

响应面法优化 α -葡萄糖苷酶 发酵条件研究

陈艳娟¹, 杨雪霞², 高红亮¹, 常忠义^{1,*}

(1. 华东师范大学生命科学学院, 上海 200062; 2. 东华大学化学化工与生物工程学院, 上海 201620)

摘要: 采用 Plackett-Burman (PB) 分析法和响应面法 (Response surface methodology, RSM) 对臭曲霉产 α -葡萄糖苷酶的发酵条件进行了优化。PB 实验表明麦芽浸粉、 KH_2PO_4 、尿素、pH 和接种量具有显著影响效应; 然后利用最陡爬坡实验逼近最大响应区域, 通过中心组合实验对影响产酶的主要因素进行研究, 建立了影响因素与响应值之间的回归方程, 并获得最佳发酵条件: 麦芽浸粉 38.13g/L, KH_2PO_4 7.88g/L, 尿素 0.91g/L, pH 为 5.76, 接种量为 9.63%。在此优化条件下发酵, α -葡萄糖苷酶产量提高了 35% 左右, 达到 1218.6U/mL。

关键词: 臭曲霉, α -葡萄糖苷酶, 响应面法

Optimization of fermentation conditions for α -glucosidase using response surface methodology

CHEN Yan-juan¹, YANG Xue-xia², GAO Hong-liang¹, CHANG Zhong-yi^{1,*}

(1. College of Life Science, East China Normal university, Shanghai 200062, China;

2. School of Chemistry and Chemical Engineering and Biological Engineering, Donghua University, Shanghai 201620, China)

Abstract: Plackett-Burman design and response surface methodology were used to optimize the fermentation conditions of α -glucosidase production by *Aspergillus foetidus* NO.4. The PB results showed that the amount of malt extract, KH_2PO_4 , urea, pH and inoculum size were most effective. The steepest ascent experiment was used to approach the optimal conditions subsequently. The response surface analysis was applied to optimize the five major factors for α -glucosidase fermentation. The regression equation between the factors and the response was established, and the optimal conditions were as follows: malt extract 38.13g/L, KH_2PO_4 7.88g/L, urea 0.91g/L, pH 5.76 and inoculum size was 9.63%. Under this situation, the α -glucosidase activity reached 1218.6U/mL, increasing about 35% than the control.

Key words: *Aspergillus foetidus*; α -glucosidase; response surface methodology (RSM)

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)04-0243-05

α -葡萄糖苷酶 (EC 3.2.1.20; α -glucosidase) 又称 α -D-葡萄糖苷水解酶, 它是一类能够从含有 α -糖苷键底物的非还原端催化水解葡萄糖基的酶的总称^[1]。 α -葡萄糖苷酶在淀粉加工工业中可以用作糖化酶制剂, 与 α -淀粉酶一起生产高葡萄糖浆^[2], 另外将 α -葡萄糖苷酶和葡萄糖氧化酶共固定化后制成生物传感器可快速高效检测麦芽糖, 应用于食品成分分析、医学诊断和环境分析等方面^[3]。因此, α -葡萄糖苷酶越来越受到食品工业界和医学界的关注。与日本相比, 我国的研究工作还处于起步阶段, 主要集中在 α -葡萄糖苷酶生产菌株的筛选、细胞固定化或酶学性质的研究等方面, 且国外生产的 α -葡萄糖苷酶大部分为纯酶, 国内研究主要以粗酶液为主^[4]。

制约国内工业化生产 α -葡萄糖苷酶的主要问题是发酵酶活很低, 因此开展提高 α -葡萄糖苷酶的研究非常重要。响应面法是一种很好地优化发酵条件的方法, 且该法也已成功应用在培养基的优化方面^[5-6]。为了提高 α -葡萄糖苷酶的酶活力, 本工作在单因素实验的基础上, 通过 Plackett-Burman 分析法和响应面方法 (Response Surface Methodology, RSM) 对臭曲霉 *Aspergillus foetidus* NO.4 产 α -葡萄糖苷酶的发酵条件进行优化, 以期工业化生产 α -葡萄糖苷酶提供有益参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

臭曲霉 *Aspergillus foetidus* No.4 本实验室保藏。

1.2 实验方法

1.2.1 培养方法 在 4℃ 保藏的茄子瓶中, 加入 10mL 0.1% 的吐温 80, 用接种针刮下孢子, 吸取 1mL 孢子悬浮液置于 50mL 种子瓶中, 培养 10~12h 后转

收稿日期: 2011-04-21 * 通讯联系人

作者简介: 陈艳娟 (1982-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 微生物发酵。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30700064)。

接于发酵培养基中。

1.2.2 培养基制备

1.2.2.1 斜面培养基 察氏培养基

1.2.2.2 种子培养基(g/L) 麦芽浸粉 20, 玉米浆 30, K_2HPO_4 2, KH_2PO_4 3.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25, pH 5.3~6.0。

1.2.2.3 发酵培养基(g/L) 麦芽浸粉 35, 玉米浆 40, K_2HPO_4 2, KH_2PO_4 3.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25, 尿素 0.5, pH 5.3~6.0。

1.2.3 α -葡萄糖苷酶的测定方法^[7-8] 取 2% α -甲基葡萄糖苷溶液 0.5mL、0.02mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液 1mL 置于 25 × 200cm 大试管中, 40℃ 水浴预热 5min, 加入 0.5mL 酶液于 40℃ 水浴反应 60min 后, 100℃ 沸水浴中加热灭活 5min, 加 1.5mL DNS, 沸水浴反应 5min, 流动水迅速冷却, 并加 21.5mL 蒸馏水定容, 520nm 测吸收值(A_1)。

另取 0.5mL 酶液和 1mL 0.02mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液, 先在 100℃ 沸水浴中加热 5min 灭酶, 再加 2% 底物 0.5mL, 保温 60min 后, 测定同上。

$$\text{酶活力 (U/mL)} = (A_1 - A_0) \times K \times 1000 \times N \times 2$$

式中: K-每度 A 值所相当之葡萄糖量(mg); N-酶液稀释倍数; A_0 -为空白对照即水在 520nm 处的吸收值。

酶活力定义为: 在 40℃ 水浴条件下, 每小时由底物 α -甲基葡萄糖苷生成 1 μ g 葡萄糖量所需酶量为 1U。

1.2.4 生物量测定 发酵液用烘干的滤纸过滤, 并用醋酸-醋酸钠缓冲液冲洗 3 遍, 将滤纸和菌体放置 80℃ 烘箱中烘干至恒重。

1.2.5 还原糖测定 DNS 方法^[9]。

1.2.6 氨基氮测定 参考文献[10]。

1.2.7 响应面法的实验设计方法 根据单因素实验对发酵条件的预实验, 将包括培养基成分及发酵培养条件在内 9 个因素为考察对象, 通过 design expert 软件分析得到影响发酵结果的较显著因素, 并对因素进行排序。通过分析得到影响发酵结果的几个显著因素, 并根据多元一次方程的系数大小和正负确定最陡爬坡实验时步长和方向^[11], 并以该实验得到的最高酶活对应的浓度为中心点, 其它非显著因素采用初始培养时的条件, 采用中心组合实验设计 5 因素 5 水平的 53 组实验, 实验分 3 段进行, 每个水平做 3 个平行, 最终取平均值。

2 结果与讨论

2.1 最佳碳源的确定

碳源浓度为 35g/L, 其它培养基成分(g/L) 为玉米浆 40, K_2HPO_4 2, KH_2PO_4 3.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25。麦芽浸粉和麦芽粉作为碳源产酶最高, 分别为 911.4U/mL 和 909.8U/mL; 而以葡萄糖、蔗糖和可溶性淀粉作为碳源, 酶活都比较低; 乳糖作为碳源对菌体生长最有利, 但产酶最低, 仅为 247.6U/mL。考虑生产降低成本, 本工作选用麦芽浸粉作为发酵的碳源, 结果见图 1(a)。

2.2 最佳氮源的确定

选用麦芽浸粉为碳源, 浓度为 35g/L, 其它成分不变, 氮源浓度为 40g/L。酵母膏对于菌体生长最有

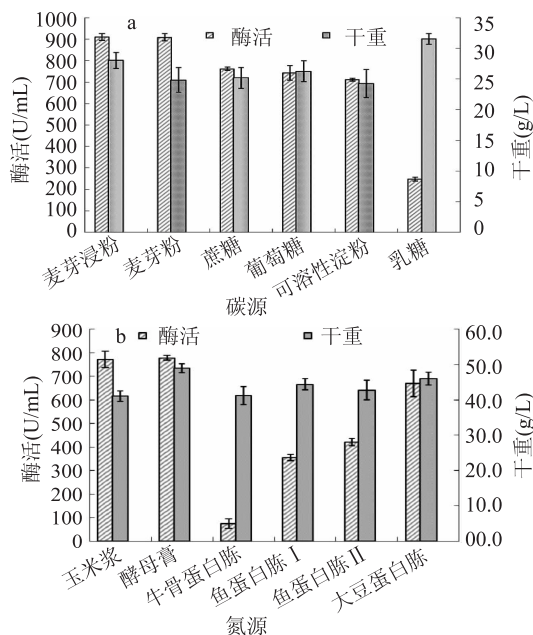


图 1 不同碳源和氮源对发酵产 α -葡萄糖苷酶的影响

Fig.1 Effect of different carbon source and nitrogen source to the α -glucosidase production by *Aspergillus foetidus* NO.4

利, 产酶也最高为 779.5U/mL, 这与 Lee S L 等人^[12]的结果类似, 玉米浆为氮源酶活为 771.9U/mL 与酵母膏的产酶活力相当(对两组进行 t 检验, $P = 0.6327$), 且玉米浆价格低廉, 适用于大规模发酵生产。蛋白胨不适合作为此发酵用氮源, 如牛骨蛋白胨对菌体生长最不利, 且产酶很低, 而鱼蛋白胨(鱼蛋白胨 II 比鱼蛋白胨 I 相比多添加皮蛋白胨成分)和 大豆蛋白胨产酶虽稍高于牛骨蛋白胨, 但产酶效果仍不佳。因此本研究后续实验选用玉米浆作为有机氮源, 结果见图 1(b)。

2.3 PB 重要因素筛选实验

选用麦芽浸粉浓度为 35g/L, 玉米浆浓度为 40g/L, 采用单因素实验确定基础培养基中无机盐和尿素的最适浓度, 以及装液量、初始 pH 和接种量等最适条件(数据未列出)。在此基础上选用实验次数 N-17 的 PB 设计(表 1), 考察麦芽浸粉、玉米浆、 K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、尿素、装液量、pH 和接种量 9 个因素 $X_1, X_2, X_3 \dots X_9$ 对响应值 Y(α -葡萄糖苷酶酶活)的影响, 并余留两个空白项以估计实验误差, 每组实验设计 3 个平行。

表 2 Plackett-Burman 实验主效应分析

Table 2 The main effect analysis of Plackett-Burman experiment

变量	F 值	Prob > F	重要性排序
X_1	99.0694	<0.0001	1
X_2	4.3872	0.0811	7
X_3	1.1853	0.3181	8
X_4	6.5192	0.0433	5
X_5	0.0396	0.8489	9
X_6	18.5348	0.0051	2
X_7	5.6737	0.0546	6
X_8	9.5100	0.0216	4
X_9	16.0099	0.0071	3

表1 PB 实验因素水平表
Table 1 Factors and levels in PB design

水平	因素								
	X ₁ 麦芽浸粉 (g/L)	X ₂ 玉米浆 (g/L)	X ₃ K ₂ HPO ₄ (g/L)	X ₄ KH ₂ PO ₄ (g/L)	X ₅ MgSO ₄ · 7H ₂ O (g/L)	X ₆ 尿素 (g/L)	X ₇ 装液量 (mL/250mL)	X ₈ pH	X ₉ 接种量 (%)
-1	20	20	1.5	2	0.05	0.1	30	5.0	8
0	35	40	3	4	0.1	0.5	40	5.5	10
1	50	60	4.5	6	0.15	0.9	50	6.0	12

回归方程为 $Y = 840.41 + 153.38X_1 - 32.28X_2 - 16.78X_3 + 39.34X_4 + 3.07X_5 + 66.34X_6 + 36.70X_7 + 47.52X_8 - 61.66X_9$ 。

对结果进行方差分析,“Model Prob > F”等于 0.0011,表明模型是重要的,同时“Prob > F”小于 0.05,表明因素是重要的(表 2),对发酵产酶影响较显著的因素依次为麦芽浸粉、尿素、接种量、pH 和 KH₂PO₄。

2.4 最陡爬坡实验设计结果

根据 PB 实验得到的多元一次方程的系数大小和正负确定最陡爬坡实验时各重要因素的步长和方向^[11],其中麦芽浸粉、KH₂PO₄、尿素、pH 和接种量分别为 X₁、X₂、X₃、X₄ 和 X₅,由表 3 可以看出最高酶活在第 2 次实验附近最高,故取第二次实验各因素的水平为下一步响应面设计的中心点。

表3 最陡爬坡实验设计及结果

Table 3 Design and the results of steepest ascent search experiment

实验号	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	Y 酶活(U/mL)
1	35	4	0.5	5.50	10	1046.2
2	38	6	1	5.65	8.75	1168.3
3	41	8	1.5	5.80	7.50	1032.4
4	44	10	2	5.95	6.25	1023.2
5	47	12	2.5	6.10	5.00	1041.6
6	50	14	3	6.25	3.75	842.3
7	53	16	3.5	6.40	2.50	817.8
8	56	18	4	6.55	1.25	790.2

2.5 响应面设计法确定重要因素的最佳水平

根据中心组合实验(Central composite design, CCD)设计的原理,由最陡爬坡实验得到中心组合实验设计的中心点,各重要因素 X₁: 麦芽浸粉、X₂: KH₂PO₄、X₃: 尿素、X₄: pH 和 X₅: 接种量水平表见表 4,每个因素取 5 个水平。其中星号臂长 $\gamma = 2.143$ 设计 5 因素 5 水平的实验,由于实验组数太多,因此选择了分段实验,实验分 3 段,共计 53 组实验,每组做 3 个水平,每组实验值取平均值,结果见表 5。

对实验结果进行回归分析,得到了各重要因素和响应值 Y 之间的回归方程 $Y = 1185.09 + 42.01X_1 + 7.22X_2 + 6.33X_3 - 6.93X_4 + 27.52X_5 - 36.98X_1X_2 + 28.37X_1X_3 + 18.00X_1X_4 - 8.59X_1X_5 - 4.21X_2X_3 - 16.00X_2X_4 + 43.74X_2X_5 - 29.99X_3X_4 - 1.99X_3X_5 + 41.82X_4X_5 - 78.45X_1^2 - 22.43X_2^2 - 35.37X_3^2 - 23.59X_4^2 - 34.88X_5^2$, $R^2 = 0.9319$ 说明方程的拟合度较好,通过对回归方程的方差分析得出一次项 X₁ 和 X₅,二次项和交互项 X₁X₂、X₁X₃、X₂X₅、X₃X₄、X₄X₅ 对 α -葡萄糖苷酶

酶的影响是显著的。各实验因子对 α -葡萄糖苷酶的酶活影响为非线性关系。

表4 响应面分析实验的因素水平表

Table 4 Factors and levels in the Box-Behnken experiments design

因子	水平				
	-2.143	-1	0	+1	+2.143
X ₁	20.9	30	38	46	55.1
X ₂	1.7	4	6	8	10.3
X ₃	0.1	0.6	1	1.4	1.9
X ₄	5.22	5.45	5.65	5.85	6.07
X ₅	6.88	7.88	8.75	9.63	10.62

通过对响应面实验进行方差分析,如表 6 所示,“Model Prob > F”小于 0.0001,表明模型具有高度的显著性,失拟项不显著(P = 0.0529),又回归方程的相关系数 $R^2 = 0.9319$ 大于 0.9,表明约有 93.19% 的酶活变化可由此模型解释,一般认为相关系数大于 0.9,方程具有较好的拟合性。通过响应面回归方程做响应曲面(图 2),更具有直观性。进一步对该结果进

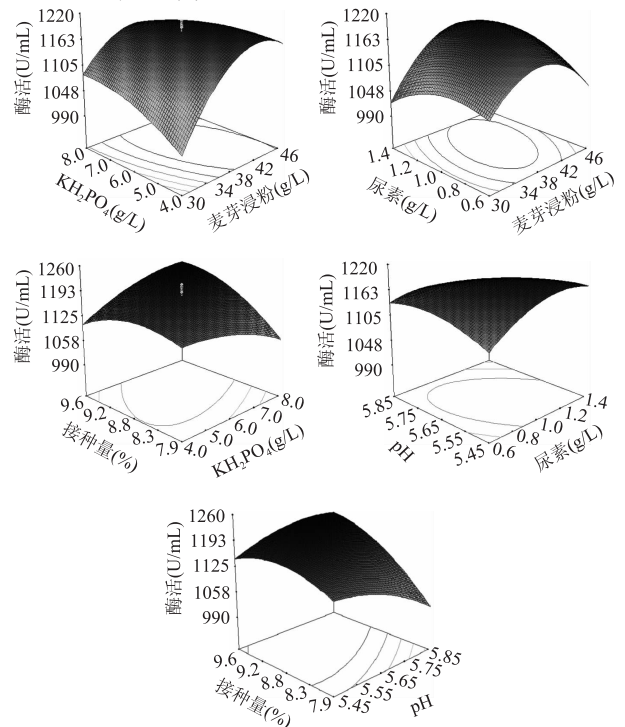


图2 $Y = f(X_1, X_2)$, $Y = f(X_1, X_3)$, $Y = f(X_2, X_5)$, $Y = f(X_3, X_4)$, $Y = f(X_4, X_5)$ 响应面立体分析图

Fig.2 The response surface graph of ethanol reflux time and ratio of $Y = f(X_1, X_2)$, $Y = f(X_1, X_3)$, $Y = f(X_2, X_5)$, $Y = f(X_3, X_4)$, $Y = f(X_4, X_5)$

表5 响应面中心组合实验设计及结果

Table 5 Design and results of central composite experiments

实验号	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	Y 酶活 (U/mL)	实验号	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	Y 酶活 (U/mL)
1	-1	1	1	-1	-1	1000.8	28	-1	-1	1	-1	-1	1005.1
2	-1	1	-1	-1	1	1080.2	29	-1	-1	-1	-1	1	950.2
3	0	0	0	0	0	1205.3	30	-1	-1	-1	1	-1	953.7
4	1	-1	-1	-1	1	885.1	31	1	-1	-1	-1	-1	1050
5	-1	-1	1	-1	1	885.5	32	1	1	-1	1	-1	900.4
6	-1	-1	1	1	-1	820.5	33	-1	1	-1	-1	-1	1001.7
7	-1	-1	-1	-1	-1	950.1	34	0	0	0	0	0	1195.1
8	-1	-1	-1	1	1	1000.3	35	0	0	0	0	0	1211
9	1	-1	1	1	1	1193.4	36	0	0	0	0	0	1199
10	1	1	-1	1	1	1173.4	37	1	1	1	1	1	1050.7
11	-1	1	1	1	1	1107	38	-1	1	1	1	-1	800.6
12	-1	1	-1	1	-1	900.9	39	-1	-1	1	1	1	880.6
13	1	1	-1	-1	-1	940.9	40	1	1	-1	-1	1	1000.1
14	0	0	0	0	0	1210.5	41	0	0	0	-2.143	0	1057.9
15	1	1	1	1	-1	900.4	42	2.143	0	0	0	0	903.6
16	0	0	0	0	0	1120.1	43	0	0	0	2.143	0	1000.2
17	1	1	1	-1	1	1127.4	44	0	0	0	0	-2.143	989.5
18	1	-1	-1	1	-1	1047.7	45	0	0	2.143	0	0	1000.4
19	0	0	0	0	0	1200.1	46	0	2.143	0	0	0	1050.9
20	1	-1	1	-1	-1	1165.4	47	-2.143	0	0	0	0	650.8
21	0	0	0	0	0	1189.2	48	0	0	0	0	0	1180.6
22	1	1	1	-1	-1	1060.3	49	0	0	0	0	2.143	965
23	-1	1	-1	1	1	1150.5	50	0	-2.143	0	0	0	1017.9
24	1	-1	-1	1	1	1130.3	51	0	0	0	0	0	1180.3
25	1	-1	1	1	-1	1100	52	0	0	-2.143	0	0	949.6
26	1	-1	1	-1	1	1060.1	53	0	0	0	0	0	1190.6
27	-1	1	1	-1	1	1109.4							

表6 中心组合实验结果方差分析

Table 6 Variance analysis for design and results of central composite experiments

来源	平方和	均方	F 值	P	来源	平方和	均方	F 值	P
Block	13795.89	6897.94			X ₂ X ₃	567.00	567.00	0.31	0.5821
模型	751600	37581.70	20.51	<0.0001	X ₂ X ₄	8188.80	8188.80	4.47	0.0429
X ₁	72689.18	72689.18	39.68	<0.0001	X ₂ X ₅	61223.75	61 223.75	33.42	<0.0001
X ₂	2147.82	2147.82	1.17	0.2875	X ₃ X ₄	28782.00	28 782.00	15.71	0.0004
X ₃	1648.43	1648.43	0.90	0.3504	X ₃ X ₅	126.80	126.80	0.069	0.7943
X ₄	1979.73	1979.73	1.08	0.3069	X ₄ X ₅	55970.22	55970.22	30.55	<0.0001
X ₅	31181.91	31181.91	17.02	0.0003	X ₁ ²	258900	258 900	141.32	<0.0001
X ₁ X ₂	43771.01	43771.01	23.89	<0.0001	X ₂ ²	21163.53	21163.53	11.55	0.0019
X ₁ X ₃	25758.83	25758.83	14.06	0.0008	X ₃ ²	52621.93	52621.93	28.72	<0.0001
X ₁ X ₄	10364.40	10364.40	5.66	0.0240	X ₄ ²	23419.76	23419.76	12.78	0.0012
X ₁ X ₅	2361.56	2361.56	1.29	0.2652	X ₅ ²	51173.68	51173.68	27.93	<0.0001
失拟分析	49140.64	2233.67	3.07	0.0529					
误差	5821.61	727.70							
总计	820400								

行分析,得出该方程具有最高估测值 $Y = 1211.5U/mL$ 。此时各因素取值分别为麦芽浸粉添加量为 $38.13g/L$, KH_2PO_4 为 $7.88g/L$, 尿素 $0.91g/L$, pH 为 5.76 , 接种量 9.63% 。对预测的最佳点进行摇瓶验证实验,实验重复 3 次,得出酶活为 $1218.6U/mL$,说明预测和实验值具有较好的吻合性。

2.6 最优条件下生长曲线的测定

在最优培养基的条件下对发酵过程做生长曲线

如图 3 所示,臭曲霉迅速生长,在 20h 左右进入稳定期,因碳氮源组成成分较复杂,可能与菌丝在 72h 处出现二次生长的现象有关,且多次重复实验得到相似的结果。葡萄糖苷酶在菌体生长进入稳定期之后开始产生,并在 108h 处达到最高点 ($1218.6U/mL$),继续培养,酶活有所下降,这与 Lee S L 等人^[12]报道 A.niger CCRC 31494 酶活在 8d 达到最高有所不同。pH 在整个发酵期间维持在 $4.9\sim 6.0$ 之间,在 24h 时,

pH 达到最低点,原因是由于此过程代谢旺盛,菌体生长需要大量消耗糖,产生的有机酸致使 pH 降低。而通过还原糖的测定也证实了这一点,还原糖在发酵前 2d 不断被消耗,且此段时间糖耗速率最大。从生长曲线上也可看出氮源的消耗与碳源的消耗几乎同步,但从氨基氮的曲线上看,在发酵后期,氨基氮有个小幅的上升,可能是由于菌体自溶造成的。

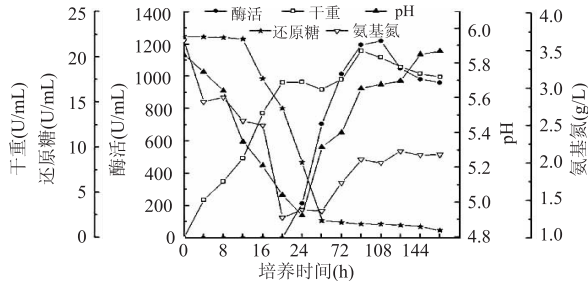


图3 最优培养条件下臭曲霉 NO.4 产 α -葡萄糖苷酶的生长曲线
Fig.3 The best culture condition of *Aspergillus foetidus* NO.4 growth curves

3 结论

通过单因素实验优化了臭曲霉 No.4 产 α -葡萄糖苷酶的最佳碳源为麦芽浸粉,最佳氮源为玉米浆。应用 design expert 软件设计 PB 和 CCD,合理安排实验,减少了工作量,取得了较好的实验结果,通过 PB 实验找到对实验影响较重要的五个因素,分别为麦芽浸粉、 KH_2PO_4 、尿素、接种量和 pH。通过中心组合实验,采用统计学的方法得出臭曲霉 No.4 发酵产酶的二次多项数学模型,并利用该模型对产酶进行了预测,并通过实验验证最高酶活为 1218.6U/mL,与模型预测值之间较接近,说明模型具有较好的拟合性。

(上接第 242 页)

原理研究很少,可以借助于葡萄酒中的有机酸变化机理。

3 结论

桑椹营养丰富,含有大量生理活性物质,包括有机酸类物质,其功效日益引起世人的注目。整个发酵过程中,有机酸含量变化是比较明显的。

酒精发酵过程酵母代谢活动旺盛,其代谢产物多样,本文只是选取有机酸含量变化这一因素进行研究。目前,关于桑椹发酵过程中各物质成分的变化研究很少,仅有少数针对某些成分变化的报道。因此,本文关于桑椹发酵中有机酸变化的研究对于桑椹的开发利用有着极大的指导意义。另外,桑椹果酒风味独特、营养丰富,是一种具有开发价值的新产品。

参考文献

[1] 黎梅,冉晓鸿.桑椹酒的酿制工艺[J].酿酒科技,2003(6):

参考文献

[1] 赵元,张莲英,胡晓燕,等.1 种新的天然 α -葡萄糖苷酶抑制剂的分离纯化及其活性测定[J].中国生化药物杂志,2007,28(1):20-22.
 [2] 杨磊.嗜嗜热古菌 *Thermococcus siculi* HJ21 产高温 α -葡萄糖苷酶的研究[D].无锡:江南大学,2008.
 [3] Nimpiboon P, Nakapong S, Pichyangkura R, et al. Synthesis of a novel prebiotic trisaccharide by a type I α -glucosidase from *B. licheniformis* strain TH4-2 [J]. Process Biochemistry, 2011, 46: 448-457.
 [4] 毕金峰,魏宝东. α -转移葡萄糖苷酶粗酶液的酶学性质[J].食品科学,2005,26(2):75-78.
 [5] Liu C, Sun Z T, Du J H. Response surface optimization of fermentation conditions for producing xylanase by *Aspergillus niger* SL-05 [J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2008, 35: 703-711.
 [6] 刘娅,刘宏娟,张建安,等.响应面法优化 *Clostridium beijerinckii* 木糖发酵产丁醇培养基的研究[J].食品工业科技,2010(7):194-196.
 [7] 胡学智,凌晨,武雯,等.葡萄糖苷转移酶生产菌种的筛选[J].工业微生物,1998,28(1):1-6.
 [8] 陈桂光,管立忠,李玮,等. α -葡萄糖苷酶高产菌株诱变选育的研究[J].现代食品科技,2007,23(7):19-21.
 [9] 宁正祥.食品成分分析手册[M].北京:中国轻工业出版社,1998:9.
 [10] GB/T5009.39-2003 酱油卫生标准的分析方法[S].
 [11] 蔡友华,范文霞,刘学铭,等.响应面优化巴西虫草发酵培养基的研究[J].食用菌学报,2007,14(2):55-59.
 [12] Lee S L, Chen W C. Optimization of medium composition for the production of glucosyltransferase by *Aspergillus niger* with response surface methodology [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1997, 21: 436-440.
 98-100.
 [2] 吴继军,肖更生,刘学铭,等.桑果汁发酵前后营养成分的变化[J].酿酒科技,2002(3):62-63.
 [3] 李银,滕永慧,陈艺红,等.桑椹的化学成分[J].沈阳药科大学学报,2003,20(6):422-424.
 [4] F Koyuncu. Organic acid composition of native black mulberry fruit [J]. Chemistry of Natural Compounds, 2004, 40 (4): 367-369.
 [5] Mustafa Özgen, Sedat Serçe, Cemal Kaya. Phytochemical and antioxidant properties of anthocyanin-rich *Morus nigra* and *Morus rubra* fruits [J]. Scientia Horticulturae, 2009, 119(3): 275-279.
 [6] 陈文华,张旻,李鑫.高效液相色谱法测定果酒中的有机酸[J].中国卫生检验杂志,2003,13(4):453-454.
 [7] 高年发,张军,韩英素.高效液相色谱法测定葡萄酒中的有机酸[J].酿酒,2004,31(1):67-69.
 [8] 赵国群,张桂,张秋生,等.发酵过程果酒成分对苹果酸乳酸发酵的影响[J].酿酒科技,2006(5):39-42.