

黑曲霉转化橙皮苷制备橙皮素的条件优化及其抗氧化活性的比较

陈玉婷^{1,2,3}, 刘昊澄^{1,2}, 徐玉娟¹, 吴继军¹, 余元善¹, 温靖¹, 傅曼琴^{1,2*}

(1. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 农业部功能食品重点实验室, 广东省农产品加工重点实验室, 广东广州 510610) (2. 岭南现代农业科学与技术广东省实验室河源分中心, 广东河源 517000) (3. 梧州学院食品与制药工程学院, 广西梧州 543002)

摘要: 该研究采用微生物转化法, 以橙皮苷为底物, 利用黑曲霉菌株 (*Aspergillus niger* CP-2) 进行定向生物转化制备橙皮素, 通过对黑曲霉菌接种量、pH 值、底物浓度、反应温度以及恒温摇床转速进行单因素实验, 并选择接种量、pH 值、底物浓度三个重要影响因素进行正交实验, 以探究出最适转化条件。结果表明: 通过高效液相色谱法 (HPLC) 对 *Aspergillus niger* CP-2 生物转化的产物鉴定, 确定为橙皮素, 最终确定的最佳工艺为: 黑曲霉接种量为 10%、pH 值为 7.5、橙皮苷底物浓度为 1.0 mmol/L、反应温度为 37 °C、恒温摇床转速为 200 r/min。在此反应体系下反应 24 h 后, 得到的橙皮素产率为 63.90%; 此外, 转化产物橙皮素的抗氧化活性以及对 H₂O₂ 损伤 HCK-8 细胞的保护能力均高于转化底物橙皮苷, 因此, 黑曲霉的生物转化技术可为柑橘属副产物活性物质的高值化利用提供理论依据。

关键词: 黑曲霉; 橙皮素; 橙皮苷; 抗氧化活性

文章编号: 1673-9078(2024)09-65-73

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.9.0942

Optimization of the Conditions for Converting Hesperidin to Hesperetin by *Aspergillus niger* and Comparison of Their Antioxidant Activities

CHEN Yuting^{1,2,3}, LIU Haocheng^{1,2}, XU Yujuan¹, WU Jijun¹, YU Yuanshan¹, WEN Jing¹, FU Manqin^{1,2*}

(1. Sericultural & Agri-Food Research Institute Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Functional Foods, Ministry of Agriculture, Guangdong Key Laboratory of Agricultural Products Processing, Guangzhou 510610, China) (2. Heyuan Branch, Guangdong Laboratory for Lingnan Modern Agriculture, Heyuan 517000, China) (3. College of Food and Pharmaceutical Engineering, Wuzhou University, Wuzhou 543002, China)

引文格式:

陈玉婷, 刘昊澄, 徐玉娟, 等. 黑曲霉转化橙皮苷制备橙皮素的条件优化及其抗氧化活性的比较[J]. 现代食品科技, 2024, 40(9): 65-73.

CHEN Yuting, LIU Haocheng, XU Yujuan, et al. Optimization of the conditions for converting hesperidin to hesperetin by *Aspergillus niger* and comparison of their antioxidant activities [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(9): 65-73.

收稿日期: 2023-08-06

基金项目: 岭南现代农业科学与技术广东省实验室河源分中心自主科研项目 (DT20220028); 广州市科技计划项目 (2023B03J1370); 国家重点研发计划项目 (2021YFD1600104); 广东省现代农业产业技术体系创新团队建设项目 (2023KJ110); 广东省农业科学院项目 (R2020PY-JX011, 202109TD);

作者简介: 陈玉婷 (1996-), 硕士, 研究方向: 农产品加工, E-mail: ywcyt0625@163.com

通讯作者: 傅曼琴 (1985-), 博士, 研究员, 研究方向: 农产品加工, E-mail: fumanqin84@126.com

Abstract: In this study, microbial transformation method was used to prepare hesperetin by directed biotransformation using *Aspergillus niger* strain (*A. niger* CP-2) with hesperidin as the substrate. Single factor experiments were carried out on the inoculation amount of *A. niger* strain, pH, substrate concentration, reaction temperature, and speed of the constant-temperature shaker, then the three important influencing factors, inoculation amount, pH, and substrate concentration were selected for the Orthogonal experiments to investigate the optimal transformation conditions. The results showed that the product of *A. niger* CP-2 biotransformation was identified as hesperetin by high performance liquid chromatography (HPLC), and the optimal process was determined as follows: inoculum amount of *A. niger* was 10%, pH value was 7.5, the concentration of hesperidin substrate was 1.0 mmol/L, the temperature of the reaction was 37 °C, and the speed of the shaking machine was 200 r/min. After 24 h of reaction in this reaction system, the yield of hesperetin was 63.90%. Moreover, the antioxidant activity of the transformed product, hesperetin, and its protective ability against H₂O₂-induced damage to HCK-8 cells were higher than those of the transformation substrate, hesperidin. Therefore, the biotransformation technology using *A. niger* can provide a theoretical basis for the high-value utilisation of the active substances in the citrus by-products of the genus *Citrus*.

Key words: *Aspergillus niger* CP-2; hesperidin; hesperetin; hesperidin; antioxidant activity

黄酮类化合物是柑橘类中最重要的特征和生物活性成分,可分为黄酮苷(如橙皮苷、柚皮苷、芸香柚皮苷等)和多甲氧基黄酮(如川陈皮素和橘皮素)^[1]。橙皮苷是由苷元(橙皮素)和芸香糖构成的二氢黄酮苷。多种羟基、多甲氧基和糖苷等特殊结构使得黄酮类化合物具有广泛的生物活性^[2,3],据报道,橙皮苷具有多种生物功能,如抗菌、抗癌、抗炎、抗氧化、抗糖尿病等,在医药、食品等领域有巨大的开发价值^[4,5]。橙皮苷由于其溶解性较差,含有糖苷键的黄酮类化合物生物利用率较低,因而限制了它在食品等领域中的应用^[1,6]。橙皮苷脱糖基化是提高溶解度和生物利用度的有效且有前景的方法^[7,8]。橙皮苷水解后可生成橙皮素-7-O-葡萄糖苷和橙皮素^[9]。橙皮素具有多种药用和商业价值,具有抗氧化^[4]、抗肿瘤^[5]等功效,对糖尿病慢性并发症、皮肤病也有很好的疗效^[10]。

目前生产橙皮素的方法主要是化学水解法和生物催化^[11]。类黄酮糖苷的化学水解条件通常过于苛刻,无法保存其基本酚类结构,这可能会降低其生物活性并产生不需要的副产物。生物催化是指利用动植物细胞或器官、微生物和游离酶,对外源化合物的结构进行转化和修饰的生理生化反应。酶的生产通常涉及多个过程,包括发酵、细胞裂解、分离、纯化,甚至结晶,这使得酶法成本高昂^[12,13]。酶的应用也受到缺乏操作稳定性和重复使用性的限制。微生物作为一种可持续的天然催化剂,微生物转化不仅对产物具有高选择性和温和的反应条件,而且保留了完整的细胞,从而避免了细胞裂解和酶纯化

的需要,因此大大降低了成本。从这个角度来看,微生物催化水解黄酮苷的研究具有深远的意义。

黑曲霉因其强大的酶系及安全性成为了微生物转化的主要菌种之一^[14]。黑曲霉在 α -L-鼠李糖苷酶和 β -D-葡萄糖苷酶的作用下对黄酮苷类进行转化并生成相应的苷元^[15,16],图1是橙皮苷转化生成橙皮素结构图。为了提高柑橘黄酮苷的利用率及商业价值,探究生物转化水解黄酮苷具有深远的意义。因此,本研究以黑曲霉菌株为对象,利用单因素实验考察了接种量、pH值、底物浓度、转速几个关键反应因素对产物的产率的影响,正交实验选取最优的转化条件,建立稳定的黑曲霉转化橙皮苷生产橙皮素的转化体系,并对转化产物的抗氧化活性进行评估。

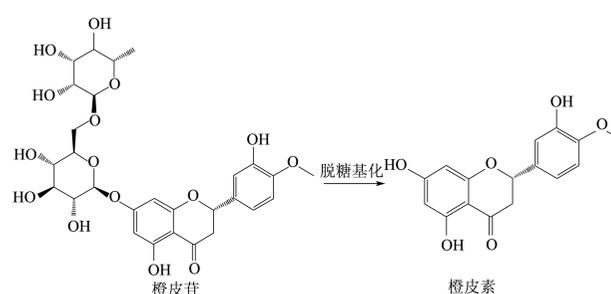


图1 橙皮苷转化生成橙皮素结构图

Fig.1 Structural diagram of the conversion of hesperidin into hesperetin

1 材料与方法

1.1 试验材料

黑曲霉 (*Aspergillus niger* CP-2), 来自果蔬加

工研究实验室, (广东省微生物菌种保藏中心, GDMCC No:61088)。HCK-8 细胞购于美国模式菌种收集中心细胞库, 冻存保种。

马铃薯葡萄糖水培养基, 广东环凯微生物科技有限公司; 橙皮苷标准品, 广州齐云生物科技有限公司; 橙皮素标准品、DPPH 标准品、Trolox 标准品、芦丁标准品、没食子酸标准品以及福林酚, 上海源叶生物科技有限公司; 磷酸氢二钠, 福晨化学试剂有限公司; 胰蛋白酶、磷酸二氢钠, 天津市大茂化学试剂厂; DMEM 培养基、HBSS 缓冲液、PBS 粉末、甲醇, 天津市科密欧化学试剂有限公司。

1.2 仪器设备

LC-20AT 高效液相色谱仪, 苏州岛津仪器公司; SW-CJ-2FD 超净工作台, 苏净集团苏州安泰空气技术有限公司; ZQZY-88BV 恒温振荡培养箱, 上海知楚仪器有限公司; YXQ-50SI 自动立式压力蒸汽灭菌锅, 上海博迅医疗生物仪器股份有限公司; ME204 电子天平, 梅特勒-托利多仪器有限公司; 流式细胞仪, 美国 BD Biosciences 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 黑曲霉菌丝球的培养

取保存在甘油管的 100 μL 的 *A. niger* CP-2 于马铃薯葡萄糖水的平板上, 在无菌条件下用涂布棒轻轻涂均匀, 放置在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至有菌落后, 用接种环在无菌条件下轻轻刮取 *A. niger* CP-2 平板培养基上的黑曲霉菌落, 接种到马铃薯葡萄糖水液体培养基中, 同时加入无菌玻璃珠, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 的恒温振荡培养箱中培养 72 h 后, 得到如图 2 所示的黑曲霉菌丝球, 接种量以菌丝球的重量计。



图 2 *A. niger* CP-2 的形态特征图

Fig.2 Morphological characteristics of *A. niger* CP-2

1.3.2 橙皮苷、橙皮素高效液相色谱分析

通过高效液相色谱 (HPLC) 对橙皮苷、橙皮

素含量进行分析, 具体方法见参考文献^[17], 色谱条件如下: C18 色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), 柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$; 二极管阵列检测器 (PDA), 流动相: 超纯水 (A), 甲醇 (D); 0~10 min, 10% A, 90% D; 10~14 min, 30% A, 70% D; 14~15 min, 50% A, 50% D; 15~20 min, 90% A, 10% D; 检测波长 280 nm; 流量: 1.0 mL/min; 进样量: 10 μL 。

标准曲线制作: 准确称取 5 mg 标准品 (HPLC 级) 置于 50 mL 容量瓶中, 用色谱级甲醇溶液溶解得到质量浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准溶液, 制备质量浓度为 100、80、60、40、20 以及 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准溶液。分别吸取不同浓度的标准溶液 1 mL 注入液相瓶中进行检测, 进样量 10 μL , 记录测得的峰面积。以质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 橙皮苷、橙皮素标准曲线如表 1。橙皮苷、橙皮素分别在 0~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的质量浓度范围内有良好的线性关系, 可以用于这两种物质的定量检测^[17]。

表 1 黄酮类化合物的标准曲线

Table 1 Standard curves of two flavonoids

化合物	标准曲线	相关系数 R^2
橙皮苷	$y=15\ 619x+121\ 969$	0.990 9
橙皮素	$y=28\ 869x+32\ 147$	0.999 9

1.3.3 单因素实验

利用单因素试验法, 分别探究转化时间、转速、接种量、pH 值以及底物浓度对黑曲霉转化橙皮苷的影响。

1.3.3.1 转化时间对黑曲霉转化橙皮苷的影响

在接种量为 10%、温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、转速 200 r/min、pH 值为 7.0, 底物浓度为 1.0 mmol/L, 分别于转化时间为 0、8、16、24、32、48 h 取样, 每组实验均做 3 次平行。测定不同转化时间下黑曲霉将橙皮苷底物转化成橙皮素的产率。

1.3.3.2 转速对黑曲霉转化橙皮苷的影响

在接种量为 10%、转化温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 值为 7.0、底物浓度为 1.0 mmol/L, 转化时间 24 h 情况下, 分别控制转速为 0、50、100、150、200 r/min, 测定不同转速下黑曲霉将橙皮苷底物转化成橙皮素的产率。

1.3.3.3 接种量对黑曲霉转化橙皮苷的影响

控制温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 值为 7.0、转速 200 r/min、底物浓度为 1.0 mmol/L, 转化时间 24 h, 在无菌条件下分别接种 1%、5%、10%、15%、20% (质量分数) 的黑曲霉菌丝球, 每个变量组均做 3 个平行。测定

接种量对橙皮素产率的影响。

1.3.3.4 起始pH值对黑曲霉转化橙皮苷的影响

在接种量 10%、温度为 37 °C、转速 200 r/min、橙皮苷底物浓度为 1.0 mmol/L，转化时间 24 h，分别控制 pH 值为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0，每组实验均做 3 次平行。测定不同 pH 值条件下黑曲霉将橙皮苷底物转化成橙皮素的产率。

1.3.3.5 底物浓度对黑曲霉转化橙皮苷的影响

在接种量 10%、温度为 37 °C、转速 200 r/min、pH 值为 7.0，分别控制底物终浓度为 0.25、0.5、1.0、2.0、4.0 mmol/L，每组实验均做 3 次平行。测定不同底物浓度下黑曲霉将橙皮苷底物转化成橙皮素的产率。

1.3.4 正交实验

根据单因素试验结果，选取接种量、pH 值、底物浓度这三个因素为主要影响因素，每个因素选取 3 个水平，以橙皮素产率为指标确定最佳转化条件。试验的正交设计表如表 2 所示。

表 2 黑曲霉制备橙皮素的优化工艺正交实验设计
Table 2 Design of orthogonal experiment for optimum process of preparation of hesperidin from *A. niger*

水平	A	B	C
	接种量/%	pH 值	底物浓度/(mmol/L)
1	5	7.0	0.5
2	10	7.5	1.0
3	15	8.0	1.5

将样品进行高效液相色谱分析，按下式计算橙皮素的产率。

$$P = \frac{C_1}{C_2} \times 100\% \quad (1)$$

式中：

P ——表示产率；

C_1 ——表示转化产物浓度；

C_2 ——表示转化底物浓度。

1.3.5 抗氧化活性分析

1.3.5.1 DPPH自由基清除能力的测定

用 80% 的无水甲醇溶液分别配置 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 DPPH 甲醇溶液和 Trolox 标准溶液。分别取 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL 的 Trolox 标准溶液，定容到 10 mL，获得不同浓度的 Trolox 溶液。取稀释后的橙皮苷、橙皮素样品和不同浓度的 Trolox 溶液 50 μL ，加入 150 μL DPPH· 溶液，混匀后避光反应 20 min，在 517 nm 波长处采用酶标仪检测样品的吸

光度值。以 OD 值为纵坐标，标准品 Trolox 的浓度为横坐标，绘制标准曲线为 $y = -0.0375x + 1.1637$ ， $R^2 = 0.9984$ ，最终的 DPPH· 抗氧化能力以当量 Trolox 溶液浓度表示^[18]。

1.3.5.2 清除ABTS⁺能力的测定

取 50 mL 浓度为 7 mmol/L 的 ABTS 溶液与 0.88 mL 浓度为 140 mmol/L 的过硫酸钾溶液混合，避光静置过夜，配置 ABTS 储备液。将 Trolox 标准液用超纯水稀释为 0、25、50、75、100、125、150 $\mu\text{mol/L}$ 系列梯度溶液。取适当稀释好的样品和不同浓度的 Trolox 溶液 10 μL ，加入 200 μL ABTS 溶液，旋涡振荡 30 s，遮光反应 1 h，在 734 nm 处测吸光度值。以 OD 值为纵坐标，标准品 Trolox 的浓度为横坐标，绘制标准曲线为 $y = -0.0013x + 0.5761$ ， $R^2 = 0.9979$ 。最终的清除 ABTS⁺ 的能力以当量 Trolox 溶液浓度来表示^[18]。

1.3.5.3 总抗氧化能力 (FRAP) 的测定

称取 0.31 g 三水合醋酸钠，加入 1.6 mL 乙酸，用超纯水定容 100 mL，制成 FRAP 工作液 1。称取 0.312 g TPTZ 用 40 mmol/L 盐酸溶液定容 100 mL，制成 FRAP 工作液 2。称取 0.54 g FeCl₃·6H₂O，用蒸馏水定容到 100 mL，配成 FRAP 工作液 3。将 FRAP 工作液 1、2、3 按照 10:1:1 (V/V/V) 的比例配成 FRAP 工作液。取 10 μL 待测样品或 Trolox 标准品溶液加入 96 孔板中，加入 300 μL 的 FRAP 工作液，避光反应 4 min 后，用酶标仪在 593 nm 下测定吸光值。将样品溶液的吸光值同 Trolox 参照的吸光值做比较来评价抗氧化活性^[18]。

1.3.6 底物和产物的人胚肾上皮细胞系 (HKC-8 细胞) 毒性评价

1.3.6.1 HKC-8细胞培养

HKC-8 细胞株为人肾小管上皮细胞。分别用含 10% 胎牛血清、青霉素 100 U/mL 和链霉素 100 U/mL 的 EME α 和 DMEM/F12 培养液培养，置于 $\varphi = 5\%$ CO₂、恒湿、37 °C 条件下，细胞生长至 80% 时用胰蛋白酶 (0.05 wt.% Trypsin-EDTA) 进行消化传代。

1.3.6.2 MTT法测试HKC-8细胞毒性

将 80% 融合且生长状态良好的 HKC-8 细胞用含 EDTA 胰蛋白酶消化后，用培养基稀释吹散至单细胞悬液。取 96 孔板，每孔中加入 100 μL 浓度为 6×10^4 的细胞悬液，于 37 °C， $\varphi = 5\%$ CO₂ 的恒温恒湿培养箱中培养 24 h。待细胞融合后，用 PBS 洗涤

一次, 加入 100 μL 培养基稀释的样品溶液。培养箱内继续培养 1 h 后, 去除培养液, 用 PBS 清洗两遍。每孔加入 200 μL 0.5 mg/mL 的 MTT 溶液, 继续培养 4 h 后, 弃去上清液。每孔加入 150 μL 二甲基亚砷 (DMSO), 震荡使蓝紫色结晶充分溶解, 用酶标仪测定 490 nm 下的吸光值。计算各实验组中半抑制率 IC_{50} 毒性。

1.3.7 橙皮苷、橙皮素对 H_2O_2 损伤HKC-8细胞的保护作用

在已接种 HKC-8 细胞的 96 孔板中加入 100 μL 含有 0.2 mmol/L H_2O_2 溶液和 25 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的橙皮苷、橙皮素样品的培养基, 每个样品做 4 个复孔。以加入 100 μL DMEM 培养基的孔为空白组, 以加入含 0.2 mmol/L H_2O_2 的 DMEM 培养基的孔为损伤组, 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 下培养 24 h。收集细胞并用结合液重悬, 加入 10 μL 碘化丙啶 (PI) 染色液和 5 μL Annexin V-Fitc 混匀, 室温避光孵育 30 min, 使用流式细胞仪进行检测^[19]。

1.3.8 数据处理分析

每个试验进行 3 次测定, 实验结果以平均值 \pm 标准差表示, 用 Origin 9.0 软件绘图, 采用 SPSS 分析软件进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 单因素实验分析

2.1.1 转化时间对黑曲霉转化橙皮苷的影响

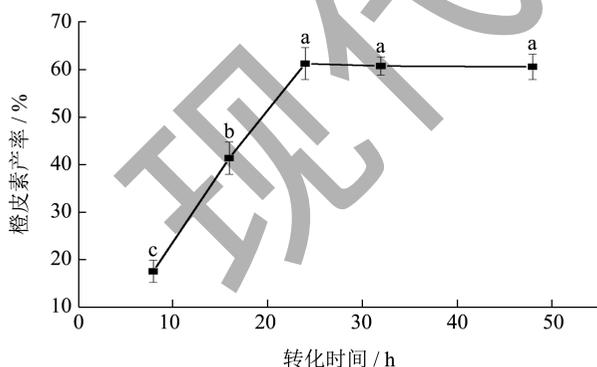


图3 转化时间对黑曲霉转化橙皮素的影响

Fig.3 Effect of the transformation time on the transformation of hesperidin by *A. niger* CP-2

注: 不同小写字母表示不同转化时间有显著性差异 ($P < 0.05$)。

转化时间对橙皮素的产率影响如图 3 所示, 在反应时间达 24 h, 橙皮素的产率为最高值。当反应

时间过短, 转化还在进行时便结束, 使橙皮苷转化不完全, 转化产物没有达到峰值; 当反应时间过长, 可能是由于微生物的生长具有周期性, 产物会随着发酵液中营养物质的消耗从产生到增加再到维持不变或者降低^[20]。因此可以将 24 h 定为黑曲霉生物转化橙皮苷的终点。

2.1.2 转速对黑曲霉转化橙皮苷的影响

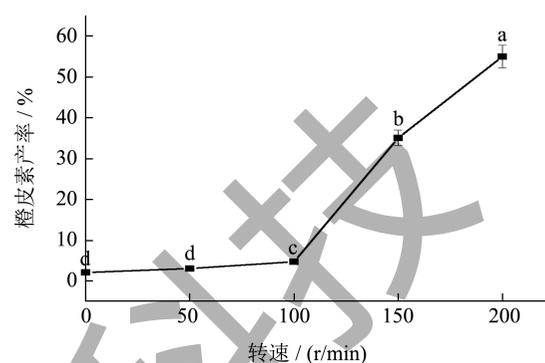


图4 转速对黑曲霉转化橙皮素的影响

Fig.4 Effect of the speed on the transformation of hesperidin by *A. niger* CP-2

注: 不同小写字母表示不同转速有显著性差异 ($P < 0.05$)。

不同摇床转速对黑曲霉转化制备橙皮素的过程至关重要, 直接关系其转化黄酮的能力, 如图 4 所示, 在处于较低的转速时, 橙皮苷的转化率处于较低的水平, 橙皮素的产率增加较慢, 可见在低转速时不利于橙皮苷的转化, 转速 100~200 r/min 时橙皮素的产率增加较快, 转速 200 r/min 橙皮素的产率最高。有研究表明, 当转速高于 250 r/min 时, 无法形成规则的菌球, 且菌丝较长易发生断裂。转速在 180~220 r/min 时, 能形成正常的菌球, 且转速在 220 r/min 时, 则能形成实心菌球, 菌球形态均匀、大小达到最佳状态^[21]。有研究表明^[22], 摇床转速的升高不仅提高了培养基中的溶氧量, 同时也促进了真菌养分的吸收, 从而促进菌丝球的形成; 同时, 高转速也意味着产生较大的剪切力, 从而促使菌丝断裂, 不利于菌丝球的形成, 这导致摇床转速对不同丝状真菌菌丝球的形成具有不同的影响效果。在本研究中, 并没有探究溶氧对黑曲霉转化橙皮苷的影响。有研究表明, 当转速变时, 反应体系中存在一定的扩散极限。到达极限后连接酶的催化活性随着转速的增加而降低^[23]。随着转速的增加, 酶的催化活性降低, 可能是细胞连接酶在剪切力和空气/流体界面中钝化^[24], 说明较高的转速不利于初始反应的酶活化。在本研究中, 主要利用 α -L-鼠李糖苷酶和 β -D-

葡萄糖苷酶对黄酮进行转化,故确定 200 r/min 为最适转速,此时橙皮素的产率为 54.90%。

2.1.3 接种量对黑曲霉转化橙皮苷的影响

如图 5 所示,接种量对黑曲霉将橙皮苷转化为橙皮素的产率有重要影响。有研究表明,黑曲霉菌丝体中具有 α -L-鼠李糖苷酶和 β -D-葡萄糖苷酶,能够将橙皮苷水解为橙皮素^[25]。*A. niger* 基因组序列的研究为其他组学的研究和应用提供了新的平台。目前,NCBI 数据库中黑曲霉的基因组序列中有 24 个 α -L-鼠李糖苷酶基因和 13 个 β -D-葡萄糖苷酶基因。接种量会影响黑曲霉产 α -L-鼠李糖苷酶和 β -D-葡萄糖苷酶的效率,在本研究中,当反应体系中的黑曲霉接种量为 1%~10% 时,橙皮素的产率随着接种量的增加而上升。而当接种浓度继续增加时,橙皮素的产率反而下降。有研究表明,接种量会影响菌体产酶效率,接种量少,产酶速率太低;若接种量太大,菌体发育旺盛,反而会抑制目标代谢物的生成^[26]。因此合适的接种量有利于产酶,从而更利于橙皮苷的转化以及橙皮素的生成。在本研究中,橙皮素的产率在接种量为 10% 时达到最大值,为 64.34%。

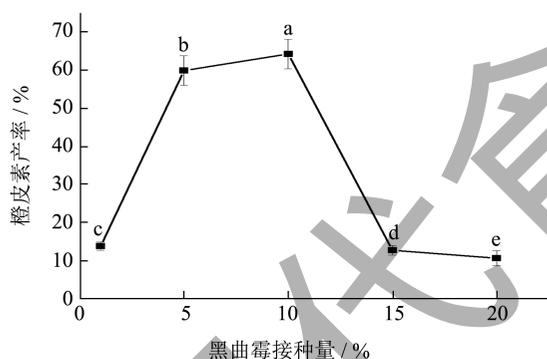


图 5 黑曲霉接种量对黑曲霉转化橙皮素的影响

Fig.5 Effect of *A. niger* inoculum amount on the transformation of hesperidin by *A. niger* CP-2

注:不同小写字母表示不同接种量有显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.1.4 pH值对黑曲霉转化橙皮苷的影响

黑曲霉对橙皮苷的转化主要依靠酶的作用,而 pH 值对酶的酶促反应速率有很大的影响,因此对橙皮苷的转化也有明显的影响。酶最适合 pH 值指在某一特定 pH 值时,酶促反应具有最大反应速率,高于或低于此值,反应速率下降。结果如图 6 所示,在反应体系中 pH 值为 6.0~7.5 时,随着 pH 值的升高,橙皮素的产率也随之增加。其中,在 pH 值为 6.0~6.5 时,橙皮素的产率增加缓慢,橙皮素产率

为 18.67%; 在 pH 值为 6.5~7.5 时,橙皮素的产率快速增加。pH 值影响 *A. niger* CP-2 中相关酶的活性,主要是通过氢离子浓度和电荷效应的影响。董宇等^[27]的研究也表明酶在催化反应时存在着电荷和空间两种效应的共同作用,因此推测缓冲溶液的 pH 值变化时催化效率随之变化的现象的原因也在于此。橙皮苷转化为橙皮素是通过微生物产生的酶来实现的, pH 值是影响酶活性的重要因素^[28,29]。因此,本研究中黑曲霉转化橙皮苷的最适 pH 值为 7.5。

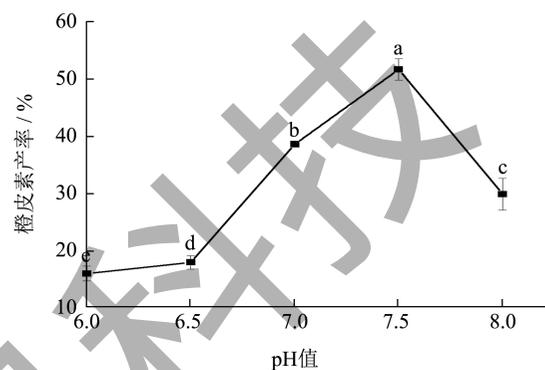


图 6 pH 值对黑曲霉转化橙皮素的影响

Fig.6 Effect of the pH value on the transformation of hesperidin by *A. niger* CP-2

注:不同小写字母表示不同 pH 值有显著性差异 ($P < 0.05$)。

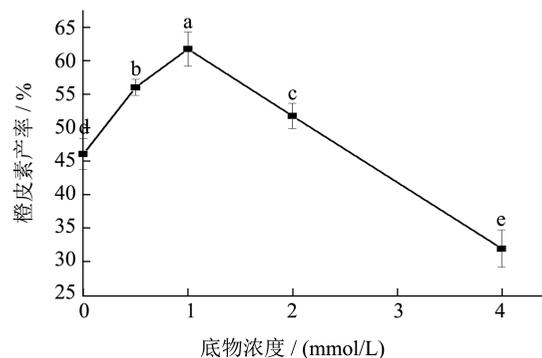


图 7 底物浓度对黑曲霉转化橙皮素的影响

Fig.7 Effect of the concentration of substrate on the transformation of hesperidin by *A. niger* CP-2

注:不同小写字母表示不同底物浓度有显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.1.5 底物浓度对黑曲霉转化橙皮苷的影响

如图 7 所示,随着底物浓度从 0 mmol/L 到 4.0 mmol/L 的增加,橙皮素的产率呈现先升高后降低的趋势。当橙皮苷的浓度为 1.0 mmol/L 时,橙皮素的产率最高为 61.71%。当橙皮苷的浓度持续增加时,橙皮素的产率呈下降趋势。可能的原因是 *A. niger*

CP-2 在反应体系中的转化以及产酶能力有限，随着底物浓度的增加，反应体系的转化能力趋于饱和，因此橙皮素的产率不随底物浓度增加而增加。

2.2 正交实验分析

对 *A. niger* CP-2 转化橙皮苷的正交试验结果进行方差分析，如表 3 和表 4 所示，影响橙皮素产量的因素顺序为：A>B>C，即接种量、pH 值和底物浓度三个因素中，极差最大的是接种量，接下来是 pH 值，然后是底物浓度。黑曲霉转化橙皮苷的最佳条件为 A2B2C1，即在接种量为 10%，pH 值为 7.5，底物浓度为 1.0 mmol/L 的反应体系下，橙皮素的产率最高，为 63.90%。图 8 显示 24 h 后黑曲霉转化制备橙皮素的液相图，转化制备效果较明显，实验可行。目前已有利用黑曲霉细胞催化橙皮苷转化产橙皮素的研究报道，而全细胞催化剂是指微生物细胞经过特定配方的发酵液培养后，利用离心（细菌）或抽滤（霉菌）收集到湿菌体，再用冷冻干燥或有机溶剂干燥等方法将其脱水获得。有研究表明，黑曲霉催化芦丁水解反应可选择性地生成异槲皮苷，最高转化率大于 99%，但研究中只是考虑了转化率并未考虑产物的产率^[30]。而在本研究中直接以橙皮素的产率来评估黑曲霉转化橙皮苷的能力，是较为合理的。

表 3 黑曲霉转化制备橙皮素优化工艺正交实验结果

Table 3 Experimental results of orthogonal optimization of hesperidin preparation by *A. niger*

组号	A	B	C	橙皮素产率/%
1	1	1	1	10.46
2	1	2	2	11.32
3	1	3	3	16.43
4	2	1	3	38.00
5	2	2	1	63.90
6	2	3	2	41.65
7	3	1	2	49.35
8	3	2	3	56.34
9	3	3	1	28.76
K1	38.2	97.81	116.01	
K2	135.99	131.56	122.11	
K3	142.01	86.83	78.08	
k1	12.73	32.60	38.67	
k2	45.33	43.85	40.70	
k3	47.34	28.94	26.03	
R	34.60	14.91	14.68	

表 4 黑曲霉转化制备橙皮素优化工艺方差分析

Table 4 Analysis of variance of optimization process for preparation of hesperidin by *A. niger*

来源	离差平方和	自由度	F 值	显著性
A	2 263.96	2	24.86	P<0.05
B	362.27	2	3.98	P>0.05
C	379.39	2	4.17	

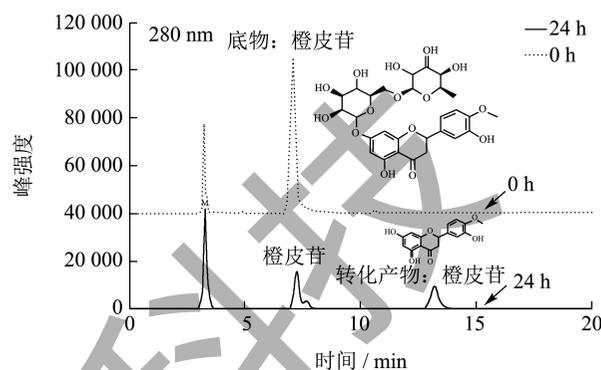


图 8 黑曲霉转化制备橙皮素的液相图

Fig.8 Liquid phase diagram of the preparation of hesperidin by the transformation of *A. niger* CP-2

2.3 抗氧化活性及对H₂O₂诱导的细胞凋亡有一定的拮抗能力

抗氧化是不同机制作用的结果，如抑制过氧化物的分解，阻止清除自由基等^[31,32]。本研究采用 DPPH、ABTS 以及 FRAP 三种方法评估转化底物及产物的抗氧化能力。由表 5 可以看出，转化产物橙皮素的 DPPH、ABTS 以及 FRAP 的值均高于转化底物橙皮苷，说明通过黑曲霉生物转化后，抗氧化能力得到进一步提高。

利用 MTT 法对橙皮苷和橙皮素的人胚肾上皮细胞系 (HKC-8) 进行评价，发现其 IC₅₀ 分别为 66.79 μmol/L 和 71.37 μmol/L，因此将浓度为 25 μmol/L 的转化产物及底物进行 H₂O₂ 损伤 HKC-8 细胞的保护作用分析。如图 9a、9b 所示，在空白组中，正常情况下细胞凋亡率不超过 7%，而在 H₂O₂ 模型对照组中，细胞凋亡率达到 25.12%，橙皮苷组的细胞凋亡率为 20.08%，与模型组差异显著 (P<0.05)，具有一定的细胞氧化损伤保护作用；而橙皮素组的细胞凋亡率仅为 12.23%，相对于模型组呈现极显著差异 (P<0.01)，说明橙皮素具有比橙皮苷更强的细胞氧化损伤保护作用，因此，在未呈现细胞毒性的浓度下，底物和转化产物都均有细胞氧化损伤保护作用，而转化产物的保护作用更强。

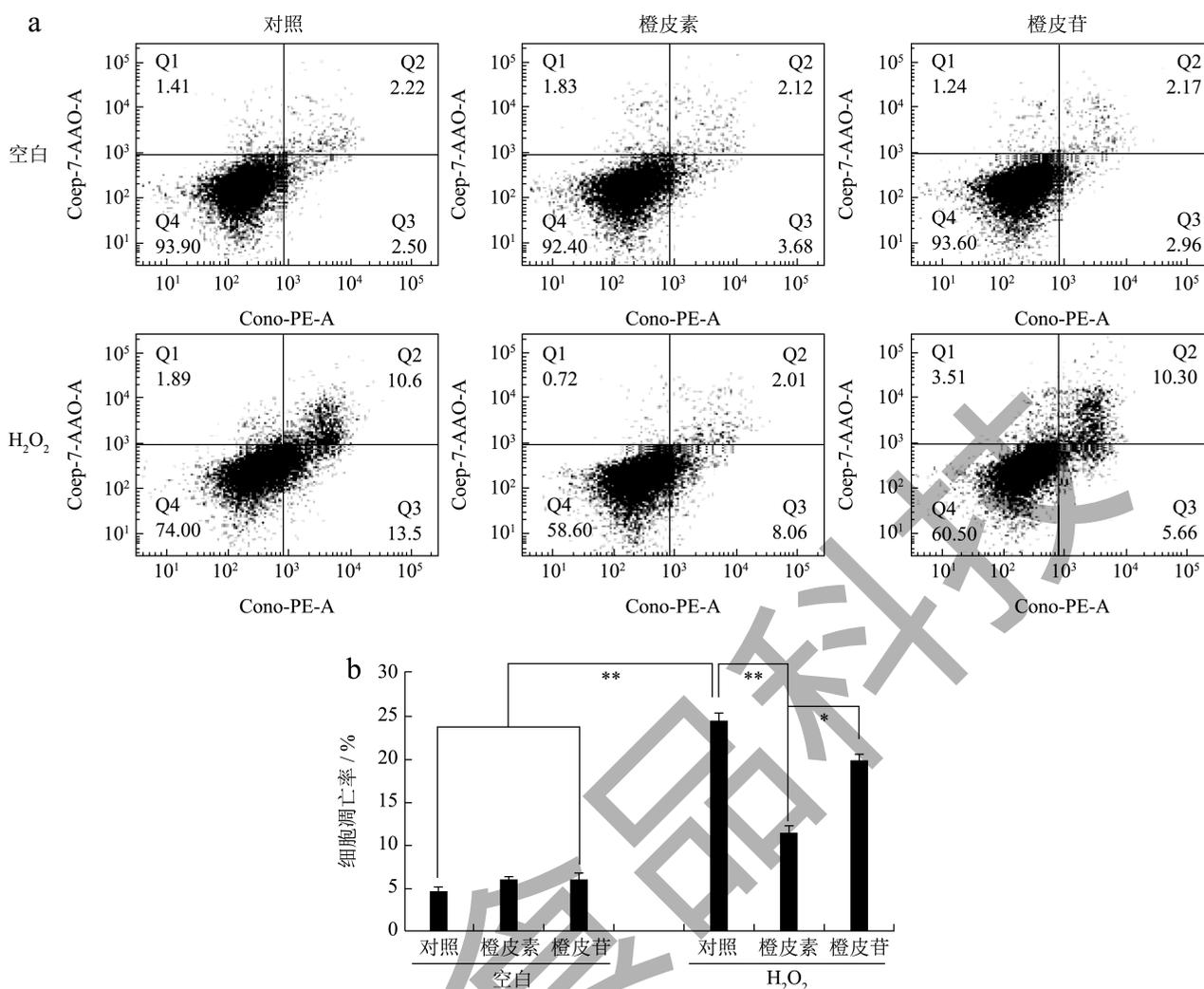


图9 转化底物、产物对 H₂O₂ 损伤 HKC-8 细胞的保护作用

Fig.9 Protective effects of transformation substrates and products on H₂O₂-injured HKC-8 cells

表 5 转化底物、产物的抗氧化活性及细胞毒性

Table 5 Antioxidant activity and cytotoxicity of transformation substrates and products

指标	橙皮苷	橙皮素
FRAP/(mmol AE/g)	0.66 ± 0.05 ^a	0.92 ± 0.08 ^b
DPPH/(mmol AE/g)	0.72 ± 0.11 ^a	1.03 ± 0.11 ^b
ABTS/(mmol AE/g)	1.18 ± 0.10 ^a	1.72 ± 0.13 ^b
毒性试验 IC ₅₀ /(μmol/L)	66.79 ± 0.63 ^a	71.37 ± 0.60 ^b

注：同一系列不同小写字母表示橙皮苷和橙皮素之间有显著性差异 (P<0.05)。

3 结论

本实验采用微生物法，利用黑曲霉菌株作为发酵菌株，探究在不同因素对该黑曲霉菌株转化制备橙皮素的影响，利用单因素实验和正交实验进行转化，以橙皮素的产率作为指标，优化反应条件，最终确定了黑曲霉转化制备橙皮素优化工艺为：恒温

摇床转速为 200 r/min、接种量为 10%、pH 值为 7.5、底物浓度为 1 mmol/L、温度为 37 °C，黑曲霉在此反应体系下，反应 24 h 后，得到的橙皮素产率为 63.90%。该工艺步骤简便，过程环保，产物产率高，后续纯化比较容易；同时转化产物橙皮素的抗氧化活性 (DPPH、ABTS 以及 FRAP) 均高于转化底物橙皮苷 (P<0.05)，同时，在无细胞毒性的浓度下，橙皮素对 H₂O₂ 损伤 HKC-8 细胞的保护能力同样高于转化底物橙皮苷 (P<0.05)，此结果可为橙皮素的工业化生产提供理论依据，具有广阔的实用前景。

参考文献

- [1] GAO Z, GAO W, ZENG S, et al. Chemical structures, bioactivities and molecular mechanisms of *citrus* polymathoxyflavones [J]. Journal of Functional Foods, 2018, 40: 498-509.
- [2] 傅曼琴,陈玉婷,吴继军,等.陈皮表面微生物及其转化黄酮类物质的研究进展[J].现代食品科技,2022,38(4):282-291.

- [3] CHOI S S, LEE S H, LEE K A. A comparative study of hesperetin, hesperidin and hesperidin glucoside: Antioxidant, anti-inflammatory, and antibacterial activities *in vitro* [J]. *Antioxidants*, 2022, 11(8): 1618.
- [4] 张风亭,胡坦,潘思轶.雪腐镰刀菌和酱油曲霉转化橙皮苷生成橙皮素单葡萄糖苷效果[J].食品科学,2022,43(22): 145-150.
- [5] MIYAKE Y, YAMAMOTO K, TSUJIHARA N, et al. Protective effects of lemon flavonoids on oxidative stress in diabetic rats [J]. *Lipids*, 1998, 33(7): 689.
- [6] 张风亭,胡坦,潘思轶.橙皮苷生物学活性及其改性技术的研究进展[J].食品工业科技,2022,43(10):442-449.
- [7] 汪胡芳,莫丽英,王杏利,等.糖基化改性甜菊苷、橙皮苷及芦丁苷作为新型药物载体的研究与应用[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(23):220-227.
- [8] DUAN L, DOU L, YU K, et al. Polymethoxyflavones in peel of *Citrus reticulata* 'Chachi' and their biological activities [J]. *Food Chemistry*, 2017, 234: 254-261.
- [9] LIU X, LUO Y, WU H, et al. Systematic analysis of O-methyltransferase gene family and identification of potential members involved in the formation of O-methylated flavonoids in citrus [J]. *Gene*, 2016, 575 (2): 458-472.
- [10] LI Z, FENG C, LUO X, et al. Revealing the influence of microbiota on the quality of Pu-erh tea during fermentation process by shotgun metagenomic and metabolomic analysis [J]. *Food Microbiology* 2018, 76: 405-415.
- [11] JIAO J, GAI Q Y, WANG W, et al. Remarkable enhancement of flavonoid production in a co-cultivation system of *Isatis tinctoria* L. hairy root cultures and immobilized *A. niger* [J]. *Industrial Crops and Products*, 2018, 112: 252-261.
- [12] ZOU Y, XIN X, XU H, et al. Highly efficient bioconversion of flavonoid glycosides from citrus-processing wastes in solvent-buffer systems [J]. *Green Chemistry*, 2020, 22(10): 3196-3207.
- [13] 王智磊,刘素娟,张鑫,等.黑曲霉生物转化黄酮类成分研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(21):220-228.
- [14] 李小莉.产橙皮苷酶菌株的筛选及发酵提取耦合制备橙皮素单葡萄糖苷的研究[D].南京:南京农业大学,2012.
- [15] 巩建业,吴喆瑜,刘嘉男,等.黑曲霉 α -L-鼠李糖苷酶与柚皮苷分子动力学模拟研究[J].食品与生物技术学报,2019, 38(12):66-72.
- [16] FU M Q, XU Y J, CHEN Y L, et al. Evaluation of bioactive flavonoids and antioxidant activity in *Pericarpium Citri Reticulatae* (*Citrus reticulata* 'Chachi') during storage [J]. *Food Chemistry*, 2017, 230: 649-656.
- [17] WANG F. Enzymatic synthesis, isolation and purification of hesperidin monoglucoside and its application [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2019: 12-13.
- [18] MASSENTI R, BIANCO R L, SANDHU A K, et al. Huanglongbing modifies quality components and flavonoid content of 'Valencia' oranges [J]. *Journal of Science of Food and Agriculture* 2016, 96(1): 73-78.
- [19] CHEN L, TENG H, XIE Z, et al. Modifications of dietary flavonoids towards improved bioactivity: An update on structure-activity relationship [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2017, 58(4): 513-527.
- [20] IBRAHIM D, WELOOSAMY H, LIM SH. Effect of agitation speed on the morphology of *Aspergillus niger* HFD5A-1 hyphae and its pectinase production in submerged fermentation [J]. *World Journal of Biological Chemistry*, 2015, 6(3): 265-271.
- [21] 刘书彤,石冰冰,谭奕阳,等.一株产L-苹果酸黑曲霉菌株的诱变筛选及发酵培养基优化[J].食品工业科技,2024, 45(8):165-173.
- [22] LI W. Morphological engineering and fermentation process optimization of deep sea fungi against aflatoxin [D]. Harbin: Master's Thesis of Harbin Institute of Technology, 2018.
- [23] LI X F, ZONG M H, YANG R D. Novozym 435-catalyzed regioselective acylation of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine in a co-solvent mixture of pyridine and isopropyl ether [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2006, 38(1): 48-53.
- [24] KAHN M, SALT D, ALLEN D, et al. Shear associated effects in relation to proteins [J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 1991, 51(2): 278-279.
- [25] PURI M, KALRA S. Purification and characterization of naringinase from a newly isolated strain of *A. niger* 1344 for the transformation of flavonoids [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2005, 21(5): 753-758.
- [26] 许雨颖.黑曲霉C2J6产脂肪酶发酵工艺及其废弃菌丝球吸附能力初探[D].石河子:石河子大学,2023.
- [27] 董宇.结核分枝杆菌FAS-II脱水酶HadAB的结构及抑制机制研究[D].北京:中国科学院大学,2015.
- [28] PACHECO A R, SEGRE D. A multidimensional perspective on microbial interactions [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2019, 366 (11): 1-11.
- [29] ZENGLER K, ZARMELA L S. The social network of microorganisms how auxotrophies shape complex communities [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(6): 383-390.
- [30] 唐诗潮.全细胞催化芦丁/柚皮苷水解反应的研究[D].广州:华南理工大学,2018.
- [31] YI L, MA S, REN D. Phytochemistry and bioactivity of citrus flavonoids: a focus on antioxidant, anti-inflammatory, anticancer and cardiovascular protection activities [J]. *Phytochemistry Reviews*, 2017, 16 (3): 479-511.
- [32] WANG Q, GONG J, CHISTI Y, et al. Fungal isolates from a Pu-Erh type tea fermentation and their ability to convert tea polyphenols to the abrownins [J]. *Journal of Food Science*, 2015, 80(4): 809-817.