

克鲁维酵母 Y-85合成菊粉酶最适条件的研究*

魏文铃 郑忠辉 郑志成 刘月英 庄殊珊

(厦门大学生物学系 厦门 361005)

摘要 采用响应面方法(Response Surface Method, RSM)对克鲁维酵母(*Kluyveromyces* sp.) Y-85产菊粉酶培养基成份进行了优选,和正交试验相比,该法选出的最适培养基的酶发酵水平提高 28%。用 15L 自控发酵罐进行产酶条件控制试验,并在 1000L 罐上进行 5 批次酶发酵中试,平均菊粉酶活性达 68.9 u / ml。

关键词 菊粉酶合成, 响应面方法, 克鲁维酵母菌

分类号 Q939.5

菊粉酶(Inulinase, EC.3.2.1.7)在转化菊粉(Inulin)成果糖以及制备酒精、山梨糖醇等方面具有良好的应用前景^[1]。近来,有关菊粉酶的报道逐年增加^[2~4],但中试结果的报道极少^[5]。在摇瓶产酶条件研究^[6]的基础上,我们采用响应面方法(RSM)优选克鲁维酵母 Y-85产酶的培养基,总酶活水平得到明显提高。经小型自控发酵罐的产酶温度、溶解氧、pH 等条件控制试验后,进行产菊粉酶的中试,结果表明,菊粉酶的总酶活(68.9 u / ml)高于国外报道的中试水平(43.0 u / ml)^[5]。

1 材料和方法

1.1 菌种

克鲁维酵母(*Kluyveromyces* sp.) Y-85菌株为本课题组筛选获得。

1.2 培养基及培养条件

1.2.1 斜面培养基(%): 酵母膏 1.0, 葡萄糖 2.0, 蛋白胨 1.0, 琼脂 2.0, pH 自然。

1.2.2 摇瓶培养基(%): (正交试验优选的配方)菊芋粉抽提液 7.0(以总糖计), 玉米浆 3.0, 尿素 2.0, pH5.0; RSM 实验中增加牛肉膏(0.2~0.6)成份。菊芋粉抽提液制备、培养条件同前文^[6]。

1.3 主要仪器设备

LF-S₁₅实验室自控发酵罐,上海华东生物技术工程公司产品;1000L 发酵罐,福建龙岩地区味精厂中试车间提供。

1.4 测定方法

总糖、还原糖和生物量的测定,酶活性单位规定及酶活性测定均同前文^[6]。酶活性测

*国家“八·五”攻关项目。

参加本文研究工作的还有谢忠、陈如铭、黄庆辉等教师以及蔡文铮(92届)、方少琳(93届)、黄助(94届)等微生物专业毕业生。

收稿日期:1997-08-13

定以菊糖(Sigma公司产品)为底物。

2 结果和讨论

2.1 产酶培养基的优选

在摇瓶产酶条件实验中,探讨不同碳、氮源以及尿素、玉米浆和菊芋粉抽提液等营养液浓度对酶发酵水平的影响,并用正交试验来确定这些营养物质成份的适宜浓度,优选出的培养基配方见“材料和方法”。从试验结果及应用的角度考虑,选择既对Y-85菌株产酶有利,又适合于工业化生产要求的菊芋粉抽提液、尿素、玉米浆和牛肉膏作为产酶培养基组成成份,并采用响应面方法^[7,8]来优选各成份的适宜浓度范围,试验的营养物浓度与编码水平设置如表1。

表1 试验的营养物浓度与编码水平

Table1 Concentrations and coded level of nutrients in experiment

编码水平 Coded level	菊芋抽提液* JAEJ(%)	尿素 Urea(%)	牛肉膏 Beef extrat(%)	玉米浆 CSL(%)
-2	6.0	0.5	0.2	2.0
-1	7.0	1.0	0.3	3.0
0	8.0	1.5	0.4	4.0
+1	9.0	2.0	0.5	5.0
+2	10.0	2.5	0.6	6.0

*菊芋抽取液 Jerusalem artichoke extracted juice.

在考虑四种因素对产酶影响时,采用Box-Wilson的中心组合设计(Central Composite Design, CCD)^[7],用表1设置的四因子五水平方式进行25组实验,结果见表2。选用RSM中适合的方程式为:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{14} X_1 X_4 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{24} X_2 X_4 + \beta_{34} X_3 X_4 + \beta_{123} X_1 X_2 X_3 + \beta_{124} X_1 X_2 X_4 + \beta_{134} X_1 X_3 X_4 + \beta_{234} X_2 X_3 X_4 + \beta_{1234} X_1 X_2 X_3 X_4 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{44} X_4^2$$

式中,Y为菊粉酶活性, X_1 为菊芋抽提液(JAEJ)浓度, X_2 为尿素浓度, X_3 为牛肉膏浓度, X_4 为玉米浆浓度, β_0 为对照, β_1, β_2, \dots 为各项系数。

实验结果用多重回归技术进行分析,并借助计算机算出上述方程各项系数,结果见表3。

分析结果表明,回归方程的决定系数 R^2 达到0.87,这说明方程适用于产酶量的理论预报。为了进一步探讨回归方程预报的实验结果与实际实验结果相符合程度,作了一系列的验证实验。结果(表4)表明,预报的结果与实际实验结果相当一致(相对误差在 $\pm 5.0\%$ 以内)。用这一回归方程优选出的产酶最适宜培养基的成份为(%) : 菊芋粉抽提液8.0,尿素2.0,牛肉膏0.2,玉米浆4.0。虽然尚有其它组合也有较高的预报酶活,但因其成本较高等原因不宜选用。以这种方法选出的最适宜培养基进行摇瓶发酵,酶活性(59.85 u / ml)

比正交试验(46.76 u / ml)提高 28%。

表2 实验设计和结果

Table 2 Design and results of experments

序号 Trial no	菊芋 抽提液 JAEJ	尿素 Urea	牛肉膏 Beef extract	玉米浆 CSL	菊粉酶活性 Inulinase activity (u/ml)	序号 Trial no	菊芋 抽提液 JAEJ	尿素 Urea	牛肉膏 Beef extract	玉米浆 CSL	菊粉酶活性 Inulinase activity (u/ml)
1	-1	-1	-1	-1	41.70	14	+1	-1	+1	+1	42.42
2	+1	-1	-1	-1	49.10	15	-1	+1	+1	+1	44.73
3	-1	+1	-1	-1	42.43	16	+1	+1	+1	+1	37.65
4	+1	+1	-1	-1	49.95	17	-2	0	0	0	46.54
5	-1	-1	+1	-1	39.96	18	+2	0	0	0	45.56
6	+1	-1	+1	-1	52.36	19	0	-2	0	0	48.68
7	-1	+1	+1	-1	44.29	20	0	+2	0	0	50.38
8	+1	+1	+1	-1	58.01	21	0	0	-2	0	58.61
9	-1	-1	-1	+1	34.80	22	0	0	+2	0	51.67
10	+1	-1	-1	+1	44.24	23	0	0	0	-2	41.06
11	-1	+1	-1	+1	39.57	24	0	0	0	+2	35.40
12	+1	+1	-1	+1	46.05	25	0	0	0	0	42.10
13	-1	-1	+1	+1	42.10						

表3 上述实验得到系数的评价

Table 3 Estimates of coefficients from aforesaid experments

变量 Variable	系数 Coefficient	显著性 Significance	变量 Variable	系数 Coefficient	显著性 Significance
Constant	42.10		X_3X_4	-17.18	
X_1	60.15	*	$X_1X_2X_3$	-6.28	
X_2	24.20		$X_1X_2X_4$	-22.33	
X_3	0.21		$X_1X_3X_4$	-63.69	*
X_4	-71.95	*	$X_2X_3X_4$	-32.19	
X_1X_2	-16.56		$X_1X_2X_3X_4$	-10.38	
X_1X_3	-21.32		X_1^2	15.00	
X_1X_4	-59.57	*	X_2^2	41.12	
X_2X_3	-0.52		X_3^2	83.92	*
X_2X_4	-13.27		X_4^2	-43.65	

* 表明概率 Indicate a probability of ≤ 0.05

2.2 15L 自控发酵罐产酶条件控制试验

摇瓶发酵实验确定最适产酶条件的基础上,用优选的产酶培养基,在 15L 自控发酵罐上进行三批次酶发酵试验。装液量为 7L,接种量 5.0% (V/V),发酵温度 30℃,通气量 1.5:1 (V/V/min),罐压 0.5×10^5 Pa,搅拌转速 400r/min。三批发酵的发酵液平均总酶活性

表4 回归方程预报结果的验证

Table 4 Experiments to verify predictions from regression equation

序号 Trial no.	菊芋		牛肉膏		菊粉酶活性		相对误差 Relative error (±%)
	抽提液	尿素	Beef	玉米浆	Inulinase activity (u/ml)		
	JAEJ (%)	Urea (%)	extract (%)	CSL (%)	预报的 Predicted	实测的 Observed	
1	8.0	2.0	0.4	5.0	40.00	41.24	+3.00
2	7.0	1.5	0.5	5.0	43.79	45.39	+3.52
3	9.0	1.5	0.6	3.0	62.70	59.85	-4.76
4	9.0	2.5	0.4	3.0	55.47	55.46	-0.00
5	8.0	2.0	0.2	4.0	55.47	54.02	-0.26
6	10.0	1.0	0.3	4.0	53.53	55.50	+3.54
7	8.0	2.0	0.4	5.0	39.96	40.53	+1.40
8	7.0	2.0	0.2	3.0	52.90	52.36	+1.03

67.61u/ml, 其中最高一批的总酶活性达 68.83u/ml, 发酵过程动力学分析如图 1。从图 1 看出, 发酵期间随着菌体生长而产酶, 但酶的大量合成在菌体细胞生长一段时间(12h)以后才开始, 这时培养液中的总糖及还原糖浓度降到很低水平。这表明还原糖浓度较高时酶的合成受到阻遏作用。菌体对数生长期耗氧迅速, 发酵 12h 相对溶氧接近零, 而且一直维持至对数生长期的后期, 这表明菌体在生长及产酶旺盛期对氧的需求量较大。

2.3 1000L 罐产酶中试

上述研究后, 在 1000L 罐上进行五批次产酶中试。每批试验用的培养基均按优选的配方配制, 装液量 500L, 接种量 5%(V/V), 搅拌转速 300r/min, 通气量 1.5:1(V/V/min), 罐压维持 0.5×10^5 Pa, 温度 30℃, 经 24h 发酵后测得五批培养液总酶活性 (u/ml) 分别为: 67.3, 72.9, 66.5, 71.7 和 66.1, 发酵过程的产酶分布、菌体生长、糖耗以及 pH 变化等均与 15L 自控发酵罐类似。中试结果表明, 利用响应面方法 (RSM) 优选出的培养基以及经研究确定的产酶工艺条件是可行的。Pessoa 等人报道^[5], 乳酒假

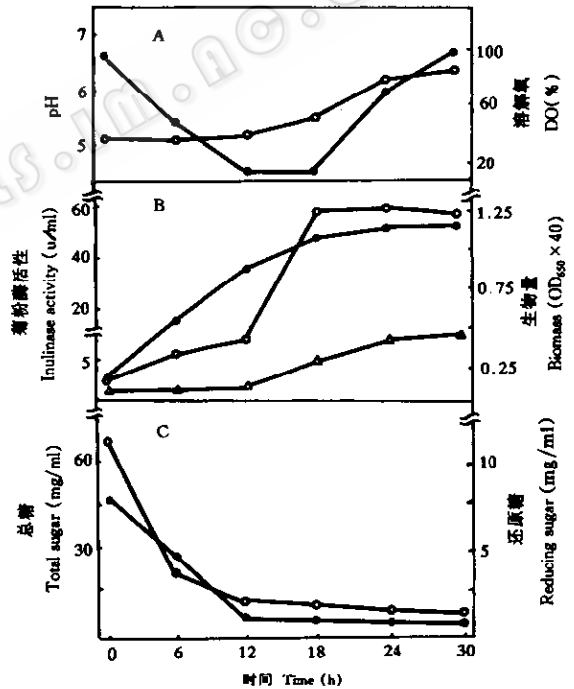


图 1 15L 发酵罐中产酶过程动力学

Fig.1 Kinetics of enzyme production in a 15L fermentor
A. pH(○), Dissolved oxygen(●); B. Total activity(○), Activity in suspension(△), Biomass (●); C. Total sugar(○), Reducing sugar(●).

丝酵母 (*Candida kefyr*) DSM 70106 菌株在 300L 罐上中试发酵 72 h, 菊粉酶最高活性 43.0 u / ml, 克鲁维酵母 Y-85 菌株在 1000L 罐上平均酶活达 68.9 u / ml, 与之相比, 中试酶活水平高 60.2%。而且, 该菌株酶发酵周期短 (24 h), 性能稳定并能直接利用菊芋粉粗提的抽提液为原料等特点, 是一株可用于工业化生产菊粉酶的优良菌株。

在 15L 发酵罐进行产酶条件试验时, 我们发现 Y-85 酵母合成菊粉酶过程受还原糖的阻遏作用, 筛选去阻遏突变体可望进一步提高产酶水平, 我们已进行初步探讨^[9], 深入的研究工作, 正在进行之中。

致谢 衷心感谢陈朝教授所进行的计算机运算核对工作。

参 考 文 献

- [1] 魏文铃. 食品科学, 1991, 10: 19~21.
- [2] Barthomeuf C, Fegerat F, Pourrat H. *J Ferment Bioeng*, 1991, 72(6): 491~494.
- [3] Viswanathan P, Kulkarni, P R. *J Applied Bacteriology*, 1995, 78(4): 384~386.
- [4] Ongenbaysal G, Sukan S S. *Biotech Letters*, 1996, 18(2): 1431~1434.
- [5] Pessoa A, Vitolo M, Hustedt H. *Applied Biochem Biotech*, 1996, 57(8): 699~709.
- [6] 郑忠辉, 刘月英, 蔡文铮, 等. 厦门大学学报, 1993, 32(3): 360~364.
- [7] Maddox I S, Richert S H. *J Applied Bacteriology*, 1977, 43: 197~204.
- [8] Chen K C, Lee T C, Houg J Y. *Enzyme Microb Technol*, 1992, 14(8): 659~664.
- [9] 魏文铃. 厦门大学学报, 1991, 30(1): 94~98.

STUDIES ON OPTIMAL CONDITIONS FOR INULINASE PRODUCTION BY *KLUYVEROMYCES* SP. Y-85

Wei Wenling Zheng Zhonghui Zheng Zhicheng Liu Yueying Zhuang Shushan

(Department of Biology, Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract The application of response surface method to optimal medium-screening for inulinase production by *Kluyveromyces* sp. Y-85 has been investigated. The experiments of condition control for the enzyme production was carried out in a 15L fermenter. A large scale fermentation (1000L fermenter) was performed five batches, and average inulinase activity of 68.9 u / ml achieved.

Key words Inulinase production, Response surface method, *Kluyveromyces* sp.