

黑曲霉菊糖酶的分离纯化及其活性测定

董强¹ 董云玲² 钱凯先² 于洪琴² 马庆恒²

(山东省医科院基础医学研究所 济南 250062; ¹山东省计划生育研究所; ²浙江大学生命科学学院)

摘要 从一株黑曲霉 p319 的菊芋培养液中, 采用硫酸铵盐析、Sephadex G-25、DEAE-cellulose-52、Sephadex G-100 柱层析等方法, 分离纯化得到三个菊糖酶组份 EI、EII、EIII, 三者经聚丙烯酰胺凝胶电泳验证均达到均一。并对其活性进行了初步测定, 三者比活分别达到 29.8u/mg, 4.9u/mg, 1.2u/mg。

关键词 菊芋, 菊糖, 菊糖酶, 果糖, 黑曲霉

分类号 Q93-3

菊糖 (inulin) 作为贮存物质普遍存在于菊芋、蒲公英、菊苣、大丽花及牛蒡属植物中。菊糖的化学本质是通过线性的 β -2.1 糖苷键连接的果聚糖 (菊糖分子的每一链长约 25~30 个果糖单位^[1]) 还原末端连接一葡萄糖残基, 分子量约为 3000~5000^[2]。其链长及分子量大小与不同的收获季节及作物成熟程度等有关^[2]。菊芋 (*Jerusalem artichoke*), 是一种具代表性的产菊糖的植物, 其含糖量高, 作为菊糖来源生产果糖成本很低。利用酶解的方法从菊糖生产果糖比酸解法更优越, 主要表现在酶解可达到很高的果糖产量^[2], 且酶解也没有酸解中色素及副产物的产生^[3]。水解 β -果糖苷键的酶有两类, 一类是 2.1- β -D 果聚糖水解酶 (E.C. 3.2.1.7), 属内切酶, 产物为寡聚果糖; 另一类是 β -D-呋喃果糖苷果糖水解酶 (E.C. 3.2.1.2.6), 专一地从菊糖中释放果糖, 是从菊糖生产果糖很有用的酶。菊糖酶来源于植物和微生物^[4], 微生物菊糖酶主要来自霉菌、酵母菌, 偶见于细菌, 且霉菌的菊糖酶活性高于酵母^[5]。由菊糖酶分解菊芋中的菊糖生产超高果糖浆 (UHFS) 已受到国内外重视, 但对于酶解糖化作用来说, 足够有效的产酶微生物还没有确定。我们经 UV 诱变诱导筛选获得了一株高产菊糖酶的黑曲霉 p319, 从其菊芋培养液中分离纯化菊糖酶, 并对其活性进行了测定。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 斜面培养基: 采用查氏培养基^[6]。

1.1.2 发酵培养基: 菊芋 62.5%, 玉米浆 0.5%, KCl 0.07%, MgSO₄ 0.05%, FeSO₄ 0.001%, 自然 pH。菊芋湿重 62.5g 切碎煮沸 15min, 滤液加水至 100ml, 得到 62.5% 菊芋提取物。

1.1.3 菌种: 黑曲霉 p319 (*Aspergillus niger* p319), 由本室经诱变筛选得到。

1.1.4 仪器: HD-81-5A 型核酸蛋白检测仪, 上海沪西仪器厂; BSZ-100 自动部分收集器, 上海沪西仪器厂; TH-250 梯度混合仪, 上海沪西仪器厂; DYY-III2 型稳流稳压电泳仪, 北京六一仪器厂; 20RP-52D 型自动高速冷冻离心机, Hitachi Co. Japan; 722 型光栅分光光度计, 上海分析仪器厂。

1.1.5 药品: 菊糖, 上海化学试剂采购供应站; 标准果糖, 上海试剂三厂; 牛血清白蛋白, 电泳纯, 上海化学试剂采购供应站; DEAE-Cellulose-52, Whatman; Sephadex G-25, Pharmacia; Sephadex G-100 Pharmacia; 聚乙二醇, MW10 000, Whatman 进口分装; 考马斯亮兰 R-250, Fluka 进口分装; 其它试剂均为进口

或国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 培养方法:斜面菌种和摇瓶培养均为30℃ 72h。

1.2.2 酶的提纯方法:(1)粗酶液的制备:发酵液过滤后在4000r/min离心15min,弃沉淀,取上清得粗酶液。(2)硫酸铵分级沉淀:粗酶液用40%饱和度硫酸铵盐析,4℃静置72h,10kr/min离心10min得上清液。上清液再用90%饱和度的硫酸铵盐析,4℃静置72h,18kr/min离心20min,去上清液,用尽可能少的0.1mol/L pH5.0 HAc-NaAc buffer溶解,得盐析蛋白溶解液。(3)Sephadex G-25分子筛脱盐:盐析蛋白溶解液先离心去沉淀,上Sephadex G-25柱(2.6×60cm)除盐,测定酶活力曲线。(4)离子交换柱层析^[7]:将用酸、碱交替处理好的DEAE-纤维素-52层析柱(2.6×20cm)用0.1mol/L pH5.0 HAc-NaAc buffer充分平衡,上样后用0.1mol/L起始buffer洗脱5h,然后用0-0.8mol/L的NaCl梯度洗脱,最后用1.0mol/L的NaCl彻底洗脱。测酶活,收集活力部分。(5)Sephadex G-100分子筛柱层析^[7]:将离子交换柱层析收集到的各活力部分分别浓缩、离心后,上Sephadex G-100(2.6×70cm),用0.05mol/L HAc-NaAc pH5.0 buffer洗脱。

1.2.3 酶活测定方法:采用Somogyi还原糖比色定糖法^[8],以果糖作标准曲线。取0.9ml 2%菊糖溶液,加入0.1ml酶液,50℃保温10min,100℃ 5min终止反应。其中菊糖溶液用0.1mol/L HAc-NaAc pH5.0 buffer配制,用前需50℃预热5min。取反应液0.1ml加入蒸馏水0.9ml,加入Somogyi A液1ml,摇匀后置沸水浴中10min,冷却后加B液1ml,充分振荡反应后,加入蒸馏水7ml,摇匀后静置片刻,于620nm处比色测定。一个酶活力单位定义为1min内催化水解菊糖产生1μmol果糖所需的酶量。

1.2.4 蛋白含量测定方法:采用Folin-酚法^[8],以牛血清白蛋白作标准曲线,对照标准曲线计

算各测定样品蛋白含量。

1.2.5 酶纯度检验:采用聚丙烯酰胺凝胶不连续圆盘电泳^[9]验证纯度。浓缩胶含2.5%的丙烯酰胺,pH6.7;分离胶含7.5%的丙烯酰胺pH8.9;电极buffer为pH8.3的Tris-甘氨酸buffer,管型为0.5×12cm。样品经适度浓缩后上样,每管电流1mA。0.25%考马斯亮兰R250染色,再固定,脱色。

2 结果

2.1 酶的分离纯化

从A niger p319的菊芋培养液中分离纯化得到三个组分:EI、EII、EIII。盐析蛋白首先上Sephadex G-25柱去盐,结果见图1,由图1可以看出,蛋白部分很快被洗脱下来,G-25柱层析可将盐和还原糖除去,但蛋白各组分无法分离出来。收集脱盐柱层析洗脱液中的蛋白组分,上DEAE-纤维素-52柱,进行离子交换柱层析,层析结果见图2。由图2可以看出,该层析过程可得到A、B两个活性部分,A是未吸附部分,B组分在洗脱液含0.3mol/L的NaCl时被洗脱。收集活力部分浓缩后,A、B组分分别进行Sephadex G-100柱层析,见图3及图4。由图3可看出,较高的蛋白峰无活力,而在较低峰处有活力存在,收集并命名为EI。由图4可看出,B组分可分离得到两个活力部分,命名为EII、EIII。

2.2 酶的分步纯化统计结果

对粗酶液、盐析蛋白液、活力部分A、活力部分B、EI、EII、EIII分别测定总活力、总蛋白,计算出比活、收率及提纯倍数。详细统计结果见表1。

2.3 PAGE电泳结果

PAGE电泳图谱显示EI、EII、EIII均呈一条带,证明均达到电泳纯。

3 讨论

本实验通过盐析、离子交换、分子筛柱层析等步骤得到菊糖酶三个组分:EI、EII、EIII,且均达到电泳纯。从表1可以看出,各组分比活

分别为EI 29.8u/ml, EII 4.9u/ml, EIII 1.2u/ml, 提纯倍数分别为66.2, 17.3, 2.7; 收率为18.7%, 0.7%, 1.7%; 三者相差较大, 可见EI是主要的酶, 推测EI为外切酶, 因为外切酶活性一般要比内切酶高得多(内切酶作用于底物要

比外切酶困难得多), 但若将外切酶和内切酶结合起来, 可能会有协同作用, 可大大提高降解菊糖的速度。

由图1可见Sephadex G-25柱层析中蛋白部分很快被全部洗脱下来, 这是由于只有小分

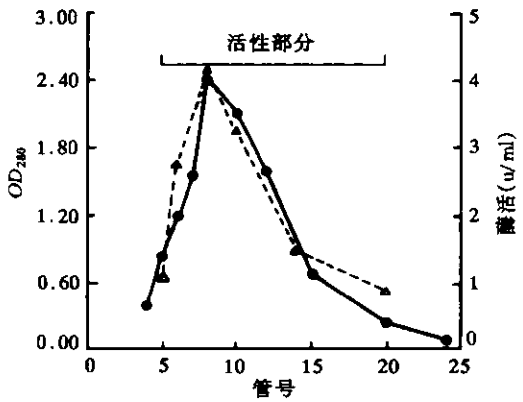


图1 盐析酶液的Sephadex G-25柱层析

●—● 280nm光吸收 △---△酶活

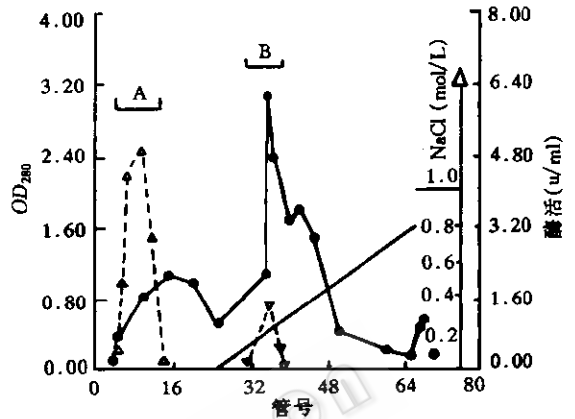


图2 脱盐酶液的DEAE-Cellulose 52柱层析

●—● 280nm光吸收 △---△酶活

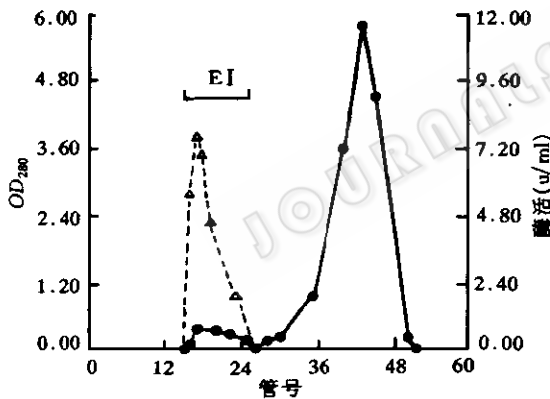


图3 活性部分A的Sephadex G-100柱层析

●—● 280nm光吸收 △---△酶活

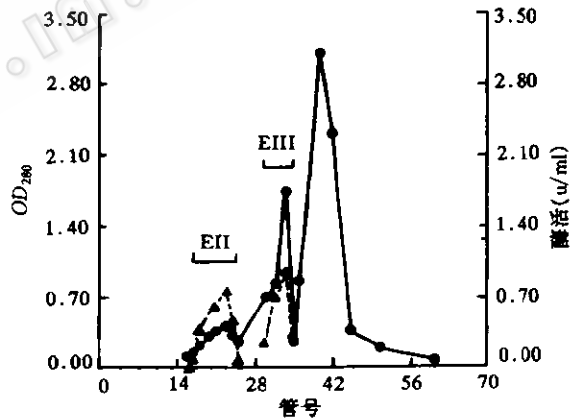


图4 活性部分B的Sephadex G-100柱层析

●—● 280nm光吸收 △---△酶活

表1 黑曲霉p319菊糖酶的分离纯化及酶活统计结果

提取步骤	总蛋白/mg	总活力/u	比活/u/mg	得率	提纯倍数
粗提液	3921.1	1764.5	0.45	100	1
硫酸铵盐析	124.3	571.7	4.6	32.4	10.2
DEAE纤维素52: A部分	33.0	379.4	11.5	21.5	25.6
DEAE纤维素52: B部分	25.6	84.7	3.3	4.8	7.3
EI	11.1	330.0	29.8	18.7	66.2
SephadexG-100 EII	2.53	12.4	4.9	0.7	17.3
EIII	2.50	30.0	1.2	1.7	2.7

子的盐类、还原糖等可以进入该凝胶内部。此法比透析除盐省时,且可除去样品中几乎全部还原糖,有利于后面提纯过程中酶活的测定(可避免空白颜色过深)。由图2 DEAE纤维素柱层析结果可见,活力部分A在280nm处吸收峰为“穿过峰”,不吸附。这说明该部分在pH5.0的HAc-NaAc缓冲体系中分子处于等电状态或带正电,因而不与DEAE纤维素上的阴离子进行交换。因此在pH5.0条件下分离该酶时应注意此不吸附现象。由图3可知,E I的峰很低,而很高的峰为色素峰,无酶活。可能是由于E I分子中含有较少的芳香氨基酸或这些较少的氨基酸包藏于分子内部,使这些发色团被掩盖起来,从而使该部分在280nm处光吸收较弱。因此应特别注意应隔管测酶活而不是看峰的大体形状。

经过几步的分离提纯后,菊糖酶的最终收率为21.1%,酶损失的原因可能有:①盐析过程中酶有损失;②透析、浓缩过程中有部分蛋白会变性沉淀,当然包括一部分的菊糖酶;③本实验进行的层析过程是在室温下进行的,对酶的稳定性有一定影响;④该菌种不仅产菊糖酶,还产蛋白酶,故在分离过程中蛋白酶在未除去以前肯定要破坏一部分菊糖酶。实验

中曾试验将粗酶液4℃放置一周,结果酶活完全丧失。因此应尽快进行分离纯化,以防失活。另外,发酵培养过程中,培养基氮素含量过高可导致产生较多的蛋白酶,培养时间一般不大于72h,以免蛋白酶将菊糖酶水解掉。

致谢 本研究部分工作曾得到山东大学微生物技术国家重点实验室陈冠军教授的指导和帮助,谨致谢意。

参 考 文 献

[1] Moussa Fitalibi & Jacques C. Baratti. Appl Microbiol Biotechnol, 1987, 26:13~20.
 [2] Mukherjee khana & Sengupta S. Journal of Science & Industrial Research, 1989, 48:145~152.
 [3] Gupta AK. J Chem Tech & Biotechnol, 1988, 42: 69~76.
 [4] Hemson Cynthia A. J Plant Physiol, 1989, 134(2): 186~191.
 [5] Bagsuaerd LZ. Starch, 1981, 33(11):373~377.
 [6] 周德庆主编. 微生物学实验手册,上海:上海科学技术出版社,1986.
 [7] 林卓坤主编. 色谱法,北京:科学出版社,1982.
 [8] 北大生物系生物化学教研室编. 生物化学实验指导,北京:高等教育出版社,1979.
 [9] Davis BJ. Ann NY Acad Sci, 1964, 121:404~427.

ISOLATION AND PURIFICATION OF INULASE FROM *ASPERGILLUS NIGER* AND DETERMINATION OF ITS ACTIVITY

Dong Qiang ¹Dong Yunling ²Qian Kaixian Yu Hongqin Ma Qingheng

(Basic Institute of Medicine, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan, 250062; ¹Shandong Institute of Family Planning; ²Department of Life Sciences, Zhejiang University)

Abstract From the inulin culture fluid of a strain named *Aspergillus niger* p319, utilizing (NH₄)₂SO₄ precipitation, Sephadex G-25, DEAE-cellulose 52 and Sephadex G-100 column chromatography methods, three inulase compositions named E I, E II and E III were obtained. All of them showed a single band in PAGE. Their activities were determined, which reached 29.8u / mg, 4.9u / mg and 1.2u / mg respectively.

Key words Jerusalem artichoke, Inulin, inulase, Fructose, *Aspergillus niger*