

# 柚苷酶产生真菌的复筛及菌种初步鉴定

郭倩<sup>1</sup>, 郭应龙<sup>1</sup>, 黄高凌<sup>2,\*</sup>, 蔡慧农<sup>2</sup>, 倪辉<sup>2</sup>, 肖安凤<sup>2</sup>, 胡阳<sup>2</sup>

(1. 四川农业大学信息与工学院功能性食品实验室, 四川 雅安 625014

2. 集美大学生物工程学院, 厦门 福建 361021)

**摘要:** 对前期分离获得的柚苷酶产生真菌进行复筛, 从 56 株柚苷酶产生真菌中复筛出了 8 株脱苦能力较强的真菌, 其中, 实验室编号为 4-4-1 的菌株对柚皮苷的分解率为 99%。对菌株 4-4-1 进行形态鉴定, 结果表明, 该真菌培养基中菌丝呈棉絮状, 分生孢子梗单生, 粗短, 为轮辐状排列的瓶形小梗, 分生孢子微弯、镰刀形, 参照真菌鉴定手册第 610 页的描述鉴定为小型茄腐皮镰孢霉。

**关键词:** 柚苷酶; 真菌; 筛选; 鉴定; 蜜柚果汁

## Screening and Identification of Naringin Enzyme Producing Fungus for Debitting Pomelo Juice

GUO Qian<sup>1</sup>, WU Ying-long<sup>1</sup>, HUANG Gao-ling<sup>2,\*</sup>, CAI Hui-nong<sup>2</sup>, NI Hui<sup>2</sup>, XIAO An-feng<sup>2</sup>, HU Yang<sup>2</sup>

(1. Functional Food Laboratory, Institute of Information and Engineering, Sichuan Agricultural University, Yaan 625014, China;

2. School of Bioengineering, Jimei University, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** By screening fungus producing naringin enzyme repeatedly 8 strains of superior debittering capability from 56 strains funguses were obtained. Results showed that No. 4-4-1 laboratory's strains was up to decomposition rate of 99% for naringin. No. 4-4-1 strain's conidiophore was single, tubbiness, and as bottle shape and ranging as spoke, and conidiophore peduncle was slightly bend as sickle. The hyphae were like cotton fibre in the culture medium. It was identified as *F. solani* (Mart.) APP. et Wr. var. *minus* Wr. according to the Fungal Identification Manual page 610.

**Key words** naringin enzyme; fungus; screening; identification; juice of pomelo

中图分类号: TS251.65

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)02-0225-04

蜜柚属芸香科水果, 蜜柚果肉多汁、含糖、风味醇厚清香, 果汁易于榨取, 利用蜜柚可以开发出蜜柚果汁、蜜柚果酒等多种具有较高附加值的蜜柚加工产品, 但事实上, 目前市场上只有少量几个品牌的小量的蜜柚果汁一直处于试销状态而未能产业化生产上市。究其原因, 是由于蜜柚的果肉或果汁中含有苦味物质。苦味物质中最主要的是柚皮苷(naringin)。脱苦的方法有物理方法<sup>[1]</sup>、化学方法<sup>[2]</sup>等。相对而言, 酶法脱苦具有专一性强, 对风味和营养成分无破坏, 效果好, 成本低等优点, 是最理想和最具应用前景的方法。要利用酶法<sup>[3-4]</sup>脱苦, 必须先分离获得能产生脱苦酶的微生物菌株, 并经过鉴定确知是否属于致病菌。本研究对前期分离获得的柚苷酶产生菌株进行复筛, 并用传统的真菌鉴定方法对脱苦效果较好的菌株进行初步鉴定, 为利用

酶法脱苦蜜柚果汁提供实验基础<sup>[5]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种来源

所用菌种为实验室通过在堆积腐烂的柚子皮上富集而来的天然菌株, 经过平板划线分离初筛而获得, 共 380 株, 本实验室保存, 其中 56 株为真菌。

### 1.2 试剂

柚皮苷标准品 Sigma 公司; 色谱纯甲醇、乙腈美国 TEDIA 公司; 分析纯丙酮、石油醚 汕头市达濠精细化学品公司; 葡萄糖、琼脂、酵母膏 上海国药集团; 乳酸石炭酸棉蓝染液、乳酸石炭酸番红染液等自制。

### 1.3 培养基

收稿日期: 2007-08-20

基金项目: 福建省自然科学基金项目(B0610030); 厦门市科技计划项目(3502E-2006-3016)

作者简介: 郭倩(1982-), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品科学。E-mail: gqareil@yahoo.com.cn

\* 通讯作者: 黄高凌(1966-), 女, 副教授, 研究方向为食品科学。E-mail: hgaol@jmu.edu.cn

基础分离培养基: 马铃薯 200g/L, 葡萄糖 20g/L, 琼脂 20g/L, 自然 pH 值<sup>[6]</sup>。

斜面保存培养基: 马铃薯 200g/L, 葡萄糖 20g/L, 琼脂 20g/L, 自然 pH 值。

选择性液体发酵培养基:  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  10g/L,  $\text{KCl}$  5g/L,  $\text{KNO}_3$  3g/L,  $\text{NaCl}$  2g/L, 苦味物丙酮提取液 10ml/L, 酵母膏 1g/L, pH6.0。

选择性固体平板培养基:  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  10g/L,  $\text{KCl}$  5g/L,  $\text{KNO}_3$  3g/L,  $\text{NaCl}$  2g/L, 苦味物丙酮提取液 10ml/L, 酵母膏 1g/L, 琼脂 20g/L, pH6.0。

鉴定用人工合成培养基:  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  10g/L,  $\text{KCl}$  5g/L,  $\text{KNO}_3$  3g/L,  $\text{NaCl}$  2g/L, 酵母膏 1g/L, 琼脂 20g/L, pH6.0。

#### 1.4 菌株的复筛方法

将初步筛选出来的真菌菌株接种于选择性液体发酵培养基中进行试管发酵, 每株菌接 3 个平行、1 个空白对照, 28℃、160r/min 摇床发酵培养 5d, 取出, 先对发酵液进行冷冻处理, 然后再做真空冷冻干燥 2d, 在每根试管中加入 1ml 乙腈溶解, 把浸提液转移至离心管, 用电子天平平衡后, 经高速离心机离心(10000r/min, 20min)并经过针头式滤膜过滤后放置于 4℃冰箱中保存。

#### 1.5 柚皮苷的分解率测定

采用高效液相色谱法检测<sup>[7]</sup>: 色谱柱为 Symmetry  $\text{C}_{18}$  柱, 柱温 35℃、柱压 0~3500Psi, 检测波长 210nm, 走样时间 10min。

表 1 苦味物检测液相分析方法  
Table 1 Analysis and determination of bitterness by high performance liquid chromatography

时间(min)	流速(min)	A (%)	B (%)	积分
0.0	1.00	25.0	75.0	
1.5	1.00	65.0	35.0	6
7.0	1.00	65.0	35.0	6
8.0	1.00	25.0	75.0	6
10.0	1.00	25.0	75.0	6

注: A 为有机相溶液, B 为 pH 值为 3.5 的柠檬酸缓冲液。

#### 1.6 真菌的菌落外观观察

用接种针挑取少量孢子, 用点接法接种于 PDA 平板中央, 28℃恒温培养, 每隔 12h, 观察菌落形态, 色泽及其生长速度<sup>[8]</sup>。

#### 1.7 菌株的有性生殖观察

依据相关鉴定方法<sup>[9]</sup>, 在平皿底铺一张略小于皿底的圆滤纸片, 再放一个 U 形玻棒, 其上放一洁净载玻片和一块盖玻片, 盖上皿盖, 包扎后于 121℃灭菌 25min, 烘干, 再用无菌滴管滴一滴人工合成营养缺陷型培养基于上述培养室的载玻片上。待凝固后, 用接

种针挑取少量的孢子接种于琼脂块的边缘, 用无菌镊子将盖玻片覆盖在琼脂块上。然后在平皿的滤纸上加 5ml 的 20% 无菌甘油, 盖上皿盖, 28℃培养。24h 后, 取出载玻片置显微镜下观察, 并且拍照保存。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株的复筛结果

表 2 蜜柚果汁脱苦酶产生真菌的复筛结果  
Table 2 Results of rescreening of fungus producing debittering enzyme for pomelo juice

菌种号	柚皮苷的分解率(%)	菌种号	柚皮苷的分解率(%)
2-1	100	6-p-14	52
2-3	99	6-p-18	48
2-9	97	6-p-22	51
2-19	5	6-p-37	47
2-22	97	6-p-43	50
2-32	100	6-p-54	61
2-34	19	6-p2-18	55
3-7	94	6-p-20	56
3-8	100	6-p2-22	37
3-10	100	7-p3-8	100
3-3-1	100	7-p3-9	100
3-3-2	100	7-p3-10	94
3-3-3	26	7-p3-15	100
3-3-4	16	7-p3-16	100
3-3-5	20	7-p3-18	100
3-3-7	92	7-p3-20	100
3-3-8	100	7-p3-22	100
3-3-15	100	7-p3-23	21
3-3-18	100	7-p3-26	100
3-3-21	100	7-p3-27	98
3-3-22	14	7-p3-29	100
3-3-24	100	7-p3-30	100
3-3-25	26	7-p3-40	100
3-3-28	99	7-p3-45	100
4-4-1	99	7-p3-50	100
6-p-3	46	7-p3-52	99
6-p-7	51	8-p2-101	44
6-p-10	57	8-p2-108	27

注: 以上数值为三次平行实验的平均值。

表 2 是 56 株真菌复筛的实验结果。从表 2 中可以看出, 复筛出来的大部分的真菌对柚皮苷的分解能力都很强, 而且培养 5d 后, 有 27 株真菌对柚皮苷的分解率都达到了 100% 的分解率; 其中大部分菌种可鉴定为青霉属或曲霉属, 而实验室编号为 4-4-1 的菌株经初步判定无法确认其菌属, 并且 4-4-1 菌株对柚皮苷的分解率为 99%, 所以我们将它挑出作进一步的菌种鉴定。

### 2.2 有性生殖观察

图 1 为菌株 4-4-1 的有性生殖观察实验结果。由图 1 可知, 载玻片上只有营养菌丝, 而未见有性世代, 根据真菌鉴定手册<sup>[10]</sup>第 1 页, 有性孢子不详或不发生, 属

于半知菌类,由此可断定编号为4-4-1菌种为有性世代还未被发现的半知菌类(*Fungi imperfecti*)。

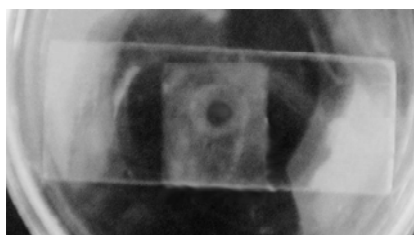
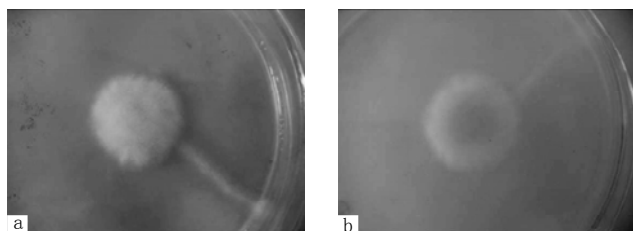


图1 载玻片培养观察法观察菌株4-4-1的有性生殖过程

Fig.1 Observation on sexual reproductive process of strain 4-4-1 by slide glass cultured observation method

### 2.3 菌落的外观观察

图2~4分别是菌株4-4-1的在PDA培养基上培养2、4和8d的菌落外观照片。菌落在2d色或褐色绒毛状;菌落在8d后,表面恢复苍白色,由于培养基中溶出的色素增多,使得培养基背面呈深褐色,菌丝体表面会出现粉状的颗粒,说明产生了分生孢子或粉孢子。据真菌鉴定手册<sup>[10]</sup>第406页描述,分生孢子梗外露,绒毛状,这株菌鉴定为丛梗孢目(*Moniliales*)。



a. 正面菌落形态; b. 培养基反面颜色。

图2 菌株4-4-1 2d时的形态

Fig.2 Colony morphology of strain 4-4-1 on medium PDA plates after 2 days

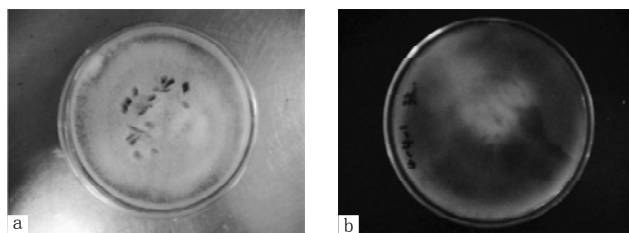


图3 菌株4-4-1 4d时的菌落表面形态

Fig.3 Colony morphology of strain 4-4-1 on medium PDA plates after 4 days

### 2.4 菌株的染色、制片和显微镜观察

图5是4-4-1菌株镰刀形孢子形态,图6是4-4-1菌株厚垣孢子形态。对培养物染色后显微镜观察发现,菌丝体有隔膜,外壁光滑;分生孢子梗直接产生于气生菌丝中,孢子梗呈现瓶状小梗;分生孢子纺锤-镰刀形,两端渐变窄,基部无脚胞,有隔,一般3~5隔(图5

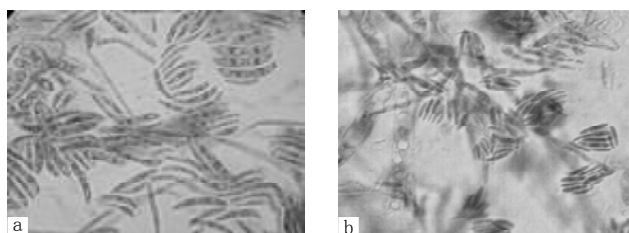


a. 菌落正面形态; b. 培养基反面。

图4 菌株8d后的菌落形态

Fig.4 Colony morphology of strain 4-4-1 on medium PDA plates after 8 days

(a)); 菌丝及分生孢子梗的分枝常对生及轮生;在制片观察过程中,常在菌丝中发现膨大细胞(图7),单个或串生,壁薄,透明;发现有厚垣孢子,椭圆形,间生,成结节状;小型分生孢子生于气生菌丝,不呈洋梨形,而是假头状着生,椭圆形或生于粘孢团;分生孢子壁和隔膜都较厚,香肠状,足细胞不明显。



a. 孢子有3~5隔; b. 孢子及膨大细胞。

图5 菌株4-4-1的孢子形态

Fig.5 Spore morphology of strain 4-4-1

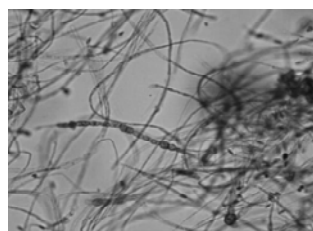


图6 菌株4-4-1的厚垣孢子形态

Fig.6 Chlamydospore morphology of strain 4-4-1

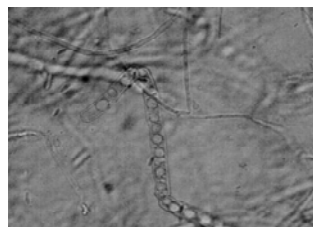


图7 菌丝膨大细胞

Fig.7 Enlargement cells of mycelium

由这些图可知,该菌的分生孢子壁和隔膜都较厚,孢子弯成短喙,足细胞不显著,群集时带褐色或玫瑰色,发现与瘤座孢科(*Tuberculariaceae*),鲜色多胞族

(*Hyalophragmeae*), 镰孢霉属(*Fusarium* Lk. ex Fr.), 黄色镰孢霉组(*Martiella*(*Hypomyces*))的记载基本相符合, 而且在仪器卫生微生物检验标准手册中报道说, 此类菌株, 曾在柑桔类的腐烂的果实中分离获得过, 依据上面描述, 推断这菌株为黄色镰孢霉组(*Martiella*(*Hypomyces*)), 而黄色镰孢霉组(*Martiella*(*Hypomyces*))又与顶厚垣孢组归并为茄腐皮镰孢霉; (*F. solani*(Mart.) Appel et Wr. em. S. et H.); 而后, 根据分生孢子的隔膜的大小, 再细分为小型茄腐皮镰孢霉(*F. solani*(Mart.) APP. et Wr. var. *ninus* Wr.)。

### 3 结 论

对初筛出的 56 株真菌株进行复筛, 得到对柚苷分解能力强的 27 株, 其中挑选出的对柚皮苷分解较强的编号为 4-4-1 的菌株。未观察到该菌的有性世代, 该菌的菌丝呈绒毛状, 初期白色, 中期为白-洋红色, 产生深洋红色或褐色色素, 后期重新回复成白色, 而背面则呈褐色, 菌丝变成棉絮状, 该菌的孢子镰刀形, 分生孢子 3~5 隔, 鉴定为黄色镰孢霉组(*Martiella*(*Hypomyces*)), 小型茄腐皮镰孢霉(*F. solani*(Mart.) APP.

et Wr. var. *ninus* Wr.)。

### 参考文献:

- [1] BRAVERMAN J B S. Citrus Products[M]. New York: Interscience, 1949: 98.
- [2] CHANDLER B V, KEFFORD J F. The chemical assay of limonin: their importance of oranges[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1996, 17: 193.
- [3] 单扬, 李高阳, 张菊华. 柑桔发酵酒脱苦技术研究[J]. 食品与机械, 2001, 85(5): 14-15.
- [4] 徐仲伟, 刘心恕. 三种脱苦方法脱除柑桔汁果味的研究[J]. 食品与发酵工业, 1992, 18(4): 6-16.
- [5] TING S V, RUSSELL L K. Citrus fruits and their products: Analysis and Technology[M]. Basel. New York: Marcel Dekker Inc.
- [6] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2004, 12.
- [7] PURI M, BANERJEE U C. Production, purification and characterization of the debittering enzyme naringinase[J]. Biotechnology Advances, 2000, 18: 207-217.
- [8] 杜连祥, 路福平. 微生物学实验技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2001: 6.
- [9] HASEGAWA S, MAIER V P. Biochemistry of limonoid citrus juice bitter principles and biochemical debittering processes[J]. Bitterness in Food and Beverage, 1990, 25: 293-308.
- [10] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.