果如图 5 所示。

表 3 正交试验设计与结果

Table 3 Design and results of orthogonal test

实验序号	A(麦芽浸粉浓度)/%	B(酵母蛋白胨浓度)/%	C(曲拉通 X-100 浓度)/%	酶活/(U/mL)
1	4	2	0.10	0.412±0.016
2	4	3	0.25	0.441±0.014
3	4	4	0.50	0.422±0.014
4	5	2	0.25	0.338±0.016
5	5	3	0.50	0.396±0.013
6	5	4	0.10	0.387±0.011
7	6	2	0.50	0.368±0.013
8	6	3	0.10	0.391±0.015
9	6	4	0.25	0.436±0.017
K_1	0.425	0.373	0.415	
K_2	0.374	0.405	0.399	
K_3	0.398	0.395	0.384	
极差	0.051	0.042	0.010	

表 4 正交试验结果方差分析

Table 4 Analysis of variance of the orthogonal test results

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
A	0.004	2	8.000	6.940	*
B	0.003	2	6.000	6.940	
C	0.000	2	0.000	6.940	
误差	0.000	4			

注：*表示差异显著(P<0.05)。

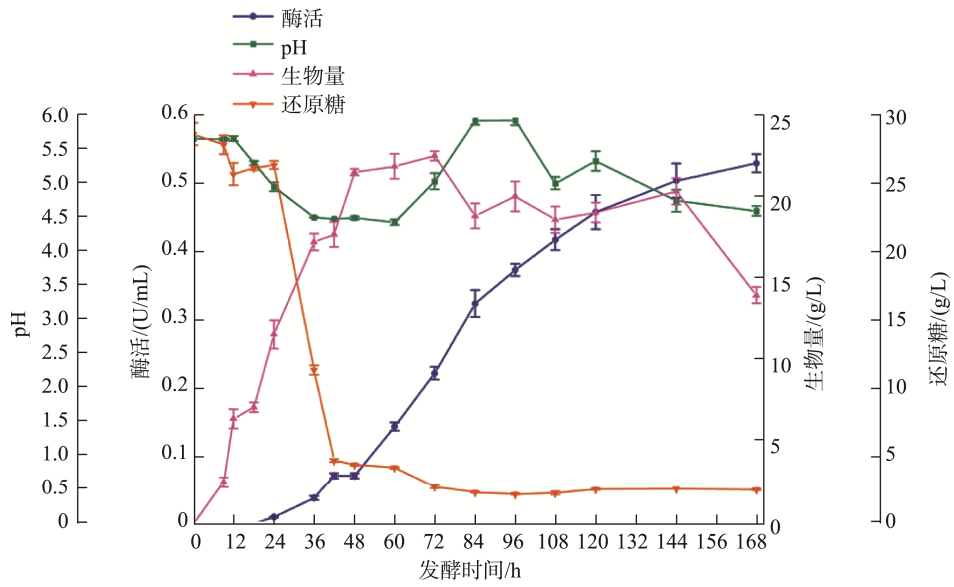


图 5　高产菌株 ASP004-G 的代谢曲线

Fig.5　Metabolic curve of the high-yield strain ASP004-G

如图 5 所示，在最优培养条件下，黑曲霉菌株 ASP004-G 迅速生长，在 0~48 h 时间段内生物量大量积累，48 h 之后趋于稳定，72 h 时到达最高点，为(22.53±0.031) g/L，72 h 后生物量开始降低，144 h 后进入发酵后期，由于营养物质的缺少和菌体自溶，进入衰亡期。发酵液中还原糖含量在发酵 0~42 h 时迅速下降，这与生物量大量增加时间相一致，42 h 后还原糖趋于稳定，72 h 后稳定在 2 g/L 左右。α-葡萄糖苷酶酶活在菌体生长进入稳定期即 48 h 后开始迅速增加，120 h 后增速变慢，但仍在增加，168 h 时仍在增长，为(0.530±0.020) U/mL，这可能是因为发酵后期菌体自溶导致 α-葡萄糖苷酶积累。

发酵液 pH 在整个发酵过程中维持在 4.4~6.0 之间，前期菌体生长导致还原糖的大量消耗，从而产生有机酸使得 pH 降低，于 60 h 到达最低点，为 4.4。60 h 后 pH 开始回升，但在 108 h 后又下降至 5.0 左右，并在整个发酵后期维持在 5.0 左右。这说明发酵过程中 pH 的变化可能是影响黑曲霉菌株产酶的一个重要因素，可以在后续的发酵罐放大发酵实验中考虑加强发酵过程中的 pH 的调控。分别使用优化后得到的最适发酵培养基和原始发酵培养基(1.3 节)对在优化后发酵条件下对高产菌株 ASP004 进行发酵，168 h 时 α-葡萄糖苷酶酶活分别为(0.530±0.020) U/mL 和(0.414±0.016) U/mL，优化后酶活较优化前提高 28%。

3　结论与讨论

本研究以高产 α-葡萄糖苷酶黑曲霉菌株 ASP004-G 为研究对象，通过单因素试验对其 α-葡萄糖苷酶发酵条件进行优化，得出最优发酵条件为：最适 pH 范围为 4.9~5.9；当接种量在 0.5%~4.0%时，接种量对 ASP004-G 产酶并无太大影响，选定最优接种量为 2.0%。通过单因素试验方法对 α-葡萄糖苷酶酶活指标进行优化，结果表明：最优碳源为 5%麦芽浸粉，最优氮源为 4%酵母蛋白胨；添加 0.1%的吐温 80、司班 80 和曲拉通 X-100 对菌株产酶均有促进作用，当添加 0.25%的曲拉通 X-100 时对菌株产酶有较强的促进作用，酶活提高 20%。通过正交试验得到 α-葡萄糖苷酶最优产酶发酵培养基配方为：麦芽浸粉 4%，酵母蛋白胨 3%，曲拉通 X-100 0.10%，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%，$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.5%，pH 5.9。按照优化后最优发酵条件和发酵培养基进行发酵试验，菌株 AS004-G 在优化后培养基中发酵 168 h，酶活为(0.530±0.020) U/mL，较原始培养基产酶(0.414±0.016) U/mL 提高 28%，单因素方差分析显示，具有显著差异(P<0.05)。张皓[34]对产 α-葡萄糖苷酶黑曲霉转苷条件进行优化，其 IMO 含量可达 65%。与本研究相比，本研究并未对 α-葡萄糖苷酶转苷作用进行探讨，还需下一步继续探索。陆兵等[35]对产 α-葡萄糖苷酶黑曲霉发酵条件进行优化，优化后最显著影响发酵条件为装液量和发酵温度(P<0.01)，这可能是因为不同生产菌株相应最优发酵条件不同。应为摇瓶发酵与发酵罐放大发酵不同发酵模式所导致的产量差别。易菊阳等[36]对产 α-葡萄糖苷酶黑曲霉发酵条件进行优化，其最优发酵条件下酶活可达 427 U/mL，与本研究相比，这是因为两项研究对 α-葡萄糖苷酶酶活定义不同。周璐等[37]对产 L-苏氨酸高产菌株发酵条件进行优化，较优化前产率提示 38.1%，说明发酵培养条件的优化可有效提升微生物发酵产物产量水平。本研究仍存在一定不足，仅考虑了 α-葡萄糖苷酶的水解酶活性指标，未考虑转苷酶活性，可进一步在建立转苷产物检测方法的基础上

再建立转苷酶酶活测定方法，从而以转苷酶活性指标优化发酵工艺，同时进行发酵罐放大发酵试验，并对其发酵工艺进行优化。本研究可为 α-葡萄糖苷酶的进一步工业化应用提供一定的理论基础。

参考文献

[1] BO Z, NAN H, WEI Z, *et al*. Development of a strategy for the screening of α-glucosidase-producing microorganisms [J]. Journal of Microbiology (Seoul, Korea), 2020, 58(2): 163–172.

[2] CHEN WP, XIE T, SHAO YC, *et al.* Phylogenomic relation-ships between amylolytic enzymes from 85 strains of fungi [J]. PLoS One, 2012, 7(11): 15.

[3] 路涵, 方婷, 牛晓旭, 等. 新型 α-葡萄糖苷酶 Aga432 分子改造及酶学性质分析[J]. 食品工业科技, 2025, 46(11): 185–193.
LU H, FANG T, NIU XX, *et al*. Molecular modification and enzymatic properties of the novel α-glucosidase Aga432 [J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(11): 185–193.

[4] PATRICIA G, MARÍA G, MERCEDES R, *et al*. Molecular characterization and heterologous expression of a *Xanthophyllomyces* dendrorhous α-glucosidase with potential for prebiotics production [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(7): 3125–3135.

[5] KIM JH, KIM HY, JIN CH. Mechanistic investigation of anthocyanidin derivatives as alpha-glucosidase inhibitors [J]. Bioorganic Chemistry, 2019, 87: 803–809.

[6] 赵灵芝, 赵柳, 张小清, 等. 智能手机辅助双探针比色法检测 α-葡萄糖苷酶[J]. 分析测试学报, 2024, 43(6): 905–912.
ZHAO LZ, ZHAO L, ZHANG XQ, *et al*. Detection of α-glucosidase by a smartphone assisted dual-probe colorimetric method [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2024, 43(6): 905–912.

[7] LIU WW, LI HY, WEN YY, *et al*. Molecular mechanism for the α-glucosidase inhibitory effect of wheat germ peptides [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(50): 15231–15239.

[8] SINESD L, THOMAS JS, ANNA S, *et al*. The α-amylase and α-glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts [J]. FoodChemistry, 2013, 141(3): 2170–2176.

[9] 陶强, 李姣, 曹皖雪, 等. 肽 Tyr-Pro-Ile-Trp(YPIW)对 α-葡萄糖苷酶的抑制机理及其稳定性[J]. 食品科学, 2025, 46(7): 43–50.
TAO Q, LI J, CAO WX, *et al.* Mechanism for the inhibition of α-glucosidase by peptide Tyr-pro-ile-trp(YPIW) and its stability [J]. Food Science, 2025, 46(7): 43–50.

[10] SUKUMARAN SK, YEE KK, IWATA S, *et al.* Taste cell-expressed α-glucosidase enzymes contribute to gustatory responses to disaccharides [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113(21): 6035–6040.

[11] SORNDECH W, NAKORN KN, TONGTA S, *et al.* Isomalto-oligosaccharides: Recent insights in production technology and their use for food and medical applications [J]. LWT-Food Science and Technology, 2018, 95: 135–142.

[12] AUIEWIRIYANUKUL W, SABURI W, KATO K, *et al.* Function and structure of GH13-31 alpha-glucosidase with high alpha-(1,4)-glucosidic linkage specificity and transglucosylation activity [J]. Febs Letters, 2018, 592(13): 2268−2281.

[13] 李林波, 王宝石, 张明霞, 等. α-葡萄糖苷酶高效合成低聚异麦芽糖的策略分析[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(21): 275–281.
LI LB, WANG BS, ZHANG MX, *et al.* Strategical analysis of high-efficient synthesis of isomalto-oligosaccharides by α-glucosidase [J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(21): 275–281.

[14] KAULPIBOON J, RUDEEKULTHAMRONG P, WATANASATITARPA S, *et al*. Synthesis of long-chain isomaltooligosaccharides from tapioca starch and an *in vitro* investigation of their prebiotic properties [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2015, 120: 127–135.

[15] 李林波, 张士双, 杨天佑, 等. α-葡萄糖苷酶的异源表达及应用研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(2): 325–332.
LI LB, ZHANG SS, YANG TY, *et al.* Advances in heterologous expression and application of α-glucosidase [J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(2): 325–332.

[16] XIAO J, WESTBROEK W, MOTABAR O, *et al*. Discovery of a novel noniminosugar acid alpha glucosidase chaperone series [J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2012, 55(17): 7546−7559.

[17] MELO EBD, GOMES ADS, CARVALHO I. α- and β-glucosidase inhibitors: Chemical structure and biological activity [J]. Journal of Cheminformatics, 2007, 38(2): 10277–10302.

[18] 杜婧玮. 构巢曲霉来源 α-葡萄糖苷酶产物特异性分子改造、表达及应用[D]. 无锡: 江南大学, 2024.
DU JW. Product-specific molecular modification, expression and application of α-glucosidase from *Aspergillus nidulans* [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2024.

[19] ZHAO NN, XU YS, WANG K, *et al*. Synthesis of isomalto-oligosac charides by *Pichia pastoris* displaying the *Aspergillus niger* α-glu cosidase [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(43): 9468–9474.

[20] CHEN P, XU RX, WANG JH, *et al*. Starch biotransformation into isomaltooligosaccharides using thermostable alpha-glucosidase from *Geobacillus stearothermophilus* [J]. PeerJ, 2018, 6: e5086.

[21] MEYER TSM, MIGUEL ASM, FERNÁNDEZ DER, *et al*. Biotechnological production of oligosaccharides-applications in the food industry [M]. England: InTech, 2015.

[22] 易福生. 葡萄糖苷酶在啤酒酿造中的应用[J]. 酿酒科技, 2006(1): 82–83, 89.
YI FS. Application of glucosidase in beer brewing [J]. Liquor-Making Science & Technology, 2006(1): 82–83, 89.

[23] 杨震, 胡先望, 陈朋, 等. α-葡萄糖苷酶应用开发现状[J]. 甘肃科学学报, 2011, 23(2): 54–57.
YANG Z, HU XW, CHEN P, *et al*. Present application and development of α-glucosidases [J]. Journal of Gansu Sciences, 2011, 23(2): 54–57.

[24] 邱卫华, 刘瑾如. 微生物发酵在天然 α-葡萄糖苷酶抑制剂研究中的应用进展[J]. 化学与生物工程, 2024, 41(12): 15–23.
QIU WH, LIU JR. Application progress in microbial fermentation technology in developing natural α-glucosidase inhibitors [J]. Chemistry& Bioengineering, 2024, 41(12): 15–23.

[25] GOURINENI V, STEWART ML, ICOZ D, *et al.* Gastrointestinal tolerance and glycemic response of isomaltooligosaccharides in healthy

adults [J]. Nutrients, 2018, 10(3): 301.

[26] 吴孔阳, 陈桂光, 黄时海, 等. α-葡萄糖苷酶的异源表达及纯化研究进展[J]. 食品工业科技, 2011, 32(12): 547–551.
WU KY, CHEN GG, HUANG SH, *et al*. Advancement in heterologous expression and purification of α-glucosidase [J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 32(12): 547–551.

[27] CHEN DL, TONG X, CHEN SW, *et al*. Heterologous expression and biochemical characterization of α-glucosidase from *Aspergillus niger* by *Pichia pastroris* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58: 4819–4824.

[28] 熊进, 黄魁英, 曹丁, 等. 诱变育种方法在霉菌中的应用[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(9): 198–201.
XIONG J, HUANG KY, CAO D, *et al.* The application of mutation breeding method in the mould [J]. Food Research and Development, 2017, 38(9): 198–201.

[29] KONG W, WU D, HU N, *et al*. Robust hybrid enzyme nanoreactor mediated plasmonic sensing strategy for ultrasensitive screening of anti-diabetic drug [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2018, 99: 653–659.

[30] CHEN GG, LI W, ZHANG YK, *et al*. A high-throughput method for screening of *Aspergillus niger* mutants with high transglycosylation activity by detecting non-fermentable reducing sugar [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2011, 27(6): 1519.

[31] 孙永红. 臭曲霉产 α-转移葡萄糖苷酶液体发酵条件及酶学性质研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2010.
SUN YH. Fermentation conditions andcharacterization of α-transglucosidase from *Asnergillus foetidus* SH4 [D]. Shanghai: East China NormaL University, 2010.

[32] 张树政. 酶制剂工业[M]. 北京: 科学出版社, 1984.
ZHANG SZ. Enzyme preparation industry [M]. Beijing: Science Press, 1984.

[33] 陈艳娟. α-葡萄糖苷酶发酵条件优化及诱变筛选模型的初步研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2011.
CHEN YJ. Optimization of α-glucosidase fermentation conditions and preliminary study on mutagenesis screening model [D]. Shanghai: East China NormaL University, 2010.

[34] 张皓. 产 α-葡萄糖苷酶菌株的发酵和转苷条件优化、酶学性质研究及诱变育种[D]. 南宁: 广西大学, 2020.
ZHANG H. Optimization of fermentation and transglycosidation conditions ofα-glucosidase-producing strains, research on enzymatic properties and mutation breeding [D]. Nanning: Guangxi University, 2020.

[35] 陆兵, 武玉莹, 李志弘, 等. 响应面法优化黑曲霉产 α-葡萄糖苷酶发酵条件[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(19): 161–166.
LU B, WU YY, LI ZH, *et al*. Optimization of fermentation conditions for α-glucosidase production by *Aspergillus niger* using response surface methodology [J]. Food Research and Development, 2015, 36(19): 161–166.

[36] 易菊阳, 梁钰婷, 陆兵, 等. 高产 α-葡萄糖苷酶黑曲霉的微波选育及发酵条件优化[J]. 食品科学, 2014, 35(15): 145–150.
YI JY, LIANG YT, LU B, *et al*. Microwave breeding of *Aspergillus niger* with high α-gluosidase activity and optimization of its fermentation conditions [J]. Food Science, 2014, 35(15): 145–150.

[37] 周璐, 汲广习, 闫更轩, 等. *L*-苏氨酸高产菌株的发酵条件优化[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(18): 214–223.
ZHOU L, JI GX, YAN GX, *et al*. Optimization of fermentation conditions for high-yielding *L*-threonine strains [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(18): 214–223.

(责任编辑: 安香玉　蔡世佳)