

指数补料发酵提高鲁氏酵母 β -1, 3-葡聚糖酶产量

谢婷¹, 刘飞¹, 李敏¹, 王志¹, 陈雄¹, 李欣¹, 曾雨雷², 秦万芳³

(1. 工业发酵湖北省协同创新中心, 发酵工程教育部重点实验室, 湖北工业大学生物工程学院, 湖北武汉 430068)

(2. 安琪酵母股份有限公司, 湖北宜昌 443000) (3. 湖北正佳微生物工程股份有限公司, 湖北随州 441300)

摘要: 高耐盐鲁氏酵母 A 菌株 (耐 24% 盐) 10 L 发酵罐产 β -1,3-葡聚糖酶的过程中, 葡萄糖 (YEPD) 是鲁氏酵母 A 生长和产酶的最适碳源, 其发酵效率显著高于甘油 (YEPG) 和乙醇 (YEPE), 而乙酸钠的可利用性较差。YEPD 批培养生长效率 (生物量)、最大酶活力以及酶产率分别比 YEPG 和 YEPE 批培养提高了 1.89% 和 29.88%、114% 和 19.65% 以及 188% 和 33%。与 YEPD 批培养相比, 15~23 h 开始指数流加 YEPF 培养基, 达到最大生物量的周期缩短 12 h, 最大生物量提高 19.29%, 而且 β -1,3 葡聚糖酶几乎以指数增长的方式提前 6 h 合成到最大酶活力 (44.99 U/mL), 酶产率提高了 76.86%, 达到 2.14 U/(mL h), 实现了指数补料发酵的目的。研究结果确定了有效提高鲁氏酵母 A 生物量和 β -1,3-葡聚糖酶产量的指数补料模型, 为高耐盐鲁氏酵母菌株和 β -1,3-葡聚糖酶产品有效生产以及其在高活性酿造功能食品行业的应用打下了基础。

关键词: 鲁氏酵母 A; 指数补料批培养; 耐盐性; β -1,3-葡聚糖酶

文章编号: 1673-9078(2015)6-205-210

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.6.032

Enhancement of β -1,3-glucanase Production in Salt-tolerant *Zygosaccharomyces rouxii* by Exponential Fed-batch

XIE Ting¹, LIU Fei¹, LI Min¹, WANG Zhi¹, CHEN Xiong¹, LI Xin¹, ZENG Yu-lei², QIN Wan-fang³

(1. Hubei Collaborative Innovation Center for Industrial Fermentation, Key Laboratory of Fermentation Engineering (Ministry of Education), College of Bioengineering, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China)

(2. Angel Yeast Co., LTD., Yichang 443000, China)

(3. Hubei Zhengjia Microbe Project and Technology Co., LTD., Suizhou 441300, China)

Abstract: High salt-tolerant *Zygosaccharomyces rouxii* A (tolerant of 24% NaCl) was used to produce β -1,3-Glucanase in 10 L fermenter. Glucose (YEPD) is the optimum carbon source for yeast growth and enzyme production. Fermentation efficiency with YEPD batch culture is significantly higher than that with glycerol (YEPG) and ethanol (YEPE), respectively. Meanwhile, batch culture efficiency with acetate as carbon source was poor. The growth efficiency (biomass), the largest β -1,3-Glucanase and enzyme productivity with YEPD batch cultivation was increased by 1.89% and 29.88%, 114% and 19.65%, 188% and 33% than that with YEPG and YEPE batch culture, respectively. Compared with the YEPD batch cultivation, exponential fed-batch with YEPF medium from 15 to 23 h, the time of maximum biomass was shortened by 12 h and the maximum biomass was increased by 19.29%. Moreover, β -1,3-glucanase was nearly logarithmically synthesized to the largest enzyme activity (44.99 U/mL), the time of synthesis was shortened by 6 h and enzyme productivity was up to 2.14 U/(mL h) that was increased by 76.86%. Exponential fed-batch model for effective enhancement of biomass and β -1,3-glucanase production by *Z. Rouxii* A was confirmed by the results above, which laid the foundations for the effective production of high salt-tolerant *Z. Rouxii* A, β -1,3-glucanase products and the application of them in highly active fermentative function food industry.

Key words: *Zygosaccharomyces rouxii* A; exponential fed-batch; salt-tolerant; β -1,3-glucanase

酵母细胞壁含有丰富的 β -葡聚糖, 其中85%左右为 β -1,3-1,6-葡聚糖, 是维系酵母细胞壁骨架和刚性的主

收稿日期: 2015-03-09

基金项目: 湖北省重大科技专项项目 (2012ACA15)

作者简介: 谢婷 (1987-), 女, 硕士研究生, 主要从事生物能源与发酵工程研究

通讯作者: 王志 (1971-), 男, 副教授, 从事生物工程研究

要物质^[1]。一定分子量的具有三股螺旋结构的酵母 β -1,3-1,6-葡聚糖是具有生物活性的高效生物应答物, 其在促进免疫以及抗肿瘤方面的功效已得到广泛认可^[2], 是一种市场潜力巨大的保健食品, 并可由化学法和酶解法制得^[3]。酸热水解酵母细胞壁制备活性葡聚糖存在水解程度 (分子量和三股螺旋活性结构) 不易控制、环境保护压力大的缺点, 而酶法水解位点专一、效率

高, 制备工艺环境友好, 更符合国家可持续发展战略的要求。

β -葡聚糖酶主要由细菌(芽孢杆菌)、真菌(酵母菌、曲霉、毛霉等)和瘤胃微生物等合成, 并在微生物新陈代谢和形态发生过程中行使着重要功能^[4]。酵母在葡萄糖限制生长状态时能产生 β -1,3-葡聚糖酶^[5]。而且, 使用酵母来源的 β -1,3-葡聚糖酶制备生物活性葡聚糖产品, 因其酶解位点专一性更强、分子量控制效率高、三股螺旋空间结构不易破坏等优势而更能满足市场对活性酵母 β -1,3-1,6-葡聚糖的需求。

近年来, β -葡聚糖酶的研究势头有增无减, 生产方法不断改进, 来源范围不断扩大, 在医药、纺织、饲料、废水处理和日用化工等方面的应用价值正逐渐地显现出来, 其应用前景十分广阔^[6], 特别是在食品发酵工业中的应用。鲁氏酵母作为醇香型的酵母, 在酱醅保温发酵过程中占酵母菌总数的45%^[7], 是提升酱油品质和功能中的重要菌种。酿造行业对高耐盐性鲁氏酵母菌剂产品的需求持续增强, 但是有关鲁氏酵母产 β -1,3-葡聚糖酶研究和生产的报道不多^[8], 因此, 若能在发酵培养鲁氏酵母获得菌剂产品的同时还能高效生产 β -1,3-葡聚糖酶产品以满足上述行业的需求, 无疑会进一步体现出显著的经济效益和社会效益。

指数流加发酵是建立在对物料平衡及反应动力学基础上的常用前置流加控制方法, 使限制性基质的供给与反应器中细胞量随时间的指数增加相适应^[9]。考虑到酵母是在葡萄糖限制生长状态时产生专一性的 β -1,3-葡聚糖酶。因此, 以本实验室筛选的高耐盐鲁氏酵母为发酵菌株, 研究了碳源底物、批发酵、指数补料批培养对鲁氏酵母生物量和 β -1,3-葡聚糖酶产量的影响, 并确定了有效提高鲁氏酵母 A 生物量和 β -1,3-葡聚糖酶产量的指数补料模型, 为高耐盐鲁氏酵母 A 及 β -1,3-葡聚糖酶在高活性酿造功能食品中的应用打下了基础。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器

1.1.1 菌种

鲁氏酵母 A (*Zygosaccharomyces rouxii* A), 耐盐 24%, 由实验室保存。

1.1.2 培养基

YEPD 培养基 (g/L): 酵母浸粉 10、蛋白胨 20、葡萄糖 20。

YEPG 培养基 (g/L): 酵母浸粉 10、蛋白胨 20、甘油 60。

YEPE 培养基 (g/L): 酵母浸粉 10、蛋白胨 20、葡萄糖 5, 灭菌后加入终浓度为 15 g/L 的乙醇。

YEPF 培养基 (g/L): 酵母浸粉 10、蛋白胨 20、葡萄糖 50。

培养基灭菌条件: 115℃, 20 min。

1.1.3 仪器

DELTA 320 pH 计, 梅特勒托利多仪器(上海)有限公司; 立式压力蒸汽灭菌器, 上海博迅实业有限公司医疗设备厂; SGJ-10 L/C 发酵罐, 上海联环生物工程设备有限公司; TG18M 台式高速离心机, 长沙平凡仪器仪表有限公司; HNY-211B 全温振荡培养箱, 天津欧诺仪器仪表有限公司; 冷冻离心机, Eppendorf 5417R 型(德国); DZF-6020 电热鼓风干燥箱, 重庆试验仪器有限公司; UVmini-1240 紫外可见分光光度计, 岛津制作所; 生物传感仪, 山东省生物科学研究院。

1.2 方法

1.2.1 不同碳源对鲁氏酵母 A 发酵生长的影响

鲁氏酵母 A 的新鲜斜面加入 9 mL 无菌生理盐水, 制备菌悬液, 接入不同碳源替代 YEPD 葡萄糖的各发酵摇瓶培养基中, 30℃, 180 r/min, 培养 19 h 后, 测定菌体光密度值, 确定碳源替代对菌体生长的影响。碳源替代设计如表 1 所示:

表 1 不同碳源替代 YEPD 葡萄糖设计

Table 1 The design of carbon source substitution for glucose in

YEPD			
碳源/浓度	碳源 1/浓度	碳源 2/浓度	碳源 3/浓度
葡萄糖/2%	甘油/2%	乙醇/2%	乙酸钠/2%

1.2.2 YEPG 培养基对鲁氏酵母 A 产 β -1,3-葡聚糖酶的影响

YEPG 培养的鲁氏酵母 A 种子液(吸光值为 11.15±0.11), 以 10% 的接种量接入装有 YEPG 发酵培养基的 10 L 发酵罐中(接后体积为 6 L)。控制发酵温度 30℃, 转速 300 r/min, 通气量 1 vvm。周期取样, 测量菌体生物量(干重)、酶活性和 pH, 并采用乙酰丙酮法^[10]测定甘油含量。

1.2.2.1 生物量(干重)测定

取 8 mL 发酵液, 立即于 4℃ 的冷冻离心机, 8000 r/min 离心 10 min, 沉淀放在 105℃ 烘箱中, 烘至恒重, 得菌体干重。

1.2.2.2 酶液的制备

分别取 8 mL 发酵液, 立即于 4℃ 的冷冻离心机, 8000 r/min 离心 10 min, 上清液分别用于葡萄糖测定和作为粗酶液测定酶活力。

1.2.2.3 酶活力样品处理及测定方法

实验组样品处理：取 40 °C 恒温水浴预热 10 min 的 0.10% 的碱不溶性 β -1,3-1,6-葡聚糖（安琪酵母股份有限公司）悬浮液 2 mL 和 40 °C 恒温水浴预热 10 min 的酶液 2 mL，混匀，于 40 °C 恒温水浴反应 15 min（反应 5 min 左右震荡一次）。反应结束后立即沸水浴处理 5 min，后 5000 r/min 离心 10 min。收集上清于 5 mL 的比色管中，再用 pH 为 5.50 的 0.10 mol/L 的乙酸缓冲溶液定容至 5 mL，得实验组样液，用于检测。

对照组样品处理时用 pH 为 5.50 的 0.10 mol/L 的乙酸缓冲溶液代替 0.10% 的 β -1,3-1,6-葡聚糖悬浮液 2 mL，反应结束后立即沸水浴处理 5 min，5000 r/min 离心 10 min 后收集上清用 pH 为 5.50 的 0.10 mol/L 的乙酸缓冲溶液定容至 5 mL，得对照组样液，用于检测。

葡萄糖含量测定采用 3,5-二硝基水杨酸法^[11]。 β -1,3-葡聚糖酶活力单位定义为：在上述测定条件下，每分钟从底物溶液中降解释放 1 μ g 葡萄糖所需要的酶量为 1 个酶活力单位（U）。

1.2.3 YEPE 培养基对鲁氏酵母 A 发酵生产 β -1,3-葡聚糖酶的影响

YEPE 培养的鲁氏酵母 A 种子液（吸光值为 10.95 ± 0.14 ），以 10% 的接种量接入 YEPE 培养基中（接后体积为 6 L）。控制发酵温度 30 °C，转速 300 r/min，通气量 1 vvm。周期取样，测量菌体生物量（干重）、酶活力、pH、葡萄糖含量、乙醇含量（生物传感仪测定）。

酶活力测定：酶液的制备方法同 1.2.2.2，酶活力样品处理及测定方法同 1.2.2.3，其中酶反应底物替换成 0.10% 的水溶性 β -1,3-1,6 葡聚糖（安琪酵母股份有限公司）溶液。

1.2.4 YEPD 培养基对鲁氏酵母 A 发酵生产 β -1,3-葡聚糖酶的影响

YEPD 培养的鲁氏酵母 A 种子液（吸光值为 11.45 ± 0.17 ），以 10% 的接种量接到装有 YEPD 发酵培养基的 10 L 发酵罐中（接后体积为 6 L）。控制发酵温度 30 °C，转速 300 r/min，通气量 1 vvm。周期取样，测量菌体生物量（干重）、酶活力、pH 和葡萄糖含量。

酶活力测定同 1.2.3。

1.2.5 指数流加 YEPF 培养基对鲁氏酵母 A 发酵生产 β -1,3-葡聚糖酶的影响

按 1.2.4 进行批培养，15 h 指数流加 YEPF 培养基，8 h 后停止流加。溶氧与转速偶联控制在 10-20%，周期取样，测量菌体生物量（干重）、酶活力、pH 和葡萄糖含量。

酶活力测定方法同 1.2.3。

简化指数流加模型：

简化指数流加补料速率参考方程（1）进行^[12]：

$$F = \mu(VX)_0 \exp(\mu t) / Y_{x/s}(S_F - S) \quad (1)$$

式中 X 和 S 分别为细胞和底物浓度(g/L)， μ 为比生长速率 (h^{-1})，V 为发酵液体积(L)， S_F 为补加葡萄糖的浓度(g/L)， $Y_{x/s}$ 为细胞对底物（葡萄糖）的得率系数(g/g)， $(VX)_0$ 为培养体系的初始细胞量(g)，t 为流加时间(h)。

式中的有关参数取值见表 2：

表 2 指数流加模型中有关参数设定

Table 2 The parameters in exponential fed-batch model

参数	μ/h^{-1}	$Y_{x/s}/(g/g)$	$S_F/(g/L)$	$S/(g/L)$
设定值	0.14	0.50	50	1

1.3 数据分析

所得实验数据均为最少 3 次平行实验的平均值。

2 结果与分析

2.1 不同碳源对鲁氏酵母 A 发酵生长的影响

酵母在葡萄糖限制生长状态时产生专一性的 β -1,3-葡聚糖酶，考虑到发酵液中的残糖（葡萄糖）可能对以葡萄糖为指标定义 β -1,3-葡聚糖酶活力的测定产生影响，而甘油、乙醇和乙酸盐又是能被酵母利用的常用碳源^[12]。因此，考察了不同碳源替代 YEPD 培养基中的葡萄糖对鲁氏酵母 A 生长的影响。实验结果如图 1 所示：

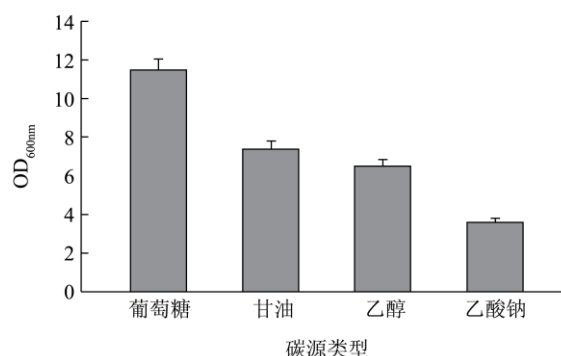


图 1 不同碳源替代 YEPD 葡萄糖对鲁氏酵母 A 菌体生长的影响

Fig.1 Influence of different carbon source substitution for glucose in YEPD on cell growth of *Z. rouxii* A

由图 1 可知：葡萄糖是鲁氏酵母 A 生长的最适碳源，甘油、乙醇和乙酸钠三种替代碳源在相同条件下培养鲁氏酵母 A，菌体光密度值 OD_{600nm} 分别为 7.42、6.52 和 3.62，均低于葡萄糖为碳源时的 11.45。鲁氏酵母 A 以甘油为碳源时，菌体密度分别是以乙醇和乙酸钠为碳源的 1.14 和 2.05 倍。三种替代碳源中甘油是最适碳源，乙醇次之，而乙酸钠的可利用性较差。因此

考察了替代 YEPD 葡萄糖的 YEPG 和 YEPE 培养基批发酵过程对鲁氏酵母 A 生长和产 β -葡聚糖酶的影响。

2.2 YEPG 培养基对鲁氏酵母 A 发酵生长产

β -1,3-葡聚糖酶的影响

YEPG 培养基在 10 L 的发酵罐中发酵培养鲁氏酵母 A, 菌体生长和 β -1,3-葡聚糖酶活力变化如图 2 所示:

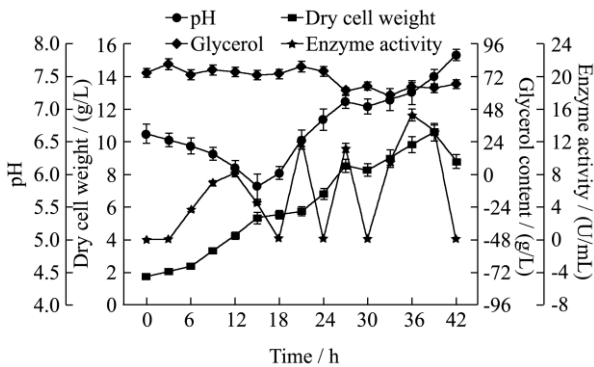


图 2 YEPG 培养基对鲁氏酵母 A 发酵生长和产 β -1, 3-葡聚糖酶的影响

Fig.2 Influence of YEPG on cell growth and β -1,3-gluconase of *Z. rouxii* A

经过近 6 h 的延迟期, 细胞对数生长至 15 h, 后经过 6 h 适应期进入二次生长期至 27 h. 30~39 h 进行三次生长, 最大生物量 10.58 g/L. 伴随着二、三次生长, pH 经历了 2 次明显的回升, 而且期间酶活性在 36 h 达到最大值 (15.28 U/mL) 后大幅反复波动, 酶产率为 0.42 U/mL/h. 可能的原因: 一、结合二三次生长现象, 发酵液中的碳氮源可能不足, β -1,3-葡聚糖酶蛋白被反复合成与降解; 二、由于酶活力定义检测产物为葡萄糖, 因此, 酶活力测定体系中的酵母 β -1,3-葡聚糖悬浊液可能影响了酶催化反应的稳定性. 同时, 由发酵过程的甘油消耗曲线确定乙酰丙酮法测定甘油含量不能满足测定要求。

综上所述, YEPG 培养基发酵培养高耐盐菌株-鲁氏酵母 A 不具备优势: 以葡萄糖定义 β -1,3-葡聚糖酶活性时, 酶活力测定体系的底物应使用水溶性的酵母 β -1,3-葡聚糖。

2.3 YEPE 培养基对鲁氏酵母 A 发酵生长产

β -1,3-葡聚糖酶的影响

基于 2.1 和 2.2 的结果, 考察了 YEPE 培养基对鲁氏酵母 A 发酵生长和产 β -1,3-葡聚糖酶的影响. 实验结果如图 3 所示:

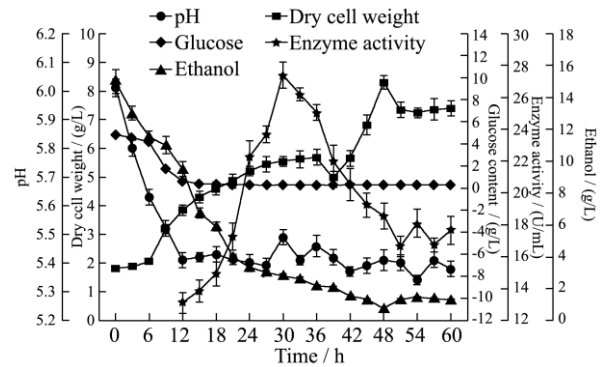


图 3 YEPE 培养基对鲁氏酵母 A 发酵生长和产 β -1, 3-葡聚糖酶的影响

Fig.3 Influence of YEPE on cell growth and β -1,3-gluconase of *Z. rouxii* A

葡萄糖在 12 h 基本耗尽, 同时乙醇也被利用了 5.50 g/L, 12~21 h 乙醇被快速利用至 3.96 g/L, 至 48 h 被缓慢利用至 1 g/L 左右. 经过近 6 h 的延迟期, 细胞进入一次生长至 36 h (生物量为 5.69 g/L), 在 39 h 进入二次生长, 48 h 最大生物量为 8.30 g/L. 同时, 伴随着一次生长, 酶活力迅速增加至 30 h 的最大酶活 (27.38 U/mL), 酶产率为 0.91 U/mL/h. 但是 30~51 h, 随着细胞二次生长, 酶活力迅速下降至 16.63 U/mL. 二次生长时生物量提高了 31.45%, 而过程中的碳源 (乙醇和葡萄糖) 仅有 1.50 g/L 左右, 这是不足以支持二次生长的, 而 β -1,3 葡聚糖酶的降解可以缓解二次生长对碳氮源的需求, 因而 30 h 后酶活性迅速下降。

2.4 YEPD 培养基对鲁氏酵母 A 发酵生长产

β -1,3-葡聚糖酶的影响

YEPD 发酵培养基在发酵过程中对鲁氏酵母 A 菌体生长和 β -1,3-葡聚糖酶活力变化如图 4 所示。

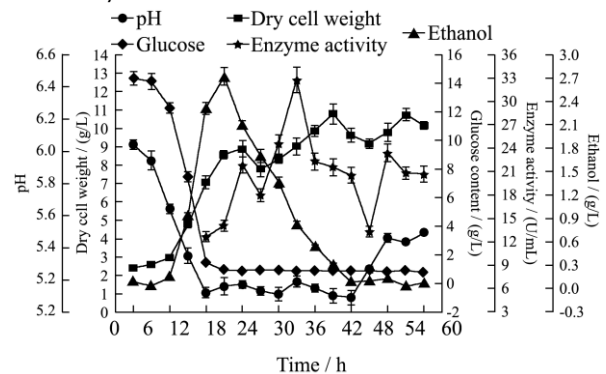


图 4 YEPD 培养基对鲁氏酵母 A 发酵生长和产 β -1, 3-葡聚糖酶的影响

Fig.4 Influence of YEPD on cell growth and β -1,3-gluconase of *Z. rouxii* A

经过近 6 h 的延迟期, 细胞进入了对数生长期,

15 h 的生物量达 8.56 g/L。经过代谢的调整, 于 21 h 开始二次生长至 33 h (生物量为 10.78 g/L)。伴随葡萄糖快速利用并在 12 h 降至 1.41 g/L, pH 也在 12 h 降至最低, 稳定在 5.14 左右至 36 h, 而后随细胞二次自溶而快速回升至 5.46 左右。乙醇浓度随着葡萄糖的利用而快速积累至 15 h 的 2.72 g/L, 并随着细胞的二次生长被迅速利用, 降至 36 h 的 0.08 g/L。同时发现, 伴随细胞的一次生长, β -1,3-葡聚糖酶活力升至 21.83 U/mL (18 h), 并随着乙醇的快速利用以及细胞的二次生长增加至 32.76 U/mL (27 h), 酶产率为 1.21 U/mL/h。这与 Kwang 等的报道^[5]一致: β -1,3-葡聚糖酶在葡萄糖限制条件下合成, 并与生长偶联。

因此, YEPD 发酵批培养鲁氏酵母产 β -1,3-葡聚糖酶周期应控制在 27 h 左右, 若进行补料批发酵, 应考虑在 15~18 h 开始补入。

根据前期发酵罐培养鲁氏酵母 A 所得的实验数据进行动力学计算, 获得部分动力学参数如表 3 所示:

表 3 YEPD 批培养过程发酵动力学参数

Table 3 Fermentation kinetic parameters in batch culture of

YEPD			
参数	μ_{max}/h^{-1}	$Y_{x/s}/(g/g)$	S/(g/L)
计算值	0.18	0.50	1

数据与毕赤酵母的 μ_{max} 和 $Y_{x/s}$ 报道^[12]相近。

2.5 指数流加 YEPF 培养基对鲁氏酵母 A 发酵

生长产 β -1,3-葡聚糖酶的影响

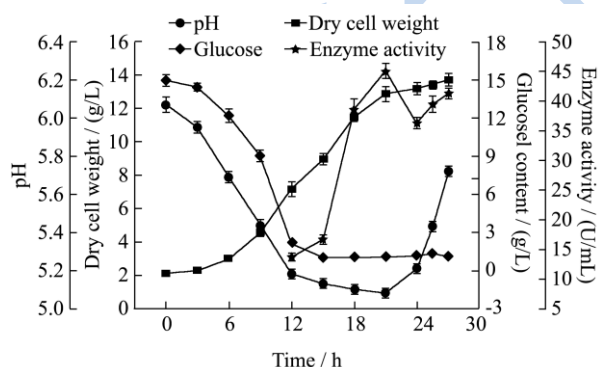


图 5 指数流加 YEPF 培养基对鲁氏酵母 A 发酵生长产 β -1,3-葡聚糖酶的影响

Fig.5 Influence of exponential feeding YEPF on cell growth and β -1,3-glucanase of *Z. rouxii* A

由图 2~4 可知: 最大生物量在 YEPD 批培养中于 33 h 达到, 分别比 YEPG 和 YEPE 批发酵提前了 6 h 和 15 h, 生物量也提高了 1.89% 和 29.88%; 最大酶活性也分别提高了 114% 和 19.65%; YEPD 发酵批培养的 β -1,3-葡聚糖酶产率为 1.21 U/(mL·h), 分别比 YEPG

和 YEPE 批发酵提高了 188% 和 33%, 具有明显的优势, 而且残糖也未对酶活性检测产生影响。因此, 确定 YEPD 培养基作为鲁氏酵母 A 发酵生产 β -1,3-葡聚糖酶的基础培养基。考虑到 β -1,3-葡聚糖酶合成与生长偶联以及酶蛋白合成对氮源的需求, 确定补料培养基用 YEPF 培养基。同时, 指数流加模式比溶氧流加或糖浓度控制流加模式有明显的优势^[12], 因此, 结合表 3 所获得的动力学参数, 考察了发酵培养 15~23 h 指数流加 YEPF 培养基对鲁氏酵母 A 菌体生长和 β -1,3-葡聚糖酶活力的影响。结果如图 5 所示。经过近 6 h 的延迟期, 细胞进入对数生长期, 12 h 生物量为 7.16 g/L, 此时, 葡萄糖几近耗尽 (2.08 g/L), pH 也降至最低值 (5.18), 酶活力为 13.68 U/mL。15~23 h 开始进行指数补料, 细胞维持了对数生长至 21 h (对应最大生物量为 12.86 g/L), 比 YEPD 批培养 33 h 生物量达到 10.78 g/L, 周期缩短了 12 h, 生物量提高了 19.29%。期间, 葡萄糖并没有出现积累情况, 而是迅速被利用, 并维持在 1.00 g/L 左右; pH 维持在 5.10 左右; β -1,3-葡聚糖酶的产率为 2.14 U/mL/h, 几乎是以对数合成的方式提高到 21 h 的最高酶活 (44.99 U/mL), 比 YEPD 批培养 27 h 酶活力至 32.76 U/mL, 周期提前了 6 h, 酶产量提高了 37.33%, 酶产率也提高了 76.86%, 实现了指数补料的目的。但是, 指数流加补料发酵 21 h 后 pH 迅速上升、酶活性快速下降、细胞也进入稳定期不再进行对数生长。指数流加 YEPF 培养基中的葡萄糖浓度需要在下一步研究中继续进行调整和优化。

3 结论

3.1 高耐盐鲁氏酵母 A 菌株发酵产 β -1,3-葡聚糖酶的过程中, 葡萄糖是鲁氏酵母 A 生长和产酶的最适碳源 (YEPD 培养基), 其发酵效率显著高于甘油 (YEPG) 和乙醇 (YEPE) 碳源, 而乙酸钠的可利用性较差。YEPD 批培养生长效率 (生物量) 比 YEPG 和 YEPE 批培养提高了 1.89% 和 29.88%; 最大酶活性也分别提高了 114% 和 19.65%。 β -1,3-葡聚糖酶产率为 1.21 U/mL/h, 分别比 YEPG 和 YEPE 批发酵提高了 188% 和 33%。与 YEPD 批培养相比, 15~23 h 开始指数流加 YEPF 培养基, 达到最大生物量的周期缩短 12 h, 最大生物量提高 19.29%, 而且 β -1,3-葡聚糖酶几乎以对数增长的方式提前 6 h 合成到最大酶活力 (44.99 U/mL), 酶产率为 2.14 U/mL/h, 也提高了 76.86%, 实现了指数补料发酵的目的。

3.2 研究结果确定了有效提高鲁氏酵母生物量和 β -1,3-葡聚糖酶产量的指数补料模型, 为高耐盐鲁氏酵

母菌剂和 β -1,3-葡聚糖酶产品有效生产以及在高活性酿造功能食品行业的应用打下了基础。

参考文献

- [1] Qin F, Aachmann FL, Christensen BE. Chain length distribution and aggregation of branched (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans from *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 90: 1092-1099
- [2] Qin F, Sletmoen M, Stokke BT, et al.. Higher order structures of a bioactive, water-soluble (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans derived from *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 92: 1026-1032
- [3] 田春华,竹磊,朱海华,等.啤酒酵母泥中酵母多糖提取工艺研究[J].江西农业学报,2010,22(7):103-104
TIAN Chun-hua, ZHU Lei, ZHU Hai-hua. Extraction and determination of zymosan from beer yeast cell wall [J]. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2010, 22(7): 103-104
- [4] 王致鹏.汉逊德巴利酵母WC43-3菌株内切 β -1,3-葡聚糖酶及其基因的研究[D].青岛:中国海洋大学,2011
WANG Zhi-peng. The studies on endo- β -1,3-glucanase and the coding gene from *Debaryomyces hansenii* WC43-3 [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2011
- [5] Kwang SK, Yun HS. Production of soluble β -glucan from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 39: 496-500
- [6] 张洁,蔡敬民,吴克,等. β -葡聚糖酶的研究与应用前景[J].安徽农业科学,2003,31(5):895-896
ZHANG Jie, CAI Jing-min, WU Ke, et al. Research and Application Prospect of β -Glucanase [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2003, 31(5): 895-896
- [7] Aoki T, Uchida K. Enhanced formation of 2-phenylethanol in *Zygosaccharomyces rouxii* due to prephenate dehydrogenase deficiency [J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1990, 54(1): 273-274
- [8] 王志,谢婷,刘飞,等.产 β -葡聚糖酶耐盐鲁氏酵母的筛选及鉴定[J].现代食品科技,2015,31(1):120-125
WANG Zhi, XIE Ting, LIU Fei, et al. Identification and screening of β -glucanase-producing salt-tolerant *Zygosaccharomyces rouxii* [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2015, 31(1): 120-125
- [9] Ramalingam S, Gautam P, Mukherjee KJ, et al. Effects of post-induction feed strategies on secretory production of recombinant streptokinase in *Escherichia coli* [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2007, 33: 34-41
- [10] 杨梅桂,陈云锋,周秀娟.乙酰丙酮分光光度法测定水中微量甘油[J].中国卫生检验杂志,2013,23(6):1408-1409
YANG Mei-gui, CHEN Yu-feng, ZHOU Xiu-juan. Determination of trace glycerol in water by acetylacetone spectrophotometric method [J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2013, 23(6):1408-1409
- [11] 俞俊棠,唐孝宜.生物工艺学[M].上海:华东理工大学出版社,2005
YU Jun-tang, TANG Xiao-yi. *Biotechnology* [M]. Shanghai: East China University of Science and Technology press, 2005
- [12] Wang Y, Wang ZH, Du GC, et al.. Enhancement of alkaline polygalacturonate lyase production in recombinant *Pichia pastoris* according to the ratio of methanol to cell concentration [J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100: 1343-1349