

黑曲霉 M89 菊粉酶的提纯与性质*

贾 英 民

赵 学 慧

(河北农业大学食品科学系 保定 071001) (华中农业大学食品科技系 武汉 430070)

摘 要 黑曲霉 (*Aspergillus niger*) M89 菊粉酶经硫酸铵分级盐析、Sephadex G-200 凝胶过滤、DEAE-纤维素离子交换层析、聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 制备分离, 提纯到 4 个菊粉酶组分 EI、EII、EIII 和 EIV。用 SDS-PAGE 测定分子量分别为 102.6、97.9、61.2 和 36.5 kD; 用等电聚焦电泳测得其等电点分别为 4.15、4.24、4.48 和 4.15。4 个组分的最适反应温度均为 55~60℃; EI 的最适 pH 为 pH 4.0, 其余 3 个组分为 pH 4.5。各组分的热稳定性有一定差异, 分子量越小的组分, 热稳定性越好, 55℃ 处理 90 min, EI 有一定的热失活, 其余 3 个组分无活力丧失, 4 个组分都是外切酶。

关键词 黑曲霉, 菊粉酶

分类号 Q556

菊粉酶 (Inulinase) 是天然果聚糖——菊粉 (Inulin) 的水解酶, 主要来源于菊科植物组织和部分微生物^[1,2]。前者的底物专一性较强, 仅作用于菊粉^[3,4], 而由微生物产生的菊粉酶普遍底物专一性较差, 大部分都能水解有 β -2, 1 呋喃果糖键的菊粉、蔗糖和棉子糖^[5~8], 属反应专一性。Nakamura 从黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 12 菌株的胞外菊粉酶提纯到的一个内切酶组分仅能水解菊粉, 产物是低聚果糖^[9]。脆壁克鲁维酵母 (*Kluyveromyces fragilis*) 产生的菊粉酶还具有水解 β -2, 6 键的活力^[10]。研究表明, 霉菌类菌株的胞外酶均由两个或两个以上组分构成, 同一菌株的不同组分间存在某些酶学性质的差异^[10~12]。本文报道从多年生长菊芋的根围土壤中分离筛选到的黑曲霉 M89 菌株菊粉酶的酶系构成及其性质。

1 材料和方法

1.1 发酵培养基

麸皮 60g, 硫酸铵 0.5g, 菊芋粉 6.5g, 水 50ml。

1.2 菊粉酶粗酶液制备

500 ml 三角瓶装 20 g 培养基, 固态发酵 8d, 达到产酶高峰, 按 1:20 加入 0.1 mol 的醋酸缓冲液 (pH4.5) 浸酶, 振荡器摇振 2 min 打散培养基, 室温放置 4 h, 再振荡 2 min, 双层滤纸抽滤除去杂质和菌体即得粗酶液。

1.3 菊粉酶的提纯过程

1.3.1 初步纯化: 在 0℃ 条件下, 用 40% 饱和度硫酸铵除杂蛋白, 用 90% 饱和度硫酸铵析

* 河北省自然科学基金资助项目 (在华中农业大学食品微生物研究室完成)。

收稿日期: 1996-10-03

出菊粉酶,用 Sephadex G25 脱盐,聚乙二醇 6000 透析浓缩。

1.3.2 Sephadex G200 层析:有效柱体积 $2.5 \times 90\text{cm}$,有效操作压 14cm ,流速 12ml/h ,用 LKB2023 型自动层析仪,操作温度为 10°C ,用 $0.05\text{mol pH}5.0$ 的醋酸缓冲液平衡并洗脱。

1.3.3 DEAE-纤维素 DE_{52} 离子交换层析:有效柱体积 $1.6 \times 60\text{cm}$,用 $\text{pH}6.0$ 的 0.05mol Tris-HCl 缓冲液平衡,控制流速为 12ml/h ,用 $0 \sim 0.5\text{mol NaCl}$ 线性梯度洗脱。

1.3.4 电泳分离:用聚丙烯酰胺垂直板电泳进行分离,浓缩胶 $\text{T}\% = 3.1\%$ 、 $\text{C}\% = 2.6\%$,用 $\text{pH}6.7$ 的 Tris-HCl 缓冲液配制;分离胶 $\text{T}\% = 7.0\%$ $\text{C}\% = 20\%$,用 $\text{pH}8.9$ 的 Tris-HCl 缓冲液配制,电极液为 $\text{pH}8.3$ 的 Tris -甘氨酸缓冲液, 4°C 、 120V 恒压电泳。

1.4 分析测定方法

1.4.1 菊粉酶分子量测定:采用 SDS-聚丙烯酰胺垂直板电泳法,标准分子量蛋白:碳酸酐酶 (Carbonic anhydrase) 30kD ,卵白蛋白 (Ovalbumin) 45kD ,牛血清白蛋白 (Bovine Serum albumin) 66.25kD ,卵转铁蛋白 (Ovtransferrin) 78kD ,醛缩酶 (Aldolase) 158kD 。以标准蛋白的分子量的对数和其相应的电泳迁移率建立回归方程,计算待测样品的分子量。

1.4.2 菊粉酶活力测定:参照 Uhm 等报道的方法^[7,13]取适当稀释的酶液 $50\mu\text{l}$,加入 $450\mu\text{l}$ 5% 的菊粉 ($0.1\text{mol pH}4.5$ 醋酸缓冲液), 55°C 恒温水浴 10min , 100°C 沸水浴 5min 快速灭活,取出迅速冷却,加入 4.5ml 蒸馏水,混匀,采用 Somogyi-Nelson 方法测定还原糖;用相同稀释的酶液预先灭活后,在上述完全相同条件下作对照。在上述条件下每分钟水解菊粉产生 $1\mu\text{mol}$ 还原糖的酶量即为 1 个酶活力单位 (U)。

1.4.3 可溶性蛋白测定:采用考马斯亮兰 G-250 法^[14],用牛血清白蛋白作对照。

1.4.4 菊粉酶水解菊粉的产物分析:采用纸层析法。展开剂为正丁醇:乙醇:水 = $10:1:2$,显色剂:苯胺-二苯胺。

2 结果和讨论

2.1 菊粉酶的提纯

黑曲霉 M89 菊粉酶提纯结果见表 1。经 Sephadex G200 分离后,得到两个具有菊粉酶活力的洗脱峰 (PKI、PKII)。进一步用 DEAE-纤维素离子交换层析分离,PKII 部分分离得到 2 个菊粉酶活力峰 (PKIIa、PKIIb);而 PKI 仍得到 1 个菊粉酶活力峰。经电泳检测,PKIIa、PKIIb 各出现一条电泳带,认为达到电泳纯;而 PKI 仍出现两条电泳带。进一步将 PKI 部分用 PAGE 分离,电泳后,将凝胶切片浸酶,又分离出了具有菊粉酶活力的两部分 (PKIa、PKIb),用聚丙烯酰胺圆盘电泳检测,均出现一条电泳带,达到电泳纯 (见图 1)。为叙述方便,根据在电泳上的迁移率大小,分别将 PKIa、PKIb、PKIIa、PKIIb 称为 EI、EII、EIII 和 EIV。Uhm 和 Nakamura 都从黑曲霉的粗酶液中提纯到 3 个菊粉酶组分^[9,11],本研究结果与前人报道的菊粉酶的构成上有一定的差异,可能是菌株的遗传特性存在一定差异,此

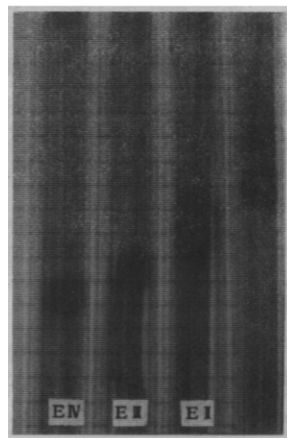


图 1 菊粉酶组分的聚丙烯酰胺圆盘电泳

Fig. 1 PAGE of inulinase components

外,由于产酶条件的不同,也可能导致粗酶液中菊粉酶组成的差异,此问题有待进一步系统研究。

表 1 黑曲霉 M89 菊粉酶的提纯

Table 1 Purification of inulinase from *Aspergillus niger* M89

提纯步骤	总酶活	总蛋白	比活力	提纯倍数	得率
Steps	Total activity(u)	Total protein(mg)	Specific activity(u/mg)	Purification fold	Activity yield(%)
粗酶液 Crude extracts	16259.50	731.37	22.23	1.00	100.00
硫酸铵分级盐析 (NH ₄) ₂ SO ₄ fractionation	13322.40	389.85	34.85	1.54	81.94
Sephadex G200层析 Sephadex G200 Chromatography					
PKI	2050.31	73.21	28.00	1.26	12.61
PKII	6208.24	70.53	88.58	3.98	38.18
DEAE纤维素层析 DEAE-celulose Chromatography					
PKI	1127.67	15.93	70.80	3.18	6.94
PKIIa(EIII)	1342.90	3.61	371.10	16.69	8.26
PKIIb(EIV)	2962.46	6.32	426.20	19.17	18.22
电泳分离 Electrophoresis					
PKIa(EI)	270.44	6.25	43.25	1.95	1.66
PKIb(EII)	547.55	5.54	98.85	4.45	3.37

2.2 黑曲霉 M89 菊粉酶蛋白质分子特性

分别用 SDS-聚丙烯酰胺电泳和等电聚焦技术测定了 4 个菊粉酶组分的分子量(MW)和等电点(pI),表 2 表明 4 个组分的分子量差异较大。EIII 的分子量几乎是 EIV 二倍,在凝胶层析时却没有分开,有可能 EIV 是由两个相同的亚基构成的二聚体,在电泳时,样品经 SDS 和巯基乙醇处理后解聚成单体。4 个菊粉酶组分的等电点差异不大,其中 EI 和 EIV 的等电点都是 4.15, EII 和 EIII 的等电点分别为 4.24 和 4.48,关于菊粉酶蛋白分子等电点的报道很少, Uhm 测定了黑曲霉菊粉酶三个组分的等电点分别为 4.5、4.9 和 5.2^[11],与本研究结果稍有差异。

表 2 黑曲霉 M89 菊粉酶的蛋白质分子特性

Table 2 Molecular characteristics of inulinase from *Aspergillus niger* M89

	EI	EII	EIII	EIV
分子量(kD)	102.6	97.9	61.2	36.5
Molecular weight				
等电点(pI)	4.15	4.24	4.48	4.15
Isoelectric point				

2.3 黑曲霉 M89 的菊粉酶组分的催化特性

2.3.1 最适反应温度及酶的热稳定性:在不同温度条件下测定组分的菊粉酶活力,以测定

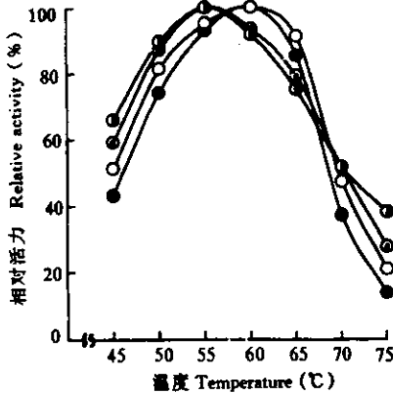


图2 温度对菊粉酶活力的影响

Fig.2 Effect of temperature on inulinase activity

●: EI; ○: EII; ⊙: EIII; ⊗: EIV.

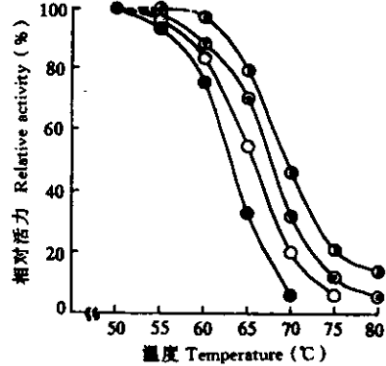


图3 菊粉酶的热稳定性

Fig.3 Thermal stability of inulinases

●: EI; ○: EII; ⊙: EIII; ⊗: EIV.

酶的最适反应温度。将各组分分别在不同温度下保温 90 min, 然后迅速冷却, 测定残余菊粉酶活力, 研究各组分的热稳定性。结果(图 2)表明 4 个组分的菊粉酶活力最适温度都在 55~60℃, 这与王慧莲、Nakamura 和 Uhm 等报道的结果较为一致^[9,11,15], 较目前已报道的酵母菌株菊粉酶的最适温度高^[16,17]。由图 3 可以看出, 4 个组分的热稳定性有一定差异, 分子量越小的组分热稳定性越好, 55℃ 热处理 90 min, EI 稍有失活, 其余 3 个组分没有酶活力的丧失, 当处理温度超过 65℃ 时, 4 个组分都表现有严重的热失活, 王慧莲报道黑曲霉的菊粉酶在 55℃ 热稳定性较好, 本文的结果与前人报道表明, 黑曲霉菊粉酶的热稳定性好, 最适温度高, 为其在超高果葡糖浆生产上应用提供很大方便。

2.3.2 黑曲霉 M89 菊粉酶的最适 pH 和酸碱稳定性: 用不同 pH 的 0.1 mol 柠檬酸、磷酸二

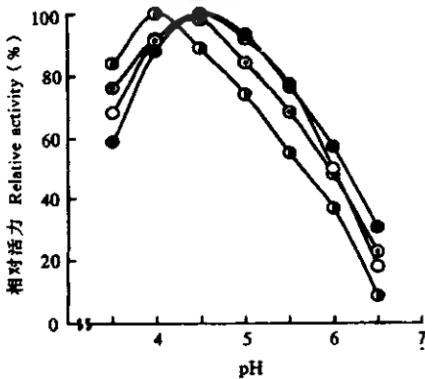


图4 pH对菊粉酶活力的影响

Fig.4 Effect of pH on inulinase activity

●: EI; ○: EII; ⊙: EIII; ⊗: EIV.

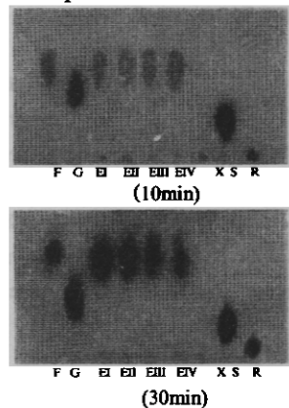


图5 菊粉酶水解菊粉的产物分析

G: 葡萄糖; F: 果糖; S: 蔗糖; R: 棉子糖; X: 对照

Fig.4 Analysis of the hydrolytic products of inulin by inulinases

G: Glucose; F: Fructose; S: Sucrose;

R: Raffinose; X: Control.

氢钠、巴比妥缓冲液配制 5% 的菊粉,测定 pH 对菊粉酶活力的影响,结果(图 4)表明,4 个组分的菊粉酶活力受基质 pH 影响较明显,最适 pH 范围较窄,EII、EIII、EIV 的最适 pH 为 4.0~5.0,当 pH5.5 以上时,酶活力有严重丧失;EI 的最适 pH 在 4.0 左右,当 pH5.0 时仅表现 75% 的酶活力。

将各组分分别用不同 pH 的上述缓冲液室温透析 12h,然后恢复 pH4.5,测定残余菊粉酶活力,结果表明 4 个组分的酸碱稳定性较好,在 pH4.0~7.0 范围无活力丧失,当 pH10 时,4 个组分都有一定程度的失活(20%~25%),结合图 4 分析,可以看出,在 pH5.0~7.0 范围内,菊粉酶活力的丧失是可逆的,当 pH 得到恢复后,菊粉酶活力也得到恢复。

2.3.3 纯菊粉酶组分水解菊粉的作用方式:用各组分在 55℃ 水解 5% 的菊粉(菊粉经重结晶处理),分别在水解 10 min 和 30 min 取样进行纸层析。用葡萄糖、果糖、蔗糖和棉子糖作对照。结果(图 5)表明,4 个组分水解菊粉的产物是果糖,没有低聚果糖成分检出,说明 4 个菊粉酶组分均为外切酶,Uhm 报道黑曲霉的 3 个菊粉酶组分都是外切酶,与本研究结果一致,而 Nakamura 提纯的黑曲霉 3 个菊粉酶组分中,有一个是严格的内切酶,其余 2 个组分是外切酶,酶的作用方式也表明不同的黑曲霉菌株菊粉酶构成的差异。

参 考 文 献

- [1] Parekh S, Margaritis A. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1988, 22: 446~448.
- [2] Edelman J, Jefford T G. *Biochem J*. 1964, 93: 148~161.
- [3] Flood A E, Rutherford P P, Weston E W. *Nature*, 1967, 214: 1049~1053.
- [4] Rutherford P P, Deacon A C. *Biochem J*. 1972, 126: 569~573.
- [5] Kaur N, Kaur M, Gupta AK *et al*. *J Chem Tech Biotechnol*, 1992, 53: 279~284.
- [6] Allais J J, Sadk K, Philippe B *et al*. *Appl Environment Microbiol*, 1986, 52(5): 1086~1090.
- [7] Derycke D G, Vandamme E J. *J Chem Tech Biotechnol*, 1984, 34B: 45~51.
- [8] Manzoni M, Cavazzoni V. *J Chem Tech Biotechnol*, 1992, 54: 311~315.
- [9] Nakamura T, Nakatsu S. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, 1987, 52: 58~587.
- [10] Synder H Z, Phaff H J. *Antonie Van Leeuw Enhoek J Microbiol Serol*, 1960, 26: 433~452.
- [11] 白春阳, 苏文金. *真菌学报*, 1994, 13(4): 282~289.
- [12] Uhm T B, Jeon D Y, Byun S M *et al*. *Biochem Biophys Acta*, 1987, 926: 119~126.
- [13] Uhm T B, Byun S M. *Biotechnol Lett*, 1987, 9: 287~290.
- [14] Sedmak J J, Grosserg S E. *Analytical Biochem*, 1977, 19: 544~552.
- [15] 王慧莲, 宋国勇, 李虹. *食品与发酵工业*, 1994, 3: 16~20.
- [16] Workman W E, Day D F. *FEBS Letters*, 1983, 160(2): 16~20.
- [17] Rouwenhorst R J, Visser L E, Vanderbaan A A. *Appl Environment Microbiol*, 1988, 54: 1131~1137.

PURIFICATION AND PROPERTIES OF INULINASES FROM *ASPERGILLUS NIGER* M89

Jia Yingmin

(Department of Food Science, Hebei Agricultural University, Baoding 071001)

Zhao Xuehui

(Department of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract Four inulinase components were purified from *Aspergillus niger* M89 by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fractionation, Sephadex G-200 gel filtration, DEAE-cellulose chromatography and polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The molecular weight of EI, EII, EIII and EIV were indicated to be 102.6, 97.9, 62.5 and 36.5kD respectively by SDS-PAGE. Measured by isoelectric focusing, their isoelectric points were 4.15, 4.24, 4.48 and 4.15 respectively. Four forms of inulinase exhibited maximal inulinase activity between 55~60°C with optimal pH 4.0~5.0. There were some difference in their thermal stability. The little the molecule of the component was, the stronger its thermal stability was. All of four components were exo-acting inulinases.

Key words *Aspergillus niger*, Inulinases