

黑曲霉 H9-30 全细胞催化合成低聚异麦芽糖

黄楠^{1,2}, 周波^{1,2}, 叶童^{1,2}, 陈桂光^{1,2}, 梁智群^{1,2}, 曾伟^{1,2*}

1(亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室(广西大学), 广西 南宁, 530004)

2(广西大学 生命科学与技术学院, 广西 南宁, 530004)

摘要 以黑曲霉 H9-30 全细胞为催化剂转化麦芽糖生产低聚异麦芽糖, 通过单因素实验确定其摇瓶最佳转化条件为: 温度 48 ℃, 初始 pH 值 4.2, 麦芽糖质量浓度为 600 g/L, 黑曲霉细胞添加量为 15 g/L。此条件下, 有效三糖(异麦芽糖、潘糖和异麦芽三糖)占总糖质量分数的 50.5%, 总低聚异麦芽糖含量为 63.3%, 达到低聚异麦芽糖工业生产标准。研究结果表明, 利用黑曲霉全细胞催化生产低聚异麦芽糖具有较好的操作稳定性, 生产 IMO-50 的半衰期达到 20 批次(10 d), 有望应用于工业化生产低聚异麦芽糖。

关键词 低聚异麦芽糖; 全细胞催化; 黑曲霉

低聚异麦芽糖(isomaltooligosaccharides, IMO)是一类由 α -1,6 糖苷键连接葡萄糖基形成的功能性低聚糖^[1-2]。IMO 可促进短链脂肪酸产生, 降低肠道内 pH 值以减少致病菌, 还能促进结肠中双歧杆菌和乳酸杆菌群的增殖, 抑制肠道病原体的生长^[3-4]。在食品中添加 IMO 能防止淀粉老化, 延长食品的保质期^[5]。作为益生元和膳食纤维的 IMO 具有热值低、促益菌、防龋齿、稳定性高等优点, 现被广泛用于食品行业。

IMO 起初作为一种淀粉酶解的副产物, 发现于葡萄糖生产过程中。生产 IMO 的传统方法有 2 种: (1)由 α -淀粉酶(EC 3.2.1.1)、 β -淀粉酶(EC 3.2.1.2)和 α -葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.20)协同转化生成^[6-7]; (2)由 α -葡萄糖苷酶与新普鲁兰酶(EC 3.2.1.135)协同转化生成^[8]。使用游离酶生产低聚异麦芽糖成本高且生产过程繁琐。目前国内外相关领域的研究主要集中在高产 α -葡萄糖苷酶新菌株的选育^[9-10]、新型 α -葡萄糖苷酶的分离纯化及其酶学性质研究^[11-13]、固定化细胞和固定化酶^[14-15]等方面。然而, IMO 的工业化生产仍面临成本高, 转化时间长, 转化率低等问题^[16]。因此, 有必要寻找一种低耗、高效的方法生产 IMO。

全细胞催化是一种利用完整生物体作为催化剂进行生物转化的方法, 其因制备简单、生产成本低和

催化效率高等优点, 被广泛应用于各类产物的合成, 如蔗果低聚糖^[17]、茶多酚^[18]、阿糖腺苷^[19]等。OJHA 等^[20]利用微杆菌(*Microbacterium* sp.)全细胞转化麦芽糖合成 IMO, 其 IMO 转化率达到 58%, 取得较好成果, 但其菌体无法回收利用; 徐燕杉^[21]以黑曲霉(*Aspergillus niger*) α -葡萄糖苷酶在毕赤酵母(*Pichia pastoris*)的表面展示, 催化合成 IMO, 其初始 IMO 转化率为 45%, 但重复利用 3 次后转化率降低至 30%。黑曲霉作为一种丝状真菌有产酶能力强, 菌体便于回收等特点, 是用于全细胞转化生产 IMO 的理想菌种。开展这一方向的研究工作, 有利于进一步降低商品 IMO 的生产成本和增加 IMO 的工业生产效率。

实验室在前期工作中通过复合诱变选育得到 1 株产 α -葡萄糖苷酶的黑曲霉菌株 H9-30, 其菌体转苷活力达 24 000 U/g。本文以黑曲霉 H9-30 全细胞作为生物催化剂, 以麦芽糖作为反应底物, 探究转化合成 IMO 的最优条件, 并重复利用黑曲霉细胞生产 IMO, 以期为其工业化应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株

黑曲霉 H9-30, 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) GXJ-1: 保藏于广西大学生命科学与技术学院食品发酵工程实验室。

1.1.2 试剂

葡萄糖、麦芽糖、异麦芽糖、麦芽三糖、潘糖、异麦芽三糖标准品: 美国 Sigma-Aldrich 公司。

第一作者: 硕士研究生(曾伟副研究员为通讯作者, E-mail: zengwei1987@gxu.edu.cn)。

基金项目: 国家自然科学基金(31560448); 广西自然科学基金(2016GXNSFAA380130)

收稿日期: 2018-12-12, 改回日期: 2019-02-28

1.1.3 培养基

斜面培养基(g/L):麸皮汁 30,麦芽糖 30,琼脂 20,pH 5.0。麸皮种子培养基:麸皮 8 g,蒸馏水 4 mL,自然 pH。发酵培养基(g/L):玉米淀粉 80,玉米浆干粉 40,醋酸钙 0.8,甲基-葡萄糖胺 0.1,pH 4.8。酵母培养基(g/L):麦芽糖 10,胰蛋白胨 5,酵母粉 5。培养基于 115 ℃灭菌 30 min。

1.2 仪器与设备

LC-10AT 型高效液相色谱仪,日本岛津公司;SW-CJ-1F 超净工作台,苏州安泰空气技术公司;METTLER TOLEDO PL303 精密电子天平,德国 METTLER 公司;SKY-211B 振荡培养箱、SKY-110WX 恒温水浴摇床、SKJH-1109 超净工作台,上海苏坤公司。

1.3 实验方法

1.3.1 黑曲霉细胞的培养与收集

取培养 60 h 长满成熟孢子的种子,用无菌的生理盐水将孢子洗下,以 6 层纱布将其过滤至含有玻璃珠的 250 mL 三角瓶中,得到孢子悬液。悬液在 34 ℃,220 r/min 下振荡 30 min 将孢子打散。以血球计数板法计算孢子数量,并将孢子悬液浓度调至 1×10^7 个/mL。将浓度为 1×10^7 个/mL 的孢子悬液以体积分数 1% 接种至含 50 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中,在 34 ℃,220 r/min 的振荡培养箱中培养 42 h。将发酵液抽滤,以 10 倍体积的去离子水冲洗 3 次后收集细胞。

1.3.2 黑曲霉细胞的预处理

黑曲霉细胞菌体在 2 g/L 麦芽糖的 NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲液(20 mmol/L,pH 6.0)中重悬,在 52 ℃下保温 30 min 致死细胞。以 10 倍体积的去离子水冲洗致死后的黑曲霉细胞,重复冲洗 3 次后于 40 ℃恒温干燥箱放至恒重。

1.3.3 IMO 的转化参数

1.3.3.1 温度对全细胞转化合成 IMO 的影响

将黑曲霉细胞 α -葡萄糖苷酶与底物于 37、42、45、48、50、52、55、60、70 ℃ 分别保温 30 min 后混匀,整个体系于 pH 6.0 的 Britton-Robison 缓冲液(20 mmol/L)中反应。以 300 g/L 的麦芽糖为底物检测不同温度下 α -葡萄糖苷酶的转苷活力,考察黑曲霉细胞 α -葡萄糖苷酶的最适转苷温度。将黑曲霉细胞于 45、48、50、52 ℃ 保温 24 h,考察黑曲霉细胞 α -葡萄糖苷酶的热稳定性。

1.3.3.2 反应初始 pH 值对全细胞转化合成 IMO 的影响

将黑曲霉细胞 α -葡萄糖苷酶与底物溶于 pH 值为 3.0、4.0、4.2、4.5、5.0、5.5、6.0、7.0、8.0、9.0 的 Britton-Robison 缓冲液,测定在不同 pH 值下 α -葡萄糖苷酶转苷活力,考察最适初始转苷 pH 值。将 α -葡萄糖苷酶与底物溶于 pH 值为 4.0、4.2、4.5 的 Britton-Robison 缓冲液,在最适反应温度下保温 24 h,混合体系于 37 ℃测定酶的保留活力。

1.3.3.3 底物浓度对全细胞转化合成 IMO 的影响

将黑曲霉细胞添加至含麦芽糖 100、200、300、400、500、600、800 g/L 的 Britton-Robison 缓冲液中,在最适温度和 pH 值下转化生成 IMO,考察底物浓度对全细胞转化合成 IMO 的影响。

1.3.3.4 黑曲霉细胞添加量对 IMO 合成的影响

将黑曲霉细胞以 5、10、15、20 g/L 添加至含有 100 mL 最适转化浓度麦芽糖浆的 250 mL 三角瓶中,以最适温度和 pH 值下转化底物。跟踪转苷反应,考察黑曲霉细胞添加量对 IMO 合成的影响。

1.3.4 IMO 的全细胞转化及纯化

将黑曲霉细胞添加至麦芽糖浆中,在最适转苷温度与 pH 值下反应,得到 IMO 与可发酵性糖(葡萄糖、麦芽糖等)的混合液。以酿酒酵母消耗混合液中的可发酵性糖^[22],得到纯化的 IMO。

1.3.5 α -葡萄糖苷酶转苷活力的测定

1.3.5.1 α -葡萄糖苷酶转苷活力的定义

在 37 ℃、pH 4.2,300 g/L 麦芽糖条件下,每小时转化麦芽糖生成 1 μg 有效三糖(eIMO,包括异麦芽糖、潘糖和异麦芽三糖)所对应的酶量定义为 1 个酶活力单位(U)。

1.3.5.2 菌丝体 α -葡萄糖苷酶转苷活力的测定方法

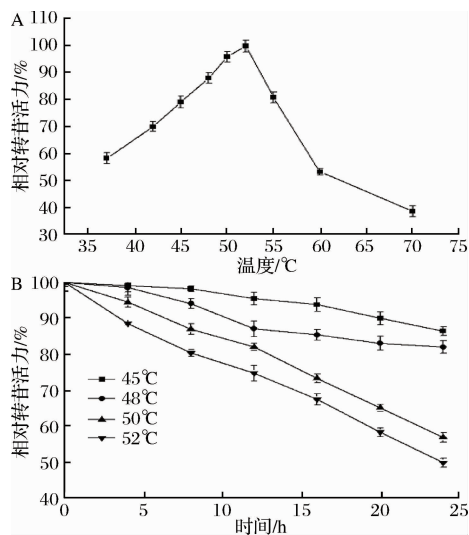
取黑曲霉细胞 0.03 g 于 10 mL EP 管中,加入 5 mL 以 pH 4.2,20 mmol/L 的醋酸-醋酸钠缓冲液配制的 300 g/L 麦芽糖溶液,混匀,37 ℃水浴 1 h。沸水浴 10 min 终止转苷反应。使用配有 Ecosil NH_2 柱(5 μm , 4.6 mm \times 250 mm)和 Waters Sugar-Pak 1 柱(10 μm , 6.5 mm \times 300 mm)的色谱系统,以 HPLC 分析 eIMO,以确定转苷活力。色谱条件参照 GB/T 20881—2007,《低聚异麦芽糖》强制性国家标准中的检测方法。

2 结果与分析

2.1 温度对黑曲霉细胞转苷反应的影响

反应温度影响细胞中 α -葡萄糖苷酶的活力和稳定性。由图 1-A 可知,黑曲霉细胞中的 α -葡萄糖苷

酶在 52 ℃ 转苷活力达到最大,且在 45 ~ 55 ℃ 的转苷活力为最高活力的 80% 以上。由图 1-B 可见,反应体系的温度对 α -葡萄糖苷酶的稳定性影响较大。在 48 ℃ 的 α -葡萄糖苷酶稳定性明显高于 50 ℃。这是由于 α -葡萄糖苷酶随着温度的升高,酶逐渐失活造成^[16]。虽然细胞中 α -葡萄糖苷酶在 52 ℃ 表现出最大转苷活力,但其稳定性远低于 48 ℃。反应温度越低, α -葡萄糖苷酶的稳定性越高,但过低的转化温度会导致转化时间延长。在实际应用中,若反应温度低于 48 ℃,反应过程中的杂菌污染情况严重,因此本研究选择反应温度为 48 ℃。



A-温度对黑曲霉细胞 α -葡萄糖苷酶转苷活力的影响;
B-温度对黑曲霉细胞 α -葡萄糖苷酶稳定性的影响

图 1 温度对黑曲霉细胞 α -葡萄糖苷酶转苷反应的影响

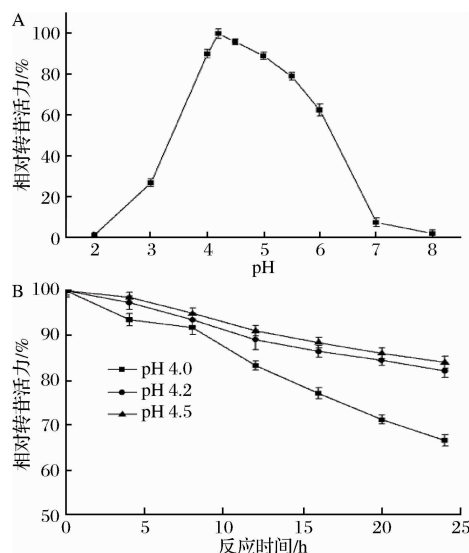
Fig. 1 Effect of temperature on α -glucosidase transglycosylation of *A. niger* cells

2.2 初始 pH 值对黑曲霉细胞转苷反应的影响

由图 2-A 可知,在弱酸性环境中 α -葡萄糖苷酶的转苷活力较强,这与固定化后的转移葡萄糖苷酶性质相似^[23]。黑曲霉细胞 α -葡萄糖苷酶的最适转苷初始 pH 值为 4.2,细胞中 α -葡萄糖苷酶的转苷活力在 pH 值 4.0 ~ 5.0 保持较高值(大于 80%)。然而,当反应体系 pH 值为 4.0 时, α -葡萄糖苷酶的相对转苷活力随着保温时间的增加急剧下降(图 2-B)。这是由于酶在超过耐酸阈值后逐渐变性失活所致。为保证较高的转化效率和反应中酶的稳定性,本研究选择初始 pH 值为 4.2。

2.3 麦芽糖浓度对黑曲霉细胞转苷反应的影响

底物浓度通过改变酶的区域选择性影响转苷反应^[24]。 α -葡萄糖苷酶在底物浓度远高于酶浓度时,



A-初始 pH 值对黑曲霉细胞 α -葡萄糖苷酶转苷活力的影响;

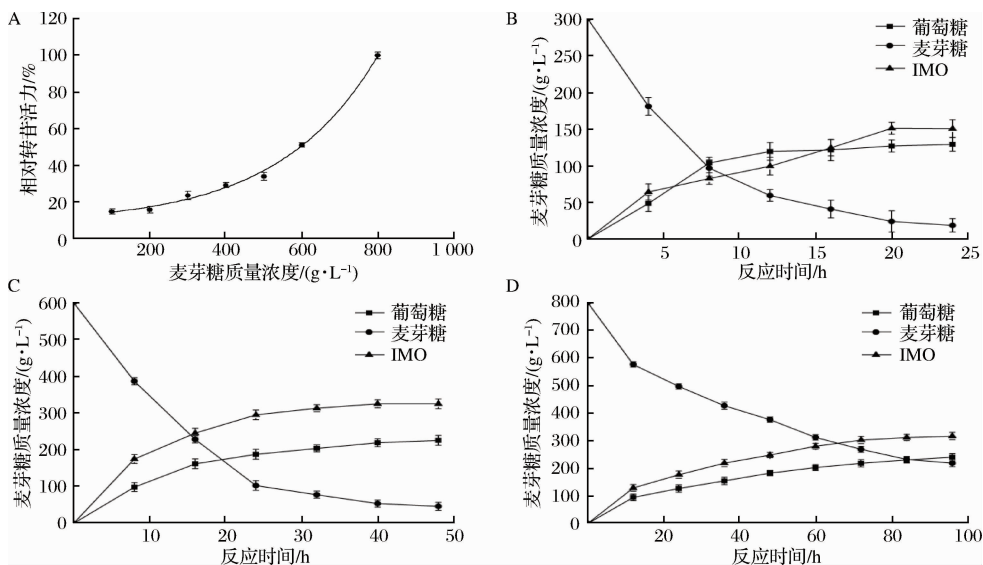
B-初始 pH 值对黑曲霉细胞 α -葡萄糖苷酶稳定性的影响

图 2 初始 pH 值对黑曲霉细胞 α -葡萄糖苷酶转苷反应的影响

Fig. 2 Effect of initial pH value on α -glucosidase transglycosylation of *A. niger* cells

酶作用于底物非还原端的 1,4-糖苷键,并将切下的活性糖基供体转移至糖基受体形成新的 1,6-糖苷键,从而表现出转糖苷活性^[25]。实验在 48 ℃ 和 pH 值为 4.2 的条件下,探究了麦芽糖质量浓度(200 ~ 1 000 g/L)对菌丝体转苷反应的影响。由图 3-A 可知,反应体系中麦芽糖质量浓度对菌丝体中 α -葡萄糖苷酶的转苷活力影响显著。在实验浓度范围内, α -葡萄糖苷酶转苷活力随底物浓度增加呈指数增长($y = 4.221\exp(x/25.981) + 8.211$, $R^2 = 0.996$),这意味着单位时间底物的转化速率大大增加。OJHA 等^[20]曾报道 α -葡萄糖苷酶在高底物浓度下表现出强烈的转苷作用,VETERE 等^[24]曾通过调节底物浓度改变酶的区域选择性影响转苷反应,但 α -葡萄糖苷酶转苷活力随底物浓度上升呈指数型升高尚属首次报道。

然而,较高的转苷活力并未使底物转化率显著提升。向麦芽糖浓度为 300、600、800 g/L 的反应体系中添加等量的黑曲霉细胞,反应终点的 eIMO 含量分别为 154.3 g/L(图 3-B)、312.2 g/L(图 3-C)、316.8 g/L(图 3-D)。反应初期(0 ~ 10 h),eIMO 的产生速率随麦芽糖质量浓度升高而加快。但这种转苷速率提升的现象随反应时间的延长逐渐消失。麦芽糖质量浓度为 800 g/L 时,eIMO 在 84 h 达到最大值,远高于 300 g/L 麦芽糖下达到最大 eIMO 所需时间(20 h)。



A-麦芽糖浓度对黑曲霉细胞 α -葡萄糖苷酶转苷活力的影响;B-麦芽糖浓度对 eIMO 合成的影响

图3 麦芽糖浓度对黑曲霉细胞 α -葡萄糖苷酶转苷反应的影响

Fig. 3 Effect of the concentration of maltose on transglycosylation of *A. niger* α -glucosidase

这是由于在反应过程中,反应体系的组分改变引起 pH 值降低, α -葡萄糖苷酶逐渐失活所致。在麦芽糖质量浓度大于 600 g/L 时形成的高渗透压下,反应体系的微生物污染率低,有利于工业化生产。而过高的麦芽糖质量浓度使低浓度缓冲体系无法在反应过程中维持酸碱平衡,较高的缓冲液质量浓度对产品品质不利。由此,本研究选择麦芽糖质量浓度为 600 g/L 进行反应。

2.4 黑曲霉细胞添加量对转苷反应的影响

由图 4 可知,eIMO 合成速率随黑曲霉细胞添加量的增加而上升。

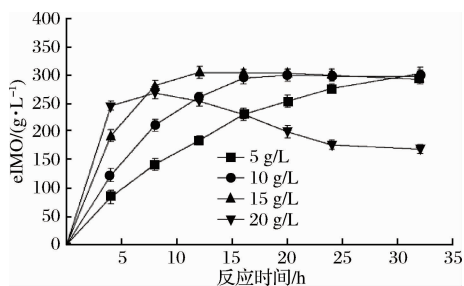


图4 黑曲霉细胞添加量对转苷反应的影响

Fig. 4 Effect of *A. niger* cell content on transglycosylation in the reaction system

eIMO 产率在细胞添加量为 5 ~ 15 g/L 时保持稳定,占总糖质量分数的 $(50.5 \pm 0.8)\%$ 。在细胞添加量为 20 g/L 时,eIMO 的合成峰值质量浓度为 268.9 g/L,低于低质量浓度黑曲霉细胞添加量的合成水平。反

应在 8 h 后,eIMO 质量浓度明显下降。这可能是由于体系中 α -葡萄糖苷酶含量过多导致反应向水解方向倾斜^[25]。为了保证 IMO 的合成速率与转化率,维持反应体系中 IMO 稳定,本研究选择黑曲霉细胞添加量 15 g/L 进行反应。

2.5 利用黑曲霉全细胞转化麦芽糖生产 IMO

当 α -葡萄糖苷酶表现出转糖苷活性且反应体系中存在短链寡糖(葡萄糖聚合度为 2 ~ 6)时,活化的糖基供体有几率与寡糖连接形成异麦芽糖结构,由此产生 IMO^[1, 26]。实验在 48 °C 下,pH 值为 4.2 的含 600 g/L 麦芽糖的醋酸-醋酸钠缓冲液(20 mmol/L)中,每批次 12 h 转化麦芽糖生产 IMO。由图 5 可知,eIMO 含量随反应批次的增加而下降,这可能是由于 α -葡萄糖苷酶在反应体系中逐渐变性失活所致^[26]。

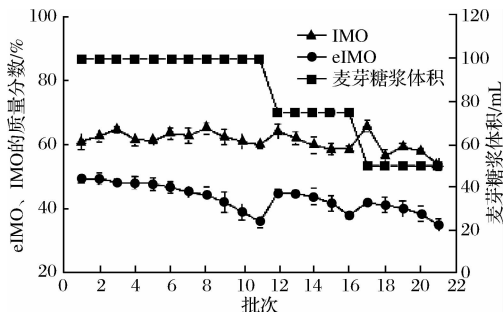


图5 黑曲霉全细胞转化麦芽糖生产 IMO

Fig. 5 Synthesis of IMO by whole-cell catalysis of *A. niger*

转化反应在 21 批时,将所添加糖浆减少为初始的一半,eIMO 质量分数仍无法大于 35% (以 IMO-50 标

准),由此确定此条件下,黑曲霉菌丝体生产 IMO-50 的半衰期为 20 批次(10 d)。菌丝体生产 IMO 的操作稳定性强,实验中 IMO 的组分稳定,第 1 批与第 20 批相比,总 IMO 含量仅下降 1.3%,葡萄糖含量低于 38%,符合 IMO-50 的工业生产标准。从表 1 可见,以黑曲霉 H9-30 细胞 α -葡萄糖苷酶转化麦芽糖产物主要为潘糖和异麦芽糖。第 20 批的转化产物的酵母耗糖结果显示,纯化后的 IMO 达到总糖含量的 93.8%,eIMO 的质量分数为总糖的 67.8%,高于 IMO-90 生产标准,为全细胞催化合成 IMO 提供了新的参考。

表 1 第 20 批黑曲霉细胞转化及酵母纯化的 IMO 组成成分

Table 1 Composition of IMO from the 20th batch of whole-cell transformation and yeast purification

组成成分	麦芽糖浆/%	全细胞转化合成 IMO/%	酵母纯化 IMO/%
葡萄糖	0.09	36.82	0.77
麦芽糖	99.91	7.22	2.24
异麦芽糖	0.00	19.82	35.76
麦芽三糖	0.00	4.29	3.15
潘糖	0.00	13.87	23.58
异麦芽三糖	0.00	4.73	8.48
四糖及其以上低聚糖	0.00	14.25	26.02
eIMO	0.00	38.42	67.83
总 IMO	0.00	58.55	93.84

3 结论

本文对黑曲霉 H9-30 细胞 α -葡萄糖苷酶转化麦芽糖生产 IMO 进行研究。通过对反应温度、初始 pH 值、底物质量浓度、细胞添加量对 α -葡萄糖苷酶转苷反应影响的探究,确定了反应最佳条件为:反应温度 48℃,初始 pH 值 4.2,麦芽糖质量浓度为 600 g/L,黑曲霉细胞添加量为 15 g/L。此条件下,eIMO 占总糖质量分数的 50.5%,总 IMO 含量达到 63.3%,葡萄糖含量小于 38%,符合工业生产 IMO 标准。黑曲霉细胞 α -葡萄糖苷酶转化 IMO 具有较好的操作稳定性,生产 IMO-50 的半衰期为 20 批次(10 d),第 20 批所产 IMO 经酵母耗糖纯化后仍高于 IMO-90 生产标准,有望应用于工业化生产 IMO。

参 考 文 献

[1] SEO S H, CHOI K H, HWANG S, et al. Characterization of the catalytic and kinetic properties of a thermostable *Thermoplasma acidophilum* α -glucosidase and its transglucosylation reaction with arbutin[J]. Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic, 2011,72(3-4):305-312.

[2] CHEN R. Enzyme and microbial technology for synthesis of bioactive oligosaccharides: An update[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2018,102(7):3 017-3 026.

[3] YAN Q J, HAN P, YANG S Q, et al. Purification and characterization of a novel α -glucosidase from *Malbranchea cinnamomea*[J]. Biotechnology Letters, 2015, 37(6): 1 279-1 286.

[4] MADSEN L R, STANLEY S, SWANN P, et al. A survey of commercially available isomaltooligosaccharide-based food ingredients[J]. Journal of Food Science, 2017, 82(2):401-408.

[5] 陈桂光,李玮,齐辉连,等. 黑曲霉低聚异麦芽糖高产菌株的诱变选育[J]. 食品工业科技, 2011(8): 185-187.

[6] SORNDECH W, SAGNELLI D, BLENNOW A, et al. Combination of amylase and transferase catalysis to improve IMO compositions and productivity[J]. LWT-Food Science and Technology, 2017,79:479-486.

[7] RUDEEKULTHAMRONG P, SAWASDEE K, KAULPI-BOON J, et al. Production of long-chain isomaltooligosaccharides from maltotriose using the thermostable amylomaltase and transglucosidase enzymes[J]. Biotechnology & Bioprocess Engineering, 2013,18(4):778-786.

[8] PAN Y C, LEE W C. Production of high-purity isomaltooligosaccharides syrup by the enzymatic conversion of transglucosidase and fermentation of yeast cells[J]. Biotechnology & Bioengineering, 2010,89(7):797-804.

[9] 吴孔阳,齐宗献,黄桂华,等. 一株产 α -葡萄糖苷酶菌株的鉴定和选育[J]. 食品研究与开发, 2012,33(12): 145-149.

[10] CHEN G G, LI W, ZHANG Y K, et al. A high-throughput method for screening of *Aspergillus niger* mutants with high transglycosylation activity by detecting non-fermentable reducing sugar[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2011,27(6):1 519-1 523.

[11] MA M, OKUYAMA M, SATO M, et al. Effects of mutation of Asn694 in *Aspergillus niger* α -glucosidase on hydrolysis and transglucosylation[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2017,101(16):6 399-6 408.

[12] KOBAYASHI I, TOKUDA M H, HASHIMOTO H, et al. Purification and characterization of a new type of alpha-glucosidase from *Paecilomyces lilacinus* that has transglucosylation activity to produce alpha-1,3- and alpha-1,2-linked oligosaccharides[J]. Bioscience Biotechnology & Biochemistry, 2003,67(1):29-35.

[13] YAMASAKI Y, SUZUKI Y, OZAWA J. Three forms of α -glucosidase and a glucoamylase from *Aspergillus awamo-*

- ri[J]. Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, 1977,41(11):2 149 – 2 161.
- [14] ZHANG L, SU Y L, ZHENG Y, et al. Sandwich-structured enzyme membrane reactor for efficient conversion of maltose into isomaltooligosaccharides [J]. Bioresource Technology, 2010,101(23):9 144 – 9 149.
- [15] HUANG Z, LI Z, SU Y, et al. Continuous production of isomalto-oligosaccharides by thermo-inactivated cells of *Aspergillus niger* J2 with coarse perlite as an immobilizing material[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2018,185(4):1 088 – 1 099.
- [16] BASU A, MUTTURI S, PRAPULLA S G. Production of isomaltooligosaccharides (IMO) using simultaneous saccharification and transglucosylation from starch and sustainable sources [J]. Process Biochemistry, 2016, 51(10):1 464 – 1 471.
- [17] 周康, 刘冬梅, 范梦珂, 等. *Aspergillus niger* CGMCC No.6640 全细胞生物转化制备蔗果低聚糖[J]. 现代食品科技, 2013,29(8):1 967 – 1 972.
- [18] 章爱媛. 黑曲霉 RAF106 全细胞生物转化茶多酚的研究[D]. 广州:华南农业大学, 2016.
- [19] 刘国生, 邢善涛, 王建琨, 等. 埃希菌全细胞转化阿糖尿苷合成阿糖腺苷[J]. 中国医药工业杂志, 2010,41(6):416 – 419.
- [20] OJHA S, MISHRA S, CHAND S. Production of isomalto-oligosaccharides by cell bound α -glucosidase of *Microbac-*
- terium* sp. [J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 60(1):486 – 494.
- [21] 徐燕杉. 黑曲霉 α -葡萄糖苷酶在毕赤酵母的表面展示及催化合成低聚异麦芽糖的研究[D]. 广州:华南理工大学, 2017.
- [22] CHEN G G, LI W, ZHANG Y K, et al. A high-throughput method for screening of *Aspergillus niger* mutants with high transglycosylation activity by detecting non-fermentable reducing sugar[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2011,27(6):1 519 – 1 523.
- [23] 岳振峰, 彭志英. 固定化酶法生产低聚异麦芽糖的研究[J]. 食品与发酵工业, 2002,28(3):6 – 9.
- [24] VETERE A, GAMINI A, CAMPA C, et al. Regiospecific transglycolytic synthesis and structural characterization of 6-*O*- α -glucopyranosyl-glucopyranose (Isomaltose) [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000,274(1):99 – 104.
- [25] KATO N, SUYAMA S, SHIROKANE M, et al. Novel α -glucosidase from *Aspergillus nidulans* with strong transglycosylation activity[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2002,68(3):1 250 – 1 256.
- [26] MACKENZIE L F, WANG Q, WARREN R A J, et al. Glycosynthases: Mutant glycosidases for oligosaccharide synthesis[J]. Journal of the American Chemical Society, 1998,120(22):5 583 – 5 584.

Synthesis of isomaltooligosaccharides by whole-cell *Aspergillus niger* H9-30

HUANG Nan^{1,2}, ZHOU Bo^{1,2}, YE Tong^{1,2}, CHEN Guiguang^{1,2},
LIANG Zhiqun^{1,2}, ZENG Wei^{1,2*}

1(State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources (Guangxi University), Nanning 530004, China)

2(College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China)

ABSTRACT Isomaltooligosaccharides (IMOs) are a kind of functional oligosaccharides that have been widely used in food industries. A new procedure for IMOs preparation was developed by using whole-cell of *Aspergillus niger* H9-30 as a catalyst and maltose as substrate. The optimal reaction condition in shaking flasks was as follows: at 48 °C with an initial pH of 4.2, with 600 g/L maltose and 15 g/L *A. niger* H9-30. Under this condition, the yields of isomaltose, panose, and isomaltotriose accounted for 50.5% of total sugar, and total IMOs content accounted for 63.3%. It was also found that using whole-cell of *A. niger* to produce IMOs had good operational stability with the half-life reached 20 batches (10 d). In conclusion, *A. niger* H9-30 has potential use for industrial production of IMO.

Key words isomaltooligosaccharides; whole-cell catalysis; *Aspergillus niger*