

酿酒酵母和米曲霉混合发酵生产 α -半乳糖苷酶和转化酶

钱 和¹ 葛向阳^{2*}

- (1. 食品科学与技术国家重点实验室 江南大学食品学院 江苏 无锡 214122)
(2. 工业生物技术教育部重点实验室 江南大学生物工程学院 江苏 无锡 214122)

摘要: 本研究首次利用酿酒酵母 Z-06 和米曲霉 L-09 作为混合菌株, 并通过对液态发酵培养基成分的优化, 使 α -半乳糖苷酶和转化酶活力分别达到 85.22 U/mL 和 563.44 U/mL, 比单菌株发酵产酶活分别提高了 5.9 倍和 8.3 倍。

关键词: 米曲霉, 酿酒酵母, α -半乳糖苷酶, 转化酶, 混合发酵

Production of α -galactosidase and Invertase Using Mixed Culture of *Aspergillus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae*

QIAN He¹ GE Xiang-Yang^{2*}

- (1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, School of Food Science, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)
(2. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: *Aspergillus oryzae* L-09 and *Saccharomyces cerevisiae* Z-06 were mixed cultured, and the component of the submerged culture medium was optimized. In the optimum medium, the activities of the α -galactosidase and invertase reached 85.22 U/mL and 563.44 U/mL, which were 5.9 and 8.3-fold higher than for the single strain, respectively.

Keywords: *Aspergillus oryzae*, *Saccharomyces cerevisiae*, α -galactosidase, Invertase, Mixed culture

2006 年世界大豆产量已达到 2.27 亿吨, 其中一半以上用于提取油脂、大豆异黄酮、大豆皂甙等高附加值产品^[1]。豆粕是大豆工业的主要固态副产物, 棉子糖和水苏糖的含量占其干重的 40%以上; 由于这些糖类不能被动物所消化, 因而较大地降低了豆粕的饲用价值。为了提高可以水解棉子糖和水苏糖的 α -半乳糖苷酶(α -galactosidase, E.C. 3.2.1.22)

和转化糖酶(β -D-fructan fructohydrolase, E.C. 3.2.1.80)的活力, 国内外报道普遍采用固态发酵工艺, 然而固态发酵本身固有的局限性严重地桎梏了该项技术的大规模推广^[2-4]。

本研究首次采用米曲霉和酿酒酵母混合菌株液态发酵工艺, 并通过对混合菌株发酵培养基成分的优化, 使上述水解酶活力得到较大幅度提高, 为液

态产酶工艺提供了新的思路。

1 材料与方法

1.1 菌种

米曲霉 L-09(*Aspergillus oryzae* L-09)和酿酒酵母 Z-06(*Saccharomyces cerevisiae* Z-06)为本实验室分离、诱变并保藏的菌株;两株菌分别采用黄豆汁和麦芽汁琼脂培养基斜面培养^[5], 4°C 保藏, 每月转接 1 次。

1.2 原料

麸皮, 大豆粕粉为市售, 大豆糖浆由山东长润生物有限公司提供, pH 5.56。

1.3 培养基

摇瓶产酶培养基: 大豆糖浆 40 g/L; 豆粕粉 40 g/L; 麸皮 40 g/L; 自然 pH, 0.1 MPa 灭菌 15 min。

1.4 方法

1.4.1 单菌株产酶实验: 1 mL 酿酒酵母种子悬液(10^8 个/mL)接入装有 100 mL 产酶培养基的 500 mL 烧瓶中, 30°C, 摇瓶(140 r/min)培养。

1.4.2 混合菌株发酵实验: 同时将 1 mL 酿酒酵母种子悬液(10^8 个/mL)和 1 mL 米曲霉孢子悬液(10^6 个/mL)接入上述培养基, 培养条件如上。定时取样, 用

pH=5.6 的醋酸缓冲液稀释, 5000 r/min 离心 5 min, 取上清液进行酶活的测定。

1.4.3 检测方法: α -半乳糖苷酶和转化糖酶活力的测量方法依据 Pessoni 等人^[6,7]的报道进行。还原糖的检测: 采用 DNS 法, 使用葡萄糖作为标样绘制 DNS 显色的标准曲线; pH 值: 采用精密酸度计测量; 总糖的测定参照: 采用酸水解法。

2 结果与讨论

2.1 酿酒酵母与米曲霉混合发酵的产酶进程

图 1 比较了单菌株和混合菌株发酵的产酶进程, 在混合菌株发酵工艺中, α -半乳糖苷酶和转化糖酶活力在 60 h 分别达到 53.9 U/mL 和 288.0 U/mL, 比参照(8.6 U/mL 和 36.5 U/mL)分别提高了 6.3 倍和 7.9 倍, 而且产酶时间也从参照的 72 h 缩短到 60 h。进一步研究表明混合菌株发酵液中的残糖浓度在 24 h 已降低到 2 g/L 以下; 然而在参照中, 直至 72 h, 发酵液中的残糖浓度仍然高于 2 g/L。这归于混合菌株发酵中两株菌对营养物质的竞争消耗, 使可发酵性糖始终维持在较低的水平, 从而有效地避免了糖化酶合成的产物抑制现象, 进一步促进了糖化酶的合成^[8,9]。

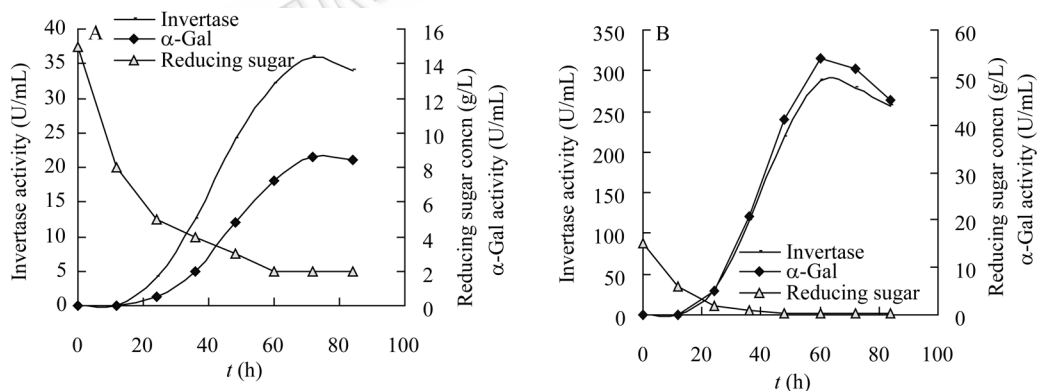


图 1 酿酒酵母产 α -半乳糖苷酶和转化酶的产酶进程

Fig. 1 Time course of α -galactosidase and invertase production by *Saccharomyces cerevisiae*

注: A: 酿酒酵母单菌株; B: 酿酒酵母和米曲霉混合菌株。

Note: A: Single strain of *Saccharomyces cerevisiae*; B: Mixed culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae*.

2.2 不同碳源对产酶的影响

为了进一步提高混合菌株发酵的产酶水平, 本研究首先在以酵母膏(30 g/L)为氮源的条件, 探索了碳源(30 g/L)对混合菌株发酵工艺产酶的影响。表 1 比较和分析了不同碳源, 以及混合碳源对产酶的影响; 在单一碳源中, 棉子糖是最佳的产酶碳源,

这与以前报道的 α 半乳糖苷酶和转化酶是诱导酶相一致^[9]。然而在使用混合碳源时, 以麸皮和大豆糖浆为最佳组合, 这大概是由于麸皮中广泛的营养成分, 同时大豆糖浆中含有较高浓度的棉子糖(约 18%)和水苏糖(约 6%)的缘故。进一步研究表明添加大豆糖浆显著降低了发酵液的 pH, 这大概是由于大豆糖浆

表 1 大豆糖浆作为附加碳源对酿酒酵母和米曲霉混合菌株产 α -半乳糖苷酶和转化酶的影响
Table 1 Effect of soybean sirup as the additional carbon source on the α -galactosidase and invertase production in the mixed culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae*

碳源 Carbon source	α -半乳糖苷酶活力 (U/mL) α -galactosidase activity (U/mL)	转化酶活力 (U/mL) Invertase activity (U/mL)	pH
葡萄糖 Glucose	1.53	9.63	4.05
葡萄糖+糖浆 Glucose + sirup	4.21	26.85	3.76
蔗糖 Sucrose	6.21	80.29	4.13
蔗糖+糖浆 Sucrose + sirup	8.27	126.52	3.62
棉子糖 Raffinose	20.71	265.81	4.21
棉子糖+糖浆 Raffinose + sirup	28.67	325.74	3.45
可溶性淀粉 Soluble starch	5.32	40.41	5.05
可溶性淀粉+糖浆 Soluble starch + sirup	25.65	175.84	4.87
麸皮 Wheat brans	11.50	210.87	5.46
麸皮+糖浆 Wheat brans + sirup	50.35	365.8	5.32

中高 C/N 所致, 然而在以麸皮和大豆糖浆组合培养基中, 发酵液 pH 的降低得到了缓解, 这与以前报道的麸皮缓解发酵液 pH 的降低可以提高糖化酶合成相一致^[11]。

2.3 不同氮源对产酶的影响

图 2 在以麸皮(30 g/L)和大豆糖浆(30 g/L)为碳源的情况下, 比较了不同氮源(30 g/L)对混合菌株产酶的影响, 从图中可以看出有机氮源明显优于无机氮源。在有机氮源中豆饼粉是最佳氮源, 玉米浆次之。这可以归于豆饼粉中适宜的营养成分, 同时含有一定量棉子糖的原因。

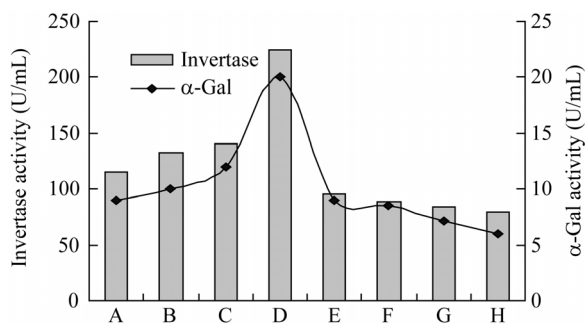


图 2 氮源对酿酒酵母和米曲霉混合菌株产 α -半乳糖苷酶和转化酶的影响

Fig. 2 Effect of nitrogen source on the α -galactosidase and invertase production in the mixed culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae*

注: A: 蛋白胨; B: 酵母膏; C: 玉米浆; D: 豆饼粉; E: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$; F: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; G: NH_4Cl ; H: 尿素。

Note: A: Peptone; B: Yeast extract; C: Corn liquid; D: Soybean flour; E: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$; F: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; G: NH_4Cl ; H: Urea.

2.4 产酶培养基组成的优化

响应面作为一种有效的参数优化方法已被广泛应用于发酵工艺培养条件和成分的实验设计中^[12]。为了进一步提高混合菌株的产酶水平, 本研究采用了 Design-Expert 7.1 软件对其发酵培养基成分进行了优化。研究表明大豆糖浆、麸皮和豆饼粉无论对单菌株还是对混合菌株的产酶都有显著性影响, 故如表 2 和 3 所示, 实验设计选用了三因素五水平的方案分别对单菌株和混合菌株产酶培养基成分进行了优化。

表 4 对响应面的结果进行了回归分析, 可以看出回归模型和三因素对混合菌株发酵产酶的影响都在显著水平。验证实验表明 α -半乳糖苷酶和转化酶在优化的培养基条件下活力分别达到 85.22 U/mL 和 563.44 U/mL, 与单菌株的 14.57 U/mL 和 68.20 U/mL 相比, 两种酶的活力分别被提高了 5.9 倍和 8.3 倍。另一方面, 通过对培养基成分的优化, 混合菌株发酵产两种酶的活力较优化前(53.9 U/mL 和 288.0 U/mL)分别提高了 1.6 倍和 1.9 倍; 单菌株发酵产两种酶的活力也较优化前(8.6 U/mL 和

表 2 响应面实验设计的因素和水平
Table 2 Factors and levels of the designed RSM

因素 Factors	水平 Levels				
	-1.68	-1	0	1	1.68
大豆糖浆 Soybean sirup (X_1 , g/L)	16	50	100	150	184
麸皮 Wheat brans (X_2 , g/L)	0.64	20	40	60	7.36
豆饼粉 Soybean flour (X_3 , g/L)	0.64	20	40	60	7.36

表3 响应面实验的设计和结果
Table 3 Design and results of the RSM experiments

Run	X_1	X_2	X_3	酿酒酵母单菌 Single <i>Saccharomyces cerevisiae</i>		混合菌株 Mixed culture	
				A ^a (U/mL)	I ^b (U/mL)	A ^a (U/mL)	I ^b (U/mL)
				1	0	-1.68	0
2	-1	-1	1	13.54	53.42	64.07	368.55
3	0	1.68	0	12.5	65.92	71.63	432.87
4	1	-1	-1	4.68	39.78	40.43	174.37
5	1	-1	1	9.89	39.78	51.98	228.38
6	1	1	-1	9.89	34.1	54.86	207.62
7	0	0	0	12.5	62.51	72.18	456.77
8	0	0	0	14.58	68.2	80.85	448.57
9	-1	-1	-1	5.21	40.92	44.75	195.38
10	0	0	0	13.54	62.51	83.73	539.83
11	1.68	0	0	5.72	56.83	51.98	244.99
12	0	0	1.68	10.41	68.2	63.57	365.46
13	-1	1	1	14.06	56.83	75.58	476.69
14	0	0	-1.68	4.68	30.68	37.53	220.08
15	-1	1	-1	11.45	32.96	64.11	484.83
16	-1.68	0	0	8.85	48.87	87.15	559.35
17	1	1	1	8.33	65.92	58.09	330.94
OR ^c	-0.50	0.44	0.54	14.57	68.20	-	-
	-0.98	0.53	0.33	-	-	85.22	563.44

注: ^aA: α 半乳糖苷酶; ^bI: 转化酶; ^cOR: 优化结果.

Note: ^aA: α -galactosidase; ^bI: Invertase; ^cOR: Optimized results.

表4 Alpha半乳糖苷酶和转化酶的响应面回归结果
Table 4 Regression results of the α -galactosidase and invertase production using RSM

参数 Parameters	酿酒酵母单菌 Single <i>Saccharomyces cerevisiae</i>				混合菌株 Mixed culture			
	A ^a		I ^b		A ^a		I ^b	
	E ^c	Pr>/T/	E ^c	Pr>/T/	E ^c	Pr>/T/	E ^c	Pr>/T/
Intercept	13.38	0.01*	64.73	0.01*	79.27	0.01*	484.49	0.01*
X_1	-1.22	0.05	0.64	0.74	-7.49	0.01*	-81.51	**
X_2	1.85	0.01*	4.81	0.04*	4.41	0.05	52.51	0.01*
X_3	1.77	0.01*	9.61	**	6.55	0.01*	42.99	0.02*
$X_1 X_2$	-0.39	0.59	3.12	0.25	-1.29	0.61	-32.72	0.15
$X_1 X_3$	-0.91	0.22	-0.56	0.82	-2.01	0.44	1.53	0.94
$X_2 X_3$	-1.56	0.05	5.39	0.06	-2.02	0.43	-14.01	0.51
X_1^2	-1.68	0.02*	-5.17	0.04*	-4.49	0.06	-37.47	0.06
X_2^2	-1.41	0.04*	-5.78	0.02*	-4.69	0.05	-45.91	0.03*
X_3^2	-1.59	0.02*	-6.38	0.01*	-11.24	**	-76.23	0.01*
R^2	0.88		0.88		0.90		0.90	

Note: *: Variables is significant at the 0.05 level; **: $P < 0.001$; ^aA: α -galactosidase; ^bI: Invertase; ^cE: Estimated results.

36.5 U/mL)分别提高了 1.7 倍和 1.8 倍。

由于液态发酵中存在着较强的产物抑制现象,不利于糖化酶的合成,所以近年来固态发酵再次受到酶制剂工业的关注。但由于固态发酵产 α -半乳糖苷酶的生产周期长达 96 h,同时在粉尘污染、酶的萃取和自动化控制等方面存在一系列有待解决的问题,严重桎梏了该项技术的大规模推广^[2-4]。本研究采用了混合菌株发酵工艺,在液态发酵体系中消除了产物抑制现象,所以较大幅度地提高了目的酶生产强度,缩短了生产周期。

3 结论

本研究首次探索了多菌株混合的液态发酵工艺,并对产酶的培养基成分进行了优化。结果表明,酿酒酵母和米曲霉混合发酵可以显著提高 α -半乳糖苷酶和转化糖酶的合成水平,而且大豆糖浆、麸皮和豆饼粉为最佳培养基组成。通过优化, α -半乳糖苷酶和转化糖酶活力分别达到 85.22 U/mL 和 563.44 U/mL,比单菌株的优化结果分别提高了 5.9 倍和 8.3 倍。该项研究为液态发酵生产 α -半乳糖苷酶和转化糖酶提供了新的思路。

参 考 文 献

[1] Collins Keith J, Oilseeds. World agricultural supply and demand estimates. United States Department of Agriculture. 2007, **451**: 27-29.
[2] Shankar SK, Mulimani VH. Alpha-galactosidase production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation. *Biores Technol*, 2007, **98**: 958-961.

[3] Kotiguda G, Kapnoor S, Veerappa H. Degradation of raffinose oligosaccharides in soymilk by immobilized alpha-galactosidase of *Aspergillus oryzae*. *J Microbiol Biotechnol*, 2007, **17**: 1430-1436.
[4] Liu CQ, Chen QH, Tang B, et al. Effect of cultivating conditions on a-galactosidase production by a novel *Aspergillus foetidus* ZU-G1 strain in solid-state fermentation. *Lett Appl Microbiol*, 2007, **45**: 206-212
[5] Shen P, Fan XR, Li GW. Microbiology Experiment. Beijing: High Education Press, 1999, pp.214-227.
[6] Pessoni RAB, Figueiredo-Ribeiro RCI, Braga MR. Extracellular inulinase from *Penicillium janczewskii*, a fungus isolated from the rhizosphere of *Vernonia herbacea*. *Appl Microbiol*, 1999, **87**: 141-147.
[7] Szendefy J, Szakacs G, Christopher L. Potential of solid-state fermentation enzymes of *Aspergillus oryzae* in biobleaching of paper pulp. *Enzyme Microbiol Technol*, 2006, **39**: 1354-1360.
[8] Maldonado MC, Strasser de Saad AM, Callieri D. Catabolite repression of the synthesis of inducible polygalacturonase and pectinesterase by *Aspergillus niger* sp.. *Current Microbiology*, 1989, **18**: 303-306.
[9] Rajoka MI, Yasmeen A. Inunction, and production studies of a novel glucoamylase of *Aspergillus niger*. *World J Microbiol Biotechnol*, 2005, **21**: 179-187.
[10] Zhang WG, Ge XY. Improvement of fructanohydrolase production in *Aspergillus niger* SL-09 by sucrose ester. *Food Technol Biotechnol*, 2006, **44**: 59-64.
[11] Yu XB, Yun YM, Koo HS. Production of cellulase by *Trichoderma reesei* Rut C30 in wheat bran-containing medium. *J Microbiol Biotechnol*, 1998, **8**: 208-213.
[12] Ting XJ, He GQ, Chen QH, et al. Medium optimization for the production of thermal stable glucanase by *Bacillus subtilis* ZJF-1A5 using response surface methodology. *Biores Technol*, 2004, **93**: 175-181.

稿件书写规范

论文中有关正、斜体的约定

物种的学名: 菌株的属名、种名(包括亚种、变种)用拉丁文斜体。属的首字母大写, 其余小写, 属以上用拉丁文正体。病毒一律用正体, 首字母大写。

限制性内切酶: 前 3 个字母用斜体, 后面的字母和编码正体平排, 例如: *Bam*H、*Msp*、*Sau*3A 等。

氨基酸和碱基的缩写: 氨基酸缩写用 3 个字母表示时, 仅第一个字母大写, 其余小写, 正体。碱基缩写为大写正体。

基因符号用小写斜体, 蛋白质符号首字母大写, 用正体。