

克鲁维酵母 Y-85 菊粉酶的纯化和性质*

魏文铃 余娴文 戴亚 郑晶 谢忠

(厦门大学生物系 厦门 361005)

摘要 克鲁维酵母 (*Kluyveromyces* sp.) Y-85 产生的胞内菊粉酶 (endocellular inulinase) 和胞外菊粉酶 (exocellular inulinase) 粗酶液分别经 PEG6000-磷酸盐缓冲液双水相抽提得部分纯化酶液。前者进一步用硫酸铵分级沉淀、Protein-PAK DEAE 离子交换、Protein-PAK 200SW 凝胶过滤后得到两个菊粉酶组分 E I 和 E II; 后者采用 DEAE-Sephacel 离子交换、Sephadex G150 凝胶过滤后得到菊粉酶 Eexo。经 Waters 650E 蛋白纯化系统鉴定, 三者均呈单一的对称峰; E I 和 E II 达聚丙烯酰胺盘状凝胶电泳纯。E I、E II 和 Eexo 的分子量分别为 42kD、65kD 和 57kD; 三者均为糖蛋白, 多糖含量分别为 30%、35% 和 25%; I / S (Inulinase activity / Sucrase activity) 比值分别为 0.086、0.078 和 0.072; 三者均属外切菊粉酶。E I、E II 和 Eexo 酶反应最适 pH 分别为 4.6、4.5 和 4.6, 最适温度分别为 52℃、52℃ 和 55℃; Ag^+ 、 Hg^{2+} 和 PCMB 对酶活性有强烈的抑制作用; 三者水解菊芋粉糖液的产物均为果糖 (86.5%) 和葡萄糖 (13.5%)。

关键词 克鲁维酵母, 菊粉酶, 纯化和性质

菊粉酶 (Inulinase, EC 3.2.1.7) 在转化菊粉 (Inulin) 成果糖以及制备酒精、山梨糖醇等方面具有良好的应用前景^[1]。菊粉酶的性质研究, 对酶制剂的生产和应用, 尤其是对固定化酶的制备与应用, 具有理论指导意义。由于分离纯化困难, 国外有关酶性质的研究报道不多^[2], 国内仅见丝状真菌产生的菊粉酶纯酶研究报道^[3]。以前, 我们曾报道克鲁维酵母 Y-85 菊粉酶发酵条件以及粗酶的一些性质研究^[4], 现着重描述该菌产生的胞内、胞外菊粉酶的纯化和性质, 并与其它菌株产生的菊粉酶研究进行比较。

1 材料和方法

1.1 粗酶液的制备

将酶发酵液过滤, 所得滤液作为胞外菊粉酶粗酶液; 经离心洗涤的菌体, 用含半胱氨酸的磷酸盐缓冲液提取^[4], 收集离心的上清液作为胞内菊粉酶粗酶液。

1.2 酶活性的测定

菊粉酶和蔗糖酶活性测定按前文^[5]所述的方法进行。

1.3 酶的纯度鉴定

采用 Waters 650E 蛋白纯化系统 (分析性 Protein-PAK 200SW 柱, 486 型检测器) 和聚

*国家“八·五”攻关项目资助课题。

本文于1996年6月14日收到。

聚丙烯酰胺盘状凝胶电泳方法鉴定。

1.4 酶的碳水化合物含量与蛋白质含量测定

酶蛋白中碳水化合物含量测定按 Dubis 描述的苯酚-硫酸法^[6]进行,以葡萄糖作标准曲线;蛋白质含量测定按 Lowry 法^[7],以牛血清蛋白作标准蛋白。

1.5 酶的分子量测定

采用垂直板状 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)^[8]测定酶分子量,分离胶浓度 10%,浓缩胶浓度 4.5%,电极液为 pH8.3Tris-Gly-SDS 缓冲液,每板电流 20mA,电泳完毕用考马氏亮兰 R₂₅₀染色。

1.6 菊芋粉糖液酶解产物分析

菊芋 (*Helianthus tuberosus*) 块茎,经切片、烘干和粉碎后得菊芋粉,采用浸泡、捣浆、沸水浴提取方法制备菊芋粉糖液^[9]。糖液经纯酶水解后的产物用高效液相色谱 (HPLC) 分析,方法同前文^[4]。

1.7 酶的纯化程序

克鲁维酵母 Y-85 产生的胞内菊粉酶和胞外菊粉酶分别按图 1 和图 2 程序纯化。

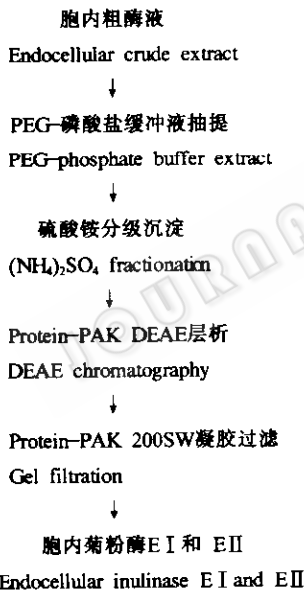


图1 克鲁维酵母Y-85胞内菊粉酶纯化程序

Fig.1 Purification procedure for endocellular inulinase from *Kluyveromyces* sp. Y-85

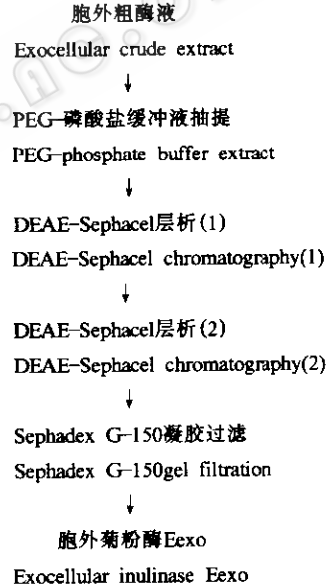


图2 克鲁维酵母Y-85胞外菊粉酶纯化程序

Fig.2 Purification procedure for exocellular inulinase from *Kluyveromyces* sp. Y-85

2 结果和讨论

2.1 菊粉酶的纯化

胞内菊粉酶粗酶液经 PEG-磷酸盐缓冲液双水相抽提、硫酸铵分级沉淀、Protein-PAK DEAE 离子交换柱层析 (Waters 650E 蛋白纯化系统) 后,纯化 48.56 倍、比活力 64.59 u / mg 的酶液 (表 1), 经聚丙烯酰胺盘状凝胶电泳检测发现酶液中仍有三条蛋白区带。因此,酶液

进一步采用 Protein-PAK 200SW 凝胶柱过滤, 最终得到两个菊粉酶活性峰, 分别命名 E I 和 E II, 两者得率比为 1.48:1.00。

表1 胞内菊粉酶的纯化

Table 1 Purification of endocellular inulinase

步骤 Procedure	总酶活 Total activity(u)	总蛋白 Total protein(mg)	比活力 Specific activity(u/mg)	纯化倍数 Purification fold	得率 Activity yield(%)
胞内粗酶液 Crude extract	8635.60	6507.20	1.33	1.00	100.00
PEG-磷酸盐缓冲液提取 PEG-phosphate buffer extract	7795.00	1812.80	4.30	3.23	90.27
硫酸铵分级沉淀 (NH ₄) ₂ SO ₄ fractionation	5482.50	312.22	17.56	13.20	63.49
Protein-PAK DEAE层析 Protein-PAK DEAE chromatography	2565.00	39.71	64.59	48.56	29.70
Protein-PAK 200 SW凝胶过滤 E I: 1430.40	E I: 1430.40	11.04	129.57	97.42	16.56
Protein-PAK 200SW gel filtration E II: 968.50	E II: 968.50	8.96	108.09	81.37	11.22

克鲁维酵母 Y-85产生的胞外菊粉酶粗酶液, 经 PEG-磷酸盐缓冲液双水相抽提, 两次 DEAE-Sephacel 离子交换柱层析, Sephadex G-150 凝胶过滤, 最后得到提纯 271.34 倍、比活力 162.80 u / mg 的酶液 (表 2)。

2.2 酶的纯度鉴定

表2 胞外菊粉酶的纯化

Table 2 Purification of exocellular inulinase

步骤 Procedure	总酶活 Total activity(u)	总蛋白 Total protein(mg)	比活力 Specific activity(u/mg)	纯化倍数 Purification fold	得率 Activity yield(%)
胞外粗酶液 Crude extract	8980.00	15007.50	0.60	1.00	100.00
PEG-磷酸盐缓冲液提取 PEG-phosphate buffer extract	7747.50	4420.00	1.75	2.92	86.27
DEAE-Sephacel 离子交换柱层析 DEAE-Sephacel chromatography	7493.40	1086.00	6.90	11.50	83.40
DEAE-Sephacel 离子交换柱层析 DEAE-Sephacel chromatography	6500.00	276.00	23.55	39.25	72.38
Sephadex G-150 凝胶过滤 Sephadex G-150 gel filtration	2670.00	16.40	162.80	271.34	29.73

菊粉酶 E I、E II 和 E_{exo} 经 Waters 650E 蛋白纯化系统 (分析性 Protein-PAK 200SW 柱, 486 型检测器) 鉴定, 三者均为单一的对称峰 (图 3); E I 和 E II 经聚丙烯酰胺盘状凝胶电泳鉴定为电泳纯。

2.3 酶的分子量测定

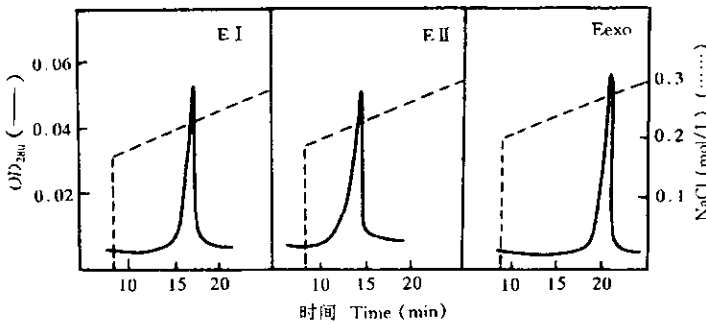


图3 Waters 650E蛋白纯化系统鉴定菊粉酶纯度

Fig.3 Identification of inulinase purity by waters 650E protein purification system

Aspergillus ficuum 来的3种内切菊粉酶分子量均为64kD, 而Uhm等^[11]从*Aspergillus niger*分离到的三种菊粉酶分子量高达300kD.

2.4 酶的碳水化合物含量测定

三者均为糖蛋白: E I多糖含量为30%, E II为35%, Eexo为25%。微生物菊粉酶中多糖含量较高, *Aspergillus niger*的3种菊粉酶中多糖含量分别为20%、30%和40%^[11], *Aspergillus ficuum*菊粉酶多糖含量则处于22%~41%之间^[10]。

2.5 K_m 值与 I / S 值的测定

在 pH5.6, 0.1mol / L 的 NaAc-HAc 缓冲液系统中, 分别以蔗糖和菊糖 (Sigma 产品, MW 为 4 000) 为底物, 用 lineweaver-Burk 双倒数作图法求得 E I、E II 和 Eexo 对菊糖、蔗糖的 K_m 值; 以上述缓冲液适当稀释酶液, 测定三种酶液对 2% 菊糖的活性 (I) 和蔗糖的活性 (S), 并计算出 I / S 比值。所得结果见表 3 所列。从霉菌来的菊粉酶 I / S 值较高, 而酵母菌产生的菌粉酶 I / S 值往往比较低, 并且两者均可水解蔗糖。因此, 有人曾认为酵母菊粉酶是一类特殊的转化酶 (Invetase, E C 3.2.1.26)。为了区分酵母产生的菊粉酶和转化酶, Ettalibi 等^[10]认为菊粉酶的 I / S 比值应高于 10^{-2} , 而转化酶的 I / S 值往往低于 10^{-4} 。按照这种划分法, E I、E II 和 Eexo 均属菊粉酶。

2.6 酶的底物特异性

以蔗糖、棉子糖、松三糖、菊糖等为底物 (1.0%), 分别加入适量 (10 u / g) 酶 E I、E II 和 Eexo, 50℃ 恒温振荡作用 6 h 后, 产物用纸层析法作定性分析。酶水解产物中发现有果糖、葡萄糖和蜜二糖 (从棉子糖产生), 未见蔗糖, 松三糖则不被以上三种酶所水解。松三糖末端结构虽然与菊糖相似, 但由于其果糖分子 C_3 位置上连接另一个葡萄糖分子, 因此不被菊粉酶所水解。内切菊粉酶通常不水解蔗糖和棉子糖, 酶解菊糖只产生低聚果

采用 SDS-PAGE 法测定 E I、E II 和 Eexo 的分子量 (图 4), 计算测得结果分别为 42kD、65kD 和 57kD。由于菊粉酶产生菌种不同, 以及提纯方法上的差别, 有关酶分子量测定的报道差别较大, Ettalibi 等^[10]报道, 从

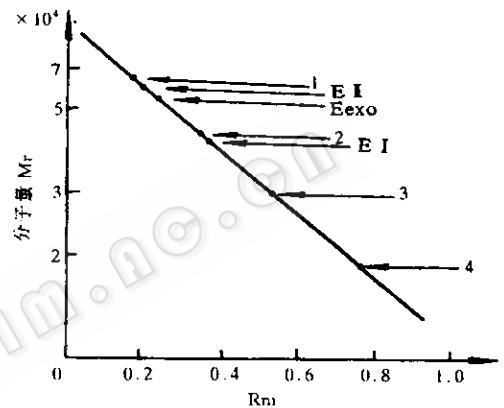


图4 SDS-PAGE法测定酶分子量

Fig.4 Determination of inulinase molecular weight by SDS-PAGE

- 1. Albumin (67 000); 2. Actin (43 000);
- 3. Carbonic anhydrase (30 000); 4. TMV Gapsulate protein (17 500).

糖。克鲁维酵母 Y-85 菌株产生的胞内和胞外菊粉酶中分离到的 EI、EII 和 Eexo 均属外切菊粉酶。酵母菌产生的菊粉酶多属外切菊粉酶; 而霉菌则情况不同, 例如 Ettalibi 等从 *Aspergillus ficuum* 产生的菊粉酶中分离到 5 种外切菊粉酶和 3 种内切菊粉酶^[10]。

表3 菊粉酶的 K_m 值和 I/S 比值Table 3 K_m and I/S ratios of inulinase

纯酶 pure enzyme	K_m		菊粉酶活力 Inulinase activity (I)	蔗糖酶活力 Sucrase activity (S)	I/S
	For inulin (mmol/L)	For sucrose (mmol/L)	(u/ml)	(u/ml)	
EI	9.6	16.0	427.4	4969.7	0.086
EII	8.9	14.9	406.6	5212.8	0.078
Eexo	10.0	15.6	395.0	5486.1	0.072

2.7 pH 值对酶活性和稳定性的影响

测定时采用 0.1 mol / L GLy-HCL 缓冲液 (pH2.8~3.6), 0.1 mol / L HAC-NaAc 缓冲液 (pH3.6~6.0) 和 0.1 mol / L NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲液 (pH6.0~8.0) 系统。在上述不同 pH (每隔 0.5 pH 值) 缓冲液中, 以菊糖为底物测定三种酶活力 (50℃), 结果表明, EI、Eexo 酶反应最适 pH 均为 4.6, EII 为 4.5。将三种酶分别加到各种不同 pH (每隔 0.5 pH 值) 的缓冲液中, 30℃ 恒温 24h 后测定酶活力, EI、EII 在 pH4.0~6.5, Eexo 在 pH4.0~7.0 范围内保持稳定, 均保留 90% 以上活力。

三种酶的反应最适 pH 和 pH 稳定范围与 *Penicillium purpurogenum* 产生的菊粉酶相类似^[12]。应该指出, 酶反应在较低 pH 下进行, 可避免酶解菊粉时形成色素及副产物。

2.8 温度对酶活性和稳定性的影响

在 0.1 mol / L HAC-NaAc 缓冲液 (pH5.6) 中进行各种温度下 (40~70℃, 相隔 5℃) 酶反应, 结果发现 EI 和 EII 水解菊糖反应最适温度为 52℃, Eexo 为 55℃。这比未经纯化的粗酶液最适温度 (50℃) 略有提高^[4], 与 Vandamme 等报道的酵母菊粉酶相近^[2]。将酶分别在不同温度 (40~70℃, 相隔 5℃) 下保温 10 min 后, 测定其剩余活力, 结果表明, EI、EII 温度升高到 55℃ 尚存 85% 酶活力, 温度 60℃ 时仅剩 40% 活性; Eexo 温度升高 57℃ 时存有 87% 酶活力, 温度升高到 60℃ 时, 仅存 45% 活性。在实际应用中, 在较高的温度下水解, 有利于提高底物菊粉的溶解度和酶解反应时控制杂菌的污染。

2.9 金属离子及某些化合物对酶活性的影响

在适当稀释的酶液中, 分别加入各种金属离子和 EDTA、PCMB, 使其最终浓度达 1 mmol / L, 50℃ 保温 1 h 后测定酶活力。结果表明, Ni^{3+} 对三种酶均有激活作用, Mg^{2+} 对 Eexo 有一定激活作用; Fe^{3+} 对 Eexo 有一定抑制作用, 而 Ag^+ 、 Hg^{2+} 和 PCMB 对三种酶均有强烈的抑制作用。从 PCMB 强烈抑制酶活性可以看出, 三种酶的活性基团中包含巯基。Nakamura 等报道 *Penicillium sp.2* 产生的 3 种胞外菊粉酶中, Co^{2+} 对酶有较强的激活作用^[2], 这种情况在本研究中未曾发现。

2.10 菊粉酶水解菊芋粉糖液及其产物分析

酶解时菊糖浓度分别为 2.0%、5.0% 和 10.0%, 按 1g 糖加入 10u 的酶量添加酶 EI、

EⅡ和Eexo, 50℃恒温水浴振荡, 相隔一定时间取样, 分别测定总还原糖含量。结果发现, 2.0%、5.0%和10.0%的菊糖溶液分别在4h、6h和9h内均被三种酶所完全水解。(酶解率达99%)。用HPLC分析测定, 色谱图上仅出现果糖和葡萄糖峰, 果糖占86.5%, 葡萄糖占13.5%。以上结果表明, 纯化的三种菊粉酶水解菊糖的性质与粗酶液相同^[4]。

参 考 文 献

- [1] 魏文铃. 食品科学, 1991, 10: 19~21.
- [2] Vandamme E J, Deerycke D G. *Adv Appl Microb*, 1983, 29: 139~176.
- [3] 白春阳, 苏文金. 真菌学报, 1994, 13(4): 282~299.
- [4] 郑忠辉, 刘月英, 魏文铃, 等. 厦大学学报, 1995, 34(1): 82~87.
- [5] 魏文铃, 谢 忠, 王群力, 等. 工业微生物, 1994, 24(4): 19~23.
- [6] Dubis M, Gilles K A. *Analytical Chem*, 1956, 28: 350~356.
- [7] Lowry O H, Rosebrough N H, Farr A. *J Biol chem*, 1951, 193: 265~275.
- [8] Laemmli U K. *Nature*, 1970, 227: 680~685.
- [9] 郑文竹, 姚炳新, 魏文铃, 等. 厦大学学报, 1996, 35(1): 112~116.
- [10] Ettalib M, Baratti J C. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1987, 26: 13~20.
- [11] Uhm T B, Jeon D Y, Byun S M et al. *Biochim Biophys Acta*, 1987, 926: 119~126.
- [12] Onodera S, Shiomi N. *Agric Biol chem*, 1988, 52(10): 2569~2576.

PURIFICATION AND PROPERTIES OF INULINASE FROM *KLUYVEROMYCES* SP. Y-85

Wei Wenling Yu Xiawen Dai Ya Zheng Jing Xie Zhong

(Department of Biology, Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract The crude endocellular inulinase from *Kluyveromyces* sp. Y-85 was purified to two components, designated as EⅠ and EⅡ, using PEG6000-phosphate buffer extraction, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fractionation, DEAE chromatography and gel filtration (Protein-PAK); The crude exocellular inulinase from this strain was purified to Eexo by means of PEG6000-phosphate buffer extraction, double DEAE-Sephac chromatography, Sephadex G-150 gel filtration. EⅠ、EⅡ and Eexo were demonstrated to be homogeneous by Waters 650E protein purification system. Their molecular weights are 42kD, 65kD and 57kD, respectively. All the inulinases were glycoproteins containing a saccharide (from 25% to 35%) and belonged to the endo-inulinase. In addition, EⅠ、EⅡ、Eexo were optimally reactive at pH4.6、4.5、4.6 and at 52℃、52℃、55℃, respectively. Ag^+ 、 Hg^{2+} and PCMB inhibited these enzymes' activity strongly. The products of raw inulin extracted from *Helianthus tuberosus* hydrolyzed by these three enzymes were fructose (86.5%) and glucose (13.5%)

Key words *Kluyveromyces*, Inulinase, Purification and properties