

不同培养条件对黑曲霉细胞生长及水解特性的影响研究

唐诗潮, 李晓凤, 袁琨

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 本文研究了培养条件中不同种类、不同浓度的氮源和表面活性剂、发酵时间、温度、转速对黑曲霉全细胞生物量及水解活性的影响规律。研究发现, 氮源对于黑曲霉细胞中具有水解活性的诱导酶系的产生具有一定的促进作用, 且作用结果因氮源种类不同而异, 其中酵母膏对黑曲霉具有最佳的培养效果; 当酵母膏质量浓度为 1.5 g/L 时, 黑曲霉生物量达到 1.35 g/L, 且水解活性达到 66.45%。表面活性剂中 Triton X-100 培养的黑曲霉全细胞催化剂的水解活性表现最佳, 当其含量为 0.5% 时, 黑曲霉水解催化效率达到最大值。无机盐种类、浓度及培养温度和转速等条件对黑曲霉细胞生长和水解活性的影响也进行了研究, 并确定具有水解活力的黑曲霉细胞的最佳培养方法为: 酵母膏 1.5 g/L, Triton X-100 0.5%; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g/L; KH_2PO_4 1 g/L, KCl 0.5 g/L; $(NH_4)_2SO_4$ 1.5 g/L; KCl 0.5 g/L; 无水 $CaCl_2$ 0.1 g/L; 温度 35 °C, 转速 140 r/min。在该条件下, 黑曲霉细胞生长量和水解效率分别达到 1.73 g/L 和 90.23%。

关键词: 全细胞催化; 培养条件; 黑曲霉; 生物量; 水解反应

文章编号: 1673-9078(2017)8-195-200

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.8.029

Effect of Culture Conditions on the Growth and Hydrolytic Performance of *Aspergillus niger*

TANG Shi-chao, LI Xiao-feng, YUAN Kun

(School of Food Sciences and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The effects of different culture conditions, including different types and concentrations of nitrogen sources and surfactants, fermentation time, temperature, and rotation speed, on the biomass and hydrolytic activity of *Aspergillus niger* (*A. niger*) cells were studied in this paper. The results showed that different nitrogen sources enhanced the production of the induced enzymes with hydrolytic activities in *A. niger* cells, and the rate of enhancement by the different nitrogen sources were different. Among the tested nitrogen sources, yeast extract showed the best inducing effect on the cells. For yeast extract concentration of 1.5 g/L, the biomass of *A. niger* corresponds 1.35 g/L. Among the surfactants examined, the optimal hydrolytic activity was found in the *A. niger* cells cultured using Triton X-100. In the culture media with 0.5% Triton X-100, the hydrolysis efficiency of *A. niger* reached 58.12%. In addition, the effects of inorganic salts, culture temperature, and rotation speed were also investigated and the optimal conditions to cultivate *Aspergillus niger* cells with hydrolytic activities were as follows: yeast extract 1.5 g/L, Triton X-100 0.5%, magnesium sulfate heptahydrate 1 g/L, monopotassium phosphate 1 g/L, potassium chloride 0.5 g/L, ammonium sulfate 1.5 g/L, and anhydrous calcium chloride 0.1 g/L. The ideal culture temperature and rotation speed were confirmed as 35 °C and 140 r/min, respectively. Under the optimal culture conditions, biomass and hydrolysis efficiency of *A. niger* cells were 1.73 g/L and 90.23%, respectively.

Key words: whole-cell catalysis; culture conditions; *Aspergillus niger*; biomass; hydrolysis

黑曲霉(*Aspergillus niger*)是一种自然界中常见的腐生真菌, 属于半知菌类曲霉属, 主要存在于粮食、植物加工品以及土壤中^[1]。其生长过程一般分为三个

收稿日期: 2017-05-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31270636、21676105); 新世纪优秀人才培养计划(NCET-12-0192); 中央高校基本业务费(2015ZZ111)

作者简介: 唐诗潮(1992-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 生物催化

通讯作者: 李晓凤(1977-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 生物催化

阶段: 第一阶段为白色的绒状; 第二阶段变成黄色或者鲜黄色; 第三阶段生成为黑色厚绒状, 背面呈现无色或者中央略带黄褐色的状态。黑曲霉不仅在外源基因的表达上具有很强的能力, 同时在重组子方面也具有非常优异的遗传稳定性。由于黑曲霉生长繁殖快、发酵周期短, 不产生有毒有害的物质的特性, 同时也具备丰富的脂肪酶、蛋白酶等多种酶蛋白表达系统, 使得黑曲霉在酶制剂生产中得到了广泛重视, 也是美

国食品药品监督管理局已准许其作为食品工业酶的主要生产菌之一^[2]。作为工业化产酶的常见菌种之一,黑曲霉所产的酶种类众多,如酸性蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶、果胶酶和 β -葡萄糖苷酶等。它所生产的酶类产量高、活性高,目前已经广泛用于医药工业、食品工业和废水的处理等领域^[3-6]。在微生物最初开始应用于制备抗生素类的药品,但随着生物催化技术的飞速发展,微生物细胞作为酶抑制剂、免疫调剂和拮抗剂在生物制药等多个研究领域也获得了广泛的重视^[7]。与酶法相比,全细胞催化既继承了酶法的条件温和、产物得率高、环境友好的反应特点,又克服了传统化学催化法需要在高温高压下,由酸或碱催化完成,对设备要求高,且对环境造成污染的缺点;同时,全细胞催化还具有成本低廉、催化剂及反应介质都可以重复利用等优势,有利于工业化生产,能够有效推动微生物在医药、食品和化妆品等工业中的广泛应用。但迄今为止全细胞催化剂的开发研究较之酶法相对较少,为了丰富全细胞催化理论,本实验以黑曲霉进行生物转化,主要涉及其发酵性能的研究,例如培养条件中不同种类、不同浓度的氮源和表面活性剂、发酵时间、温度、转速对黑曲霉全细胞生物量及水解活性的影响规律。

黑曲霉是具有多种酶类表达体系的微生物,以往研究多集中于其发酵性能^[8,9],迄今为止未见作为全细胞催化剂性能的研究报道。基于此,本研究通过采用不同的培养条件,研究了黑曲霉全细胞的生长量变化及其水解活性的影响规律。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

黑曲霉 *Aspergillus niger*, 华南理工大学食品安全与检测中心保藏菌种。

1.1.2 主要试剂

芸香叶苷购自日本 TCI 公司; 营养肉汤, 广东环凯微生物科技有限公司; 酵母浸膏, 北京奥博星生物技术有限责任公司; Tween 80、Tween 60、Tween 20、Span 80、Span 60 和 Triton X-100 均购自本地试剂公司, 均为分析纯; 甲醇购自德国 Merck 公司, 为色谱纯。其余试剂均购自本地试剂公司。

1.1.3 仪器与设备

Waters 高效液相色谱仪, 配备 Waters 600 控制器、2996 光电二极管阵列检测器、717 Plus 自动进样器; 色谱柱: 4.6×250 mm (5 μ m) Zorbax SB-C18 分析型色

谱柱 (Agilent Technologies Co, Ltd, USA); YXQ-LX 立式压力蒸汽灭菌锅, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; SW-CF-IF 超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; Alpha 1-4LD plus 真空冷冻干燥机, 德国 Martin-Christ 公司; SKY-211B 全温摇床柜, 上海苏坤实业有限公司; HZQ-F100 全温浴振荡培养箱, 苏州培英实验设备有限公司; FA2204B 型电子天平, 上海精密科学仪器有限公司; Thermo Micro17 微量离心机, 上海纳诺实业有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种培养方法

黑曲霉孢子的获取: 将接种于马铃薯琼脂培养基中的黑曲霉菌丝放入 28 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 60 h, 获取黑曲霉孢子, 用适量的无菌水溶解孢子, 把孢子悬浮液 (接种量为 3%, *V/V*) 接种到发酵培养基中。

发酵培养基配方 (g/L): 10, 表面活性剂 Triton X-100; 2, 柚皮苷; 2, 酵母膏; 1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 1, KH_2PO_4 ; 0.5, KCl; 1.5, $(NH_4)_2SO_4$; 0.5, KCl; 0.1, 无水 $CaCl_2$; 200 mL 培养基装于 500 mL 锥形瓶中, 培养温度 37 $^{\circ}$ C, 摇瓶转速 180 r/min, 培养时间 60 h, pH 自然。

1.2.2 全细胞催化剂制备方法

摇瓶培养 48 h 后, 抽滤除去培养液得到湿菌体。湿菌体用蒸馏水洗涤 3 次。菌体残留的培养基被洗去后, -45 $^{\circ}$ C 真空冷冻干燥 24 h 获得冻干菌体即为黑曲霉全细胞催化剂。4 $^{\circ}$ C 条件下储存备用。

1.2.3 黑曲霉全细胞水解反应模型

向 5 mL 锥形瓶中加入 32.8 mmol (20 mg) 黄酮粉末、1 mL 甲醇, 震荡使其完全溶解, 随后加入 1 mL 醋酸-醋酸钠缓冲液 (pH 5.0), 再分别加入 20 mg 不同培养条件下得到的全细胞催化剂, 混合均匀, 置于全温摇床柜中 (35 $^{\circ}$ C, 120 r/min)。反应 12 h 后取样, 每次取样 50 μ L, 12000 r/min 离心 2 min 后取上清液 20 μ L, 用甲醇稀释 50 倍, 过 0.45 μ m 有机相滤膜。HPLC 进样 20 μ L, 供高效液相色谱检测分析。

1.2.4 黑曲霉水解效率、生物量的计算

1.2.4.1 黑曲霉水解效率

根据水解反应前后黄酮底物峰面积的差值与反应前黄酮类化合物峰面积的比值来计算水解反应效率 (hydrolytic efficiency):

$$\text{反应效率 HE\%} = \frac{[S - S_0]}{[S_0]} \times 100\%$$

式中: S 和 S_0 分别表示反应前后底物峰面积。

1.2.4.2 生物量

将 1.2.2 制得的黑曲霉全细胞催化剂置于精密天

平中进行菌丝称重, 作为黑曲霉的生物量。

1.2.5 高效液相色谱 (HPLC) 分析

仪器: Waters 高效液相色谱仪; 配备 PDA 紫外检测器; 检测波长为 360 nm。色谱柱: 4.6×250 mm 5 μm Zorbax SB-C18 分析型色谱柱。

分析条件: 20%乙腈-水溶液 (含 0.1%磷酸); 流速: 0.9 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样量: 20 μL。

2 结果与讨论

2.1 不同氮源对黑曲霉生物量及水解特性的影响

氮源是菌体合成氨基酸、蛋白质、核酸和细胞质的主要成分, 也是合成各种含氮代谢产物的重要原料。为了了解氮源对 *Aspergillus niger* 的生物量及其水解催化效率的影响, 本研究对氮源进行了探究。

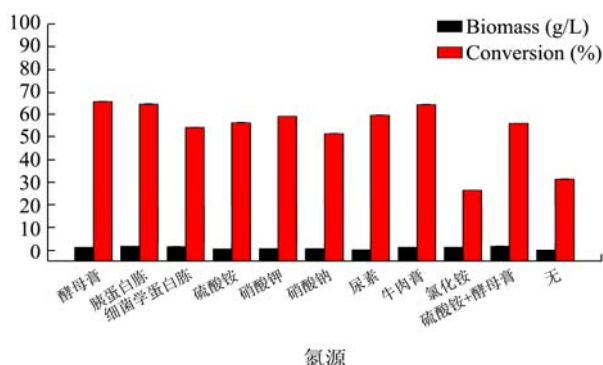


图1 不同氮源对黑曲霉生物量及水解催化效率的影响

Fig.1 Effects of different nitrogen sources on the biomass and hydrolysis catalytic efficiency of *Aspergillus niger*

在培养基中其它成分不变的情况下, 固定各氮源质量浓度为 2 g/L, 分别以酵母膏、胰蛋白胨、细菌学蛋白胨、硫酸铵、硝酸钾、硝酸钠、尿素、牛肉膏、氯化铵和硫酸铵+酵母膏 (1:1) 10 种物质作为氮源, 发酵培养, 比较不同氮源对 *Aspergillus niger* 生物量及产酶的影响。如图 1 所示, 当培养基中不添加氮源时, 其生物量受到严重的抑制作用, 为 0.025 g/L, 说明氮源对于微生物的生长有着显著的影响。在 10 种不同氮源的培养基中, 除了硫酸铵、硝酸钾、硝酸钠和尿素之外, 在添加其余 6 种氮源的培养基中, *Aspergillus niger* 均能较好的生长。从底物的转化率方面来看, 所有培养基都呈现出一定的催化效果, 说明氮源并不是 *Aspergillus niger* GIM 3.25 产生具有催化活力酶的决定性因素, 只起着促进作用。对比底物转化率可以发现, 以酵母膏为氮源培养的 *Aspergillus niger* GIM 3.25 的催化活力最高, 达到 65.6%, 因此, 选取酵母

膏为氮源。

2.2 不同浓度酵母膏对黑曲霉生物量及水解特性的影响

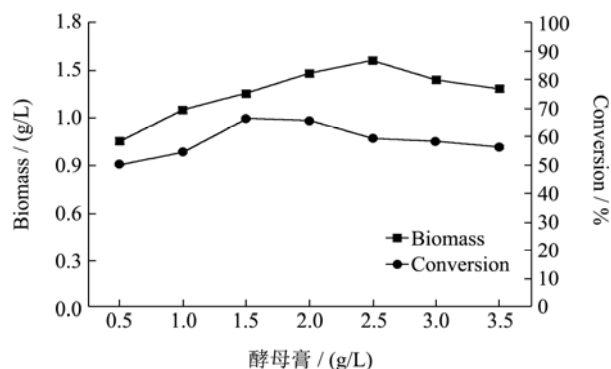


图2 不同浓度酵母膏对黑曲霉生物量及水解活性的影响

Fig.2 Effects of different concentrations of yeast on the biomass and hydrolysis activity of *Aspergillus niger*

以酵母膏为氮源, 分别考察 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 和 3.5 g/L 7 个质量浓度的酵母膏对 *Aspergillus niger* 的生物量及其水解效果的影响。如图 2 所示, *Aspergillus niger* GIM 3.25 发酵 60 h 后的生物量随着酵母膏质量浓度的增加呈现出先增加后减少的趋势, 当酵母膏质量浓度在 2.5 g/L 时, 生物量达到最大值, 为 1.55 g/L。其原因可能在于酵母膏浓度过高时, 大于了 *Aspergillus niger* GIM 3.25 的细胞液内浓度, 细胞为了减小浓度差而过度吸水, 使得细胞吸水过多而死亡, 从而使得生物量下降。而底物转化率也随着酵母膏质量浓度的增加呈先增加后趋于平缓的趋势, 在 1.5 g/L 时出现达到最大。总体来说, 酵母膏质量浓度对于 *Aspergillus niger* GIM 3.25 的催化活性影响较小, 因此, 综合考虑, 选用 1.5 g/L 酵母膏为氮源的质量浓度。

2.3 不同种类表面活性剂对黑曲霉生物量及水解特性的影响

表面活性剂是指加入少量能使其溶液体系的界面状态发生明显变化的物质, 具有固定的亲水亲油基团, 在溶液的表面能定向排列。根据亲水基团的性质, 表面活性剂可以分为非离子型、阳离子型、阴离子型和两性离子型。表面活性剂不仅能诱导酶的产生, 而且能够对细胞膜的通透性产生影响^[10]。有研究发现, Tween 80 对菌丝连接酶存在着释放作用^[11,12]。但是同时, Tween 85 也被发现在酶总活力不变的情况下, 增加游离酶的产量同时降低胞内酶的产量^[13]。因此需要选择合适的表面活性剂来获得 *Aspergillus niger* 最佳的

生物量及其水解效果的影响。

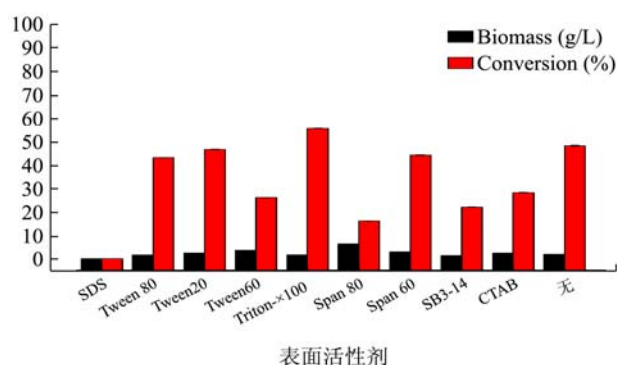


图3 不同种类表面活性剂对黑曲霉生物量及水解活性的影响

Fig.3 Effects of different types of surfactants on the biomass and hydrolysis activity of *Aspergillus niger*

如图3所示, 本实验研究了非离子型(Tween 80、Tween 60、Tween 20、Span 80、Span 60 和 Triton X-100)、阳离子型(CTAB)、阴离子型(SDS)和两性离子型(SB3-14)表面活性剂对菌株的影响。在生物量来看, 除了十二烷基苯磺酸钠外, 在其余的培养基中, 菌株均能正常的生长, 尤其是在 Span 80 中, 生物量达到 6.43 g/L。原因在于十二烷基苯磺酸钠的粘稠度过高, 使得菌体无法生长。在催化效果方面, 阳离子型(CTAB)、阴离子型(SDS)和两性离子型(SB3-14)表面活性剂都对水解酶的活力有较强的抑制作用, 均低于30%, 原因可能在于离子型表面活性剂的带电基团与蛋白质表面的带电氨基酸产生强烈的电荷排斥作用, 导致蛋白变性而失去活力。因此这三种表面活性剂不能较好的促进 *Aspergillus niger* GIM 3.25 的产酶。而 Triton X-100 则表现出了最佳的催化活性, 达到 55.68%。综合考虑, 选择 Triton X-100 作为培养基配方中的表面活性剂。

2.4 不同浓度 Triton X-100 对黑曲霉生物量及水解特性的影响

本实验以乳化剂 Triton X-100 为表面活性剂, 分别考察 0.25%、0.50%、1.00%、1.50%、2.00%、2.50%、3.00%和 3.50%等 7 个浓度对 *Aspergillus niger* 最佳的生物量及其水解效果的影响。如图 4 所示, *Aspergillus niger* GIM 3.25 的生物量随着表面活性剂的添加量呈先增加后减少的变化趋势, 当浓度在 0.25%~1%时, 生物量增加, 在浓度为 1%时达到最大, 为 1.75 g/L, 之后随着浓度的增大, 生物量开始减少。在催化效果方面, 催化效果随着 Triton X-100 含量的增加而增加, 然后趋于平缓。当表面活性剂 Triton X-100 含量超过 0.5%后, *Aspergillus niger* GIM 3.25 的催化活力不再增

加; 当表面活性剂 Triton X-100 含量超过 3.00%后, *Aspergillus niger* GIM 3.25 的催化活力随着 Triton X-100 用量的增加而小幅下降。

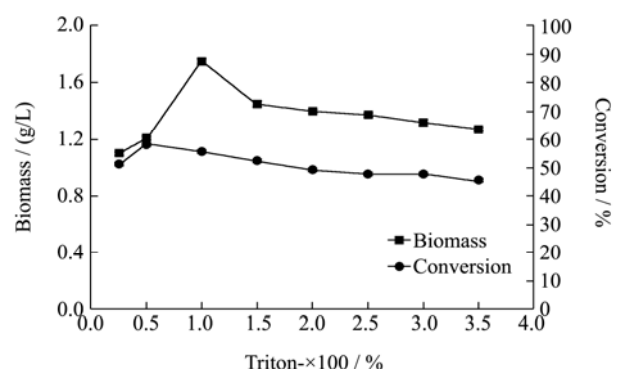


图4 不同浓度 Triton X-100 对黑曲霉生物量及水解活性的影响

Fig.4 Effects of different concentrations of Triton X-100 on the biomass and hydrolysis activity of *Aspergillus niger*

这可能是一方面非离子型表面活性剂在催化时具有形成胶束的特性, 当低于其临界胶束浓度的条件下, 可以激活相应的酶, 因为非离子型表面活性剂 Triton X-100 在低浓度时可以与酶的活性中心产生相互作用, 帮助酶稳定在开放的构象, 有利于底物进入活性中心以及产物的释放, 酶的活力得到提高, 催化效果加强^[14]; 当形成胶束后, 高浓度的 TritonX-100 对其水解酶活有不同程度的抑制作用, 原因在于 Triton X-100 会进入酶的活性中心并与其紧密结合, 使水解酶的活性中心被占据, 而无法催化其他底物的水解反应, 酶的活力受到抑制, 催化效率下降^[15]。因此, 选取浓度为 0.5%的 Triton X-100 作为最适表面活性剂浓度。

2.5 不同发酵温度对黑曲霉生物量及水解特性的影响

温度是对于微生物生长及酶活性有着重要的影响。因此在微生物的发酵过程中提供一个稳定且合适的温度环境是必不可少的要素之一。在确保其他初始发酵条件不变的情况下, 选取 30 °C、35 °C、40 °C 和 45 °C 4 个温度点进行发酵培养, 探究了不同温度对 *Aspergillus niger* 最佳的生物量及其水解效果的影响。结果如图 5 所示, 在生物量方面, *Aspergillus niger* 随着发酵温度的上升而呈现先增加而后下降的趋势, 催化活力也有类似的规律。在 35 °C 时, 生物量和催化活力均达到最高, 分别为 1.59 g/L 和 62.74%。可能的原因在于, 在一定的温度范围内, 温度的升高, 会加快微生物的生长发育, 使得产酶增加; 当温度过高时,

菌体易衰老, 同时还会影响发酵液的物理性质和溶解氧, 从而间接影响酶的合成。选取 35 °C 作为发酵的最宜温度。

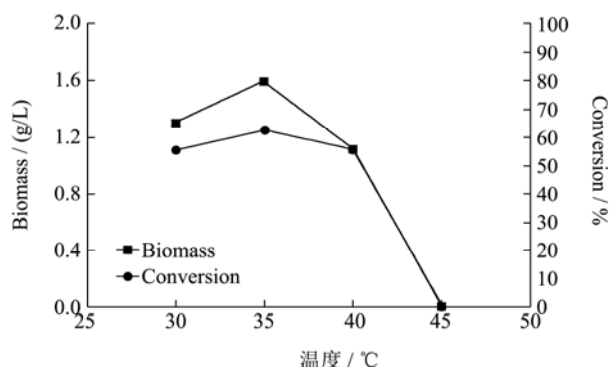


图 5 不同发酵温度对黑曲霉生物量及水解活性的影响

Fig.5 Effects of different fermentation temperatures on the biomass and hydrolysis activity of *Aspergillus niger*

2.6 不同发酵时间对黑曲霉生物量及水解特

性的影响

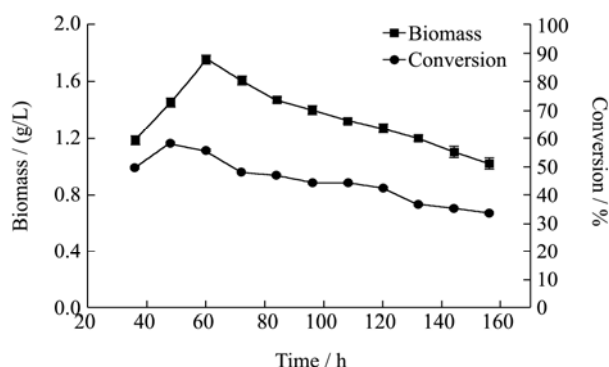


图 6 不同发酵时间对黑曲霉生物量及水解活性的影响

Fig.6 Effects of different fermentation time periods on the biomass and hydrolysis activity of *Aspergillus niger*

为了在最短的时间内获得高产量、高催化活性的菌体, 本实验对 36 h、48 h、60 h、72 h、84 h、96 h、108 h、120 h、132 h、144 h 和 156 h 共计 11 个时间位点对菌体的影响进行了探究。结果如图 6 所示, 菌体生物量和催化活性都在很短的时间内达到最高点, 其最大生物量和活性均出现在出现在 48 h, 分别达到 1.75 g/L 和 58.33%。分析其原因, 温度的升高增加了分子运动活化能, 因此细胞连接酶的活性中心与底物分子直接的有效碰撞增多, 与酶分子之间结合速度加快, 同时由于温度的升高, 细胞的分裂速度加快, 使得细胞的生物量也出现增长。但是随着发酵培养时间的延长, 生物量和底物转化率在 156 h 内分别显著降至 1.02 g/L 和 33.56%。推测这是因为在 48 h 培养之后, 培养基中的代谢废物含量呈上升趋势, 细胞的增殖和

全细胞水解酶的合成受阻。因此选取 48 h 作为发酵时间。

2.7 不同发酵转速对黑曲霉生物量及水解活

性的影响

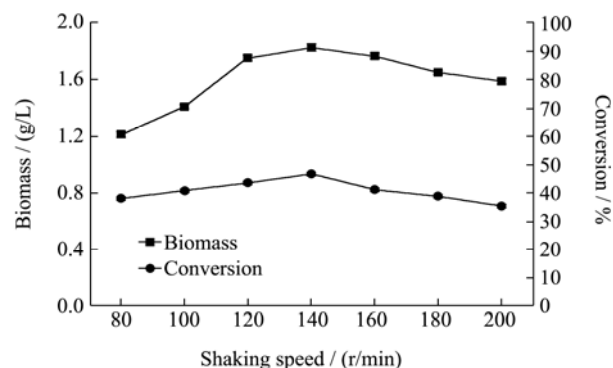


图 7 不同发酵转速对黑曲霉生物量及水解活性的影响

Fig.7 Effects of different rotation speeds during fermentation on the biomass and hydrolysis activity of *Aspergillus niger*

在微生物生长过程中, 转速能够对发酵液的保持一个运动的状态, 使得微生物在生长后避免沉积在一起, 影响生长。同时, 在催化过程中, 转速能够对底物分子在酶活性中心的扩散程度产生硬性, 因此本实验对 80 r/min、100 r/min、120 r/min、140 r/min、160 r/min、180 r/min 和 200 r/min 7 个发酵转速对 *Aspergillus niger* 最佳的生物量及其水解活性的影响进行了研究。由图 7 可知, 当初始发酵转速为 140 r/min 时, 其催化效果和生物量都略高于其他初始发酵转速下的转化率和生物量。但是在 80 r/min 至 200 r/min 的范围内, 转化率和生物量均呈现先提高后略微下降。原因可能在于, 低转速能够加速氧溶解, 改善通气效率, 减少菌丝抱团过紧等。而当处于高转速时, 容易引起菌丝细胞损伤, 造成代谢异常, 产量降低; 当搅拌转速过低时, 菌丝容易抱团, 形成菌丝团或菌球, 不利于营养物质的吸收和酶的分泌^[16]。因此在该发酵条件下, 选取最适振荡速度以 140 r/min 为宜。

2.8 验证试验

通过以上试验, 初步优化得到了 *Aspergillus niger* 产最佳生物量和催化活力的发酵培养基为: 柚皮苷 2.0 g/L, 酵母膏 1.5 g/L, MgSO₄·7H₂O 1.0 g/L, KH₂PO₄ 1.0 g/L, KCl 1.5 g/L, 无水 CaCl₂ 0.1 g/L, 表面活性剂 Triton X-100 0.5%(V/V)、发酵温度 35 °C、发酵振荡速度 140 r/min。在此条件下培养 48 h, 全细胞催化剂用量只需使用优化前培养基培养的菌体用量的 1/3 即可达到高于优化前黑曲霉全细胞催化剂 60 mg 催化效果的水

平,大大提高了催化活性。

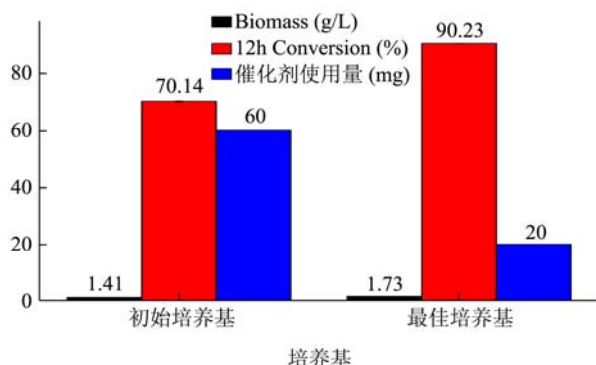


图8 初始培养条件与优化培养条件下黑曲霉的生长量和水解活性对比

Fig.8 Comparison of the biomass and hydrolytic activity of *Aspergillus niger* cultured under initial medium and optimized medium conditions

3 结论

本研究在前期研究的基础上,研究了不同培养条件下黑曲霉全细胞的生长和催化特性,结果表明:不同种类的氮源不仅对黑曲霉细胞的生长具有着极重要的促进作用,同时对其水解效率的提高也有着不同的促进作用;其中,酵母膏对于水解活力的促进作用最佳,所培养细胞的水解效率达到65.6%。0.5%的非离子型表面活性剂Triton X-100、发酵时间、发酵温度以及发酵转速对*Aspergillus niger*的生物量及其水解活性均有不同程度的影响。最佳培养条件为最适氮源酵母膏,质量浓度为1.5 g/L;最适表面活性剂为Triton X-100,百分含量为0.5%;最佳发酵时间是48 h;最佳发酵温度为35℃;最佳发酵转速为140 r/min。黑曲霉全细胞催化剂具有易培养、制备简单、成本低廉和催化效率高特点,本研究工作将为黑曲霉为代表的真菌催化剂在黄酮类化合物中的水解修饰反应提供理论依据。

参考文献

- [1] 微生物学[M].北京:人民教育出版社,1990
Department of microbiology [M]. Beijing: People's Education Press, 1990
- [2] 陆文清,李德发,邓萍.黑曲霉固态发酵饲用复合酶活分析[J].中国饲料,2004,3:21-23
LU Wen-qing, LI De-fa, DENG Ping. Analysis of enzyme activity of solidified fermentation for *Aspergillus niger* [J]. China Feed, 2004, 3: 21-23
- [3] 孙海彦,王茜,彭明.利用黑曲霉 β -葡萄糖苷酶催化香兰素葡萄糖苷水解[J].基因组学与应用生物学,2011,30(6):687-690
SUN Hai-yan, WANG Qian, PENG Ming. Preparation of vanillin glucoside catalyzed by *Aspergillus niger* β -Glucosidase [J]. Genomics and Applied Biology, 2011, 30(6): 687-690
- [4] 郭艳梅,郑平,孙际宾.黑曲霉作为细胞工厂:知识准备与技术基础[J].生物工程学报,2010,26(10):1410-1418
GUO Yan-mei, ZHENG Ping, SUN Ji-bin. *Aspergillus niger* as a cell plant: knowledge preparation and technical basis [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2010, 26(10): 1410-1418
- [5] 王松林,姜澎涛,刘国飞,等.黑曲霉菌种的筛选及培养条件的优化[J].造纸科学与技术,2017,1:64-69
WANG Song-lin, JIANG Peng-tao, LIU Guo-fei, et al. Screening of *Aspergillus niger* strains and optimization of culture conditions [J]. Paper Science and Technology, 2017, 1: 64-69
- [6] Patel H, Chapla D, Divecha J, et al. Improved yield of α -L-arabinofuranosidase by newly isolated *Aspergillus niger* ADH-11 and synergistic effect of crude enzyme on saccharification of maize stover [J]. Bioresources and Bioprocessing, 2015, 2(1): 11
- [7] 陈健钱.微生物制药研究进展与发展趋势[J].生物化工,2016,2(2):74-75
CHEN Jian-qian. Microbial drug research progress and development trend [J]. Biochemical, 2016, 2(2): 74-75
- [8] 张熙,韩双艳.黑曲霉发酵产酶研究进展[J].化学与生物工程,2016,33(1):13-16
ZHANG Xi, HAN Shuang-yan. Advances in fermentation production of *Aspergillus niger* [J]. Chemistry and Bioengineering, 2016, 33(1): 13-16
- [9] 钱伟,黄元杰,王先锋,等.黑曲霉固态发酵产柚苷酶培养基的优化[J].安徽工程大学学报,2016,1:16-20
QIAN Wei, HUANG Yuan-jie, WANG Xian-feng, et al. Optimization of the culture medium of *Aspergillus niger* by solid-state fermentation [J]. Journal of Anhui University of Engineering, 2016, 1: 16-20
- [10] Yousuke T, Naoki N, Yuji O, et al. Effect of addition of Tween 80 and potassium dihydrogenphosphate to basal medium on the isolation of marine eukaryotes, thraustochytrids [J]. Journal of Bioscience & Bioengineering, 2008, 105(5): 562
- [11] Long K, Ghazali H M, Ariff A, et al. Mycelium-bound lipase from a locally isolated strain of *Aspergillus flavus* link: Pattern and factors involved in its production [J]. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 1996, 67(2): 157-

- 163
- [12] Cruz P M, Christen P, Farres A. Medium optimization by a fractional factorial design for lipase production by *Rhizopus delemar* [J]. *Journal of Fermentation & Bioengineering*, 1993, 76(2): 94-97
- [13] Chen J, Shimura S, Kirimura K, et al. Lipase production from hydrocarbons by WU-C12 in the presence of surfactants [J]. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry*, 1994, 58(4): 773-775
- [14] Carrasco-López C, Godoy C, de las Rivas B, et al. Activation of bacterial thermoalkalophilic lipases is spurred by dramatic structural rearrangements [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(7): 4365-4372
- [15] Hermoso J, Pignol D, Kerfelec B, et al. Lipase activation by nonionic detergents the crystal structure of the porcine lipase-colipase-tetraethylene glycol monoethyl ether complex [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(30): 18007-18016
- [16] 吴升山.黑曲霉 DB056 产柚苷酶发酵工艺的研究[D].厦门:集美大学,2010
- WU Sheng-shan. *Aspergillus niger* DB056 naringinase fermentation process [D]. Xiamen: Jimei University, 2010