

毛壳霉内切菊粉酶的纯化与性质

张国青 崔福绵 杨秀清 钱世钧*

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 :毛壳霉(*Chaetomium* sp.) C34 发酵液经硫酸铵分级沉淀、DEAE-纤维素 11 离子交换层析、Q-Sepharose Fast Flow 离子交换层析、Sephacryl S-200 凝胶过滤、Phenol Sepharose™ HP 疏水层析,得到电泳纯的内切菊粉酶组分,纯化倍数为 30.8 倍,活力回收率为 7.7%。用 SDS-PAGE 测得该酶亚基的分子量为 66kD。菊粉酶的最适 pH 为 6.0,最适温度为 50~55℃。菊粉酶在 50℃以下,pH5.0~8.0 时较稳定。 Cu^{2+} 完全抑制酶的活性, Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 、EDTA 以及 NBS(N-bromosuccinimide, N-溴代丁二酰亚胺)对该酶有很强的抑制作用。该酶对菊粉有较强底物专一性,产物主要为低聚果糖,也可作用于蔗糖, I/S 值为 20。以菊粉为底物时, K_m 为 0.199mmol/L, V_{max} 为 115 $\mu\text{mol}(\text{mg}\cdot\text{min})^{-1}$ 。

关键词 :毛壳霉,内切菊粉酶,纯化,性质

中图分类号:Q814 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2004)06-0785-04

菊粉酶(Inulinase)是一种催化水解菊粉中 β -2,1-呋喃果糖苷键的水解酶。自然界中许多微生物都能够产生水解菊粉的酶。菊粉酶按作用方式分为外切菊粉酶和内切菊粉酶两类。通常用 I/S 值的大小表明菌所产菊粉酶的特性, I 是以菊粉作底物时的酶活力, S 是以蔗糖作底物时的酶活力。一般认为当 $I/S > 10$ 时,酶表现为内切活性。外切菊粉酶(Exoinulinase)能从菊粉分子末端逐一卸下单个果糖,产物是果糖和少量葡萄糖。内切菊粉酶(Endoinulinase)常来源于真菌^[1-3],它从菊粉分子内部随机切断某个 β -2,1-呋喃果糖苷键,产物主要为低聚果糖。低聚果糖在消化道能促进双歧杆菌的繁殖,从而抑制病原菌的活动^[4]。低聚果糖以其优越生理性能,日益得到人们的广泛重视。此前国内关于内切菊粉酶的研究报道很少。本文报道从菊芋根系土壤中分离到的毛壳霉菌株产生的内切菊粉酶的分离纯化及其性质研究。

1 材料和方法

1.1 菌株和培养

毛壳霉菌 C34,由本实验室筛选得到。发酵培养基成分:菊芋粉 2g,磷酸氢二铵 0.4g,水 100mL。500mL 三角瓶中加入 100mL 上述培养基,35℃ 液态发酵 3d,达到产酶高峰。培养物滤液即为粗酶液。

1.2 菊粉酶的纯化

1.2.1 硫酸铵沉淀:在 4℃ 下,滤液用 20% 饱和度硫

酸铵沉淀后,10000r/min 离心除杂蛋白,用 65% 饱和度硫酸铵析出菊粉酶,将沉淀溶于少量 pH6.0 0.02mol/L Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 缓冲液中,进行彻底透析。

1.2.2 DEAE-纤维素 11 离子交换层析:将上述所得酶液加到已用 pH6.0 0.02mol/L Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 缓冲液平衡过 DEAE-纤维素柱(2.6cm \times 20cm)上,用含 0.1mol/L、0.2mol/L、0.3mol/L、0.5mol/L NaCl 的上述缓冲液分级洗脱,合并有酶活性组分。

1.2.3 Q-Sepharose Fast Flow 离子交换层析:操作步骤同 1.2.2。

1.2.4 Sephacryl S-200 凝胶层析:将步骤 1.2.3 得到的酶活性部分用小柱(3.5mL,10K,Pall-Gelman 产品)浓缩,加到预先用 pH6.0 0.02mol/L Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 缓冲液平衡的 Sephacryl S-200 层析柱(1.6cm \times 90cm)上,用同样的缓冲液洗脱,合并有酶活性部分。

1.2.5 Phenol Sepharose™ HP 疏水层析:将步骤 1.2.4 所得酶活性部分对含 2mol/L 硫酸铵的 pH6.0 0.02mol/L Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 缓冲液透析,得到的透析液加到预先用上述透析液平衡好的 Phenol Sepharose™ HP 柱(1mL,预装柱为 Pharmacia 产品)上,先用上述缓冲液洗柱,后用含 1、0.5、0.2、0.05、0.02mol/L 硫酸铵的上述缓冲液分级洗脱,合并酶活力组分。

1.3 酶活力的测定

取适当稀释的酶液 50 μL ,加到 450 μL 用 pH6.0

* 通讯作者。Tel/Fax: 86-10-62651598; E-mail: qiansj@sun.im.ac.cn

作者简介 张国青(1970-),女,天津人,助理研究员,硕士,主要从事酶学研究。E-mail: gqning@hotmail.com

收稿日期 2004-02-17,修回日期 2004-04-21

0.1mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液配制的 2% 的菊粉 (Sigma 产品) 溶液, 53℃ 恒温水浴 30min, 置 100℃ 沸水浴中 10min, 中止反应, 取出迅速冷却, 然后采用 3, 5-二硝基水杨酸法^[5] 测定还原糖。在上述条件下每分钟水解菊粉, 产生 1 μmol 还原糖(以果糖计)的酶量定义为 1 个酶活力单位(U)。

1.4 电泳分离

参照文献[6], 分离胶浓度为 10%, SDS-PAGE 后用考马斯亮蓝 R-250 摇床染色 2h。

1.5 蛋白含量测定

采用 Bradford 法^[7], 用牛血清白蛋白为标准。

1.6 菊粉酶水解菊粉的产物分析

产物分析采用薄层层析法。展开剂为正丁醇: 冰醋酸: 水 = 4:2:1, 显色剂为苯胺-二苯胺^[8]。

2 结果

2.1 菊粉酶的纯化

毛壳霉菊粉酶的纯化结果见表 1。粗酶液(I/S 为 20) 经 DEAE 纤维素离子交换层析, 所得活力组分是未吸附的穿透峰, 收集内切菊粉酶活力组分。此酶活力组分用做下一步的 Q-Sepharose Fast Flow 离子交换层析, 将上述浓缩组分进一步用 Sephacryl S-200 凝胶层析柱分离, 收集活性部分应用到 Phenol Sepharose 疏水层析柱上, 得到一个具有内切菊粉酶活力蛋白峰。所得到的酶比活力为 184.6U/mg, 纯化倍数为 30.8, 活力回收率为 7.7%, 该酶样品纯化后 I/S 仍为 20。变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测为一条电泳带(图 1), 亚基分子量为 66kD。

表 1 毛壳霉内切菊粉酶的纯化

Table 1 Purification of endoinulinase from *Chaetomium* sp.

Step	Total Activity/U	Total protein/mg	Specific activity(U/mg)	Purification fold	Activity yield /%
Culture filtrate	3100	518.0	6.0	1.0	100.0
(NH_4) ₂ SO ₄ fractionation	2072	269.0	7.7	1.3	66.8
DEAE-cellulose	1400	40.0	35.0	5.8	45.2
Q-Sepharose Fast flow	640	6.6	97.0	16.2	20.6
Sephacryl S-200	576	4.8	120.0	20.0	18.6
Phenol Sepharose TM HP	240	1.3	184.6	30.8	7.7

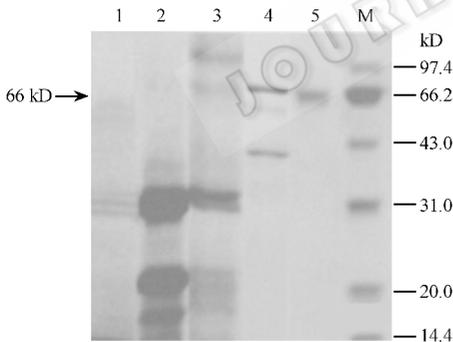


图 1 各步纯化产物的电泳图谱

Fig. 1 The electrophoretic patterns of proteins in the different steps of purification on SDS-PAGE

1. Culture filtrate; 2. DEAE-cellulose fraction; 3. Q-Sepharose Fast Flow fraction; 4. Sephacryl S-200 fraction; 5. Phenol SepharoseTM HP fraction.

2.2 菊粉酶的基本性质

2.2.1 温度对菊粉酶活力和稳定性的影响: 上述反应系统中, 于 35 ~ 60℃ 分别测定酶活力。结果显示, 最适作用温度为 50 ~ 55℃。将酶液在不同温度(20 ~ 60℃) 下保温 30min, 然后测定残留酶活力。结果表明此菊粉酶在 50℃ 以下较稳定, 超过 50℃ 酶活

性急剧下降, 60℃ 时酶活性完全丧失。

2.2.2 pH 对菊粉酶活力和酶稳定性的影响: 将酶液分别加在 pH4.0 ~ 5.5 HAc-NaAc 缓冲液及 pH6.0 ~ 8.0 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液配制的菊粉中, 结果表明菊粉酶的最适作用 pH 为 6.0。将酶在不同 pH 缓冲液中于 30℃ 保温 30min 后测定酶活性, 结果显示, 该菊粉酶在 pH5.0 ~ 8.0 范围内较稳定。

2.2.3 菊粉酶对不同底物的作用: 在 53℃, pH6.0 反应条件下, 分别以纯菊粉、粗菊糖、蔗糖、棉子糖和松三糖为底物测酶活力。结果显示, 该菊粉酶对纯菊粉、粗菊糖和蔗糖都有作用; 不作用棉子糖, 也不作用松三糖, 这一结果与 Rong 等^[9] 报道一致, 与其他来源的内切菊粉酶不同^[10]。

2.2.4 金属离子、EDTA 和 NBS 对酶活力的影响: 在酶反应液中分别加入不同的金属离子(大部分为金属离子的氯化物)使其终浓度为 1mmol/L 和 5mmol/L。表 2 显示: Cu^{2+} 在所检测范围完全抑制酶的活性, Mn^{2+} 也有很强的抑制作用; Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 和 EDTA 在终浓度 5mmol/L 对酶活性也有强的抑制作用。氧化剂 NBS 在所检测范围几乎完全抑制酶的活性, 其余离子在检测范围对酶活力没有显著影响。

表 2 一些化学试剂对酶活性的影响

Table 2 Effect of metal ions, EDTA and NBS on enzyme activity

Metal ions	Relative activity as affected by the concentration/%	
	1mmol/L	5mmol/L
Na ⁺	102.2	97.8
K ⁺	77.8	86.7
Ca ²⁺	104.4	97.8
Mg ²⁺	86.7	77.8
Mn ²⁺	44.4	22.2
Cu ²⁺	0	0
Zn ²⁺	75.6	46.7
Fe ³⁺	97.8	86.7
Fe ²⁺	97.8	62.2
Co ²⁺	108.1	82.3
NBS	4.5	2.1
EDTA	83.3	33.3

2.2.5 菊粉酶的动力学特征:固定菊粉酶的量,以不同浓度菊粉溶液为底物,测定酶反应速度。采用 Lineweaver-Burk 作图法,求得毛壳霉菊粉酶对菊粉的 K_m 为 0.199mmol/L, V_{max} 为 115 μ mol/(mg \cdot min)

2.2.6 产物鉴定:用薄层层析进行产物鉴定(图 2)。菊粉酶水解菊粉,在不同的水解时间内,产物主要为低聚果糖和少量果糖,低聚果糖的量随着水解时间的延长而增加。可以确认该菊粉酶为内切菊粉酶。

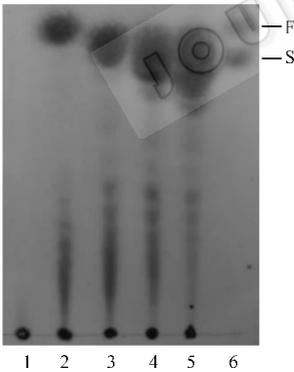


图 2 菊粉酶水解菊粉的产物分析

Fig.2 Analysis of the hydrolytic products of inulin by inulinases

1~5. Reaction time is 0, 0.5, 1, 2, 3h, respectively; 6. st. F: Fructose; S: Sucrose.

3 讨论

在本工作中,从毛壳霉中纯化得到一个菊粉酶组分,虽然菊粉酶纯化的研究已有很多报道,但还没有从毛壳霉中分离纯化的报道。该酶经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测为一条电泳带,亚基分子量为 66kD,与其他来源的内切菊粉酶大小相近^[2,11]。通

过产物薄层层析分析,表明该菊粉酶降解菊粉的产物主要为低聚果糖和少量果糖,说明该酶为内切菊粉酶。氧化剂 NBS 在所检测的范围几乎完全抑制酶的活性,说明菊粉酶的活性中心可能有色氨酸残基存在^[12]。

据报道,大多数内切菊粉酶缺少转化酶活性,然而本研究中纯化出的内切菊粉酶,除有菊粉酶活性外,还有转化酶活性, Moussa 和 Jacques^[13]也曾得到过类似的研究结果。该酶的作用机理和特性还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Erick J V, Dirk G. Microbial inulinases: fermentation process, properties, and applications. *Advances in Applied Microbiology*, 1983, **29**: 139 - 176.
- [2] Nakamura T, Shitara A, Matsuda S, et al. Production, purification and properties of an endo-inulinase of *Penicillium* sp. TN-88 that liberates inulotriose. *J Ferment Bioeng*, 1997, **84**: 313 - 318.
- [3] Nakamura T, Kurokawa T, Nakatsu S. Crystallization and general properties of an extracellular inulinase from *Aspergillus* sp. *J Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, 1978, **52**(4): 159 - 166.
- [4] Wang X, Gibson G R. Effect of the *in vitro* fermentation of oligo-fructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *J Applied Bacteriology*, 1993, **75**(4): 373 - 380.
- [5] 张惟杰. 复合多糖生化研究技术. 上海: 上海科学技术出版社, 1987, 1 - 2.
- [6] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛, 等. 生物化学实验方法和技术. 北京: 高等教育出版社, 1982, 165.
- [7] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248 - 254.
- [8] Doner L W. High-Performance thin-layer chromatography of starch, cellulose, xylan, and chitin hydrolyzates. *Methods Enzymol*, 1988, **160**: 176 - 180.
- [9] Rong X, Masatoshi T, Shoichi T. Purification and some properties of endoinulinase from *Chrysosporium pannorum*. *J Fermentation and Bioengineering*, 1989, **67**(4): 244 - 248.
- [10] Wanker E, Huber A, Schwab H. Purification and characterization of the *Bacillus subtilis* levanase produced in *E. coli*. *J Microb*, 1995, **61**(5): 1953 - 1958.
- [11] Shuichi O, Norio S. Purification and substrate specificity of endo-type inulinase from *Penicillium purpurogenum*. *Agric Biol Chem*, 1988, **52**(10): 2569 - 2576.
- [12] Nakamura T, Nagatomo Y, Hamada S, et al. Occurrence of two forms of extracellular endoinulinase from *Aspergillus niger* mutant 817. *J fermentation and Bioengineering*, 1994, **78**(2): 134 - 139.
- [13] Moussa E, Jacques C B. Purification, properties and comparison of invertase, exoinulinase and endoinulinase of *Aspergillus ficuum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1987, **26**: 13 - 20.

Purification and Properties of Endoinulinase from *Chaetomium* sp.

ZHANG Guo-Qing CUI Fu-Mian YANG Xiu-Qing QIAN Shi-Jun*

(Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China)

Abstract : An endoinulinase produced by *Chaetomium* sp. C34 was purified to electrophoretic homogeneity , with recovery of 7.7% activity and purification factor of 30.8 fold by five steps including ammonium sulfate precipitation , DEAE-cellulose , Q-sepharose Fast Flow , Sephacryl S-200 and Pre-Packed Hydrophobic Column. Its subunit molecular weight was estimated to be about 66kD by SDS-PAGE. The optimum temperature and pH of the enzyme activity were 50 ~ 55°C and 6.0 respectively. The K_m and V_{max} values for inulin were 0.199mmol/L and 115 μ mol/(mg·min) respectively. Cu^{2+} completely inhibited inulinase activity. An appreciable loss of activity was observed in presence of NBS , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} and EDTA. A ratio of inulinase activity to invertase activity (I/S) of 20 was found in purified inulinase. The endoinulinase hydrolyzed inulin and liberated inulooligosaccharides. But it lacked activity toward melezitose or raffinose.

Key words : *Chaetomium* sp. , Endoinulinase , Purification , Properties

* Corresponding author. Tel/Fax : 86-10-62651598 ; E-mail : qiansj@sun.im.ac.cn

Received date : 02-17-2004

The Eighth Editorial Board of Acta Microbiologica Sinica

EDITOR-IN-CHIEF

LI Ji-Lun Academician

(College of Biology , Chinese Agricultural University , Beijing 100094 , China)

VICE-EDITOR-IN-CHIEF

TAN Hua-Rong Professor

(Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China)

LU De-Ru Professor

(Institute of Genetics , Second Military Medical University , Shanghai 200433 , China)

WANG Ao-Quan Professor

(Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China)

QU Yin-Bo Professor

(School of Life Science , Shandong University , Jinan 250100 , China)

XU Jian-Guo Professor

(National Institute of Communicable Diseases Prevention and Control , Chinese Center for Disease Control and Prevention , Beijing 102206 , China)

MEMBERS OF THE BOARD

CAI Yong-Feng

CHEN Yong-Qing

CHENG Chi

DONG Xiu-Zhu

FAN Yun-Liu

GUO Jun

HU Fu-Quan

HU Yuan-Yang

HUANG Li

LU Cheng-Ping

MIN Hang

QIAN Shi-Jun

SHAO Yi-Ming

SHENG Jun

TANG Hong

TIEN Po

WANG Ping

WANG Hua-Ming(USA)

XIE Hong

YANG Su-Sheng

ZHAI Zhong-He

ZHANG Yao-Ping(USA)

ZHENG Tian-Ling

ZHU Bao-Quan

ZHUGE Jian

MANAGING EDITORS

WANG Jin-Fang

WANG Min