

一株木霉产生菊粉酶的研究*

魏文铃 许宏毅

(厦门大学生物系, 厦门)

摘要 从土壤中分离到一株木霉(*Trichoderma* sp.) FX-1, 能产生较高活性的菊粉酶(Inulinase)。该酶能被菊粉(Inulin)诱导, 而不被蔗糖、棉子糖、纤维素、葡萄糖或果糖诱导, 在适宜的培养条件下, 酶活性可达 64 u/ml。5% 的菊粉在 pH 5.0、温度 50℃ 条件下, 12 小时内几乎 100% 被该酶所水解。酶解总糖中, 果糖占 92.3%, 葡萄糖占 5.8%。酶在 60℃ 下保温 10 分钟, 其活性不变。

关键词 菊粉酶; 菊粉; 高果糖浆

由淀粉通过葡萄糖异构化生产高果糖浆, 生产上受到原料的限制。果糖另一种来源是菊粉。菊粉存在于多种植物中, 如: 菊芋(*Helianthus tuberosus*)、菊苣(*Chicory intybus*)、大丽花(*Dahlia pinnata*) 等丰富的资源中, 至今尚未很好利用。菊粉是以 β -2, 1 键连接的多聚果糖, 其末端为一个蔗糖残基, 分子量约为 6000。菊粉可通过化学法或酶法水解生成果糖。酶法水解具有副产物少、转化率高等优点。因此, 目前受到日本、欧美许多国家的普遍重视。菊粉酶主要来源于酵母^[1,2]、曲霉^[3]、青霉及镰孢霉^[4], 也有细菌^[5,6]产生菊粉酶的报道。本文着重描述木霉(*Trichoderma* sp.) FX-1 产生菊粉酶的条件, 以及粗酶液的一些特性。

材料与方 法

1. 菌种及筛选方法: 实验菌系贝尔格莱德大学 IHTM 研究所赠送, 分离自土壤。在含有菊粉作为唯一碳源的合成培养基平板上划线接种, 反复筛选, 测试 100 余株保存的菌种, 最终选择 *Trichoderma* sp. FX-1 作为研究实验菌株。

2. 培养基: 基本培养基成分(%): (NH₄)₂SO₄ 0.7, KH₂PO₄ 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.05, 酵母浸出液 0.50, 菊粉 1.0, pH 6.5。菊粉单独灭菌

(1.0 kg/cm² 灭菌 10 分钟)。

3. 培养条件: 500 ml 三角瓶装 100 ml 液体培养基, 接种孢子悬液 (10⁸/ml) 1.5ml, 置往复摇床 (200r/min), 30℃ 培养 8 天。

4. 粗酶液的制备: 取 5 ml 发酵液于 4℃, 3000 r/min 离心 20 分钟, 分离上清液作为粗酶液。

5. 酶活性测定: 分别吸取粗酶液 1.0ml, 菊粉液 (5 mg/ml) 5 ml, 0.1 mol/L、pH 5.6 醋酸缓冲液 5 ml, 混匀, 置 50℃ 保温 30 分钟, 设菊粉和缓冲液两种空白对照。还原糖用 chapliñ 描述的 3, 5-二硝基水杨酸法测定^[7], 总糖用蒽酮比色法测定^[8]。一个菊粉酶活性单位规定为每分钟酶解释放一微克分子果糖所需的酶量。

6. 蔗糖酶活性测定: 方法同上, 仅将底物改为蔗糖 (5 mg/ml)。一个蔗糖酶活性单位规定为每分钟催化水解一微克分子蔗糖所需的酶量。

7. 酶水解产物的测定: 菊粉经粗酶液水解后的产物用 Waters 高效液相色谱仪检测。糖分析柱-84038。洗提液: 乙腈/水=80/20, 视差检测器: R401 型。

* 本文部分工作是魏文铃在贝尔格莱德 IHTM 研究所进修时, 在 Dr. A. Djilico 教授指导下进行的, 特此致谢。

结果与讨论

(一) 菊粉酶生物合成的条件

1. 碳源的影响: 各种碳源对木霉 FX-1 生成菊粉酶的影响见表 1。可以看出, 只有在培养基中含有菊粉时, 才产生菊粉酶。可见该酶是一种诱导酶。

表 1 各种碳源对酶生成的影响

碳源	菊粉酶活 (I) (u/ml)	蔗糖酶活 (S) (u/ml)	I/S
菊粉	10.61	9.59	1.10
蔗糖	0.81	0.92	0.88
淀粉	0.47	0.53	0.89
纤维素	0.71	0.85	0.84
葡萄糖	0.76	0.90	0.84
麦芽糖	0.18	0.30	0.60
果糖	0.80	0.92	0.87
棉子糖	0.78	0.85	0.92
木糖	0.60	0.70	0.86

每一种碳源浓度均为 1%, 32°C 下培养 6 天

2. 有机氮源的影响: 测试三种不同浓度的牛肉膏、蛋白胨、酵母膏、玉米浆对菊粉酶生成的影响。据报道, 由青霉菌产生菊粉酶的培养过程, 添加蛋白胨、玉米浆比酵母膏效果好^[3]。我们的试验表明, 添加 0.5% 玉米浆或 1.0% 牛肉膏, 效果比酵母膏好, 而添加蛋白胨效果不如前两者(表 2)。

表 2 有机氮源对酶生成的影响

氮源	含量 (%)	菊粉酶活 (I) (u/ml)	蔗糖酶活 (S) (u/ml)	I/S
牛肉膏	0.2	8.05	8.70	0.93
	0.5	7.15	9.05	0.79
	1.0	15.32	14.55	1.05
蛋白胨	0.2	4.40	4.80	0.92
	0.5	3.20	5.30	0.60
	1.0	2.30	3.90	0.59
酵母膏	0.2	5.70	7.30	0.78
	0.5	6.00	6.70	0.89
	1.0	6.30	7.00	0.90
玉米浆	0.2	8.70	9.05	0.96
	0.5	15.20	14.75	1.03
	1.0	9.50	11.05	0.86

32°C 培养 6 天后测定

3. 无机氮源的影响: 测试了 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, NH_4Cl , NH_4NO_3 , 尿素, NaNO_3 和 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, (浓度均为 0.04 mol/L) 对菊粉酶生物合成的影响。实验结果表明, 添加 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 的效果最好 (32—40 u/ml), $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 次之 (20—26u/ml), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的效果最差 (5.0—8.6u/ml), NH_4Cl (9—12u/ml) 或 NaNO_3 (10—13 u/ml) 的效果差异不大。

4. 初始 pH 的影响: 发酵液的初始 pH 值用 1mol/L HCl 或 NaOH 调节, 测试三种酸碱度 (pH 为 3, 4, 5)。在 pH 4.0 时生成的菊粉酶活性最高 (38u/ml), 而其余两种情况下酶活较低 (15—20 u/ml)。这种酸碱度对工业发酵生产是有利的, 可以抑制其他杂菌的生长。

5. 温度的影响: Negoro 等人报道由 *Candida kefyr* 产生的菊粉酶^[9], 最适培养温度为 27—30°C, 温度升高, 酶活下降。而这株木霉发酵的最适温度为 32°C (40.5 u/ml)。温度升高到 37°C, 酶的生成不受太大影响 (39 u/ml)。温度降低到 27°C 或 22°C 时, 酶活下降 (分别为 20.5u/ml 和 30.6 u/ml)。

6. 菊粉及玉米浆含量的影响: 试验表明, 当玉米浆浓度为 4%, 菊粉为 1% 时, 菊粉酶活性可达 64 u/ml (表 3)。据报道, 由霉菌产生的菊粉酶, 如: *Penicillium* sp. 的酶活为 2.1 u/ml, *A. niger* 为 20.1 u/ml, I/S 值为 1.18^[3]。这株木霉产生的酶活性高于上述报道, 而 I/S 值与其近似。

表 3 不同浓度的菊粉和玉米浆对酶生成的影响

玉米浆 (%)	菊粉酶活性 (u/ml)				
	菊糖 (%)				
	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
1.0	30.5	25.0	24.5	25.7	23.0
2.0	39.5	35.0	36.5	20.5	10.5
4.0	64.0	45.7	32.9	30.5	30.0

基本培养基成分见材料与方法。pH 4.0, 温度 32°C, 发酵 6 天

(二) 菊粉酶(粗提液)的一些特性

1. pH 对酶活性和稳定性的影响: 酶促反

应在 50℃ 恒温 30 分钟,采用 0.1mol/L 醋酸缓冲液 (pH3.5—6.0) 和 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH6.0—8.0) 条件下进行。从图 1 可以看出,

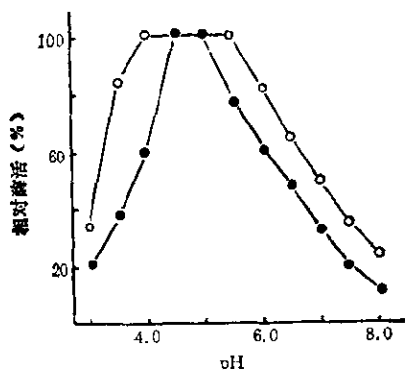


图 1 pH 对菊粉酶活性和稳定性的影响

●—● pH 对酶活性的影响
○—○ pH 对酶稳定性的影响

酶促反应最适 pH 为 4.5—5.0。此结果与 Nakamura 等人报道的由黑曲霉产生的菊粉酶相比,更偏向于酸性,并且在较宽的 pH 范围内 (pH 4.0—5.5), 30℃、24 小时酶活性保持稳定。

2. 温度对菊粉酶活性和稳定性的影响: 在 0.1 mol/L、pH 5.0 醋酸缓冲液中进行各种温度下酶促反应 (30 分钟)。从图 2 看到,酶促反应

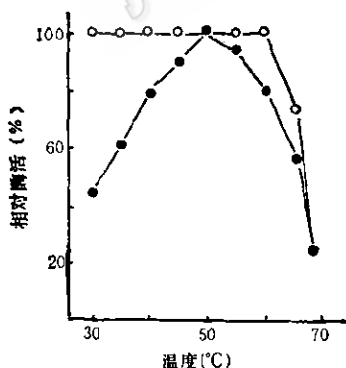


图 2 温度对菊粉酶活性和稳定性的影响

●—● 温度对酶活性的影响
○—○ 温度对酶稳定性的影响

的最适温度为 50℃。比较高的温度有利于提高菊粉的溶解度 (从而可以利用高浓度的菊粉底物) 和控制其他微生物的污染。从温度稳定

性曲线可以看到,温度提高到 60℃,仍保持 100% 酶活;温度 65℃,尚存 75% 酶活性。与已报道的由微生物产生的菊粉酶^[4]相比较,这株木霉产生的菊粉酶热稳定性能较好。

(三) 菊粉的酶水解测定

酶解反应的底物浓度分别为 2%、5%、10% (用 0.1 mol/L、pH 5.0 醋酸缓冲液配制),分别吸取上述菊粉溶液 5 ml,加 5 ml 粗酶液,混匀,在 50℃ 保温。相隔一定时间取样 0.5 ml,测定总糖、还原糖的含量。产物用高效液相色谱仪测定。水解曲线 (图 3) 表明,2.0%、5.0%、

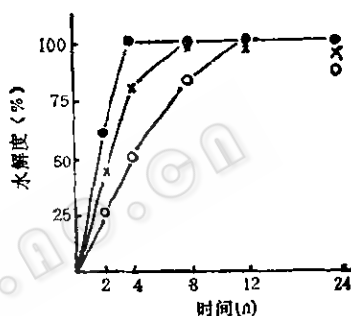


图 3 不同浓度菊粉被酶水解

●—● 2% 菊粉溶液 ×—× 5% 菊粉溶液
○—○ 10% 菊粉溶液

10.0% 菊粉溶液分别在 4 小时, 8 小时和 12 小时被酶完全水解。5.0% 菊粉溶液经酶水解 12 小时后的产物分析:在总糖中果糖占 92.3%,葡萄糖占 5.8%,低聚糖 (D.P.4—6) 占 1.9%。据此推测,木霉 FX-1 产生的菊粉酶含有二个组分,分别以内切和外切方式水解菊粉分子中的 β -1, 2 果糖苷键,与 Negoro 等人报道的结果相同^[40,41]。

参 考 文 献

1. Guirad J P et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 44(6):1245—1252, 1980.
2. Parekh S and A: Margaritis *Agric. Biol. Chem.*, 50(4):1085, 1986.
3. Derycke D G and E J Vandanme: *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 34:45, 1984.
4. 王惠莲: 食品与发酵工业, 1: 79—81, 1983.
5. Allais J J et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 53: 942, 1987.
6. Efstathiou I et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 25:143, 1986.

7. Chaplin M F et al.: Carbohydrate analysis, IRh press, Oxford Washington, 1—228, 1986.
8. Trevelyan W E and J S Harrisson: *Biochem. J.*, **63**:23, 1956.
9. Negoro H and E: *Kito J. Ferment. Technol.*, **51**: 103, 1973.
10. Negoro H: *J. Ferment. Technol.*, **56(2)**: 102, 1978.