

## 高产菊粉酶酵母筛选、发酵和酶学性质研究

王建华<sup>1</sup> 刘艳艳<sup>2</sup> 姚 斌<sup>1</sup> 王亚茹<sup>1</sup>

( 中国农业科学院饲料研究所 北京 100081 ) ( 国家医药局武汉医药设计院 武汉 430061 )

**摘 要** 筛选到 1 株菊粉酶高产克鲁维酵母菌株,采用酵母高密度细胞发酵方法,最高菊粉酶产量达到 288.78 u/mL,比 80~90 年代国际上报道的克鲁维酵母菊粉酶最高产量高 6.8 倍。该酶的菊粉酶/转化酶活性比为 1/24.72,菊糖  $K_m = 13.3 \text{ mmol/L}$ ,蔗糖  $K_m = 62.6 \text{ mmol/L}$ ,最适反应 pH 值为 4.4,但在 pH 3.8~5.6 的范围内均保持了较高的活性,相当于最适 pH 值下活性的 90%,最适反应温度为 55℃,在 50~57.5℃ 范围内能够保持较高活性,50℃ 下酶的半衰期约为 16h,外加  $\text{Mg}^{2+}$  提高酶活性 11.28%。

**关键词** 克鲁维酵母,菊粉酶,高细胞密度培养,酶学性质,高果糖浆

中图分类号 Q342 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)01-0060-05

高果糖浆(HFS)果糖含量大于 90%。菊粉酶是一步法生产 HFS 的唯一重要酶种。欧洲国家、日本研究较为深入,我国关于菊粉酶的研究始于 90 年代,目前均停留于实验室阶段,限制因子在于:产酶菌株菊粉酶产量低,产酶成本高<sup>[1~5]</sup>。菊粉酶研究集中在曲霉和酵母两大类菌种中。黑曲霉(*Aspergillus niger*)在摇床水平下,菊粉酶酶活大多至第 7 天达到高峰值 48.4~50 u/mL<sup>[3,5]</sup>。曲霉菊粉酶酶学性质见于各报道<sup>[3,5,6]</sup>。克鲁维酵母(*Kluyveromyces*)也是一个菊粉酶研究的热点菌种。据报道<sup>[7]</sup>一株 *K. marxianus* 在 1L 发酵罐中采用低碳无机培养基进行连续培养,最高胞外酶活达到 32 u/mL, I/S = 1/15,酶的最适反应温度为 50℃,最适反应 pH 值为 4.5~5.0。另一菌株 *K. marxianus* 在摇床水平下,菊粉酶活性在培养 120h 时达 34.5 u/mL 的高峰值, I/S = 1/0.6<sup>[8]</sup>。国内报道的克鲁维酵母菌株产菊粉酶最高水平为 18.7 u/mL<sup>[9,10]</sup> 国外报道的最高水平不到 38 u/mL<sup>[8,11]</sup>。达不到工业化生产的最低要求。克鲁维酵母菊粉酶  $K_n$ (蔗糖)值为 7.4~15.7 mmol/L<sup>[12]</sup>。关于菊粉酶分子生物学研究始于 90 年代<sup>[1,2]</sup>,至今具有生产意义的工程菌株尚未构造成功,进一步筛选性能优良的菊粉酶高产菌株仍是十分必要的。克鲁维酵母高密度培养方法较少被研究<sup>[13,14]</sup>,90 年代有人尝试利用乳清废液、葡萄糖、麦芽糖等作为碳源进行克

鲁维酵母高密度发酵,目的只是转化乳清废液,忽视了转化酵母菌体营养价值,未能引起足够重视,其高密度培养方法远不如酒酵母、潮生酵母和毕赤酵母的成熟。本研究旨在筛选菊粉酶高产菌株,并摸索菊粉酶高产发酵,解决 HFS 生产中菊粉酶产量低、成本高的关键问题。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

克鲁维酵母 IW9801(*Kluyveromyces*),为研究者从实验室保存克鲁维酵母菌株和酒糟中分离、筛选、诱变、继代 20 代以上稳定所得。

### 1.2 培养基

1.2.1 菌株保持斜面培养基(g/L):蛋白胨 20,酵母抽提物 10,蔗糖 20,琼脂 20。

1.2.2 筛选培养基(1L) (  $\text{NH}_4$  )<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5g, EDTA 15mg, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.45mg, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.5mg, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.3mg, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.45mg, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 1.0mg, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.3mg, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 1.0mg, KI 0.1mg, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.04mg, 泛酸钙 1.0mg, 烟酸 1.0mg, 生物素 0.4mg, 葡萄糖 30g。

1.2.3 发酵罐产酶培养基的种子液培养基 YIF(g/L):蛋白胨 20g,酵母抽提物 10g,菊糖 5g。

**1.2.4 发酵罐产酶无机培养基基础料(1L):**  
(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.0g, EDTA 30mg, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.9mg, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 3.0mg, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.6mg, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.9mg, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 2.0mg, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.6mg, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 2.0mg, KI 0.2mg, NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.08mg, 泛酸钙 2.0mg, 烟酸 2.0mg, 生物素 0.8mg, 消泡剂 GE 和 GPE 各 0.075mL, 蔗糖 10g。

**1.2.5 发酵罐产酶无机培养基补充料(1L):**  
(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 5.0g, EDTA 0.375g, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.225g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.15mg, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.015g, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.225g, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.05g, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.015g, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.05mg, KI 5.0mg, NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.02g, 泛酸钙 0.10g, 烟酸 0.10g, 生物素 0.8mg, 消泡剂 GP 和 GPE 各 0.075mL, 蔗糖 500.0g。

### 1.3 培养条件

补料发酵在德国产 6.6L Braum 自控发酵罐中进行,培养基初装量为 2.2L,接种量为 7.5%,种子液提前 1d 在 32℃,转速为 200r/min 下采用有机培养基摇瓶培养。装料前校正 pH 和 pO<sub>2</sub> 电极,发酵温度 38℃,转速 800~1100r/min,通气量 9L/min。培养至 5h 基础料中 C 源消耗完毕,开始补料,全过程由转速和补加料流速控制 pO<sub>2</sub> > 30%,由 2ml/L HCl 和氨水控制 pH 值 4.5。

所有有机培养基均经 121℃ 灭菌 40min,无机培养基经 121℃ 灭菌 30min,糖溶液经 105℃ 灭菌 20min,维生素及微量元素过滤除菌。

### 1.4 菊粉酶活性测定

本研究菊粉酶反应条件为:经过适当稀释的酶液 0.50mL 和 2.5%~3.0% 菊糖(上海化学试剂二厂)0.50mL 在 55℃ 反应 10min,反应体系 pH 值为 4.5(0.02mol/L 乙酸-乙酸钠缓冲液)。由斐林试剂法测定反应体系中还原糖含量。菊粉酶活性单位定义:反应体系中每分钟产生 1 微摩尔己糖所需酶量为 1 个酶活性单位。

## 2 结果与分析

### 2.1 高产菊粉酶酵母菌株筛选

从本实验室保存的克鲁维酵母菌株与酒糟中筛选分离产菊粉酶菌株,以菊粉酶降解菊粉形成的透明圈的直径大小为依据,进行平板分离和初筛。初筛当选菌株的菌落细胞直接在敞开的初筛平皿中,接受 20W, 39cm 的紫外光诱变 10~20min,诱变菌

落再在初筛平板上进行诱变初筛,当选菌株进一步进行摇瓶复筛,并测定摇瓶条件(200r/min, 3d 32℃)下的菊粉酶活性大小,而后选定高产菌株暂定名为 *Kluyveromyces* IW9801,该菌株继代 20 代以上,产菊粉酶性能及其它主要生物学特性稳定。

### 2.2 克鲁维 IW 9801 菌株在模式发酵罐中补料发酵产酶的时间曲线

图 1 资料表明:在 0~120h 之间菊粉酶活性直线上升,几乎 24h 翻 1 倍,发酵 1d, 2d, 3d, 5d 时的菊粉酶活性分别达到 22.71, 60.54, 116.06 和 288.78u/mL,在 3d 以前和 18h 以后增长相对平缓。粗酶比活性除了 6~12h 维持较高水平 142.2~55.43u/mg 蛋白质外,此后一直保持 12~14u/mg 蛋白质的低水平,至 96~120h 又上升到 17u/mg 蛋白质;比较而言,蛋白质总分泌量,菊粉酶蛋白分泌量和生物量三者相互之间相关性均相当高,同时这三者与菊粉酶活性之间的正比例关系亦是十分明显的。其中,最高生物量(干重)达到 121g/L,蛋白质总分泌量达到 16.67mg/mL。总之,菌体菊粉酶及蛋白质总分泌量、生物量相互之间均具有较好的正相关关系。菊粉酶最高水平达到 288.78u/mL,依照 60.68u/mg 酶蛋白经验数据计算菊粉酶蛋白分泌量最高水平达到 4757.36mg/L,占蛋白质总分泌量的 28.54%(图 1)。

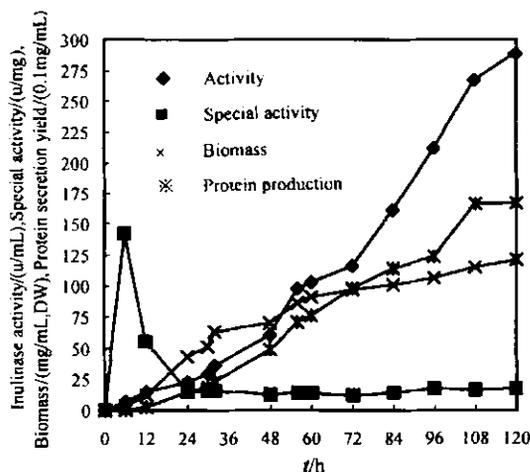


图 1 *Kluyveromyces* IW 9801 在 38℃ 下的菊粉酶活性,酶比活性,生物量和总蛋白质分泌量的时间曲线

Fig. 1 Time course of inulinase activity, special activity, total protein secretion yield, and biomass of *Kluyveromyces* IW 9801 under 38℃

### 2.3 胞外菊粉酶酶学性质研究

粗酶液经硫酸铵分段盐析,比活从 14.8u/mg 提高到 132.46u/mg(蛋白质),纯化倍数为 8.95,透

析脱盐后,进行酶学性质的研究,在有关测定中根据  
需要由 0.02mmol/L 醋酸缓冲液 (pH4.5) 对纯化酶  
液进行适当稀释。

**2.3.1 菊粉酶的底物特异性及其反应速度与底物  
浓度的关系:**(1)菊粉酶底物特异性,从表 1 知该菊  
粉酶可以同时作用于菊糖与蔗糖, I/S 值为 1:  
24.72。(2)  $K_m$  值:底物为菊糖时,按菊糖聚合度一  
般为 30,菊糖分子量为 5000,配制 0~30mmol/L 浓  
度梯度的菊糖溶液,测定菊粉酶催化反应的单糖得  
率,依实测值建立直角双曲线方程得  $V_{max} =$   
24.4mg/mL·min,  $K_m = 13.3$ mmol/L。

表 1 菊粉酶的底物特异性

Table 1 Substrate specificity of inulinase of  
*Kluyveromyces* IW9801

Substrate conc./ (mmol/L)	Activity/ (u/mL)	Relative activity/(%)	I/S
Inulin, 5.0	28.20	100.00	1/24.72
Sucrose, 73.04	696.97	2471.52	

底物为蔗糖时,测得  $V_{max} = 234.6$ mg/(mL·  
min),  $K_m = 62.6$ mmol/L。比较两种底物  $K_m$  值  
知,该酶的最适底物是菊糖不是蔗糖,故判断该酶是  
菊粉酶不是转化酶。

**2.3.2 菊粉酶反应 pH 值适性范围:**图 2 资料显  
示,菊粉酶最适反应 pH 值为 4.4,在 pH3.8~5.6  
的范围内保持了最适 pH 值下活性的 90%。本菌株  
菊粉酶 pH 适性宽广。这一特性有助于提高酶的稳  
定性及适应性。

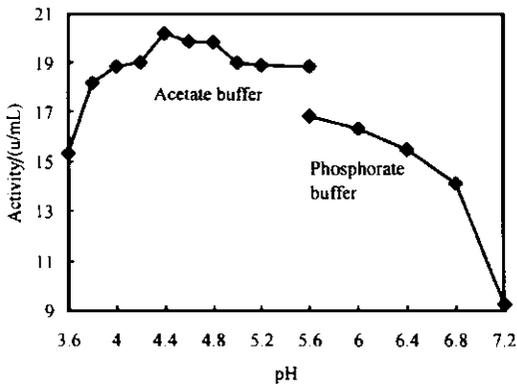


图 2 *Kluyveromyces* IW 9801 菊粉酶的 pH 适性范围  
Fig.2 pH profile of inulinase activity of  
*Kluyveromyces* IW 9801

**2.3.3 菊粉酶最适反应温度、温度适性范围与耐温  
性能:**菊粉酶最适反应温度:本菌株菊粉酶最适反应  
温度为 55℃,在 50~57.5℃ 范围内稳定性好、能够  
保持较高活性(图 3); 菊粉酶温度适性范围与耐温

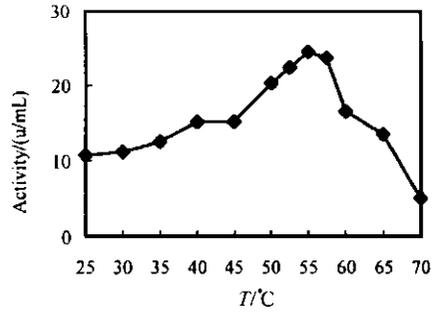


图 3 菊粉酶的温度适性范围

性能。本研究菌株菊粉酶的耐温性能研究(图 4):  
在不同温度下储藏液体菊粉酶 1h,后在 55℃ 下测定  
酶活性。结果表明:25,35 与 45℃ 下的耐温性相差  
很小,55℃,1h 残余酶活性只有 67.91%(以 5℃ 下  
酶活性作为 100%),65,1h 残余酶活性更低至  
26.11%。从图 5 可知:本研究菊粉酶在 50℃ 下的  
耐温性尚可,50℃ 下酶的半衰期约为 16h,6h 残余  
酶活性有 83.02%,12h 仍有 53.74%,至 36h 仍保  
持 32.09%。

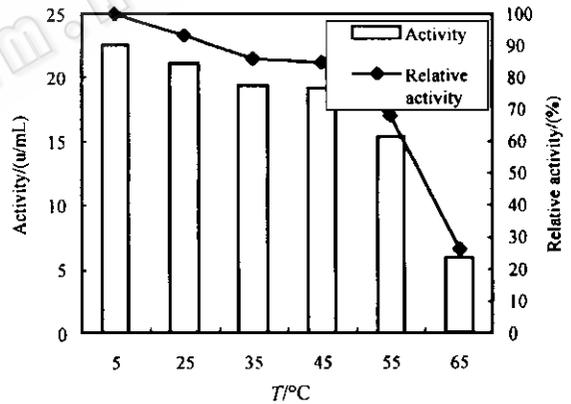


图 4 *Kluyveromyces* IW 9801 菊粉酶耐温性观察  
Fig.4 Temperature tolerance of inulinase of  
*Kluyveromyces* IW 9801

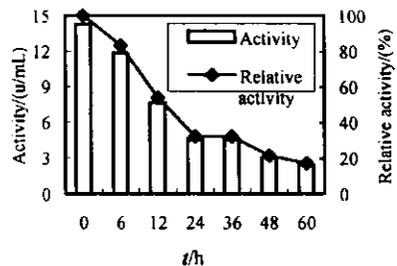


图 5 *Kluyveromyces* IW9801 液态菊粉酶在  
50℃ 下的稳定性观察  
Fig.5 Stability of liquid inulinase from  
*Kluyveromyces* IW9801 under 50°C

**2.3.4 金属离子对菊粉酶活性的影响:**从表 2 资料  
中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

可知,金属离子对菊粉酶活性有明显影响,其中除  $Mg^{2+}$  提高活性 11.28% 外,  $Ca^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$  则分别使酶活性降低 15.72%、22.41% 和 27.60%。

表 2 金属离子对菊粉酶活性的影响

Table 2 Effect of metal ions on inulinase activity

Metal ion conc. (mmol/L)	Activity/ (u/mL)	Relative activity/%
CK	58.59	100
$MgCl_2$ 25	65.20	111.28
$CaCl_2$ 25	49.38	84.28
$MnCl_2$ 25	45.46	77.59
$FeCl_3$ 25	42.42	72.40

### 3 讨论

本研究筛选到的克鲁维酵母菌株在 6.6L 发酵罐最高菊粉酶产量达到 288.78u/mL。比 90 年代国际上报道的同类菌株最高值 37u/mL<sup>[11]</sup> 高 6.8 倍,比曲霉菊粉酶最高产量 50u/mL<sup>[8]</sup> 高 4.8 倍。比本课题组 1998 年申请该技术发明专利报道值高 3.63 倍<sup>[15]</sup>,这将使高果糖浆制作中的菊粉酶成本大大降低。此外,本研究采用无机培养基高密度发酵培养酵母,与有机培养基相比,无机培养基具有如下优势:一是不易产生泡沫,降低消泡成本与难度,有利于通气;二是不易污染杂菌;三是便宜。

本研究筛选的克鲁维酵母菊粉酶酶学性质有独特之处,有些更为优秀。本研究菊粉酶 I/S 值为 1/24.72。这一比值比其它同类研究报道值 1/15~1/13 均低<sup>[8,16]</sup>。本研究测得克鲁维酵母菊粉酶  $K_m$ (菊糖)=13.3mmol/L,  $K_m$ (蔗糖)=62.6mmol/L,高于其它克鲁维酵母和曲霉外切菊粉酶转化酶的  $K_m$  值。克鲁维酵母菊粉酶  $K_m$ (蔗糖)值一般为 7.4~10.0mmol/L<sup>[15]</sup> 和 14.6~15.7mmol/L<sup>[10,12]</sup>。曲霉粗菊粉酶内切酶  $K_m$ =19mmol/L,外切酶  $K_m$ =60mmol/L,纯化过的内切酶和外切酶  $K_m$  分别为 6 和 10mmol/L<sup>[3]</sup>;本研究菊粉酶最适反应 pH 值为 4.4,但在 pH 3.8~5.6 的范围内均保持了较高

的活性,相当于最适 pH 值下活性的 90%(图 3)。曲霉菌来源的菊粉酶最适反应 pH 值为 4.4,并在 pH 4~5 范围内能够保持稳定<sup>[4]</sup>;Rouwenhorst 等<sup>[7]</sup> 报道克鲁维酵母菊粉酶反应最适 pH 为 4.5~5.0,在 pH 4~5.5 范围具有较好稳定性。本研究菊粉酶反应最适 pH 与前人报道基本相等;本研究菊粉酶最适反应温度为 55℃,在 50~57.5℃ 范围内稳定性好,能够保持较高活性(图 4),菊粉酶温度适性比前人<sup>[7]</sup> 报道的要好。50℃ 下酶的半衰期约为 16h, 6h, 12h, 36h 后残余酶活性分别为 83.02%, 53.74%, 32.09%(图 5),优于同类研究<sup>[6]</sup> 报道结果。 $Mg^{2+}$  提高活性 11.28%(表 2)为本研究菌株菊粉酶首次发现。也有不同或相反报道<sup>[3,6]</sup>,这与酶来源、纯度、测定体系不尽一样都有关。

本研究采用高密度液体发酵方法获得很高的菌体生物量,菌体湿重达到 427g/L,绝干重达到 121g/L,前人<sup>[6,8,11,16]</sup> 采用有机培养基产菊粉酶,或采用无机培养连续恒态培养,为了产酶诱导而采用 C 源限制培养基,结果使生物量很低( $< 15mg$ (dwt)/mL)。本研究酵母菌体具营养价值(另文发表)和生物量两高优势,具有开发研制成高值的医用、食用和饲用兼用酵母的潜力,一举两得。

### 4 结论

(1) 筛选到一株菊粉酶高产克鲁维酵母菌株,采用酵母高密度细胞发酵方法,最高菊粉酶产量达到 288.78u/mL,比 80~90 年代国际上报道的克鲁维酵母菊粉酶最高产量高 6.8 倍。

(2) 该酶的菊粉酶/转化酶活性比为 1/24.72;  $K_m$ (菊糖)=13.3mmol/L,  $K_m$ (蔗糖)=62.6mmol/L,最适反应 pH 值为 4.4,在 pH 3.8~5.6 的范围内均保持了最适 pH 值下活性的 90%。

(3) 最适反应温度为 55℃,在 50~57.5℃ 范围内能够保持较高活性,50℃ 下酶的半衰期约为 16h;外加  $Mg^{2+}$  提高酶活性 11.28%,为本研究菌株菊粉酶首次发现。

### 参 考 文 献

- [1] Laloux O, Cassart J P, Delcour J et al. *FEBS Lettrs*, 1991, **289**: 64~68
- [2] Onodera S, Murakami T, Ito H et al. *Biosci Biotech Biochem*, 1996, **60**: 1780~1785
- [3] Rosa A, Alada M S, Ehud I et al. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 1989, **11**: 105~117.
- [4] Zittan L. *Starch*, 1981, **33**: 373~377
- [5] Kazuyoshi O, Hamada S, Nakamura T. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, **59**: 729~733
- [6] Ongen-Baysal G, Sukan S S, Vassilev N. *Biotechnology Letters*, 1994, **16**: 289~292

- [ 7 ] Rouwenhorst R J ,Hensing M ,Verbakel J *et al* . *Applied and Environmental Microbiology* ,1990 **56** :3337~3345
- [ 8 ] Ongen-Baysal G ,Sukan S S. *Biotechnology Lett* ,1996 **18** :1431~1434
- [ 9 ] 魏文铃 ,郑忠辉 ,郑志成等 . *微生物学报* ,1998 **38** :208~121
- [ 10 ] 郑忠辉 ,刘月英 ,蔡文铮等 . *厦门大学学报* ,1993 **32** :360~364
- [ 11 ] Groot J W D Wassink ,Fleming S E. *Enzyme Microb Technol* ,1980 **2** :45~53
- [ 12 ] Negoro H. *J Ferment Technol* . 1978 **56** :120~107
- [ 13 ] Kallel V C ,Engasser J M ,*A Micro Process Biochemistry* ,1994 **29** :381~386
- [ 14 ] Shay L K ,Wegner G H. *J Dairy Sci* ,1986 **69** :676~683
- [ 15 ] 王建华等 . *中国发明专利* ,1998 ,专利申请号 :98120697.2
- [ 16 ] Rouwenhorst R J ,Visser L E van der Baan *et al* . *Appl Environ Microbiol* ,1988 **54** :1311~1137

## A Study on Screening and High Density Cell Cultivation of A Yeast Strain *Kluyveromyces* with High Inulinase Yielding and Its Enzymology Properties

WANG Jian-hua<sup>1</sup> LIU Yan-yan<sup>2</sup> YAO Bin<sup>1</sup> WANG Ya-ru<sup>1</sup>

<sup>1</sup>( Feed Research Institute ,Chinese Academy of Agricultural Sciences ,Beijing 100081 )

<sup>2</sup>( Wuhan Institute of Medicine Design ,National Administration Office of Medicine ,Wuhan 430061 )

**Abstract** A yeast strain *Kluyveromyces* with high inulinase yield was screened. The highest inulinase activity of 288.78u/mL was reached when a high cell density cultivation method was developed for inulinase production. It was 6.8 times higher than the highest level reported in the same species. The activity ratio of its inulinase to invertase was 1/24.72 ,the  $K_m$  values were 13.3mmol/L and 62.6mmol/L when inulin and sucrose were used as substrate ,respectively ;The optimum pH value was 4.4 ,this enzyme also showed a good pH adaptability and stability ,i. e. more 90% of the highest level was maintained between pH 3.8 and 5.6 ;The optimum reaction temperature was 55°C ,higher activity was maintained between 50~57.5°C ,its half life period was 16 hours at 55°C ;It was found for the first time that addition of magnesium ion into the reaction system increased the enzyme activity by 11% .

**Key words** *Kluyveromyces* ,inulinase ,high density cell cultivation ,enzymology property ,high fructose syrup