

黑曲霉菊糖酶的纯化及性质*

陈冠军 孙忠东 王颖达 钱新民**

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

摘 要 黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 319 发酵液经硫酸铵分级沉淀、DEAE-纤维素 52 离子交换层析和 Sephadex G-100 分子筛层析, 得到了电泳纯的菊糖酶组分。提纯倍数为 67, 收率为 25.5%。菊糖酶的最适 pH 为 5.0, 最适温度为 60℃。此酶为单亚基蛋白, 凝胶过滤法测得分子量为 28 000, 含糖 13.9%, 用等电聚焦法测得等电点为 5.4, 该酶对温度有较高的稳定性, 对 pH 的稳定范围较窄。Hg²⁺、Pb²⁺ 和 Cu²⁺ 对该酶有强烈的抑制作用。此酶对菊糖有较强的底物专一性, 产物为果糖, 但它也可作用于蔗糖, I/S 值为 0.348。当以菊糖为底物时, K_m 为 6.25 mmol/L, V_m 为 67.11 μmol · mg⁻¹ · min⁻¹。

关键词 菊糖酶, 黑曲霉

菊糖 (inulin) 是一种果糖聚合物, 由果糖以 β-2, 1 糖苷键线性连接, 果糖链的还原性末端被一个 β-2, 1 糖苷键连接的葡萄糖封闭, 平均每分子中含有 20~30 个果糖残基^[1]。菊糖作为碳水化合物的贮存形式存在于多种植物中, 其中最具代表性的是菊芋 (*Jerusalem artichoke*), 占其肥大块茎干物质的 80%。

自然界中许多微生物能够产生菊糖水解脱酶。菊糖酶 (inulinase), 即 β-2, 1-D-果聚糖酶 (β-2, 1-D-fructanase EC 3.2.1.7), 它可从菊糖分子的果糖非还原端逐个切下单个果糖 (外切酶活性), 或在分子内部随机切断某个 β-2, 1 糖苷键 (外切酶活性)^[2]。目前研究较多的主要是芽孢杆菌^[3], 曲霉^[4]、青霉^[5] 和克鲁氏酵母菌^[6,7] 等所产生的菊糖酶。从 70 年代, 国外就开始研究利用微生物产生的菊糖酶水解菊糖生产高果糖浆 (HFS)。与酸水解法相比, 酶解法的副产物少, 不增加环境污染; 与葡萄糖异构酶法生产 HFS 相比, 菊糖的水解只需一步酶解反应就可达到果糖占总糖 80~90% 的超高果糖浆 (UHFS)。因此, 利用菊糖的酶解法生产 UHFS 具有很大的应用潜力, 这一技术正日益受到人们的重视^[1,2,7]。

本文报道黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 319 产生的菊糖酶的分离纯化及其性质研究。

1 材料和方法

1.1 菌种与培养

黑曲霉 319, 由山东大学微生物系提供。产酶用培养基组成为 (g / 100ml): 菊芋

* 山东省科委资助项目。

** 通讯联系人。

本文于 1996 年 5 月 21 日收到。

60.0~62.5, 蛋白胨 0.2, KCl 0.7, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5, $FeSO_4 \cdot H_2O$ 0.01。其中菊芋需经切碎, 煮沸 15 min 后用纱布过滤。500 ml 三角瓶装入 100 ml 上述培养基, 54kPa 20 min 灭菌后接种, 于 30℃ 摇床振荡培养 72h, 收集培养液。

1.2 主要仪器及试剂

高速冷冻离心机 (Hitachi 200RP-520); 紫外分光光度计 (岛津 UV-240); HD-81-5A 型核酸蛋白检测仪 (浙江永嘉); TH-250 梯度混合器与 BSZ-100 分步收集器 (上海)。Bio-Gel P2 (Bio-Rad); DEAE-纤维素 52 (Whatman); Sephadex G-100 和 G-75 (Pharmacia); 菊糖 (CP, 上海化学试剂采购供应站); 果糖 (上海市试剂二厂); 牛血清白蛋白 (电泳纯, 上海牛奶公司综合厂); 两性载体电解质 (中国科学院上海生物化学研究所); 分子量标准蛋白 (Serva); 其它试剂均为 AR 或 CP 级。

1.3 酶活力测定

取 0.9 ml 用 0.1 mol / L pH5.0 的 HAc-NaAc 缓冲液配制的 2% 的菊糖溶液, 60℃ 预热 5 min, 加入 0.1 ml 适当稀释的酶液, 迅速摇匀并在 60℃ 保温 10 min 后, 置 100℃ 沸水浴 5 min 中止反应。然后以 Somogyi^[8] 定糖法测定产生的还原糖。规定在上述条件下每分钟催化菊糖水解产生 1 μ mol 果糖所需要的酶量为一个酶活力单位 (U)。

1.4 蛋白质含量测定

采用 Lawry^[9] 法, 以牛血清白蛋白为标准蛋白。

1.5 电泳分析

采用垂直板型不连续 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法^[10]。电泳初始电压为 100V, 当样品进入分离胶后, 提高电压至 180V, 以循环水 (15℃) 冷却。电泳后采用考马斯亮蓝 R250 染色。

1.6 酶分子量测定

采用凝胶过滤法。将处理好的 Sephadex G-75 装柱 ($\Phi 2.6 \times 100$ cm), 用蓝葡聚糖 2000 测定外水体积 (V_0), 标准分子量各蛋白质均配成 3 mg / ml 的溶液, 分别上样 0.5 ml, 检测洗脱液在 280 nm 下的光吸收, 计算各洗脱体积 (V_e), 绘制标准分子量蛋白的 $\lg MW - V_e / V_0$ 图, 求出待测蛋白的分子量。

1.7 蛋白质中糖含量测定

采用苯酚-硫酸法^[11]测定糖含量, 以甘露糖作标准。

1.8 等电点测定 采用分析型薄层等电聚焦法^[12]。

2 结果和讨论

2.1 菊糖酶的纯化

2.1.1 硫酸铵沉淀: 将发酵培养液离心去除菌体, 向上清液中加入硫酸铵至 40% 饱和度, 4℃ 放置 24 h, 经 10 000r / min 离心 10 min 后, 上清液再继续加入硫酸铵至 80% 饱和度, 置 4℃ 48 h 以上, 18 000 r / min 离心 20 min, 将沉淀溶于少量 0.1 mol / L pH5.0 的 HAc-NaAc 缓冲液中。

2.1.2 脱盐: 采用 Bio-Gel P2 分子筛柱层析脱盐, 用 0.1 mol / L 的 HAc-NaAc 缓冲液 (pH5.0) 洗脱, 收集活力部分洗脱液。洗脱液经 PEG-20 000 浓缩后待用。

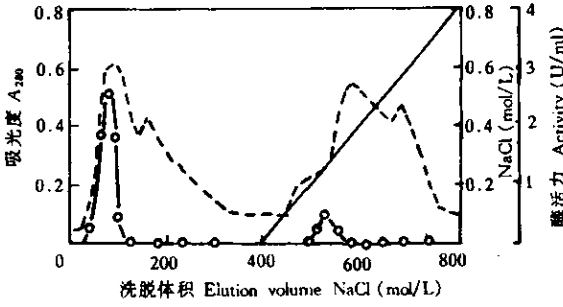


图1 黑曲霉菊糖酶的 DEAE-纤维素 52 层析图谱
-- A_{280} ; —NaCl 浓度; —○— 菊糖酶活力。

Fig.1 Chromatogram of inulinases from *A.niger* on DEAE-cellulose 52 column

-- A_{280} ; —NaCl concentration; —○— Enzymic activity.

2.1.3 离子交换层析: 将脱盐浓缩后的酶液加到预先用上述缓冲液平衡的 DEAE-纤维素52 层析柱 ($\Phi 3.0 \times 20\text{cm}$), 先用同样的缓冲溶液洗脱至 280nm 光吸收降到最低点, 再用 0~0.8mol / L 的 NaCl(由同种缓冲液配制) 进行线性梯度洗脱。测定各收集管洗脱液的酶活力, 共有两个活力蛋白峰。其中主要活力组分是一未吸附的穿过峰(组分 A); 在 0.15mol / L NaCl 处有一较小的活力峰(组分 B), 离子交换层析结果见图 1。分别收集酶活力组分, 4℃ 透析除盐后, 用 PEG-20 000 浓缩。下面主要对组分 A 进行再分离和性质测定。

2.1.4 分子筛层析: 离子交换层析得到的组分 A 浓缩液经 18 000r / min 离心 20 min 后, 加到预先用 0.02mol / L 的 HAc-NaAc 缓冲液 (pH5.0) 平衡的 Sephadex G-100 层析柱 ($\Phi 2.6 \times 100\text{cm}$) 上, 用同样的缓冲液洗脱, 分步收集并测定酶活。结果显示 (图 2) 三个洗脱峰中, 只有中间的洗脱峰有酶活性, 收集活性部分并浓缩。

经过上述步骤, 从黑曲霉 319 发酵液中分离得到了该菌株主要的菊糖酶组分, 提纯倍

表1 黑曲霉319菊糖酶的分纯化

Table 1 Purification of inulinases from *Aspergillus niger* 319

提纯步骤 Purification steps	总酶活 Total activity (U)	总蛋白 Total protein (mg)	比活力 Specific activity (U/mg)	收率 Yield (%)	提纯倍数 purification folds
粗酶液 Crude enzyme	1625	2913.0	0.56	100.0	1
硫酸铵沉淀 (NH_4) ₂ SO ₄ precipitation	1020	161.8	6.30	62.8	11
离子交换层析 Ion-exchange chromatography	469	21.9	21.4	28.9	38
分子筛层析 Gel filtration	414	11.1	37.3	25.5	67

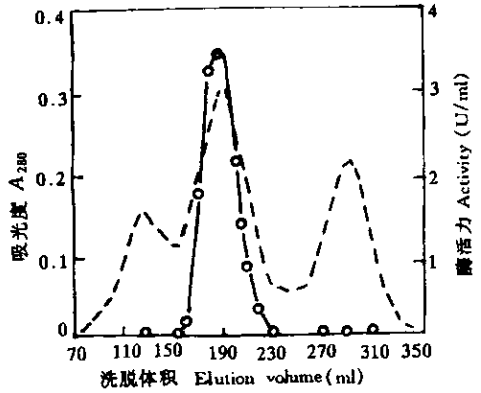


图2 黑曲霉菊糖酶组分 A 的 Sephadex G-100 层析图谱

-- A_{280} ; —○— 菊糖酶活力。

Fig.2 Gel-filtration of DEAE-purified fraction of inulinase from *A.niger* on Sephadex G-100 column

-- A_{280} ; —○— Enzymic activity.

数为 67。经垂直板型 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测, 这一主要组分已达电泳均一。黑曲霉菊糖酶 319 的整个分离提纯的结果列于表 1。

2.2 酶的基本性质

2.2.1 菊糖酶的含糖量: 经苯酚硫酸法测定, 提纯的菊糖酶为一含糖的蛋白, 其含糖量为 13.92%。

2.2.2 分子量测定: SDS-PAGE 测定, 黑曲霉菊糖酶的分子量为 25 000。再经凝胶过滤法测定, 测得该菊糖酶的分子量为 28 000。尽管糖蛋白在 SDS-PAGE 上的电泳行为往往异常, 测定的分子量会有一定误差, 但两种方法测得的菊糖酶的分子量是相近的, 这表明此酶是一种单亚基蛋白。

2.2.3 菊糖酶的等电点测定: 经薄层凝胶等电聚焦法测定, 菊糖酶的等电点为 pH5.4。其等电点高于离子交换层析时的 pH5.0, 这时其带有正电荷, 不易被 DEAE-纤维素吸附, 从而以穿过峰流出。

2.2.4 pH 对酶活力和酶活力稳定性的影响: 以不同 pH 值 (pH3.0~8.0) 的柠檬酸- Na_2HPO_4 缓冲液取代酶活力测定中的 HAC-NaAc 缓冲液, 并测定酶活力。结果表明菊糖酶的最适 pH 为 5.0 (图 3-A)。将菊糖酶液与上面不同 pH 的缓冲液混合, 室温 (~25℃) 放置 1h 后, 测定酶活。结果表明菊糖酶的稳定性较窄, 仅在 pH4.0~6.0 范围内比较稳定, 酶活力保持在 80% 以上 (图 3-B)。

2.2.5 温度对菊糖酶活力和稳定性的影响: 在 pH5.0 时, 在不同温度 (40℃~75℃) 下测定酶活力, 测得菊糖酶的最适酶活温度为 60℃ (图 4-A)。将酶液在不同温度 (30℃~80℃) 下保温 1h, 然后测定酶活。结果 (图 4-B) 表明此菊糖酶有较好的热稳定性, 在 50℃ 保温 1h 后, 酶活力保存近 90%; 在 60℃ 保温 1h 后, 酶活力保存仍接近于 80%。但在高于 60℃ 时, 酶活力下降较快。黑曲霉菊糖酶的最适温度和热稳定性高于文献报道的酵母菌和细菌的菊糖酶^[2,6,7]。由于菊糖在 50℃ 以上才有较好的溶解度, 因此黑曲霉菊糖酶的这种最适温度和热稳定性更有利于对菊糖的水解, 这对于将来工业化的应用也是非常有利的。

2.2.6 菊糖酶的底物专一性: 以 2% 不同的双糖和多聚糖作为底物, 按酶活测定方法测定菊糖酶对这些物质的水解作用, 以菊糖为底物的酶活力作为 100%, 计算菊糖酶对其它物质作为底物时的相对酶活。结果表明黑曲霉菊糖酶的专一性较强, 它不能作用于淀粉, 对于糊精和葡聚糖仅表现有 < 1% 的微弱活力; 它不作用于麦芽糖、乳糖和纤维二糖, 但对蔗糖有较强的分解能力。这说明菊糖酶作用于底物时对于 β -2, 1 果糖苷键具有基团和

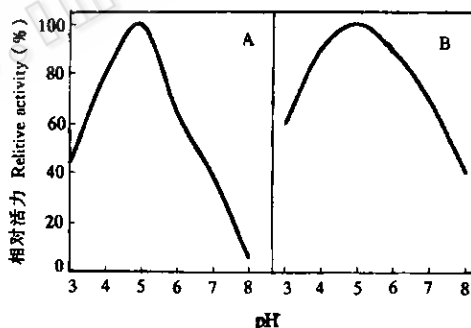


图 3 pH 对菊糖酶活力和稳定性的影响

A: 不同 pH 下酶活力测定; B: 不同 pH 下酶稳定性测定。

Fig.3 Effects of pH on activity and stability of inulinase from *A. niger*

A: Enzymic activity at various pH; B: Enzyme stability at various pH.

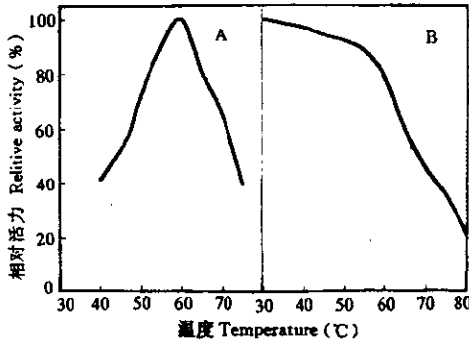


图4 温度对菊糖酶活力和稳定性的影响

A: 不同温度下酶活力测定; B: 不同温度下酶稳定性测定。

Fig.4 Effects of temperature on activity and stability of inulinase from *A. niger*

A: Enzymic activity at various temperature; B: Enzyme stability at various temperature.

余酶活。结果(表2)显示所测金属离子对菊糖酶都有不同程度的抑制作用,其中重金属离子 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Cu^{2+} 的抑制作用最明显。

表2 金属离子对菊糖酶活力的影响

Table 2 Effects of various metal ions on inulinase activity

金属离子 Metal ions (2 mmol/L)	相对酶活力 Relative activity (%)	金属离子 Metal ions (2 mmol/L)	相对酶活力 Relative activity (%)
Ca^{2+}	92.2	Mg^{2+}	65.8
Zn^{2+}	91.8	Cu^{2+}	48.2
K^+	89.6	Pb^{2+}	17.0
Fe^{2+}	76.9	Hg^{2+}	8.7
Mn^{2+}	66.5		

2.2.8 菊糖酶的动力学特征: 固定菊糖酶的量,以不同浓度的菊糖溶液为底物,测定酶的反应速度。采用 Lineweaver-Burk 作图法,求得黑曲霉菊糖酶对菊糖的 K_m 值为 6.25 mmol/L , V_m 值为 $67.11 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

在本文工作中,经过离子交换层析后,可得到两个具有菊糖酶活力的组分。其中组分 A 占总酶活的 95% 以上。因此在本文工作中,主要对这一组分进行了研究。菊糖酶组分 B 的性质及两组分之间的关系,需要进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Vandamme E J, Derycke D G. *Adv Appl Microbiol*, 1983, 29: 139~176.
- [2] Mukherjee K, Sengupta S. *J Sci Industrial Res*, 1989, 48: 145~152.
- [3] Drent W J, Gottschal J C. *Appl Environ Microbiol*, 1991, 57 (2): 455~462.

- [4] Etalibi M, Barratti J C. *Appl Microbial Technol*, 1987, 26: 13~20.
- [5] Bartheleuf C, Regeat F, Pourrat H. *J Ferment Bioeng*, 1991, 72: 491~494.
- [6] Hewitt G M, Grootwassink J W D. *Enzyme Microbiol Technol*, 1984, 6: 263~270.
- [7] Guiraud J P, Galzy P. *Bioprocess Technol*, 1990, 5: 255~296.
- [8] Somogyi M. *J Biol Chem*, 1952, 195: 19~23.
- [9] 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.
- [10] 蔡武城, 李碧羽, 李玉民. 生物化学技术教程. 上海: 复旦大学出版社, 1983. 3.
- [11] Dubois M K, Gelles A, Hamilton J K *et al*. *Anal Chem*, 1956, 28 (3): 350~356.
- [12] 郭尧君. 生物物理学报, 1988, 4: 389~391.
- [13] Snyder H E, Phaff H J. *J Bio Chem*, 1962, 237: 2438~2446.

PURIFICATION AND PROPERTIES OF INULINASE FROM *ASPERGILLUS NIGER*

Chen Guanjun Sun Zhongdong Wang Yingda Qian Xinmin

(The State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100)

Abstract The main component of inulinase was purified from fermentation broth of *Aspergillus niger* 319 to homogeneity by using ammonium sulfate fraction, ion-exchange chromatography on DEAE-cellulose column and Sephadex G-100 gel filtration. The specific activity was as 67 folds at the fermentation broth, and the yield was 25.5%. The inulinase, containing 13.92% of carbohydrate, was a monomer protein with a molecular weight of 28 000 Dalton; and its isoelectric point was pH 5.4. The optimal pH and temperature of the inulinase was pH 5.0 and 60°C, respectively. The enzyme was strongly inhibited by heavy metal ions of Hg^{2+} , Pb^{2+} and Cu^{2+} . The optimal substrate for the enzyme was inulin and the product was only fructose, but it also had invertase activity with the I/S of 0.348. The K_m and V_m of the inulinase was 6.25 mmol/L and 67.11 $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, respectively.

Key words Inulinase, *Aspergillus niger*