

文章编号: 1009-038X(2004)04-0082-04

Kluyveromyces fragilis LFS-8611 β -D-半乳糖苷酶的摇瓶培养条件

刘建福, 王璋, 许时婴
(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘要: 脆壁克鲁维酵母(*Kluyveromyces fragilis*) LFS-8611 合成的 β -D-半乳糖苷酶具有较高的催化半乳糖基转移反应活力. 脆壁克鲁维酵母(*K. fragilis*) LFS-8611 细胞生长和 β -D-半乳糖苷酶的合成同步. 该菌株生长和产酶的最适碳源为半乳糖, 乳糖次之; 最适氮源为蛋白胨 F403; 最适培养条件为: 发酵培养基的初始 pH 值为 7.0, 摇床的转速为 200 r/min. 培养基中碳源和氮源质量浓度对菌体生物量和 β -D-半乳糖苷酶活力有重要影响, 以 12 mg/mL 乳糖为碳源, 16 mg/mL 蛋白胨(F403)为氮源, 在最适培养条件下培养 32 h 后, 菌体生物量和 β -D-半乳糖苷酶活力分别为 7.56 g/L 和 18.83 U/mL.

关键词: 脆壁克鲁维酵母(*Kluyveromyces fragilis*) β -D-半乳糖苷酶合成 培养条件
中图分类号: Q 556.2 **文献标识码:** A

Culture Conditions for β -D-galactosidase Production by *Kluyveromyces fragilis* LFS-8611

LIU Jian-fu, WANG Zhang, XU Shi-ying
(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: *Kluyveromyces fragilis* LFS-8611 produced an intracellular β -D-galactosidase with high transgalactosylation activity. *Kluyveromyces fragilis* LFS-8611 growth was associated with β -D-galactosidase synthesis. Galactose and peptone F403 were the best carbon and nitrogen sources for *Kluyveromyces fragilis* growth and enzyme synthesis, followed by lactose (as C source). The optimal culture conditions for the growth and enzyme production with the strain was initial pH 7.0 and rotation speed 200 r/min. Biomass and β -D-galactosidase activity significantly decreased when culturing the strain in lower C or N sources. The biomass and enzymatic activity reached 5.89 g/L and 18.83 U/mL respectively, after 32 h cultivation under optimal culture conditions.

Key words: *Kluyveromyces fragilis*; β -D-galactosidase synthesis; culture conditions

β -D-半乳糖苷酶(EC 3.2.1.23)属于水解酶类,同时具有转移酶类性质. β -D-半乳糖苷酶可以

催化乳糖水解生成葡萄糖和半乳糖,还可以催化乳糖水解过程中产生的半乳糖基转移至乳糖等受体

收稿日期 2003-06-16; 修回日期 2003-11-10.

作者简介: 刘建福(1967-),男,河北唐山人,食品科学与工程博士研究生.

万方数据

上,形成低聚半乳糖^[1]。

低聚半乳糖甜度低,对酸、热稳定,水分活度低,具有抗淀粉回生等理化特性^[2];低聚半乳糖还具有非致龋性、非消化性(具有膳食纤维的生理功能)、产热能低、促进双歧杆菌增殖等优异的生理学特性^[3]。因此,低聚半乳糖作为一种新型的功能性食品配料应用前景广阔。

以乳糖为底物,应用 β -D-半乳糖苷酶催化合成低聚半乳糖是工业化生产低聚半乳糖的主要途径^[4,5]。很多种类的细菌、酵母菌、霉菌都产生 β -D-半乳糖苷酶。来源于不同种类的微生物的 β -D-半乳糖苷酶催化乳糖水解和半乳糖基转移反应的活力差异很大^[1]。作者筛选出一株脆壁克鲁维酵母(*Kluyveromyces fragilis*),菌株编号LFS-8611,其产生的 β -D-半乳糖苷酶具有较高的催化半乳糖基转移反应活力。

作者研究了影响脆壁克鲁维酵母(*K. fragilis*)LFS-8611生长和 β -D-半乳糖苷酶合成的摇瓶培养条件,以期大幅度提高 β -D-半乳糖苷酶发酵产量提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌种

脆壁克鲁维酵母(*K. fragilis*)LFS-86.

1.2 培养基与培养条件

1) 发酵培养基(组分 g/L):蛋白胨(F403)10,酵母膏10,乳糖10。初始pH值7.0。

2) 培养条件:摇床转速200 r/min,培养温度25℃,培养时间32 h,250 mL三角瓶装液量20 mL,接种体积分数1.0%。

1.3 粗酶的制备

发酵液经冷冻离心机离心(于2~8℃,4 000 r/min离心10 min)后,弃去上清液得到湿细胞,用0.1 mol/L,pH 7.0的磷酸盐缓冲液制成浓菌悬液,该菌悬液用超声波处理(超声破碎仪的功率为400 W,间歇式工作,破碎时间5 min)后,添加0.2 g/dL的蜗牛酶,40℃恒温,磁力搅拌下作用6 h以充分破碎细胞壁,释放出胞内 β -D-半乳糖苷酶。

1.4 酶活的测定

参照Inge Petzellbauer的方法^[7],并作适当修改。取2 mL质量浓度为250 mg/mL的乳糖溶液(用0.1 mol/L,pH 7.0的磷酸缓冲液溶解)加入试管中,将试管浸入(40±1)℃恒温水浴中预热5 min后,加入40 μ L粗酶液于60℃反应30 min,立即取出,置于沸水浴中灭酶10 min,冷却后取40 μ L反

应液加入含有苯酚(0.22 mmol/L)、葡萄糖氧化酶(400 U)、过氧化物酶(1 000 U)和4-氨基氨基替吡啶(157 μ g/L)的3 mL混合液中,(37±1)℃恒温反应20 min,于分光光度计(波长508 nm)比色。

β -D-半乳糖苷酶1 min催化乳糖水解生成1 μ mol葡萄糖定义为一个酶活力单位。

1.5 生物量的测定

发酵液离心后得到的湿细胞于90℃烘箱中干燥至恒重后,称量干菌体的质量。

2 结果与讨论

2.1 *K. fragilis* LFS-8611 生长和产酶

K. fragilis LFS-8611生长和产酶时间曲线见图1。

脆壁克鲁维酵母(*K. fragilis*)LFS-8611生长曲线呈典型的S型。 β -D-半乳糖苷酶的合成与细胞生长同步,培养8 h后细胞生长进入对数生长期,酶开始大量合成,36 h后进入恒定期,酶的合成停止, β -D-半乳糖苷酶活力达到最大值,为18.82 U/mL。

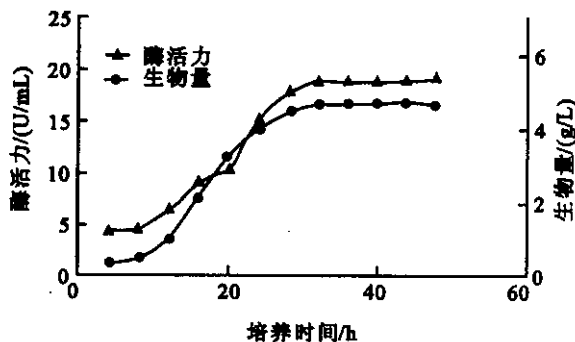


图1 *K. fragilis* LFS-8611生长和产酶曲线

Fig.1 Growth and enzyme production curve for *K. fragilis* LFS-8611

K. fragilis LFS-8611 β -D-半乳糖苷酶活力达到峰值后,继续延长培养时间,酶活力仍维持不变,表明胞内 β -D-半乳糖苷酶稳定性高,不易发生失活或被内源蛋白酶降解。

2.2 碳源

脆壁克鲁维酵母(*K. fragilis*)LFS-8611可利用多种碳源生长及合成 β -D-半乳糖苷酶,但碳源种类对该菌株的生长和产酶有重要影响。以半乳糖为碳源,脆壁克鲁维酵母(*K. fragilis*)LFS-8611生长和产酶效果最好,乳糖、果糖、葡萄糖次之,以鼠李糖、木糖、果胶等为碳源效果最差,见表1。

碳源是菌体细胞组成的原料,也是菌体生长发育必需的能源物质^[8]。脆壁克鲁维酵母(*K. fragilis*)LFS-8611对不同碳水化合物利用能力差异很大的

原因可能是该菌株对不同种类碳源的吸收利用能力不同.

表 1 碳源对 β -D-半乳糖苷酶生长和产酶的影响
Tab.1 Effect of carbon sources on *K. fragilis* LFS-8611 growth and enzyme synthesis

碳 源	酶活力/(U/mL)	生物量/(g/L)
半乳糖	25.64	8.11
乳糖	18.83	7.65
果糖	15.82	8.31
甘油	14.59	7.44
麦芽糖	11.62	7.01
葡萄糖	10.98	7.65
山梨醇	9.22	8.99
木糖	6.68	0.91
果胶	3.02	1.09
鼠李糖	2.80	0.53

培养基的成本约占发酵成本的 70% 左右^[8],同半乳糖相比,乳糖价格低廉,适于作为工业化生产 *K. fragilis* LFS-8611 β -D-半乳糖苷酶的碳源. 因此本试验所用的碳源主要是乳糖.

培养基中乳糖质量浓度对脆壁克鲁维酵母(*K. fragilis*) LFS-8611 细胞生长和 β -D-半乳糖苷酶活力的影响见图 2. 菌体的生物量和 β -D-半乳糖苷酶活力随着培养基中乳糖质量浓度增加而增加,乳糖质量浓度为 12 mg/mL,菌体生物量和酶活力达到最大值,分别为 5.84 g/L 和 19.12 U/mL.

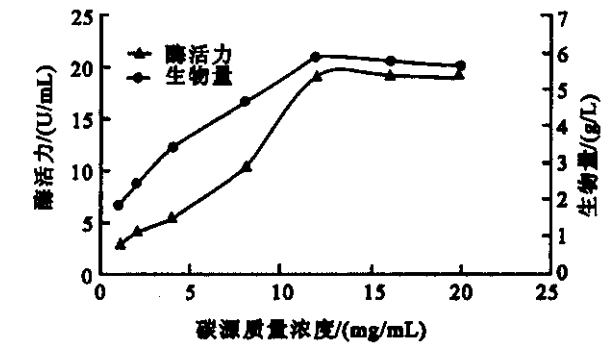


图 2 碳源质量浓度对 *K. fragilis* LFS-8611 生长和产酶的影响
Fig. 2 Effects of carbon sources on *K. fragilis* LFS-8611 growth and enzyme activity

2.3 氮源

脆壁克鲁维酵母(*K. fragilis*) LFS-8611 对各种氮源的利用情况见表 2.

表 2 氮源对 β -D-半乳糖苷酶生长和产酶的影响
Tab.2 Effect of N source

氮 源	酶活力/(U/mL)	生物量/(g/L)
蛋白胨 (F403)	18.94	7.29
胰蛋白胨	16.50	7.72
酵母膏	14.41	5.33
大豆蛋白肽	2.22	0.82
酪蛋白磷酸肽	2.99	1.53
(NH ₄) ₂ SO ₄	—	0.17
NaNO ₃	—	0.15

注:— 未检测到酶活力.

由表 2 可知,脆壁克鲁维酵母(*K. fragilis*) LFS-8611 难以利用无机氮生长和合成 β -D-半乳糖苷酶,它对不同种类的有机氮源利用能力差异很大. 以蛋白胨 F403 为氮源,菌体的生物量最大, β -D-半乳糖苷酶活力最高. 氮源的种类影响脆壁克鲁维酵母(*K. fragilis*) LFS-8611 生长和产酶的原因可能是:(1) 脆壁克鲁维酵母(*K. fragilis*) LFS-8611 对不同种类的无机氮和有机氮的分解和同化能力不同;(2) 某些氮源不含有或缺乏脆壁克鲁维酵母(*K. fragilis*) LFS-8611 生长和 β -D-半乳糖苷酶具有活性所需的生长因子.

以蛋白胨(F403)为氮源,培养基中氮源质量浓度对脆壁克鲁维酵母(*K. fragilis*) LFS-8611 生长和产酶的影响见图 3. 当氮源质量浓度低时,菌体生物量小, β -D-半乳糖苷酶活力低. 当氮源质量浓度为 16 mg/mL 时,生物量和酶活力均达到最大值,分别为 6.06 g/L 和 18.80 U/mL.

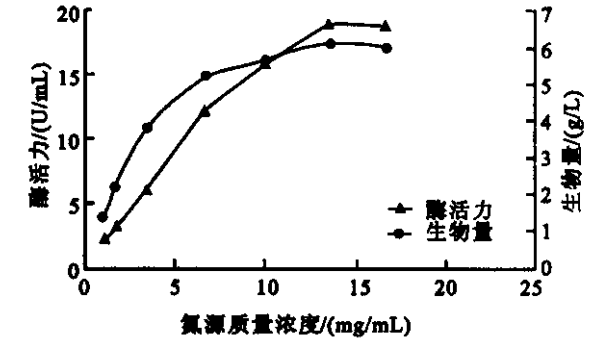


图 3 氮源质量浓度对 *K. fragilis* LFS-8611 生长和产酶的影响
Fig. 3 Effect of N source concentration on *K. fragilis* LFS-8611 growth and enzyme synthesis

2.4 pH 值

发酵培养基的初始 pH 值影响脆壁克鲁维酵母(*K. fragilis*) LFS-8611 生长和 β -D-半乳糖苷酶的合成

成,见图 4. 培养基的初始 pH 值为 4 时,菌体的生物量最小, β -D-半乳糖苷酶活力最低. 随着发酵培养基的初始 pH 值分别增加至 5,6,7 时,菌体的生物量和酶活力逐步增加;pH 值为 7 时,菌体生物量和酶活力达到峰值,分别为 5.02 g/L 和 16.18 U/mL;pH 值为 8 时,菌体生物量和酶活力开始降低.

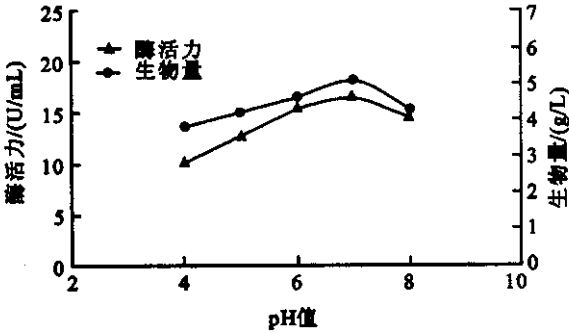


图 4 培养基初始 pH 值对 *K. fragilis* LFS-8611 生长和产酶影响

Fig. 4 Effect of initial pH on *K. fragilis* LFS-8611 growth and enzyme synthesis

pH 值影响底物分子和酶分子的带电状况,从而影响微生物对营养物质的吸收利用和酶的活力,这可能是发酵培养基的初始 pH 值影响脆壁克鲁维酵母(*K. fragilis*) LFS-8611 生长和产酶的原因.

2.5 摇床转速

静止培养(摇床转速为 0)不利于脆壁克鲁维酵母(*K. fragilis* LFS-8611)生长和产酶. 随着摇床转速的增加,菌体生物量和 β -D-半乳糖苷酶活力增加. 转速为 200 r/min 时,生物量和酶活力达到峰值,分别为 5.39 g/L 和 17.68 U/mL,见图 5.

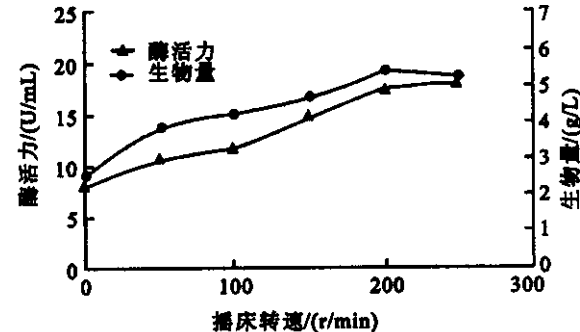


图 5 摇床转速对 *K. fragilis* LFS-8611 生长和产酶影响

Fig. 5 Effect of rotation speed on *K. fragilis* LFS-8611 growth and enzyme synthesis

摇床转速对脆壁克鲁维酵母(*K. fragilis* LFS-8611)生长和产酶的影响可能由于:(1)脆壁克鲁维酵母(*K. fragilis* LFS-8611)属于需氧微生物,摇床转速直接影响发酵培养基中溶解氧的水平;(2)摇床转速影响代谢产物和发酵热的传递^[7].

2.6 发酵过程曲线

以 12 g/L 乳糖为碳源,16 g/L 蛋白胨(F403)为氮源,在最适培养条件下进行发酵,发酵过程曲线见图 6.

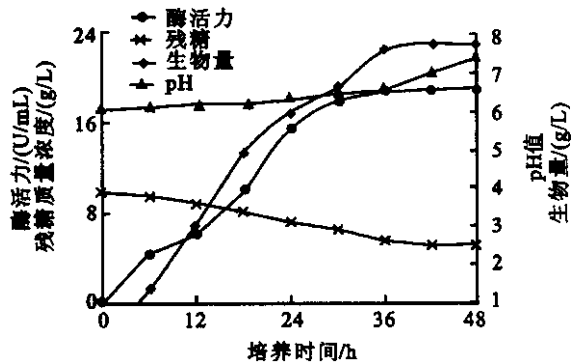


图 6 *K. fragilis* LFS-8611 发酵过程曲线

Fig. 6 Fermentation curve for *K. fragilis* LFS-8611

整个发酵过程中,发酵液的 pH 值呈缓慢上升趋势,培养基中残糖质量浓度不断下降. 培养 8~36 h 时,菌体生物量和 β -D-半乳糖苷酶活力呈线性增加,培养 36 h 后菌体生物量和酶活力分别为 7.56 g/L 和 18.83 U/mL,随后在较长时间内保持恒定.

3 结 论

脆壁克鲁维酵母(*Kluyveromyces fragilis*) LFS-8611 生长和合成 β -D-半乳糖苷酶同步. 该菌株的生长曲线呈典型的 S 型,细胞生长进入对数生长期, β -D-半乳糖苷酶大量合成,细胞生长进入稳定期,酶的合成停止,胞内 β -D-半乳糖苷酶活力达到最高. 脆壁克鲁维酵母(*Kluyveromyces fragilis*) LFS-8611 生长和产酶的最适碳源和氮源分别为半乳糖和蛋白胨 F403,最适培养条件为发酵培养基的初始 pH 值为 7.0,摇床转速为 200 r/min. 培养基中碳源或氮源质量浓度低,菌体生物量小,酶活力低,脆壁克鲁维酵母(*Kluyveromyces fragilis*) LFS-8611 生长和产酶的适宜碳源、氮源质量浓度分别为 12 mg/mL 和 16 mg/mL.

(下转第 93 页)

芽糖释放)。此酶为内切淀粉酶,可以迅速水解糊化淀粉、直链淀粉和支链淀粉内部的 α -1,4 糖苷键,从而生成具有两个葡萄糖单位的麦芽糖^[3]。

3 结 论

麦芽糖底物法应当是检测复合酶中糖化酶活力的首选方法。综合以上 4 种酶制剂的水解方式,并依据糖化酶产生葡萄糖的速度是基于作用底物葡聚糖链的长度,不难看出糖化酶分别与另处 3 种酶制剂复合时,由于它们都能降解淀粉底物,通过协同作用产生葡萄糖,这时候若使用淀粉底物法对复合糖化酶活力进行测定,就出现了结果偏差。当副酶含量过高时,由于淀粉底物葡聚糖链的长度被大大降解,从而降低了糖化酶的进一步酶解速度,产生的葡萄糖含量减少,检测出的糖化酶活力会偏

低。而当副酶含量较少时,产生较多的被部分降解的淀粉底物分子,葡聚糖链的长度适合糖化酶进一步水解底物,生成更多的葡萄糖。因此,检测出的糖化酶活力会偏高。在使用淀粉底物法测定糖化酶活力时,这种干扰是无法避免的。

当使用麦芽糖底物法对复合糖化酶活力测定时,由于麦芽糖底物只能被糖化酶专一分解,即使存在其它副酶,也不会产生葡萄糖,所以不会影响糖化酶活力的检测结果。

以上的实验结果以及原理分析证明了在对复合糖化酶活力的测定时,淀粉底物法存在结果偏差,不能准确反映出真实的糖化酶活力,而麦芽糖底物法由于不受复合糖化酶中副酶活力的影响而成为检测复合糖化酶中糖化酶活力的首选方法。

参考文献：

[1] 张树政. 酶制剂工业(上、下册) [M]. 北京 :科学出版社, 1998.
[2] 郭显章. 酶的工业生产技术 [M]. 长春 :吉林科学技术出版社, 1988.
[3] 魏述众. 生物化学 [M]. 北京 :轻工业出版社, 1996.

(责任编辑 朱 明)

(上接第 85 页)

参考文献：

[1] Raymond R. Mahoney. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis [J]. **Food Chemistry**,1998,63 :147 - 154.
[2] Crittenden R G, Playne M J. Properties and applications of food-grade oligosaccharide [J]. **Trends in Food Science & Technology**,1996,7 :353 - 361.
[3] Hideo Tomomatsu. Health effects of oligosaccharides [J]. **Food Technology**,1994,(10) :51 - 65.
[4] Teruo Nakakuki. Oligosaccharide, Production, Properties and Applications [M]. Japan :Gorden and Breach Science Publisher, 1993. 90 - 96.
[5] Hyun-jac Shin. Continuous production of galacto-oligosaccharide from lactose by *Bullrea singularis* galactosidase immobilized in chitosan beads [J]. **Process Biochemistry**,1998,33(8) :787 - 792.
[6] Demon A L, Davies J E. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology [M]. Washington :ASM Press,1999. 49 - 60.
[7] Inge Petzellbauer, Berend Nidetzky. Development an ultra-high-temperature process for the enzymatic hydrolysis of lactose [J]. **Biotechnology and Bioengineering**,1999,64(3) :322 - 332.
[8] 陈石根,周润琦. 酶学 [M]. 上海 :复旦大学出版社,2001.

(责任编辑 李春丽)