

微生物源菊粉酶的研究进展

宫颖¹, 于基成^{1*}, 刘秋¹, 陈娇^{1,2}, 于春^{1,2}

(1. 大连民族学院生命科学学院, 大连 116600; 2. 沈阳农业大学食品学院, 沈阳 110161)

摘要: 菊粉是由果糖分子经 β -2,1 糖苷键连接形成的多聚果糖, 是一种存在于菊芋和菊苣等植物中的天然碳水化合物。作为新资源食品和食品原料, 其研究已备受国内外关注。而以菊粉开发系列的功能性食品发展迅速。菊粉酶是一种能水解菊粉中 β -2,1 果糖苷键的一类水解酶, 主要为真菌、酵母菌和细菌等微生物发酵产物, 是以菊粉生产高纯度果糖浆、低聚果糖的关键酶。微生物源菊粉酶在食品、医药等领域中的重要应用价值和良好应用前景越来越成为研究者的研究热点。本文综述了近年来国内外微生物源菊粉酶的研究现状, 主要论述了产酶微生物菌株的筛选、产酶条件、工程菌株的构建及应用等研究的进展。

关键词: 菊粉酶; 微生物; 酶活; 低聚果糖

Research advance on inulinase produced by microorganism

GONG Ying¹, YU Ji-Cheng^{1*}, LIU Qiu¹, CHEN Jiao^{1,2}, YU Chun^{1,2}

(1. College of Life Science, Dalian Nationalities, Dalian 116600, China; 2. College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

ABSTRACT: Inulin exists as a reserved carbohydrate in the roots and tubers of plants such as Jerusalem artichoke, chicory and so on. It consists of linear chains of β -2,1-linked D-fructofuranose molecules terminated by a glucose residue. As a kind of new resource food or food material, the research on inulin has been paid more attentions. Inulinase is a key enzyme coming from fungi, yeast and bacteria. It targets the β -2,1 linkage of inulin and hydrolyzes it into fructose and fructooligosaccharides. Inulinase deriving from microorganism has been taken more and more attentions by researchers because of its important value and good prospect of application in food and medicine fields. The development of inulinase produced by microorganisms is reviewed in recent years, including microorganism producing inulinase isolated, enzyme producing conditions, construction of engineering strain and its application.

KEY WORDS: inulinase; microorganism; enzyme activity; fructooligosaccharides

1 引言

菊粉又称菊糖, 是由 D-呋喃果糖分子经 β -2,1 糖苷键脱水聚合而成的线性直链多糖, 其还原端含有一个葡萄糖

残基, 呈直链结构, 聚合度通常在 2~60, 平均聚合度为 30 左右, 分子量为 3000~5000 碳单位, 是一种功能性果聚糖, 同时也是最易溶解的水溶性膳食纤维。菊粉在自然界中的分布十分广泛, 某些真菌和细菌中都含有菊粉, 但其主要

基金项目: 国家自然科学基金(31270057, 31311140255)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (31270057, 31311140255)

*通讯作者: 于基成, 教授, 硕士生导师, 主要研究方向为功能微生物及其应用研究。E-mail: yujc@dlnu.edu.cn

*Corresponding author: YU Ji-Cheng, Professor, College of Life Science, Dalian Nationalities University, Dalian 116600, China. E-mail: yujc@dlnu.edu.cn

来源是植物, 如菊芋(亦称洋姜, *helianthus tuberosus*)、菊苣(*chicory*)、大丽花(*dahlia pinnata*)、牛蒡(*arctium lappa*)等^[1]。

菊粉酶(Inulinase), 学名为 β -2,1-*D*-果聚糖酶, 又称 β -果聚糖酶, 属于糖基水解酶 32 家族 (glycosyl hydrolases family 32)^[2], 广泛存在于微生物和植物中。按照菊粉酶对底物作用方式的不同可将其分为内切菊粉酶 (endoinulinase, EC 3.2.1.7)^[3] 和外切菊粉酶 (exoinulinase, EC 3.2.1.80)^[4] 两类。内切菊粉酶可随机地将菊粉链内部的糖苷键断开, 水解产物主要为低聚果糖^[5]。低聚果糖是一种功能性果聚糖, 具有调节肠道内的菌群, 增殖双歧杆菌, 促进钙吸收及增强免疫力生理功能^[4]。外切菊粉酶作用于菊粉链的非还原性末端的糖苷键上, 逐一水解释放出果糖^[6]。本文从产菊粉酶微生物菌株的筛选、产酶条件及应用等方面进行论述, 以期对微生物菊粉酶的相关研究总结经验。

2 菊粉酶的来源

目前报道, 产菊粉酶的微生物有丝状真菌 17 个属 40 余种, 酵母菌 10 个属 20 余种, 细菌 12 个属 10 余种^[7]。主要包括: 青霉属 (*Penicillium* sp.)、曲霉属 (*Aspergillus* sp.)、克鲁维酵母菌属 (*Kluyveromyces* sp.)、海洋酵母菌 (*Pichia guilliermondii*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.)、产微球茎菌 (*Microbulbifer*)、链霉菌属 (*Streptomyces* sp.)。其中 *Aspergillus* sp.、*Penicillium* sp. 及 *Kluyveromyces* sp. 研究较多也较为深入, 而产菊粉酶的细菌报道较少, 仅有芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.) 和假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.)。关于放线菌则仅有链霉菌属 (*Streptomyces* sp.), 如 *Streptomyces* sp. CP01 (1.6 U/mL), *Streptomyces* sp. ALKC4 (0.524 U/mL) 和 *Streptomyces* sp. GNDU 1 (0.552 U/mL)^[8-10]。

3 产菊粉酶微生物菌株的筛选

一般传统产菊粉酶微生物菌株的筛选主要是选用腐烂的菊芋或菊苣根部的土壤, 在以菊粉为唯一碳源的选择性培养基上进行分离纯化。Paixão 等^[11]描述了从菊芋块根处得到产菊粉酶酵母菌的分离过程, 将菊芋块根捣碎后的上清液涂布于以 0.5% 酵母膏和 0.85% 菊粉为分离培养基上, 25 °C 培养。烟曲霉 *Aspergillus fumigatus* A-6 也是从菊芋根际土壤中筛选得到的, 通过产酶条件优化, 确定了烟曲霉 *Aspergillus fumigatus* A-6 最佳产酶条件为菊芋提取液 10%, 酵母膏 2.5%, NaCl 为 0.5%, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.5%, 最高酶活力为 13.29 U/mL^[12]。也有研究者从其他环境中筛选获得产菊粉酶微生物菌株, *Aspergillus terreus* 即为从腐烂的木头中获得^[13], Germ 等^[14]则从大丽花根际的土壤中利用 IB 培养基筛选出产菊粉酶的 16 株真菌和 3 株细菌。

近来一些研究者开始转向海洋环境开发产菊粉酶的微生物菌株。与陆生微生物相比, 海洋环境以高盐、高压、

低温和寡营养为特征。海洋微生物长期适应复杂的海洋环境而生存, 因而具有嗜盐性、嗜压性、嗜冷性和低营养等独特性质。Kobayashi 等^[15]从深海中筛选出产内切菊粉酶的产微球茎菌属 (*Microbulbifer*) 菌株; 菌株 *Marinimicrobium* sp. LS-A18^[16]则是采用以菊粉为唯一碳源的培养基从黄海海泥中分离获得, 最高酶活为 14.6 U/mL。Yu 等^[17]从海洋采集的样品中分离得到产菊粉酶海洋酵母菌 *Pichia guilliermondii*, 并利用响应面法优化其产酶发酵条件, 在含有 2% 菊粉的培养基中得到最大酶活为 127.7 U/mL。研究表明海洋微生物用海水培养比淡水培养酶活力更好, 全球有 71% 的海洋区域, 如果海洋微生物能够作为工业酶制剂的生产原料, 那么大规模的工业发酵则可节约大量的淡水资源^[18], 这对于绿色生产具有潜在的应用前景。

4 产菊粉酶工程菌株构建

由于筛选出来的野生菌株酶活力较低, 因此通过对现有菌种进行诱变、基因克隆和高效表达, 以期得到高效且稳定性好的工业化菊粉酶生产菌株, 是目前微生物源菊粉酶研究的另一热点。物理和化学诱变是常用技术之一, 菌株 *Pichia guilliermondii* 经紫外和 LiCl 诱变后, 突变体酶活可达 129.8 U/mL, 比原始菌株提高了 6 倍^[17]。Laloux 等^[19]首次从 *Kluyveromyces marxianus* 中克隆获得外切菊粉酶基因 INU1, 建立了菊粉酶基因文库, 开启了菊粉酶分子生物学的研究。Zhang 等^[20]克隆 *Pichia guilliermondii* 菊粉酶基因 INU1 并在毕赤酵母中表达, 发酵后重组体酶活达 286.8 U/mL。从 *Aspergillus ficuum* 中克隆出内切菊粉酶基因 INU2, 表达至毕赤酵母 X-33 中, 重组体酶活高达 1212 U/mL^[11]。因此, 随着基因工程技术的不断发展, 通过菊粉酶表达基因的克隆, 构建重组质粒在工程菌中表达的研究必将越来越受到研究者关注, 这也将推动菊粉酶工业化生产的进程。

5 不同条件对微生物菊粉酶的影响

5.1 碳源对产酶的影响

通常认为菊粉酶是一种诱导酶, 许多研究是以含菊粉的植物(菊芋、菊苣、牛蒡等)为碳源对菌株进行产菊粉酶诱导。Laowklom 等^[8]利用菊芋块根提取出来的 1% 菊粉为碳源, 使菌株 *Streptomyces* sp. CP01 产菊粉酶活力达到 0.85 U/mL, 比以商品菊粉为碳源时酶活(0.55 U/mL)提高了 3.5 倍。而不同碳源对菌株产酶活力的影响也不相同, 刘兆明等^[21]曾考察了菊芋汁、菊粉、葡萄糖、果糖、蔗糖和乳糖时对黑曲霉 (*Aspergillus niger*) A24 诱变菌株产酶活力的影响, 发现葡萄糖、果糖为碳源时酶活力较低, 而菊芋汁则可提高酶活力。这可能是因为菊芋中不但有含量较高的菊粉, 还含有许多粗纤维、其他碳水化合物和一些矿物

质的离子, 这些物质都为菊粉酶的产生提供了其他的营养物质。

此外, 由于选用含有菊粉的植物或农副产品生产菊粉酶的成本相对较低, 而且对菊粉酶有很高的诱导作用, 这对菊粉酶的商业化生产有着重要的意义。因此, 许多研究者开始利用低成本的农作物或农产品废弃物作为诱导物进行菊粉酶的研究。Mazutti 等^[22]利用甘蔗渣和玉米浆为碳源, 通过对菌株 *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 进行液态发酵培养, 并利用响应曲面法优化了其发酵条件, 使其产酶活力达到 391.9 U/g。通过研究香蕉皮、大蒜皮、麦麸和米糠对 *Aspergillus niger* 产菊粉酶活力的影响, 结果发现香蕉皮可使 *Aspergillus niger* 酶活力达到 237 U/g^[23]。也有人比较了相同条件下, 菊苣、大蒜、大丽花、洋葱、香蕉、小麦、黑麦、大麦和粗菊粉为碳源时对菌株 *Streptomyces* sp. ALKC4 产酶活力的影响, 发现黑麦、大麦、香蕉、小麦、洋葱、菊苣与粗菊粉产酶活力相近, 而大蒜可使菌株酶活力最高, 是以粗菊粉为碳源时酶活的 1.6 倍^[9]。

5.2 氮源对产酶的影响

氮源是培养基的重要成分之一, 有机氮源和无机氮源对微生物产酶影响有显著差异。曹泽虹等^[24]在比较有机氮源和无机氮源对微生物产酶影响时发现, 酵母膏、蛋白胨、牛肉膏作为发酵氮源时, 酵母膏产酶活力最高。这一结果与酵母菌 *Pichia guilliermondii* Pcl22 产菊粉酶时所选用的氮源相一致^[25], 这可能是因为酵母膏是微生物生长的优良营养因子的原因。许多研究也同时表明, 在有机氮源中, 酵母膏最适合微生物产菊粉酶^[11,12,17,27]。无机氮源中 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、 NH_4Cl 、 NH_4NO_3 都能促进产酶量的提高, 但其中以 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 获得酶活力最高。其次为 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 这可能是因为 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 和 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 中含有氮磷元素, 在为微生物生长提供氮源的同时, 也提供了一定的磷源, 从而促进了菌体的生长和酶的产量。

5.3 pH 对产酶的影响

pH 是影响微生物生长代谢的主要因素, 产菊粉酶的不同微生物种属的适宜 pH 范围略有差异。研究表明, 大多数微生物菊粉酶产生菌的适宜 pH 为 4.0~6.0。如酵母菌 *Kluyveromyces marxianus* 适宜 pH 为 4.0^[26], 丝核菌 *Rhizoctonia* sp. 为 5.5^[27], 青霉 *Penicillium* 为 6.0^[28], 曲霉 *Aspergillus* sp. 为 3.4~5.3^[29], 尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* 为 4.0~5.5^[8], 链霉菌 *Streptomyces* sp. ALKC4 为 5.0^[9]。这可能与菊粉酶最适 pH 范围为微酸性有关, 在此 pH 范围菊粉酶活性高, 可酶解菊粉获得葡萄糖、果糖等菌体生长营养。一般认为菊粉酶最适 pH 为 6.0^[30]。

5.4 培养时间对产酶的影响

不同菌株的产菊粉酶的最大酶活出现时间也有所不

同。Onilud 等^[31]研究发现酵母菌属在 72 h 出现最大菊粉酶活力, 之后产酶活力开始下降。Sharma 等^[9]详细研究了链霉菌产菊粉酶与培养时间的关系, 最大酶活出现在 48 h, 48 h 以内产酶活力较低可能是由于链霉菌生长未进入对数生长期; 48 h 后菊粉酶的产量和酶活开始下降, 则是由于生物体进入生长稳定期, 没有了代谢活性, 随着时间的增加, 培养基营养消耗殆尽或是菌体分解的次级代谢产物抑制了菊粉酶的产量^[9]。由此可见, 培养时间对菊粉酶产量影响较为显著的原因主要与微生物种属生长特性有关, 选择适宜培养时间是获得高活力菊粉酶的关键。

5.5 培养温度对产酶活力的影响

温度是影响微生物生长繁殖的另一重要因素。不同菌体生长及产酶的最适温度有所差异。克鲁维酵母菌 *Kluyveromyces* sp. 的最适产酶温度的范围为 30~33 °C^[32], *Pichia guilliermondii* 最适产菊粉酶温度为 30 °C^[33], 青霉 *Penicillium* sp. 最适生长与产酶温度范围为 27~33 °C^[34], 而链霉菌为 28 °C^[8]。温度过低不利于菌体生长, 温度过高则抑制菌体生长使产酶量降低。目前, 也有研究人员发现产菊粉酶的耐高温菌株, 比如马克斯克鲁维氏酵母菌的产酶最佳温度高达 55 °C, 耐热芽孢杆菌(*Bacillus Smithii*)的最适生长温度为 50 °C^[35]。

5.6 转速对产酶活力的影响

转速对微生物菌株产菊粉酶的作用主要表现在通氧量和剪切力的影响。转速过低通氧量减少, 不利于菌体的生长, 但过高的转速又使菌体生长过快而使产酶量下降。同时, 过高的转速还会使剪切力增大而使细胞致死, 影响其菊粉酶的产生。一般转速在 200 r/min 左右时产酶活力最大, 链霉菌 *Streptomyces* sp. ALKC4^[10]和耐热细菌 *Bacillus smithii* T7^[35]在转速为 200 r/min 下均可获得最大酶活力。Li 等^[16]采用 210 r/min 对 *Marinimicrobium* sp. LS-A18 进行研究, 而 *Aspergillus niger* X-6^[36]和 *Pichia guilliermondii*^[37]在较低的转速下(分别为 160 r/min 和 170 r/min)才有利于菌体的生长, 菊粉酶活力可分别达到 14.6 U/mL 和 61.6 U/mL。

6 菊粉酶的应用

6.1 利用外切菊粉酶生产高果糖浆

由于高果糖浆具有甜、脆且热量低, 不容易引起龋齿和适宜糖尿病患者食用的特点, 同时因其还具有高渗透压, 保藏效果好的特性, 现已被美、日等国家作为主要的甜味剂, 广泛用于食品和医药行业。以菊粉为原料, 可分别利用酸法和酶法制备果糖。用酸法制备的果糖产量虽高, 但副产物(葡萄糖和蔗糖)多, 色素重, 分离较困难, 难以进行后续精制操作。而利用外切菊粉酶制备果糖, 不仅生产工艺简单, 转化率高, 而且果糖纯且产量高, 果糖含量可高达

90%~95%^[38]。因此, 外切菊粉酶在生产果糖及高果糖浆的工业应用上潜力巨大。

目前, 国内外利用外切菊粉酶生产高果糖浆的研究较多。黑曲霉 *Aspergillus niger* 817^[39]的突变体在 50 ℃、pH5.0 条件下水解菊粉, 果糖的转化率达 97%。克鲁维酵母菌野生菌所产菊粉酶水解菊粉生产的果糖含量达 84.8%。而 *Asparagus racemosus* 产菊粉酶水解菊粉后高果糖浆的含量也达到 86%以上^[40]。

6.2 利用内切菊粉酶生产低聚果糖

低聚果糖是由 1~4 个果糖基连接组成的, 通常是以 β -2,1 糖苷键连接在蔗糖的 D-果糖基上形成的蔗果三糖(GF2)、蔗果四糖(GF3)、蔗果五糖(GF4)及其混合物。低聚果糖是一种良好的水溶性膳食纤维和双歧因子, 同时也适于糖尿病人群食用。工业上主要是利用内切菊粉酶随机的断裂菊粉链内部的糖苷键生成低聚果糖, 此法不仅产物纯度高, 而且生产过程易于控制。纯度高的低聚果糖热能低, 适用于特殊及肥胖人群, 而高纯度低聚果糖的低吸湿性又可用于制作粉剂及颗粒, 在工业上的适用范围更广泛。基于此, 国内外研究者越来越关注于应用内切菊粉酶生产低聚果糖。黑曲霉 *Aspergillus niger*^[41]所产内切菊粉酶通过一步法水解菊粉生产低聚果糖产率可达 30.5%。*Wickerhamomyces Anomala* XS1^[42]通过细胞固定化后可得到 80%的低聚果糖。

6.3 利用菊粉酶生产酒精

利用菊粉酶降解菊芋粗提液发酵生产的酒精, 几乎能将菊芋粗提液发酵完全, 且不需要再添加其他的营养成分, 酒精产量可达 96%^[43]。Zhang 等^[44]利用酵母菌 *Saccharomyces* sp. W0 发酵菊芋生产高纯度的酒精, 120 h 产量可达 98%, 这些研究为酒精生产提供了新途径。

7 结 语

随着产菊粉酶微生物菌株资源不断开发和丰富, 以及以基因工程技术为手段的工程菌株的构建的研究深入, 通过菌株产酶发酵工艺的优化, 将极大促进以提高菊粉酶产量和活性为目的商业化生产的发展。进一步拓展菊粉在食品、医药等领域的应用范围, 特别是对促进低聚果糖产业及低热能值、低脂肪的功能性食品产业的发展有着重要的经济和社会意义。

参考文献

- [1] Zhang S, Yang F, Wang Q, *et al.* High-level secretory expression and characterization of the recombinant *Kluyveromyces marxianus* inulinase [J]. *Process Biochem*, 2012, 47(1): 151–155.
- [2] Pons T, Olmea O, China G, *et al.* Structural model for family 32 of glycosyl-hydrolase enzymes [J]. *Proteins*, 1998, 33(3): 383–395.
- [3] Li Y, Liu GL, Chi ZM. Ethanol production from inulin and unsterilized meal of Jerusalem artichoke tubers by *Saccharomyces* sp. W0 expressing the endo-inulinase gene from *Arthrobacter* sp. [J]. *Bioresource Technol*, 2013, 147(21): 254–259.
- [4] Sharma AD, Gill PK. Purification and characterization of heat-stable exo-inulinase from *Streptomyces* sp. [J]. *J Food Eng*, 2007, 79(4): 1172–1178.
- [5] Mussatto SI, Rodrigues LR, Teixeira JA. Beta-fructofuranosidase production by repeated batch fermentation with immobilized *Aspergillus japonicus* [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2009, 36(7): 923–928.
- [6] Dao TH, Zhang J, Bao J. Characterization of inulin hydrolyzing enzyme(s) in commercial glucoamylases and its application in lactic acid production from Jerusalem artichoke tubers (Jat) [J]. *Bioresource Technol*, 2013, 148(22): 157–162.
- [7] Wang JH, Liu YY, Yao B, *et al.* A study on screening and high density cell cultivation of a yeast strain *Kluyveromyces* with high inulinase yielding and its enzymology properties [J]. *Chin Academy Agric Sci*, 2000, 16(1): 60–64.
- [8] Laowklong N, Chantanaphan R, Pinphanichakarn P. Production, Purification and Characterization of Inulinase from a Newly Isolated *Streptomyces* sp. CP01 [J]. *Nat Resour*, 2012, 3(3): 137–144.
- [9] Sharma AD, Kainth S, Gill PK. Inulinase production using garlic (*Allium sativum*) powder as a potential substrate in *Streptomyces* sp. [J]. *J Food Eng*, 2006, 77(3): 486–491.
- [10] Gill PK, Sharma AD, Harchand PK, *et al.* Effect of media supplements and culture conditions on inulinase production by an actinomycete strain [J]. *Bioresource Technol*, 2003, 87(3): 359–362.
- [11] Paixão SM, Teixeira PD, Silva TP, *et al.* Screening of novel yeast inulinases and further application to bioprocesses [J]. *New Biotechnol*, 2013, 30(6): 598–606.
- [12] 黄玉玲, 王桂峰, 隆小华, 等. 产菊粉酶菌株的筛选及产酶条件优化[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(21): 160–163.
- [12] Huang YL, Wang GF, Long XH, *et al.* Screening of inulinase production strain and optimization of fermentation condition [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2012, 33(21): 160–163.
- [13] AbdElAty AA, Wehaidy HR, Mostafa FA. Optimization of inulinase production from low cost substrates using Plackett-Burman and Taguchi methods [J]. *Carbohydr Polym*, 2014, 102(2): 261–268.
- [14] Gern RM, Furlan SA, Ninow JL, *et al.* Screening for microorganisms that produce only endo-inulinase [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 55(5): 632–635.
- [15] Kobayashi T, Uchimura K, Deguchi S, *et al.* Cloning and sequencing of inulinase and fructofuranosidase genes of a deep-sea microbulbifer species and properties of recombinant enzymes [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78(7): 2493–2495.
- [16] Li AX, Li ZG, Lu WD, *et al.* Alkaline inulinase production by a newly isolated bacterium *Marinimicrobium* sp. LS-A18 and inulin hydrolysis by the enzyme [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2012, 28(1): 81–89.
- [17] Yu X, Guo N, Chi Z, *et al.* Inulinase overproduction by a mutant of the marine yeast *Pichia guilliermondii* using surface response methodology and inulin hydrolysis [J]. *Biochem Eng J*, 2009, 43(3): 266–271.
- [18] Chi Z, Chi Z, Zhang T, *et al.* Production, characterization and gene cloning of the extracellular enzymes from the marine-derived yeasts and their potential applications [J]. *Biotechnol Adv*, 2009, 27(3): 236–255.

- [19] Laloux O, Cassart J, Delcour J, *et al.* Cloning and sequencing of the inulinase gene of *Kluyveromyces marxianus* var. *Marxianus* ATCC 12424 [J]. Federation European Biochem Societies, 1991, 289(1): 64–68.
- [20] Zhang T, Gong F, Peng Y, *et al.* Optimization for high-level expression of the *Pichia guilliermondii* recombinant inulinase in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant inulinase [J]. Process Biochem, 2009, 44(12): 1335–1339.
- [21] 刘兆明, 蒋继志, 王东方. 菊粉酶酶源诱变菌株产酶发酵条件的优化[J]. 现代农业科技, 2011, 42(2): 42–43.
- Liu ZM, Jiang JZ, Wang DF. Optimization of fermentation conditions for mutant strains of inulinase-producing[J]. Mod Agric Sci Technol, 2011, 42(2): 42–43.
- [22] Mazutti M, Bender JP, Treichel H, *et al.* Optimization of inulinase production by solid-state fermentation using sugarcane bagasse as substrate [J]. Enzyme Microbial Technol, 2006, 39(1): 56–59.
- [23] Narayanan M, Srinivasan B, Gayathiri A, *et al.* Studies on the optimization and characterization for the biosynthesis of Inulinase under solid state fermentation [J]. Int J Chem Technol Res, 2013, 5(1): 376–384.
- [24] 曹泽虹, 秦卫东, 李超, 等. 响应面法优化内切型菊粉酶发酵生产培养基[J]. 食品科学, 2013, 34(13): 186–192.
- Cao ZH, Qin WD, Li C, *et al.* Optimization of fermentation medium for endoinulinase production by response surface analysis [J]. Food Sci, 2013, 34(13): 186–192.
- [25] Wang GY, Chi Z, Song B, *et al.* High level lipid production by a novel inulinase-producing yeast *Pichia guilliermondii* Pcl22 [J]. Bioresource Technol, 2012, 124(22): 77–82.
- [26] Jain SC, Jain PC, Kango N. Production of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* using dahlia tuber extract [J]. Brazilian J Microbiol, 2012, 43(1): 62–69.
- [27] Neagu BC, Constantin O, Bahrim G. Increase in extracellular inulinase production for a new *Rhizoctonia* ssp. strain by using buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) flour as a single carbon source [J]. Letters Applied Microbiol, 2012, 55(3): 195–201.
- [28] Mansouri S, Houbraken J, Samson RA, *et al.* *Penicillium subrubescens*, a new species efficiently producing inulinase [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2013, 103(6): 1343–1357.
- [29] Silva AC, Queiroz AESF, Porto TS, *et al.* Partial characterization of an inulinase produced by *Aspergillus japonicus* URM5633 [J]. Brazilian Archives Bio Technol, 2012, 55(5): 671–676.
- [30] Pandey A, Soccol CR, Selvakumar P, *et al.* Recent developments in microbial inulinases [J]. Applied Biochem Biotechnol, 1999, 81(1): 35–52.
- [31] Onilude AA, Fadaunsi IF, Garuba EO. Inulinase production by *Saccharomyces* sp. in solid state fermentation using wheat bran as substrate [J]. Annals Microbiol, 2012, 62(2): 843–848.
- [32] Singh RS, Sooch BS, Puri M. Optimization of medium and process parameters for the production of inulinase from a newly isolated *Kluyveromyces marxianus* YS-1 [J]. Bioresource Technol, 2007, 98(13): 2518–2525.
- [33] Guo N, Gong F, Chi Z, *et al.* Enhanced inulinase production in solid state fermentation by a mutant of the marine yeast *Pichia guilliermondii* using surface response methodology and inulin hydrolysis [J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2009, 36(4): 499–507.
- [34] Fernandes VS, Rosa M, Jiang B. Fungal inulinases as potential enzymes for application in the food industry[J]. Advance J Food Sci Technol, 2013, 5(8): 1031–1042.
- [35] Gao W, Bao Y, Liu Y, *et al.* Characterization of thermo-stable endoinulinase from a new strain *Bacillus smithii*T7 [J]. Applied Biochem Biotechnol, 2009, 157(3): 498–506.
- [36] Luo D, Yuan H, Liu J, *et al.* Effect of ultrasound irradiation on *Aspergillus niger* X-6 fermentation for producing inulinase [J]. Adv Biomed Eng, 2011, 1(2): 62–65.
- [37] Gong F, Sheng J, Chi Z, *et al.* Inulinase production by a marine yeast *Pichia guilliermondii* and inulin hydrolysis by the crude inulinase [J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2007, 34(3): 179–185.
- [38] Chen HQ, Chen XM, Chen TX, *et al.* Optimization of solid-state medium for the production of inulinase by *Aspergillus ficuum* JNSP5-06 using response surface methodology [J]. Carbohydr Polym, 2011, 86(1): 249–254.
- [39] Nakamura T, Ogata Y, Shitara A, *et al.* Continuous production of fructose syrups from inulin by immobilized inulinase from *Aspergillus niger* mutant 817 [J]. J Ferment Bioeng, 1995, 80(2): 164–169.
- [40] Chi Z, Chi Z, Zhang T, *et al.* Inulinase-expressing microorganisms and applications of inulinases [J]. Applied Microbiol Biotechnol, 2009, 82(2): 211–220.
- [41] Tian F, Karboune S, Hill A. Synthesis of fructooligosaccharides and *Oligos levans* by the combined use of levansucrase and endo-inulinase in one-step bi-enzymatic system [J]. Innovative Food Sci Emerging Technol, 2014, 22(2): 230–238.
- [42] Lu LL, Wu J, Song DY, *et al.* Purification of fructooligosaccharides by immobilized yeast cells and identification of ethyl β -D-fructofuranoside as a novel glycoside formed during the process [J]. Bioresource Technol, 2013, 132(6): 365–369.
- [43] Szambelan K, Nowak J, Czamecki Z. Use of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed with *Kluyveromyces fragilis* for improved ethanol production from Jerusalem artichoke tubers [J]. Biotechnol Letters, 2004, 26(10): 845–848.
- [44] Zhang T, Chi Z, Zhao CH, *et al.* Bioethanol production from hydrolysates of inulin and the tuber meal of Jerusalem artichoke by *Saccharomyces* sp. W0 [J]. Bioresource Technol, 2010, 101(21): 8166–8170.

(责任编辑: 邓伟)

作者简介



于基成, 博士, 教授, 主要研究方向为功能微生物及其应用研究。
E-mail: yujc@dlnu.edu.cn



宫颖, 硕士研究生, 主要研究方向为食品加工与质量安全控制。
E-mail: gongying501@163.com