

文章编号:1004-7271(2004)01-0056-04

酵母菌 C10 产菊粉酶酶学性质的研究

王 艳¹, 金征宇², 徐学明², 王 伟², 许继春²

(1. 上海水产大学食品学院, 上海 200090; 2. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘 要 采用菊粉酶活力测定的方法研究了酵母菌 C10 所产菊粉酶的酶学性质。该酶的最适温度和最适 pH 分别为 50℃、5.5。在此条件下, 该酶酶活力达到 12.0U/mL, I/S 值为 14.0, 其水解菊粉后低聚糖得率为 29%。1.5% 菊芋干粉为合成菊粉酶较好的诱导物; Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 对菊粉酶有激活作用, Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 有抑制作用。该菊粉酶中胞外酶、胞壁酶、胞内酶分布为 7.5:0.5:2.0。研究了底物浓度对酶反应的影响, 当底物浓度达到 20mg/mL 时, 产物浓度基本不变, 反应初速度达到最大值。

关键词 酵母; 菊粉酶; 酶活

中图分类号: TS201.2 文献标识码: A

Study on the enzymatic properties of inulinase produced by yeast C10

WANG Yan¹, JIN Zheng-yu², XU Xue-ming², WANG Wei², XU Ji-chun²

(1. Food College, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China;

2. Food College, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract The enzymatic properties of inulinase produced by yeast C10 were investigated with assays of inulinase activity. The results showed the optimum temperature and pH of inulinase were 50°C and 5.5 respectively. The value of enzymatic activity was 12.0U/mL, I/S was 14.0, and the rate of fructooligosaccharides' production was 29%. The better inducer was chicory powder with concentration at 1.5%. Mn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} can activate the inulinase, but Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} inhibit it. The ratio of exoinulinase, extracellular inulinase, endoinulinase was 7.5:0.5:2.0. When substrate concentration attained 20mg/mL, resultant concentration remained unchanged, and initial velocity attained maximal value.

Key words yeast; inulinase; enzyme activity

菊粉酶(Inulinase)是一种催化裂解菊粉(Inulin)多聚果糖中 β -2,1 果糖苷键的水解酶, 产物多为果糖和低聚糖。其为具有两种作用方式的复合酶^[1]。一为外切型, 从非还原端逐个水解 β -2,1-果聚糖苷键, 生成一分子果糖和少一个果糖单位的果聚糖。另一种为内切型, 此酶水解菊粉的多糖链内部的 β -果聚糖苷键, 产生降低了聚合度的低聚果糖。低聚果糖是一种双歧因子, 是功能性食品或饲料添加剂, 被称为原生素(Probiotic Potential of Element PPE)。酵母是产菊粉酶较好菌株, 其所产酶能有效水解廉价的菊

收稿日期: 2003-06-18

作者简介: 王 艳(1973-)女, 湖北汉川人, 博士生。专业方向为海洋生物资源的综合利用。Tel: 021-65710346, Fax: 021-65710346,

E-mail: ywang2@shfu.edu.cn

通讯作者: 金征宇(1960-)男, 江苏扬州人, 博导, 从事生物技术在饲料资源中的开发与利用的研究。

芋(洋姜)而得到低聚果糖,国内关于菊粉酶酶学性质的研究并不多,了解菊粉酶的性质,对廉价成本低聚糖的制备意义重大。本实验以酵母菌 C10 为出发菌株,研究其所产菊粉酶的一些性质。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

酵母菌 C10 为从种植菊芋(洋姜)的土壤中初步鉴定为隐球酵母属(*Cryptococcus*)的菌株经初筛、复筛后获得。

1.1.2 培养基

斜面培养基^[2]:蛋白胨 2% 酵母膏 1% 葡萄糖 2% 琼脂 2% ,pH 自然;种子培养基:同上,不加琼脂;发酵培养基:菊芋干粉 5% NaCl 0.5% 酵母膏 0.3% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.5% MgSO_4 0.05% ,500mL 三角瓶加 100 mL 培养基 ,pH 自然。

1.2 方法

1.2.1 菊粉酶活力测定

将发酵液离心(3500r/min ,15min)取清液 1mL 加 4ml 2% 菊糖(用 0.2mol/mL pH 4.5 醋酸缓冲液配制)50℃反应 10min ,沸水浴 5min 终止酶活,在其他相同条件下,以每分钟转化生成 $1\mu\text{mol}$ 还原糖的量称为一个酶活力单位^[3]。

1.2.2 内切/外切指标值(I/S)值确定

对于具有内切和外切菊粉酶活性的粗酶液,通常测其对 2% 菊粉溶液的活性(I)和 2% 蔗糖溶液的活性(S),计算出其 I/S 的值,并以此作为确定其作用方式(内切/外切)的指标。一般认为当 $I/S > 10$ 时,粗酶液的外切活性被抑制,而表现为内切活性。I/S 值通过检测水解菊粉和蔗糖后的还原糖量得到^[4,5]。

一定量酶液分别与一定浓度菊粉、蔗糖在 pH5.4 醋酸缓冲液中,55℃条件下反应 30min ,沸水浴灭活 10min ,利用 3,5-二硝基水杨酸法测其还原糖量。一个单位 I 值定义为每分钟产生 $1\mu\text{mol}$ 果糖量,1 个单位 S 值定义为每分钟水解 $1\mu\text{mol}$ 蔗糖量^[6,7]。

1.2.3 菊粉酶的提取

胞外酶提取:发酵液离心 3500r/min ,20min ,取上清液。胞壁酶提取:取 10mL 发酵液经离心洗涤所得的湿菌泥,加入缓冲液(pH6.0 50mmol/L 磷酸缓冲液,内含 10mmol/L β -巯基乙醇,10mmol/L 二巯基蔗糖醇,2mmol/L MgSO_4)10mL 搅拌均匀,30℃保湿振荡 1h ,离心取上清液。胞内酶提取:测定胞壁酶后的菌体,离心洗涤加入破壁缓冲液(pH 6.0 50mmol/L 磷酸缓冲液,内含 1mmol/L EDTA ,10mmol/L β -巯基乙醇,2% 蜗牛酶)10mL ,30℃保湿振荡 1h 后,超声波破菌体,取悬液^[8]。

1.2.4 低聚糖、还原糖测定:HPLC 法

HPLC :Water209 系列配有 R401 示差折光检测器和 M740 数据处理器;色谱柱:Hewlett Packard 公司 APS Hypersil $4.6 \times 100\text{mm}$,填料粒度 $5\mu\text{m}$;流动相:乙腈/水 75/25(v/v) ,流速 1ml/min ;温度:28℃;进样量: $10\mu\text{L}$ ^[9,10] ,标准样品二糖、四糖、五糖由无锡江南大学中研所提供。

2 试验结果

2.1 pH 值对酶活的影响

在 pH 4.5 ~ 9.0 条件下,通过多次平行试验,测定酶活力,所得结果见图 1。

2.2 pH 值对酶稳定性的影响

将酶分别在 pH 4.0 ~ 9.0 的缓冲液中 20℃放置 1hr 后,通过多次平行试验,测定其残余酶活力,结

果见图 2。

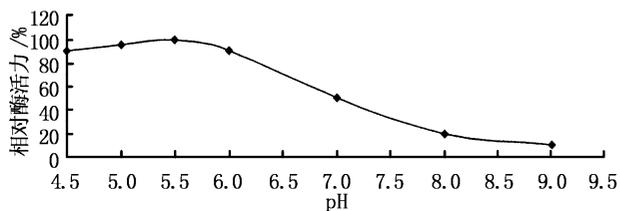


图 1 pH 值对酶活的影响

Fig.1 Effect of pH on enzyme activity

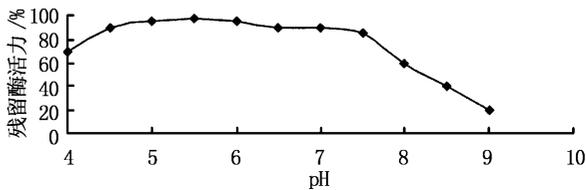


图 2 pH 值对酶稳定性的影响

Fig.2 Effect of pH on enzyme stability

2.3 温度对酶活的影响

在 pH 5.5 条件下, 30 ~ 60℃ 范围内通过多次平行试验, 测定酶活力, 结果见图 3。

2.4 菊粉酶中胞外酶、胞壁酶、胞内酶的分布

通过检测, 酵母菌 C10 所产菊粉酶中胞外酶、胞壁酶、胞内酶分布见表 1。

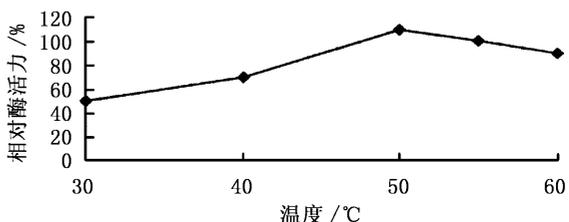


图 3 温度对酶活的影响

Fig.3 Effect of temperature on enzyme activity

2.5 金属离子对产菊粉酶的影响

通过添加不同金属离子, 测定其酶活力。不同金属离子对产酶的影响见表 2。

2.6 诱导物对产菊酶及 I/S 值的影响

添加不同诱导物^[1]检测其对产菊粉酶及 I/S 值的影响, 结果见表 3。

表 1 菊粉酶中胞外酶、胞壁酶、胞内酶分布
Tab.1 Distribution of exoinulinase, extracellular inulinase, endoinulinase

项目	胞外酶	胞壁酶	胞内酶
酶活力(U/ml)	6	0.5	1.4
占总酶活百分比(%)	75	5	20

表 2 金属离子对菊粉酶合成影响

Tab.2 Effect of different ions on inulinase's production

金属离子	相对酶活力(%)
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	-10
MgSO ₄ ·7H ₂ O	+25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	-50
CaCO ₃	+20
FeSO ₄ ·7H ₂ O	-30
MnSO ₄	+30

表 3 不同诱导物对菊粉酶合成影响

Tab.3 Effect of different inducer on inulinase's production

诱导物(1.5%)	酶活力(U/ml)	I/S 值
麦芽糖	5.0	8.7
果糖	6.5	7.5
葡萄糖	2.0	7.0
试剂菊粉	7.0	10.0
蔗糖	2.2	8.0
菊芋干粉	11.0	12

2.7 酶动力学方程

将 C10 菌株所产菊粉酶经过初步纯化后, 在 t = 40s 时间及酶量一定条件下, 改变底物浓度(s), 测产物浓度(p), 初速度设定为 Δp/t₀。

表 4 底物浓度与初速度的关系

Tab.4 Relationship between substrate concentration and initial velocity

底物浓度(mg/mL)	0	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
初速度(mg/mL·40s)	0	0.86	1.2	1.48	1.56	1.65	1.78	1.9	2	2.09	2.12	2.15

3 讨论与小结

(1) pH 值为 5.5 时 酶活最高 , 低于或高于 5.5 , 酶活都有所下降。在 4.5 ~ 6.0 之间 , 相对酶活力达 90% 以上 ; pH 值 6.0 后 , 相对酶活力急剧下降 , pH 值 7.0 后相对酶活力很低。该酶在 pH 4.5 ~ 7.0 范围内稳定 , 残留酶活达 90% 以上。当高于 7.5 时酶活损失严重。

pH 值影响酶活的原因有 : 过碱会影响酶蛋白的结构 , 甚至使酶变性失活 ; pH 值影响分子中另一些基团的解离 , 这些基团的离子化状态与酶的专一性及分子中心的构架有关。

(2) 在温度为 50℃ 时 酶活力最高 , 在 45 ~ 55℃ 间酶相对活跃。温度对酶促反应的影响有两方面 : 一方面是当温度升高时反应速度会加快 ; 另一方面是随着温度的升高 , 酶逐渐变性。酶的最适温度是这两种过程的平衡效果 , 在低于最适温度时 , 前一种效应为主 , 因而酶的活性增加 , 在高于最适温度时 , 后一种效应为主 , 因而酶的活性迅速降低。

(3) 酵母菌 C10 产菊粉酶中胞外酶 : 胞壁酶 : 胞内酶之比为 7.5 : 0.5 : 2.0。锰离子对菊粉酶的激活作用最显著 , 而锌离子 , 铜离子 , 亚铁离子有抑制作用。以菊芋干粉作为培养基中的碳源菊粉酶活力最高 , μ/S 值为 12 , 为合成内切型菊粉酶较好的诱导物。

(4) 菊粉酶属于水解酶。如果将水看作过量 , 该酶的催化反应可认为是一底物反应。采用初速度方法来测定酶的催化反应的速度 , 即在尽可能接近 0 反应时间 (30 秒或 1 分钟) 的条件下测定反应的速度。在单底物的酶催化反应中 , 当酶的浓度不变时 , 反应的初速度必然因底物浓度上升而提高 , 但在底物浓度上升达到某一值后 , 反应速度将渐近于相应的最高值。表观上 , $V - S$ 关系呈现为上凸曲线。 $V - S$ 关系的现实意义是容易理解的 : 在酶浓度不变条件下 , 底物分子与酶分子碰撞机率 , 即酶分子有效作用的机率必然与底物浓度呈类似一级反应的关系。但是 , 在底物浓度相当高时 $[S] \gg [E]$, 酶分子随时都受底物分子“饱和” , 反应速度必然渐近于最高值。

参考文献 :

- [1] 唐 军 陆 良 陈美华 等. 低聚果糖的检测及其生产菌株的筛选 [J]. 中国医药工业杂志 , 1998 , 29(4) .
- [2] Vardamme E J , Verycke P G. Microbial inulinases : fermentation process , properties , and applications [J]. Adv Appl Microbiol , 1983 , 29 : 139 - 176 .
- [3] Anilk P N , Grupta L M , Davinder P S , et al. Production , purification and immobilisation of inulinase from Kluyveromyces fragilis [J]. J Chem Tech Biotechnol , 1994 , 59 : 377 - 395 .
- [4] Toyohiko N. Production purification and properties of an endoinulase of Penicillium sp. TN-88 that liberates inulotriose [J]. Journal of Fermentation and Bioengineering , 1997 , 84(4) : 313 - 318 .
- [5] Jong P P , Dong H K , Dong S K. Enzymatic production of inulo-oligosaccharides from chicory juice [J]. Biotechnology Letters , 1998 , 20(4) : 385 - 388 .
- [6] Azhani R , Szlak A M. Purification and characterisation of endo- and exo-inulinases [J]. Biotechnol and Biochem , 1999 , 11 : 105 - 117 .
- [7] Bajpai P , Margaritis A. Characteriation of molecularsiere-bound inulinai [J]. J Fermentation Technol , 1987 , 65 : 239 - 42 .
- [8] Kour N , Jain H , Mann P , et al. Companison of properties of invertases and inulinase from chicory [J]. J Plant physiol Biochem , 1992 , 30 : 445 - 450 .
- [9] 岳金明. 菊芋生产高果糖糖浆的研究 [D]. 无锡轻工大学硕士论文 , 1993 : 5 - 9 .
- [10] Kmiko K. Purification and propenties of a thermostable inulinase [J]. Starch , 1999 , 7 : 253 - 258 .

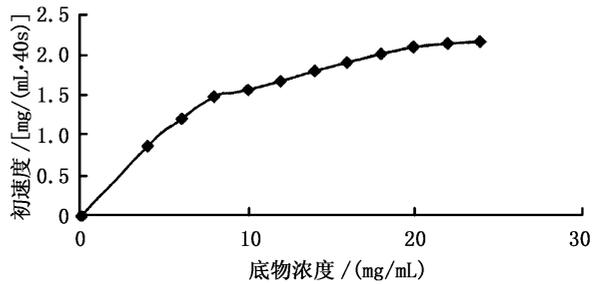


图 4 V 与 S 的关系

Fig. 4 Relationship between initial velocity and substrate concentration