齐鲁工业大学学报 第40卷 第5期 2026年10月出版
JOURNAL OF QILU UNIVERSITY OF TECHNOLOGY Vol.40 No.5 Oct.2026
DOI:10.16442/j.cnki.qlgydxxb.2026.05.006 【食品与生物工程】

马克思克鲁维酵母高产β-葡萄糖苷酶菌株的构建及发酵条件优化

史志敏,李忠海*
齐鲁工业大学(山东省科学院) 生物工程学部,山东 济南 250353

摘要:化石能源大规模开采利用引发全球变暖与能源枯竭等危机,催生了以木质纤维素为代表的可再生资源向清洁能源转化的相关研究。β-葡萄糖苷酶作为木质纤维素酶解转化的关键限速酶,其产酶成本高昂、催化活性不足等瓶颈,严重制约了木质纤维素能源转化的产业化进程;而现有工业产酶菌株普遍存在发酵周期长、环境耐受性差及易受副产物抑制等缺陷。马克思克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)因具备耐高温、生长速率快、碳源利用广泛及高效蛋白分泌系统等优势,是构建纤维素降解工程菌株的理想底盘微生物。本实验室从藏灵菇中筛选出一株马克斯克鲁维酵母KM-502,并将来源于黑曲霉(*Aspergillus niger*)的*Bgl1*基因转入菌株KM-502中,获得重组菌株KM*Bgl1*。通过单因素实验分别探究了碳源、氮源、无机盐种类和添加质量分数,菌株接种量、培养基装液量以及发酵时间对KM*Bgl1*产Bgl1酶活的影响,并结合Box-Behnken中心组合实验对发酵培养基组分和培养条件进行了优化。结果表明,蔗糖添加质量分数为7.3%、牛肉膏添加质量分数为3%、KH_2PO_4添加质量分数为0.13%,接种量为2%、装液量为21%和发酵时间为34 h时为产Bgl1酶的最佳条件。KM*Bgl1*在优化发酵条件下Bgl1的酶活是优化前的6.73倍,是出发菌株KM-502在初始培养条件下的17.74倍。本研究显著提高了菌株的β-葡萄糖苷酶表达水平,为木质纤维素能源转化领域的工业级工程菌株构建及发酵工艺参数优化提供了重要理论支撑与实验参考。

关键词:马克斯克鲁维酵母;β-葡萄糖苷酶;发酵条件优化;木质纤维素;Box-Behnken设计
中图分类号:Q819 **文献标志码**:A **文章编号**:2097-2792(2026)05-49-11

Construction of a high-yield β-glucosidase strain of *Kluyveromyces marxianus* and optimization of fermentation conditions

SHI Zhimin, LI Zhonghai*
School of Bioengineering, Qilu University of Technology
(Shandong Academy of Sciences), Jinan 250353, China

Abstract: The large-scale exploitation and utilization of fossil energy have exerted profound impacts, triggering crises such as global warming and fossil energy depletion. This scenario has thereby spurred in-depth research on the conversion of renewable resources with lignocellulose as a typical representative into clean energy. As a pivotal rate-limiting enzyme in the enzymatic hydrolysis and conversion of lignocellulose, β-glucosidase is confronted with bottlenecks including exorbitant enzyme production costs and inadequate catalytic activity, which severely impede the industrialization progress of lignocellulosic energy conversion. Furthermore, existing industrial enzyme-producing

收稿日期:2025-11-13 **网络出版时间**:2026-10-31
作者简介:史志敏,硕士生;研究方向:酵母表达系统的构建及其应用
* **通信作者**:李忠海,博士、副教授;研究方向:丝状真菌纤维素酶表达调控机制研究及产酶高活性菌株构建,酵母菌外源蛋白高产菌株构建及应用,食、药用菌种的筛选、推广应用、种植示范;lzhlzh@vip.126.com

strains are universally plagued by inherent drawbacks, such as prolonged fermentation cycles, poor environmental tolerance, and high susceptibility to by-product inhibition. *Kluyveromyces marxianus*, characterized by its prominent advantages of thermotolerance, rapid growth rate, broad carbon source utilization spectrum, and efficient protein secretion system, stands out as an ideal chassis microorganism for constructing cellulose-degrading engineering strains. In this study, a strain of K. *marxianus* KM-502 was isolated from self-preserved kefir, and the β-glucosidase derived from *Aspergillus niger* was transferred into strain KM-502 to obtain strain KM*Bgl1*. Single-factor experiments were conducted to investigate the effects of types and addition amounts of carbon sources, nitrogen sources, and inorganic salts, as well as strain inoculum size, medium loading volume, and fermentation time on Bgl1 activity. Combined with the Box-Behnken central composite experiment, the fermentation medium components and culture conditions were optimized. The results showed that the optimal enzyme production conditions were as follows: sucrose addition of 7.3%, beef extract addition of 3%, KH_2PO_4 addition of 0.13%, inoculum size of 2%, medium loading volume of 21%, and fermentation time of 34 h. Under the optimized fermentation conditions, the Bgl1 activity of KM*Bgl1* was 6.73 times that before optimization and 17.74 times that of the original strain KM-502 under initial culture conditions. This study significantly enhanced the β-glucosidase expression level of the strain, providing crucial theoretical support and experimental references for the construction of industrial-grade engineering strains and the optimization of fermentation process parameters in the field of lignocellulosic energy conversion.

Key words: *Kluyveromyces marxianus*; β-Glucosidas; fermentation condition optimizatio; lignocellulose; Box-Behnken Design

自工业革命以来,化石能源大规模地开采和利用推动了经济的快速发展,提高了人们的生活水平,但也造成了全球变暖、化石能源日渐枯竭等一系列问题。寻找绿色、安全、可持续利用的新能源迫在眉睫。木质纤维素广泛存在于木材、农作物秸秆和林业剩余物中,是自然界中最为丰富的可再生资源[1-2]。通过酶解和发酵技术可将木质纤维素转化为乙醇等清洁能源,对木质纤维素的开发利用可以缓解目前化石能源日渐枯竭的危机,还可以有效减轻碳排放严重超标等环境污染问题。

木质纤维素在木质纤维素酶的作用下降解成可发酵糖。木质纤维素水解酶系主要由纤维素酶、半纤维素酶、木质素酶等组成[3]。其中,β-葡萄糖苷酶作为纤维素酶的重要组成部分,能够催化多种糖苷键的水解反应如 C—O、C—S、C—N 键等[4],特别是将纤维二糖和纤维素寡糖水解成葡萄糖[5-7]。产酶成本高、酶活性低等问题限制了木质纤维素在能源转化方面的应用,因此,β-葡萄糖苷酶高产菌株的构建对于高效利用生物质资源具有重要意义[5,8-9]。

现有工业产酶菌株(如里氏木霉)存在发酵周期长、不耐高温及副产物抑制等问题,限制了其大规模应用的效率与经济性。马克思克鲁维酵母作为一种耐高温(42~45 ℃)[10]、快速生长(倍增时间<2 h)且碳源利用广泛的工业微生物[11-13],已被列为安全级(GRAS)菌株。马克思克鲁维酵母具备较强的分泌 β-半乳糖苷酶和菊粉酶的能力,表明其具有高效的蛋白分泌系统,但其内源性纤维素酶活性较低。在马克思克鲁维酵母中异源表达纤维素酶基因,有利于构建高效降解纤维素工程菌株。

本实验将黑曲霉来源的 *Bgl1* 基因导入马克思克鲁维酵母 KM-502,成功构建了重组菌株 KM*Bgl1*。通过单因素筛选和 Box-Behnken 响应面法对菌株 KM*Bgl1* 产 Bgl1 的液体发酵培养基组分及培养条件进行了系统筛选与优化,结果表明,KM*Bgl1* 在优化发酵条件下 Bgl1 酶活是菌株 KM-502 在初始培养条件下的 17.74 倍。

本研究以提升马克思克鲁维酵母纤维素酶表达效率为目标,采用跨物种基因重组技术与多因素发酵优化策略开展实验。结果表明,该组合方案可显著提高菌株的纤维素酶表达水平,为木质纤维素转化领域的工业级菌株构建及工艺参数优化,奠定了关键的理论基础与实验依据。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

黑曲霉 ANA8(本实验室保存);大肠杆菌 DH5α(本实验室保存);马克思克鲁维酵母 KM-502(本实验室

筛选)。质粒 pUCC001(本实验室保存),携带潮霉素抗性基因和氨苄青霉素抗性基因。

1.2　培养基

PDA 培养基:将质量分数为 20%马铃薯,煮沸 30 min 收集滤液,加入质量分数 2%的葡萄糖。

葡萄糖培养基(菌丝生产培养基):2%葡萄糖,1x liquid minimal mineral salt (MMS) medium。

纤维素酶诱导培养基:1%微晶纤维素,1x MMS。

YPD 培养基:1%酵母粉,2%蛋白胨,2%葡萄糖。

LB 培养基:1%胰蛋白胨,0.5%酵母提取物,1% NaCl,pH 7.5。

1.3　黑曲霉 cDNA 的获取

吸取 100 uL 黑曲霉菌液接种到 PDA 斜面培养基并封口,30℃恒温培养至孢子长出;生理盐水冲洗斜面,获得分生孢子悬浮液。取 1 mL 孢子悬浮液接种于 100 mL 葡萄糖液体培养基,于 30 ℃、200 r/min 摇床振荡培养 18~24 h,将黑曲霉菌液经布氏漏斗进行真空抽滤,称取 0.5 g 菌丝接种于 100 mL 纤维素酶诱导培养基(30 ℃、200 r/min、24 h)。将诱导培养后的菌液真空抽滤收取菌丝,转移至无菌离心管,-80 ℃保存备用。采用 Trizol 法提取总 RNA,以总 RNA 为模板,用逆转录酶(RTase)合成 cDNA。

1.4　重组质粒 pUCC001-*ADH1-Bgl1* 的构建

采用同源重组的方法构建重组质粒 pUCC001-*ADH1-Bgl1*,重组质粒如图 1 所示。以黑曲霉 ANA8 基因组 cDNA 为模板,*Bgl1*-F/*Bgl1*-R 为引物对,扩增目的基因 *Bgl1* 序列(2 583 bp);以 KM-502 基因组 DNA 为模板,*ADH1*-F/*ADH1*-R 为引物对,扩增 *ADH1* 启动子序列(747 bp);以质粒 pUCC001 为模板,pUCC001-F/pUCC001-R 为引物对,分别扩增筛选标记 HygR 序列(1 875 bp)、AmpR 序列(861 bp)、终止子区序列(228 bp)。采用融合 PCR 的方式融合上述片段,获得重组质粒 pUCC001-*ADH1-Bgl1*(7 716 bp)。表 1 为研究所用引物。

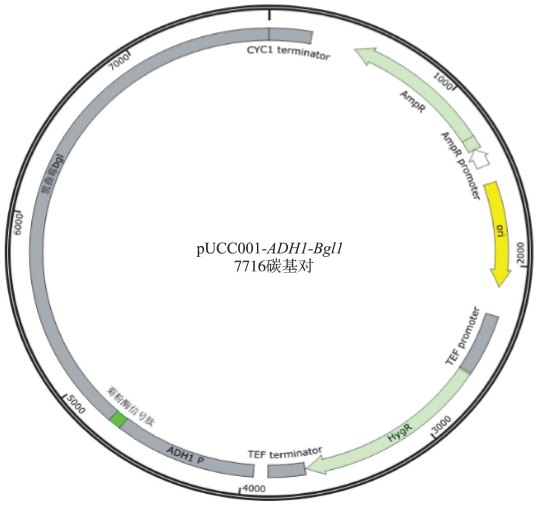


图 1　重组质粒 pUCC001-*ADH1-Bgl1* 的构建

表 1　本研究所用引物

引物	序列(5'-3')
Bgl1-F	GGCAGGAGTCAGTGCTTCAGTGATCAATTACAAGAGAAAGCTCGAGTGGCTGGAAGCC
Bgl1-R	GTAAGCGTGACATAACTAATTACATGATTACTGCACCTTGGGCAGATC
ADH1-F	CCGAGTGGCATGATTCGCGCAG
ADH1-R	GATCACTGAAGCACTGACTCCTGCCAATGGAAGCAAGAGGGAGTATGCTAACTTCATTGTGTTGTGTATATGATTTTG
pUCC001-F	TCATGTAATTAGTTATGTCAC
pUCC001-R	GGCCTGCGCGAATCATGCCACTCGGTTGAACATTCTTAGGCTGGTC

重组质粒 pUCC001-*ADH1-Bgl1* 经热激转化导入大肠杆菌,利用含氨苄青霉素的 LB 平板筛选阳性转化子,提取质粒测序验证。利用限制性内切酶 *Not*I 单酶切重组质粒 pUCC001-*ADH1-Bgl1*,通过电穿孔法将酶切线性化的质粒转化至菌株 KM-502。随后将转化体系涂布在含 4‰的潮霉素的 YPD 平板筛选,最终获得马

克斯克鲁维酵母重组菌株 KM*Bgl1*。

1.5 KM*Bgl1* 液体发酵培养基组分单因素筛选

本研究分别选取葡萄糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖和微晶纤维素作为碳源，碳源添加质量分数为培养基总量的 2%，筛选培养基其它组分的添加质量分数分别为 2%蛋白胨和 1%酵母粉；氮源的筛选分别采用蛋白胨、乙酸铵、硫酸铵、牛肉膏和尿素，添加质量分数为培养基总量的 2%，氮源筛选培养基的其它组分添加质量分数分别为 2%蔗糖和 1%酵母粉；筛选培养基中无机盐分别选取 $MgSO_4$、KH_2PO_4、$CaCl_2$、NaCl 和 Na_2CO_3，无机盐添加质量分数为培养基的 0.05%，培养基其它组分的添加质量分数分别为 2%蔗糖、2%牛肉膏、1%酵母粉。加水将培养基定容至20 mL，30 ℃，200 r/min 培养 16 h。每个处理设置 3 次重复。

1.6 KM*Bgl1* 液体发酵培养基组分碳源、氮源、无机盐添加质量分数

基于培养基组分单因素筛选的实验结果，在确定碳源、氮源和无机盐种类的基础上，分别对这些营养元素的浓度进行梯度筛选。分别设置培养基中的蔗糖质量分数为 1%、2%、4%、6%和 8%，牛肉膏质量分数为 1%、2%、3%、4%和 5%，KH_2PO_4质量分数为 0.025%、0.05%、0.1%、0.2%和 0.3%。培养基加水定容至 20 mL，30 ℃，200 r/min 培养 16 h。每个处理设置 3 次重复。

1.7 KM*Bgl1* 液体发酵培养基组分 Box-Behnken 中心组合实验

在确定筛选培养基单因素种类及浓度的基础上，进一步将蔗糖、牛肉膏、无机盐的质量分数作为关键独立变量（分别以 *A*、*B*、*C* 来表示），并基于独立变量的最优浓度设定 3 个浓度梯度（表 2）。

在此基础上，以酶活测定为反应指标，进行响应面分析试验。本实验采用 Design Expert 软件，选取 $N=17$的中心复合设计方案进行数据分析。

表 2 培养基优化响应面实验设计

水平	因素		
	$A(w_{蔗糖}/\%)$	$B(w_{牛肉膏}/\%)$	$C(w_{KH_2PO_4}/\%)$
−1	4	3	0.05
0	6	4	0.1
1	8	5	0.2

1.8 KM*Bgl1* 液体发酵培养条件筛选

以 Box-Behnken 筛选出的培养基成分为基础，分别设置 KM*Bgl1* 菌株接种体积分数 0.05%、1%、2%、3%和 4%，培养基装液量的 10%、20%、30%、40%和 50%，发酵时间设定为 8、16、24、32 和 40 h。每个处理设置 3 次重复。

1.9 KM*Bgl1* 液体发酵培养基组分 Box-Behnken 中心组合实验

在本研究中，筛选培养基的接种量、装液量和发酵时间分别以 *A*、*B*、*C* 来表示，并针对每个培养基单因素成分设定 3 种浓度梯度（表 3）。在此基础上，以酶活测定结果为反应指标，进行发酵培养的响应面分析试验。本实验采用 Design Expert 软件，选取 $N=17$ 的中心复合设计方案进行数据分析。

表 3 培养条件优化响应面实验设计

水平	因素		
	$A(\psi_{接种}/\%)$	B(装液量/%)	C(时间/h)
−1	1	20	24
0	2	30	32
1	3	40	40

1.10 β-葡萄糖苷酶（pNPG）活力的测定

β-葡萄糖苷酶的酶活测定在 1.5 mL EP 管中进行。酶反应体系中加入 50 μL pNPG 底物与 100 μL 稀释酶液后（空白对照组以等量缓冲液替代酶液），50 ℃水浴 1 h。反应结束后，立即加入 150 μL10%碳酸钠溶液以终止酶反应，随后向空白对照组补加等体积的酶液。取 200 μL 上述酶反应体系，测定其在 420 nm 处的吸光度值 OD_{420}[14]。

2　结果与讨论

2.1　马克思克鲁维酵母重组菌株 KM*Bgl1* 的构建

2.1.1　目的基因 *Bgl1* 的克隆

目的基因 *Bgl1* 扩增产物长度为 2 647 bp,实际获的扩增产物长度如图 2:第 1 泳道为黑曲霉 *Bgl1* 基因,第 2 泳道为 5 000 Marker。PCR 扩增后采用 1%琼脂糖凝胶电泳检测,出现与预期相符的特异性条带,表明成功获得目的基因 *Bgl1* 片段。

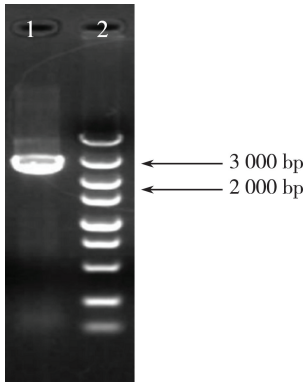


图 2　目的基因 *Bgl1* 扩增片段 PCR 验证电泳图

2.1.2　重组质粒 pUCC001-*ADH1*-*Bgl1* 的构建

重组质粒 pUCC001-*ADH1*-*Bgl1* 酶切线性化片段长度为 7 344 bp。酶切产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测,如图 3 所示,第 1 泳道为 15 000 Marker,第 2 泳道为环状重组质粒 pUCC001-*ADH1*-*Bgl1*,第 3 泳道为线性化重组质粒 pUCC001-*ADH1*-*Bgl1*。结果表明,成功获得线性化重组质粒 pUCC001-*ADH1*-*Bgl1*。

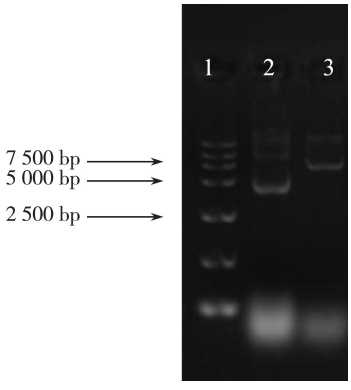


图 3　重组质粒 pUCC001-*ADH1*-*Bgl1* 验证电泳图

2.1.3　马克思克鲁维酵母重组菌株 KM*Bgl1* 的筛选

将平板上生长的转化子,使用 NaOH 裂解法粗提的酵母基因组 DNA 为模板,利用目的基因引物(*Bgl1*-F、*Bgl1*-R)扩增,PCR 筛选马克思克鲁维酵母重组子。PCR 验证结果如图 4 所示:第 1~3 泳道为黑曲霉 *Bgl1* 基因,长度为 2 647 bp;第 4 泳道为 5 000 Marker。PCR 扩增后采用 1%琼脂糖凝胶电泳检测,结果表明,成功获得马克思克鲁维酵母转化子 KM*Bgl1*。

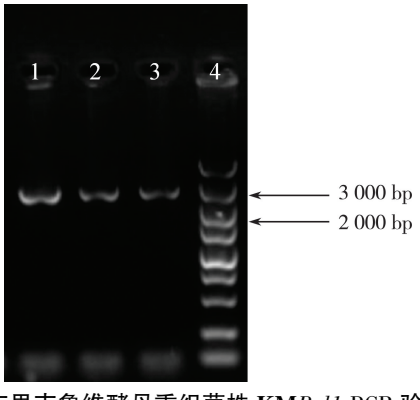


图 4　马克思克鲁维酵母重组菌株 KM*Bgl1* PCR 验证电泳图

2.2 KM*Bgl1* 液体发酵培养基组分单因素筛选

2.2.1 碳源单因素筛选

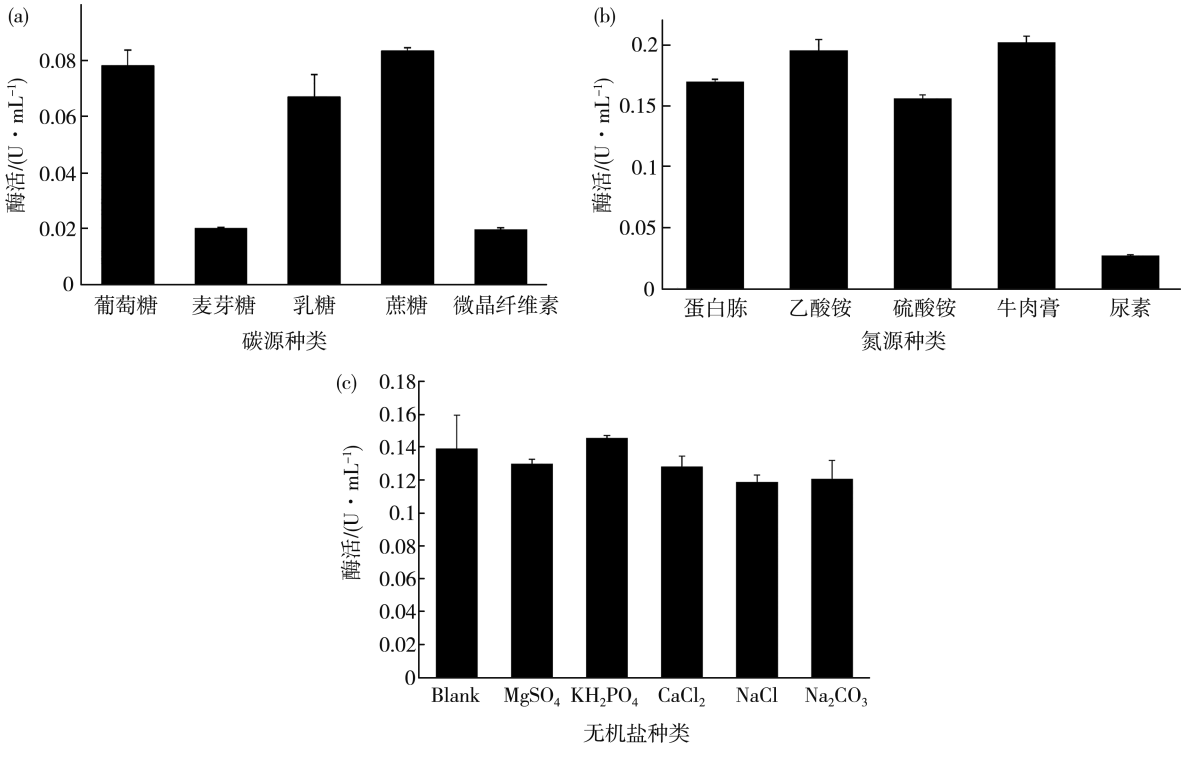
马克思克鲁维酵母产酶水平与培养基组分紧密相关,主要包括碳源、氮源、无机盐的种类和配比等。碳源是马克思克鲁维酵母的“能量供给者”,其通过调控酵母的代谢方向、生长状态及酶基因表达,进而调控产酶的种类、效率和总量。实验结果显示,不同碳源培养条件下 Bgl1 酶活性存在显著差异。如图 5(a)所示,酶活分别为 0.070、0.020、0.067、0.083 和 0.019 U/mL。结果表明,当蔗糖作为碳源时,KM*Bgl1* 产 Bgl1 酶活性最为突出,最高可达 0.083 U/mL。

2.2.2 氮源单因素筛选

氮源通过提供酶蛋白合成的必需原料和调控细胞代谢状态,直接影响马克思克鲁维酵母的菌体生长与产酶效率[15]。如图 5(b)如示,不同氮源培养条件下,Bgl1 酶活测定结果分别为 0.169、0.195、0.156、0.202 和 0.027 U/mL。结果表明,当以牛肉膏为氮源时,液体发酵中 Bgl1 酶活性最高为 0.202 U/mL。

2.2.3 无机盐单因素筛选

无机盐通过维持细胞稳态、激活酶活性、参与代谢通路等,成为马克思克鲁维酵母产酶不可或缺的调节物质[16]。如图 5(c)所示,不同无机盐培养条件下,Bgl1 酶活测定结果分别为 0.139、0.130、0.146、0.128、0.119和 0.121 U/mL。结果表明,与不加无机盐的对照组相比,添加 KH_2PO_4 组 Bgl1 酶活性相比对照组升高,添加其它无机盐组 Bgl1 酶活均低于对照组。



注:(a)为 KM*Bgl1* 在不同碳源条件下产 Bgl1 酶活;(b)为 KM*Bgl1* 在不同氮源条件下产 Bgl1 酶活;(c)为 KM*Bgl1* 在不同无机盐条件下产 Bgl1 酶活。

图 5 KM*Bgl1* 液体发酵培养基组分单因素筛选

2.3 KM*Bgl1* 液体发酵培养基成组分碳源、氮源、无机盐添加质量分数

2.3.1 碳源单因素浓度筛选

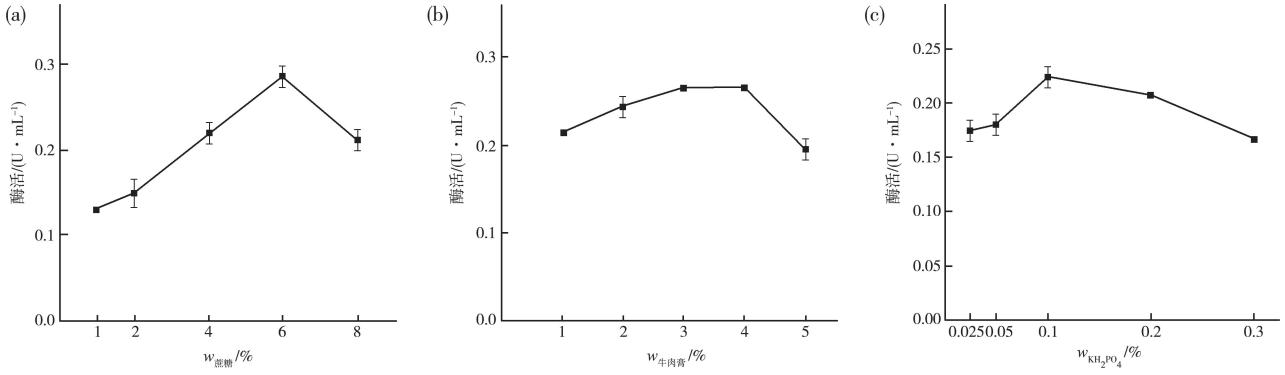
蔗糖可被酵母快速分解为葡萄糖与果糖,为菌体生长提供充足的能量与碳骨架,进而为酶的生物合成奠定物质基础[17]。如图 6(a)所示,基于不同蔗糖浓度的培养基体系,Bgl1 酶活分别为 0.130、0.150、0.220、0.286 和 0.212 U/mL。结果显示,Bgl1 酶活随蔗糖含量的升高呈现先升后降的变化趋势,当蔗糖添加质量分数由 1%提升至 6%时,Bgl1 酶活力由 0.130 U/mL 显著升高至 0.286 U/mL,增幅达 119%;当蔗糖质量分数继续升至 8%时,Bgl1 酶活降至 0.212 U/mL,表明过高浓度的蔗糖因渗透压胁迫效应对菌株的产酶活性存在抑制效应。结果表明,当培养基中蔗糖添加质量分数为 6%时,KM*Bgl1* 产 Bgl1 酶活性最高达 0.286 U/mL。

2.3.2　氮源单因素浓度筛选

牛肉膏等有机氮源降解产生的氨基酸、肽类可为酵母菌生长提供关键氮骨架。如图 6(b)所示,基于不同牛肉膏浓度的培养基体系,KM*Bgl1* 菌株的 Bgl1 酶活分别为 0.213、0.245、0.264、0.266 和 0.195 U/mL。结果显示,当牛肉膏添加质量分数为培养基总量的 1%至 4%时,Bgl1 酶活呈增加趋势;相反,当牛肉膏添加质量分数为培养基总量的 5%时,Bgl1 酶活明显下降,表明过高的氮源导致酵母代谢过量氮源时积累氨、有机酸等副产物,并进一步影响酶调控表达。结果表明,当培养基中牛肉膏添加质量分数为 4%时,KM*Bgl1* 产 Bgl1 酶活性最高达0.266 U/mL。

2.3.3　无机盐单因素浓度筛选

磷是酵母细胞核酸(DNA/RNA)、能量载体(ATP)及细胞膜磷脂的关键组成成分,同时参与糖酵解、磷酸戊糖途径等核心代谢。如图 6(c)所示,基于不同 KH_2PO_4 浓度的培养基体系,Bgl1 酶活分别为 0.174、0.179、0.224、0.207 和 0.167 U/mL。结果显示,培养基中适当的磷含量对 KM*Bgl1* 的 Bgl1 酶活有较明显的促进作用;过高的磷含量反而不利于 Bgl1 酶的表达,高磷环境下培养基中游离的 PO_4^{3-} 与 Bgl1 酶的活性中心结合占据底物(如 pNPG)的结合位点,直接抑制酶的催化活性。结果表明,当培养基中 KH_2PO_4 添加质量分数为 0.1%时,KM*Bgl1* 产 Bgl1 酶活性最高达 0.224 U/mL。



注:(a)为 KM*Bgl1* 在不同质量分数蔗糖条件下产 Bgl1 酶活;(b)为 KM*Bgl1* 在不同质量分数牛肉膏下产 Bgl1 酶活;(c)为 KM*Bgl1* 在不同质量分数 KH_2PO_4 条件下产 Bgl1 酶活。

图 6　KM*Bgl1* 液体发酵培养基组分最适添加质量分数筛选

2.4　KM*Bgl1* 液体发酵培养基成分 Box-Behnken 中心组合实验

基于表 4 中 KM*Bgl1* 菌株的液体发酵培养基优化回归模拟方差数据,计算得到的复相关系数 R^2=97.72%,说明多项式具有较高的拟合程度,预测数据与实际观测数据间存在高度相关。模型的 F 值为 33.35,对应的 P 值为<0.000 1,表明该回归模型具有统计学意义;失拟项 F 值为 0.719 2,P 值为 0.590 5,高于 0.05 阈值,表明失拟项的影响不具有显著性。因此,该模型可应用于对 KM*Bgl1* 液体发酵产 Bgl1 酶活性的分析。

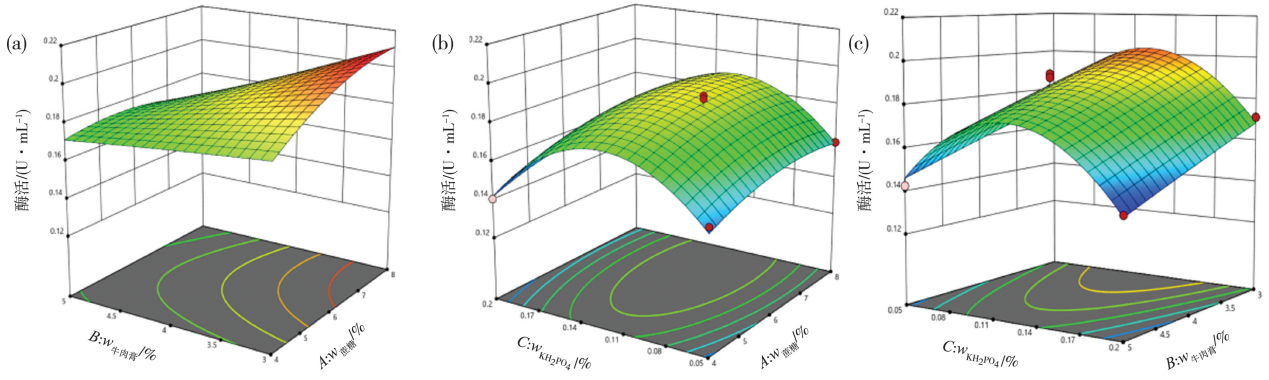
表 4　液体发酵培养基优化回归模型方差分析

来源	均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.006 2	9	0.000 7	33.35	<0.000 1
A:$w_{蔗糖}$	0.000 2	1	0.000 2	12.02	0.010 5
B:$w_{牛肉膏}$	0.001 5	1	0.001 5	73.21	0.000 1
C:$w_{KH_2PO_4}$	0.000 1	1	0.000 1	3.22	0.115 9
AB	0.000 3	1	0.000 3	15.45	0.005 7
AC	7.101×10^{-8}	1	7.101×10^{-8}	0.003 4	0.954 8
BC	1.349×10^{-6}	1	1.349×10^{-6}	0.065 5	0.805 4
A^2	0.000 2	1	0.0002	8.69	0.021 5
B^2	5.098×10^{-7}	1	5.098×10^{-7}	0.024 7	0.879 5
C^2	0.003 3	1	0.0033	157.73	<0.000 1
残差	0.000 1	7	0.000 0		
失拟项	0.000 1	F	0.000 9	0.719 2	0.590 5
纯误差	0.000 1	4	0.000 2		
总较正	0.006 3	16			

KM*Bgl1* 的液体发酵培养基优化响应面结果见表 5。基于图 7 KM*Bgl1* 的液体发酵培养基优化响应面分析图，对比三因素中两两交互作用对酶活性的影响，可知对 Bgl1 酶活影响 *AC*>*BC*>*AB*。根据响应面预测结果，在蔗糖添加质量分数为 7.3%、牛肉膏添加质量分数为 3%、KH_2PO_4添加质量分数为 0.13%时为 KM*Bgl1* 产 Bgl1 最佳条件。在此条件下，重组菌株 KM*Bgl1* 酶活是响应面分析实验中最高酶活的 1.23 倍，分别是初始培养条件下(YPD)KM*Bgl1* 酶活的 1.73 倍，以及出发菌株 KM-502 酶活的 2.78 倍。

表 5　液体发酵培养基优化响应面实验设计

因素水平	A:$w_{蔗糖}$	B:$w_{牛肉膏}$	C:$w_{KH_2PO_4}$	酶活/(U·mL^{-1})
1	4	3	0.1	0.176 677
2	8	3	0.1	0.207 93
3	4	5	0.1	0.169 39
4	8	5	0.1	0.164 942
5	4	4	0.05	0.151 027
6	8	4	0.05	0.159 429
7	4	4	0.2	0.140 681
8	8	4	0.2	0.150 981
9	6	3	0.05	0.173 074
10	6	5	0.05	0.142 455
11	6	3	0.2	0.171 191
12	6	5	0.2	0.140 092
13	6	4	0.1	0.181 121
14	6	4	0.1	0.183 39
15	6	4	0.1	0.185 285
16	6	4	0.1	0.192 466
17	6	4	0.1	0.190 758



注：(a)为不同蔗糖质量分数和牛肉膏质量分数对 KM*Bgl1* 产 Bgl1 酶活影响；(b)为不同蔗糖质量分数和 KH_2PO_4质量分数对 KM*Bgl1* 产 Bgl1 酶活影响；(c)为不同牛肉膏质量分数和 KH_2PO_4质量分数对 KM*Bgl1* 产 Bgl1 酶活影响。

图 7　各因素交互作用对 KM*Bgl1* 产 Bgl1 酶活的影响

2.5　KM*Bgl1* 液体发酵培养条件筛选

2.5.1　液体发酵接种量确定

液体发酵菌株接种量通过影响马克思克鲁维酵母的生长速率进一步影响产酶效率。如图 8(a)所示，在不同接种量条件下，Bgl1 酶活分别为 0.289、0.306、0.361、0.359 和 0.341 U/mL。当接种量低于 2%时，由于菌体密度低，导致产酶效率低；2%的高接种量能快速积累足量菌体，减少发酵前期菌体增值的耗时；当接种量高于 2%时，导致培养基中营养成分消耗速度加快，促使菌体快速进入生长稳定期与衰退期，进而引发氧气供应不足导致菌株产酶活性降低。结果表明，当 KM*Bgl1* 接种量为培养基体积的 2%时，Bgl1 酶活性最高。

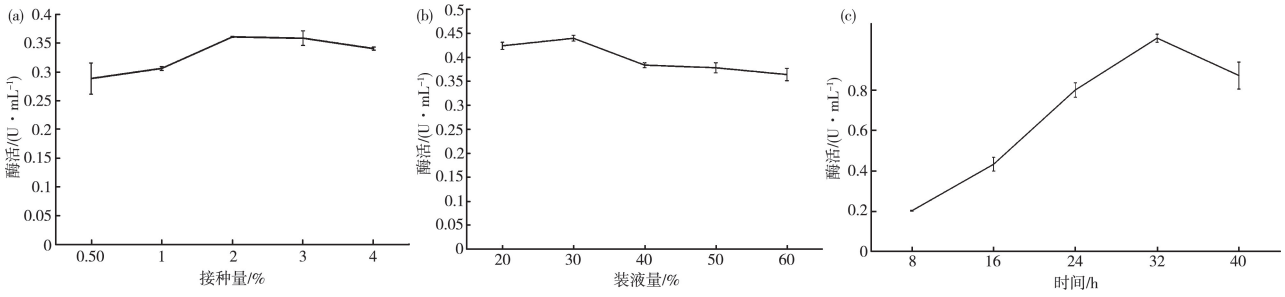
2.5.2　液体发酵装液量确定

微生物发酵过程中，容器中的装液量会影响微生物发酵微环境如：溶氧量、营养分布、代谢废物积累

等[18],进而调控菌体的生长状态与代谢方向,最终影响微生物产酶。如图 8(b)所示,在不同装液量条件下,Bgl1 酶活结果分别为:0.424、0.440、0.384、0.379 和 0.364 U/mL。当装液量低于 30%时,菌体由于局部营养过剩导致酶活较低;当装液量高于 30%时,装液量过高导致培养基溶氧量较低,酶合成的能量与物质供给不足,酶活随装液量增加持续下降。结果表明,当 KMBgl1 发酵液的装液量为锥形瓶体积的 30%时,Bgl1 酶活性最高。

2.5.3　液体发酵时间确定

发酵时间直接决定发酵效率与产物质量。如图 8(c)所示,在不同发酵时间下,Bgl1 酶活分别为:0.203、0.433、0.802、1.059 和 0.874 U/mL。在发酵 0~32 h 内,Bgl1 酶活性呈逐步上升趋势,由于发酵时间较短,菌体对培养基底物的转化不完全,导致产酶活性低;当发酵时间延长至 40 h 时,由于能源物质耗尽、副产物毒性积累等影响酶活性,Bgl1 酶活性急剧下降。结果表明,KM*Bgl1* 的发酵时间对菌株的 Bgl1 酶活具有显著的影响,当发酵 32 h 时,Bgl1 酶活性最高。



注:(a)为 KM*Bgl1* 在不同接种量条件下产 Bgl1 酶活;(b)为 KMBgl1 在不同装液量条件下产 Bgl1 酶活;(c)为 KM*Bgl1* 在不同发酵时间条件下产 Bgl1 酶活。

图 8　KM*Bgl1* 液体发酵条件优化

2.6　KM*Bgl1* 液体发酵培养条件 Box-Behnken 中心组合实验

基于表 6 液体发酵培养条件的回归模拟方差数据,计算得到的复相关系数 $R^2=97.68\%$,表明多项式具有较高的拟合度,预测数据与实际观测数据间存在高度相关。模型的 F 值为 32.82,对应的 P 值为<0.000 1,表明该回归模型具有统计学意义;失拟项 F 值为 3.71,P 值为 0.119 0,高于 0.05 阈值,表明失拟项影响不具有显著性。因此,该模型可应用于 KM*Bgl1* 液体发酵产 Bgl1 酶活性的分析和预测。

表 6　液体发酵培养条件优化回归模型方差分析

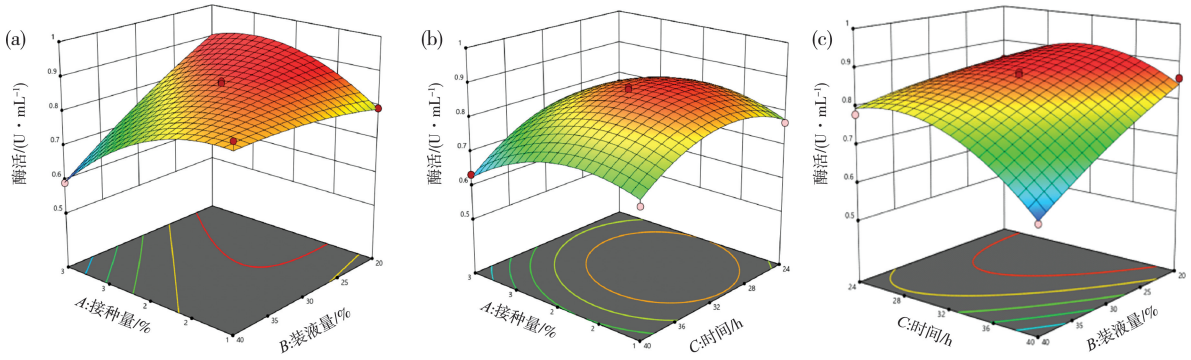
来源	均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.153 6	9	0.017 1	32.82	<0.000 1
A:接种量	0.007 4	1	0.007 4	14.27	0.006 9
B:装液量	0.037 3	1	0.037 3	71.71	<0.000 1
C:时间	0.016 5	1	0.016 5	31.67	0.000 8
AB	0.031 2	1	0.031 2	60.00	0.000 1
AC	0.001 1	1	0.001 1	2.16	0.185 4
BC	0.008 6	1	0.008 6	16.53	0.004 8
A^2	0.020 7	1	0.020 7	39.82	0.000 4
B^2	0.001 0	1	0.001 0	1.99	0.201 1
C^2	0.025 8	1	0.025 8	49.58	0.000 2
残差	0.003 6	7	0.000 5		
失拟项	0.002 7	3	0.000 9	3.71	0.119 0
纯误差	0.001 0	4	0.000 2		
总较正	0.157 2	16			

KM*Bgl1* 的液体发酵培养培养条件响应面结果见表 7。基于图 9 KM*Bgl1* 的液体发酵培养基优化响应面分析图,对比分析三因素对酶活性两两交互作用的影响,可知相互影响 $AC>BC>AB$。根据响应面预测结果,菌株 KM*Bgl1* 液体发酵培养在接种量为 2%、装液量为 21%、发酵时间为 34 h 时为最佳产 Bgl1 条件。在上述

发酵条件下,重组菌株 KM*Bgl1* 酶活是响应面分析实验中最高酶活的 1.76 倍,分别是初始培养条件下 KM*Bgl1* 酶活的 6.73 倍和出发菌株 KM-502 酶活的 17.74 倍。

表 7　液体发酵培养基优化响应面实结果

因素水平	*A*:接种量/%	*B*:装液量/%	*C*:时间/h	酶活/(U · mL^{-1})
1	1	20	32	0.792 506
2	3	20	32	0.881 337
3	1	40	32	0.855 526
4	3	40	32	0.591 105
5	1	30	24	0.767 945
6	3	30	24	0.767 400
7	1	30	40	0.701 202
8	3	30	40	0.633 678
9	2	20	24	0.845 995
10	2	40	24	0.779 233
11	2	20	40	0.857 457
12	2	40	40	0.605 296
13	2	30	32	0.857 051
14	2	30	32	0.875 702
15	2	30	32	0.880 482
16	2	30	32	0.873 285
17	2	30	32	0.843 074



注:(a)为不同接种量和装液量对 KM*Bgl1* 产 Bgl1 酶活影响;(b)为不同接种量和发酵时间对 KM*Bgl1* 产 Bgl1 酶活影响;(c)为不同装液量和发酵时间对 KM*Bgl1* 产 Bgl1 酶活影响。

图 9　各因素交互作用对 KM*Bgl1* 产 Bgl1 酶活的影响

3　结　论

本研究利用马克思克鲁维酵母为出发菌株,采用同源重组技术成功构建重组质粒 pUCC001-*ADH1*-*Bgl1*,将其转化至菌株 KM-502 中,获得 Bgl1 可稳定异源表达的重组酵母菌株 KM*Bgl1*。采用单因素试验结合响应面试验设计,对重组菌株 KM*Bgl1* 液体发酵培养基组分及发酵条件进行系统优化,运用 Design Expert 软件模拟实验验证得到 KM*Bgl1* 产 Bgl1 最优培养基:$w_{蔗糖}$为 7.3%、$w_{牛肉膏}$为 3%和 $w_{KH_2PO_4}$为 0.13%;最优发酵条件:接种量 2%、装液量 21%、发酵时间 34 h。在此条件下,KM*Bgl1* 的 Bgl1 酶活达 1.186 U/mL,为初始液体发酵条件下 KM-502 酶活的 17.74 倍。本研究结果为马克思克鲁维酵母纤维素酶的表达优化提供了基础数据和参考思路,也为后续开发更高效的木质纤维素降解系统提供了实验依据。

参考文献:

[1] 李晓贝.木质纤维素高效降解酶系的构建[D].济南:山东大学,2012.

[2] Duan Chaoran,Sun Qintao,Zhu Xianqing,et al.Influence of potassium on the degradative solvent extraction process of biomass components cellulose,hemicelluloses and lignin[J].International Journal of Biological Macromolecules,2025,304:140888.

[3] Shankar A,Jain K K,Kuhad R C,et al.Comparison of lignocellulosic enzymes and CAZymes between ascomycetes (*Trichoderma*) and basidiomycetes (*Ganoderma*) species:A proteomic approach[J].Zeitschrift Fur Naturforschung C,Journal of Biosciences,2025,80(1/2):21-32.

[4] Zhuang Xiuzheng,Zhan Hao,Song Yanpei,et al.Insights into the evolution of chemical structures in lignocellulose and non-lignocellulose biowastes during hydrothermal carbonization (HTC)[J].Fuel,2019,236:960-974.

[5] 徐诺.草酸青霉纤维素酶水解溶解浆制备纳米纤维素的研究[D].济南:山东大学,2023.

[6] 张清翠,石雅丽,刘安礼,等.外切纤维素酶的研究与应用进展[J].生物技术进展,2020,10(5):495-502.

[7] 顾方媛,陈朝银,石家骥,等.纤维素酶的研究进展与发展趋势[J].微生物学杂志,2008,28(1):83-87.

[8] 赵文萱.高产 β-葡萄糖苷酶工程菌构建及对酿酒酵母 WXY12 发酵产乙醇的影响研究[D].长春:吉林农业大学,2019.

[9] 贾贺雪.草酸青霉纤维素酶系水解木质纤维素能力的增强策略研究[D].济南:山东大学,2022.

[10] 卢敏.工程改造马克斯克鲁维酵母进行混合糖共利用[D].合肥:中国科学技术大学,2015.

[11] Raimondi S,Uccelletti D,Amaretti A,et al.Secretion of *Kluyveromyces lactis* Cu/Zn SOD:Strategies for enhanced production [J].Applied Microbiology and Biotechnology,2010,86(3):871-878.

[12] Nonklang S,Abdel-Banat B M,Cha-aim K,et al.High-temperature ethanol fermentation and transformation with linear DNA in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042[J].Applied and Environmental Microbiology,2008,74(24):7514-7521.

[13] Zhou Jungang,Zhu Peixia,Hu Xiaoyue,et al.Improved secretory expression of lignocellulolytic enzymes in *Kluyveromyces marxianus* by promoter and signal sequence engineering[J].Biotechnology for Biofuels,2018,11:235.

[14] Rajoka M I,Khan S,Latif F,et al.Influence of carbon and nitrogen sources and temperature on hyperproduction of a thermotolerant β-glucosidase from synthetic medium by *Kluyveromyces marxianus*[J].Applied Biochemistry and Biotechnology,2004,117(2):75-92.

[15] 刘娇娇,孟金浩,梁权耀,等.马克斯克鲁维酵母 β-半乳糖苷酶合成条件的优化及其酶学性质表征[J].食品与发酵工业,2023,49(23):50-55.

[16] 王亮,胡曼,王江月,等.马克斯克鲁维酵母高密度发酵条件的优化研究[J].食品工业科技,2017,38(17):111-118.

[17] Tikhomirova A S,Kulikova A K,Tsereteli A K,et al.Optimization of the conditions for beta-galactosidase biosynthesis in eukaryotes[J].Mikrobiologiia,1978,47(1):26-31.

[18] Xu Ziyin,Xu Lin,Chen Mei,et al.A study on the extraction,fermentation condition optimization,and antioxidant activity assessment of polysaccharides derived from *Kluyveromyces marxianus*[J].Foods,2025,14(16):2796.

(责任编辑:王亚宾;校　对:孙洪清)