

# 菊糖酶发酵生产条件的研究

林影 郭勇

(华南理工大学生物工程系 广州 510641)

**摘要** 脆壁克鲁维氏酵母(*Kluyveromyces fragilis*)在pH5.5的适当培养基中, 28℃摇瓶培养30h后, 进行分批发酵。结果表明: 发酵初始pH为6.0~6.5, 菊糖浓度为2%, 接种量4%, 控制前期发酵温度为28℃, 30h后发酵温度为32~34℃。发酵周期为70h左右, 最高产酶达240u/ml。在5L自控发酵罐中, 产酶达到同样水平, 发酵周期缩短约10h。

**关键词** 脆壁克鲁维氏酵母, 菊糖酶, 发酵

目前工业化生产高果糖浆的方法是利用淀粉原料, 通过三酶法生产得到含果糖42%的果葡糖浆, 再经分离纯化得到含果糖90%的高果糖浆。利用菊糖酶水解菊糖一步法便可得到含90%果糖的糖浆, 是一种有效的生产途径。

国外在对菊糖酶的研究工作中, 主要从细菌<sup>[1]</sup>、酵母<sup>[2]</sup>和霉菌<sup>[3]</sup>发酵生产菊糖酶, 其中脆壁克鲁维氏酵母最具有商业价值。近年来, 我国开始研究菊糖酶<sup>[4~6]</sup>。在对脆壁克鲁维氏酵母菊糖酶的研究中, 得到一株产量较高的菌株。本文探讨了该菌株的发酵生产条件, 为进一步大规模生产打下基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

脆壁克鲁维氏酵母(*Kluyveromyces fragilis*90)由本研究室选育得到。

### 1.2 培养基

斜面培养基(%): 酵母粉1.0, 蛋白胨1.0, 葡萄糖2.0, 琼脂2, pH5.5。

种子培养基(%)<sup>[8]</sup>: 酵母粉1.0, 葡萄糖1.5, 菊糖0.5, pH5.5。

发酵培养基(%)<sup>[8]</sup>: 菊糖2.0(菊芋中提取), 酵母粉1.0, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>0.5, FeSO<sub>4</sub>0.01, MgSO<sub>4</sub>0.1, pH6.0~6.5。

### 1.3 酵母培养

*K. fragilis*90在斜面上28℃培养48h。接一环入种子培养基中(250ml三角瓶, 装量25ml), 200r/min培养约30h。按比例接种入摇瓶(200r/min)或5L自控发酵罐(西德B. Braun公司)的发酵培养基中, 发酵至产酶高峰期止。

### 1.4 分析方法

菊糖酶活力测定<sup>[4]</sup>: 以4%蔗糖为底物, pH4.6, 50℃反应15min, 用3,5-二硝基水杨酸测定产生的还原糖量。酶活力单位定义为: 每min生成1μmol还原糖所需的酶量为一个酶活力单位。

总糖: 用苯酚-硫酸法测定<sup>[7]</sup>。

细胞浓度: 用比浊法, 在550nm下测定发酵液的吸光率。

## 2 结果和讨论

### 2.1 种子培养条件及细胞生长曲线

在灭菌新鲜培养基中接种培养, 并研究不同初始pH的培养基和不同培养温度对细胞生长的影响。结果表明: 菌体在初始pH5.5、28℃时生长速度最快, 周期最短。种子对数生长期在15~35h之间, 35h后菌体生长趋于停滞, 并开始有自溶现象。由于种子培养基中含有二种碳源, 出现了明显的二次生长现

象。以30~35h间作接种时间,此时OD<sub>550</sub>约为0.7,残糖接近0.2%,pH约6.2。

### 2.2 发酵产酶条件

2.2.1 发酵液初始pH的影响:用HCl或NaOH调节发酵培养基的初始pH分别为4.5、5.0、5.5、6.0、6.5和7.0,接入种子液6%。细胞生长和产酶结果如图1所示,当初始pH为6.0~6.5时,产酶量较大,为最适初始pH范围。

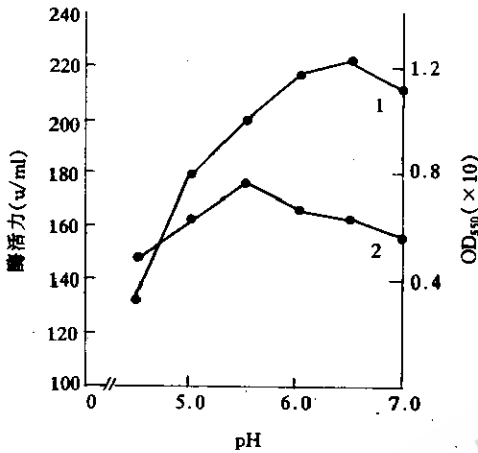


图1 初始pH对产酶的影响  
1. 产酶, 2. 细胞生长

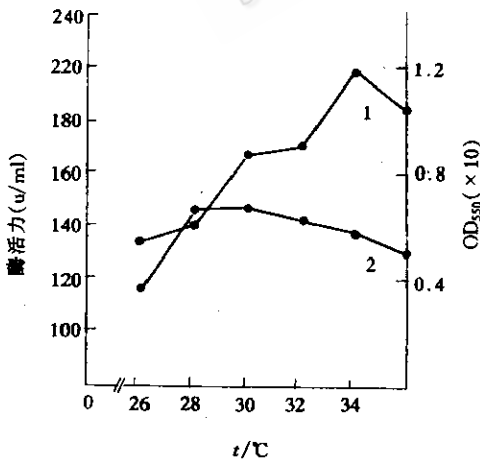


图2 温度对产酶的影响  
1. 产酶, 2. 细胞生长

### 2.2.2 发酵温度对产酶的影响: 在不同温度

下进行细胞生长和产酶的研究。虽然28~30℃时产菌较好,但34℃时产酶量最高(图2),所以有必要对发酵进行分段控温。前30h长菌期温度为28~30℃,产酶高峰期控制在32~34℃更有效。

2.2.3 接种量的影响:以接种量为2%~10%接入发酵培养基中,结果表明,接种量为4%时产酶量最高,达235u/ml(表1)。

表1 接种量对菊糖酶生产的影响

种量(%)	2	4	6	8	10
产酶(u/ml)	201	235	215	180	154

2.2.4 装液量对产酶的影响:500ml三角瓶装入不同体积培养基,在上述条件下摇瓶发酵(200r/min),结果表明装量为35ml时,产酶量最高,说明菊糖酶的产生对氧有一定的需求量(表2)。

表2 装液量对产酶的影响

装液量(ml)	20	35	50	65	80
产酶(u/ml)	180	240	210	170	165

### 2.3 5L自控发酵罐分批发酵试验

参考摇瓶数据,进行5L罐分批发酵试验。发酵罐中装液量为3L,初始pH约6.5,通风量1.2l/min,搅拌速度300r/min,发酵30h前为28℃,30h后为32~34℃。定时取样分析,结果如图3所示。发酵前期糖耗大,菌体大量繁殖的同时伴随着酶的产生,60h左右产酶最高,达最佳值,pH接近7.0。发酵周期比摇瓶发酵68~72h缩短了近10h。

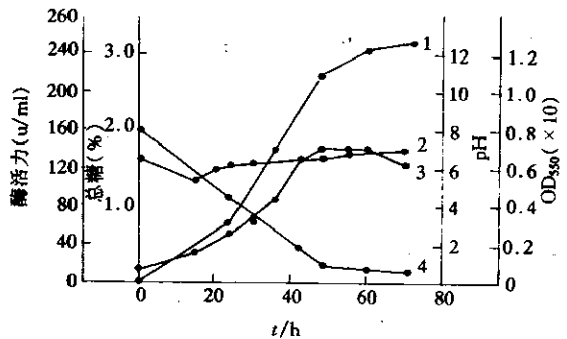


图3 5L罐发酵曲线

1. 产酶, 2. pH, 3. 细胞生长, 4. 糖耗

## 参 考 文 献

- [1] Diana L Vullo, Celia E Coto, Faustino Sineriz. Appl Environ Microbiol, 1991, 57(8): 2392 ~ 2394.
- [2] Grootwassink J W D, Hewitt G M. J Gen Microbiol, 1983, 129: 31 ~ 41.
- [3] Hirayama M, Sumi N, Hidaka H. Agric Biol Chem, 1983, 53(3): 667 ~ 673.
- [4] 林 影, 张守红, 郭勇等. 华南理工大学学报, 1993, 21(4): 33 ~ 38.
- [5] 许春兰, 顾天成, 李 飒. 食品与发酵工业, 1991, 5: 5 ~ 8.
- [6] 郑志辉, 刘月英, 蔡文锋等. 厦门大学学报, 1993, 32(3): 360 ~ 364.
- [7] Grootwassink J W D, Fleming S E. Enzyme Microb Technol, 1980, 2: 45 ~ 53.
- [8] Lin Y, Lin C H, Gao Y Q. Proce of the 3rd Asia-Pacific Biochem Eng Conf, 1994, 149 ~ 151.

## STUDY ON PRODUCTION CONDITIONS OF INULINASE

Lin Ying Guo Yong

(Department of Biotechnology South China University of Technology, Guangzhou 510641)

**Abstract** *Kluyveromyces fragilis* was grown in liquid medium, pH 5.5, 28 °C and about 30 hours in shake flasks. The inoculum 4% was then transferred into fermentive medium. Production of inulinase in batch fermentation was examined. It was shown that the optimal pH and inulin concentration were 6.0 ~ 6.5 and 2%, respectively. The temperature was controlled, at 28 °C before 30 hours and then 32 ~ 34 °C. After about 70 hours, the maximum yield of inulinase was obtained (240u /ml). In a fermentor with a capacity of 5-liter, its fermentation period was shortened.

**Key words** *Kluyveromyces fragilis*, Inulinase, Fermentation