

文章编号 :1009-038X(2004)05-0078-04

节杆菌 10137 产 β -呋喃果糖苷酶 条件及酶学性质

朱桂兰 , 童群义

(江南大学 食品学院 ,江苏 无锡 214036)

摘 要 :研究表明 ,节杆菌 10137 产 β -呋喃果糖苷酶的最佳条件为 :温度为 30 $^{\circ}\text{C}$,pH 值 7.5 ,接种体积分数为 2% ,装液体积为 40 mL. 该条件下 β -呋喃果糖苷酶的转移酶活为 177.78 U/mL. 酶作用最适 pH 值为 6.5 ,最适温度为 30 $^{\circ}\text{C}$,在 pH 值为 6.0 ~ 8.0 和 45 $^{\circ}\text{C}$ 以下稳定. Ag^{+} 和 Cu^{2+} 对该酶有较强烈的抑制作用 ,EDTA 和 Mg^{2+} 对酶活也有一定影响.

关键词 :节杆菌 β -呋喃果糖苷酶 培养条件 性质

中图分类号 :Q 55

文献标识码 :A

Culture Condition and Properties of β -Fructofuranosidase from *Arthrobacter* sp. 10137

ZHU Gui-lan , TONG Qun-yi

(School of Food Science and Technology , Southern Yangtze University , Wuxi 214036 , China)

Abstract : In this article , fermentation conditions and properties of *Arthrobacter* sp. 10137 were studied. The optimal cultural conditions for β -fructofuranosidase production were as follows : the temperature of 30 $^{\circ}\text{C}$, pH 7.5 , inoculum amount of 2% , and medium volume 40ml/250ml shakeflask. With these conditions ,the β -fructofuranosidase transfer activity was 177.78 U/mL. The optimum temperature and pH of the enzyme reaction were 30 $^{\circ}\text{C}$ and 6.5 , respectively. The enzyme was stable under 45 $^{\circ}\text{C}$ and in the range of pH 6.0 ~ 8.0. The enzyme activity was strongly inhibited by Ag^{+} and Cu^{2+} , while EDTA and Mg^{2+} had no significant effect on β -fructofuranosidase activity.

Key words : *Arthrobacter* sp. 10137 β -fructofuranosidase ; culture condition ; properties

节杆菌 10137 产 β -呋喃果糖苷酶主要用于催化合成低聚乳果糖 ,在以蔗糖和乳糖为原料的条件下 ,将蔗糖水解产生的果糖基转移至乳糖还原性末端的 C_1 位羟基上 ,生成半乳糖基蔗糖即低聚乳果糖. 低聚乳果糖作为一种新型功能性甜味剂自 1990 年在日本开发以来 ,其保健功能逐渐被人

们接受 ,近年来已进入日本及欧美市场. 低聚乳果糖是天然食物的组成部分 ,既可作为一种非膳食纤维来使用 ,又是双歧因子 ,可应用于各种食品中 ,如乳制品、低脂食品、面包和饮料等.

目前日本对低聚乳果糖的国内需要量已达到每年 2 000 t 以上 ,位于同类产品的前列 ,增长速度

收稿日期 2003-12-05 ; 修回日期 2004-06-01.

作者简介 :朱桂兰 (1980-) ,女 ,安徽舒城人 ,工学硕士.
万方数据

很快,其平均价格为 500 日元/kg. 而我国目前还没有低聚乳果糖产品上市. 作者就节杆菌 10137 产 β -呋喃果糖苷酶的培养条件及 β -呋喃果糖苷酶的酶学性质进行了试验研究,以期低聚乳果糖的工业化生产提供参考.

1 材料与方法

1.1 菌种

节杆菌 10137 (*Arthrobacter* sp. 10137) 购于中国工业微生物菌种保藏中心.

1.2 培养基

斜面培养基成分(g/L):牛肉膏 1.0,蛋白胨 0.5,NaCl 0.5,琼脂 1.5,pH 7.0

活化培养基成分(g/L):牛肉膏 1.0,蛋白胨 0.5,NaCl 0.5,pH 7.0

摇瓶培养基成分(g/L):蔗糖 4.45,酵母膏 1.40,蛋白胨 0.93, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.4, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.13,pH 7.0.

1.3 试剂

低聚乳果糖标准样品购于日本,其它均为国产分析纯试剂.

1.4 菌种的培养与处理

1.4.1 菌种活化 将保藏菌种用接种环接入活化培养基中,30℃,110 r/min 培养 24 h.

1.4.2 摇瓶培养 将活化培养后的菌种以体积分数 3% 的比例接入各种发酵培养基中,于 30℃ 条件下,110 r/min 培养 58 h.

1.5 β -呋喃果糖苷酶的转移酶活测定

β -呋喃果糖苷酶的转移酶活定义为每分钟转化生成 10^{-9} mol 低聚乳果糖来表示. 低聚乳果糖的测定方法为:将等体积的酶液和糖液(含 40 g/dL 的蔗糖和乳糖,pH 6.5)于 37℃ 反应 24 h 即生成低聚乳果糖. 采用薄层色谱法检测低聚乳果糖的含量. 色谱条件为:展开剂为正丙醇:水(V:V)=9:2,显色剂为苯胺-二苯胺-磷酸溶液,扫描波长为 530 nm.

2 结果与讨论

2.1 发酵条件对产酶量的影响

2.1.1 不同温度对产酶量的影响 将接种后的菌液于不同温度下培养 58 h,收集粗酶液,与底物(40 g/dL 的蔗糖和乳糖)反应,测定 β -呋喃果糖苷酶的转移酶活,结果见图 1.

万方数据

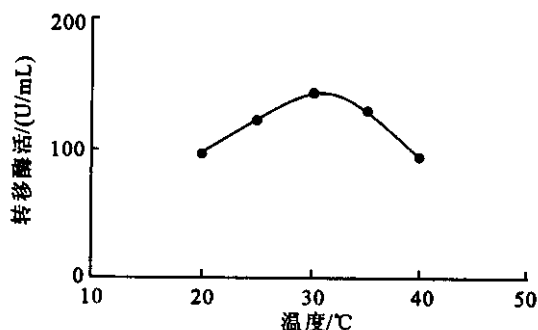


图1 不同温度对产酶量的影响

Fig.1 Effect of temperature on β -fructofuranosidase production

由图 1 可以看出,节杆菌产 β -呋喃果糖苷酶的最适温度为 30℃.

2.1.2 pH 值对产酶量的影响 将培养基的 pH 值调至 5.5~8.5,7 个不同的 pH 值,灭菌后接种,于 30℃ 下培养 58 h,测其转移酶活的大小.

结果表明(图 2),在 pH 值 7.5 时,节杆菌产酶量得到最大.

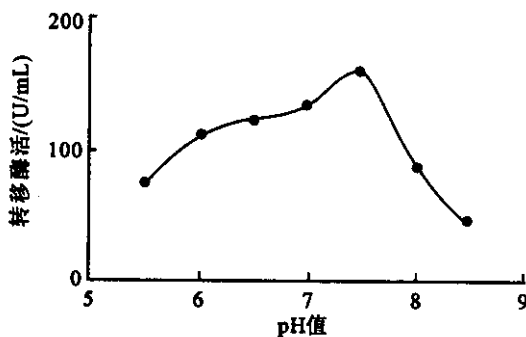


图2 pH 对产酶量的影响

Fig.2 Effect of pH on β -fructofuranosidase production

2.1.3 装液量对产酶量的影响 在 250 mL 的三角烧瓶中分别装入 30~70 mL 的不同体积培养基,灭菌后接种,于 30℃ 摇瓶培养 58 h,测其转移酶活的大小.

由图 3 可以看出,随着装液量的增加,酶的转移酶活下降,考虑经济因素,选取装液量为 40 mL (三角烧瓶容积为 250 mL).

2.1.4 接种量对产酶量的影响 在 250 mL 的三角烧瓶中装入 40 mL 的培养基,灭菌后,分别按体积分数 1%~5% 的接种量接种,于 30℃ 摇瓶培养 58 h,测其转移酶活.

由图 4 可以看出,当接种量取最大值时,转移酶活反而较小,当接种体积分数为 2% 时,酶表现出较高的转移活力,这可能是由于随接种量的增加,菌体繁殖快,反而不利于菌体内转移酶的形成. 因此最佳接种体积分数为 2%.

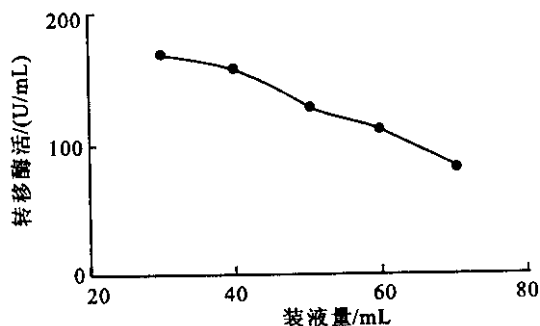


图 3 装液量对产酶量的影响

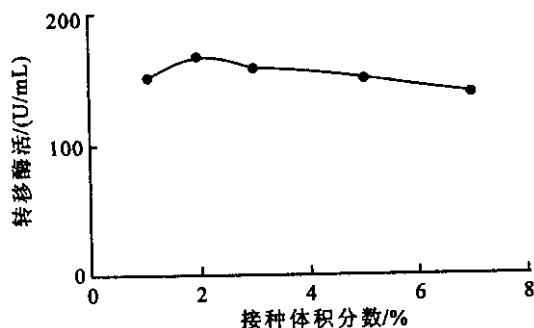
Fig. 3 Effect of medium amount on β -fructofuranosidase production

图 4 接种量对产酶量的影响

Fig. 4 Effect of inoculum amount on β -fructofuranosidase production

2.2 β -呋喃果糖苷酶的性质

2.2.1 pH 值对酶活及酶稳定性的影响 配置不同 pH 值的柠檬酸-磷酸缓冲溶液,取酶液分别在 pH 值 3 ~ 8 的条件下进行酶促反应,测定酶活,以酶活最高者为 100%,结果见图 5。由图 5 可知,该酶的最适 pH 值为 6.5。

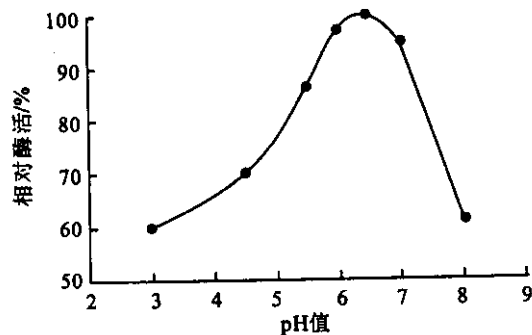


图 5 pH 对酶活的影响

Fig. 5 Effect of pH on β -fructofuranosidase activity

将酶液与不同 pH 值的缓冲液在一定条件下保温 1 h 后,再按以上酶活测定法测其活力。以在最适反应 pH 值下保温所测的酶活为 100%,其余折合成其剩余活力的百分数,以此对保温 pH 值作图,图 6 是产杆菌 β -呋喃果糖苷酶的 pH 值稳定性曲线。保温温度为 35 $^{\circ}\text{C}$,保温时间为 1 h。由图 6 可见该酶在 pH 值为 6.0 ~ 8.0 范围内是比较稳定的。

万方数据

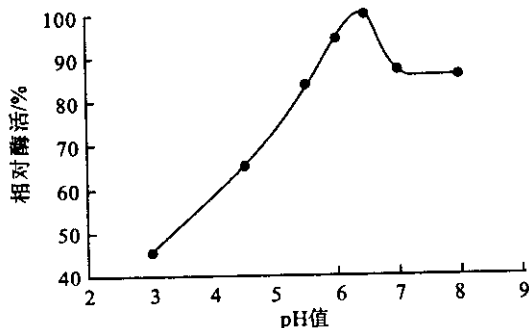


图 6 pH 对酶稳定性的影响

Fig. 6 Effect of pH on β -fructofuranosidase stability

2.2.2 温度对酶活及酶稳定性的影响 取 0.2 mL 适当稀释的酶液于 0.2 mL 底物中,底物用 0.01 mol/L 的磷酸缓冲液 (pH 6.5) 配制,分别在 20 ~ 60 $^{\circ}\text{C}$ 下反应,测定酶活,结果见图 7,得该酶最适温度为 35 $^{\circ}\text{C}$ 。从图 7 可以看出,该酶的适宜温度范围也较大。

另外,还进行了 β -呋喃果糖苷酶的热稳定性研究。取适量酶液分别于 20 ~ 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温,间隔 1 h 取酶液测酶活,结果见图 8。结果表明,45 $^{\circ}\text{C}$ 保温时酶活能维持 80% 以上,60 $^{\circ}\text{C}$ 保温能维持 60% 以上,说明该酶的耐热性好。而 1990 年 Foki FUJITA 等人报道 *Arthrobacter* sp. K-1 的 β -呋喃果糖苷酶在 55 $^{\circ}\text{C}$ 下活性最高,45 $^{\circ}\text{C}$ 以下酶的热稳定好,在 60 $^{\circ}\text{C}$ 下保温时维持 72% 的酶活。

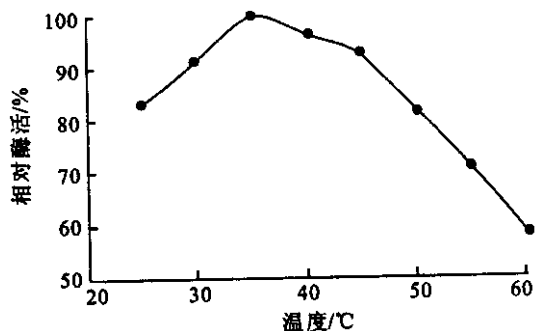


图 7 温度对酶活的影响

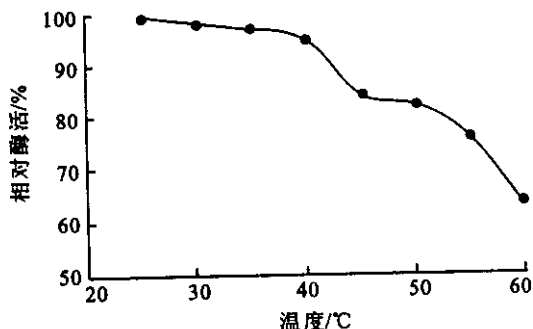
Fig. 7 Effect of temperature on β -fructofuranosidase activity

图 8 温度对酶热稳定性的影响

Fig. 8 Effect of temperature on β -fructofuranosidase stability

2.2.3 金属离子和化学物质对酶活力的影响

金属离子和其它化学物质对 β -呋喃果糖苷酶的影响见表 1.

表 1 金属离子和其它化学物质酶活的影响
Tab. 1 Effect of metal ions and other reagents on β -fructofuranosidase activity

金属离子	相对酶活/%
对照组	100
EDTA	92.8
NaCl	87.5
CaCl ₂	89.2
MgSO ₄	92.4
MnSO ₄	85.2
Fe ₂ (SO ₄) ₃	68.7
ZnSO ₄	16.3
AgNO ₃	1.1
CuSO ₄	1.3

从表 1 可以看出 , 银离子和铜离子对该酶有

较强烈的抑制作用 , 锌离子也表现出一定的抑制作用 , EDTA 和镁离子对酶活也有一定影响.

3 结 论

1) 节杆菌 10137 产 β -呋喃果糖苷酶的最佳条件为 , 温度 30 ℃ , pH 值 7.5 , 接种体积分数 2% , 装液量 40 mL , 该条件下 β -呋喃果糖苷酶的转移酶活为 177.78 U/mL.

2) β -呋喃果糖苷酶的转移酶作用最适 pH 值为 6.5 , 最适温度为 30 ℃ , 在 pH 值 6.0 ~ 8.0 和 45 ℃ 以下稳定 , 60 ℃ 保温酶活能维持 60% 以上. Ag⁺ 和 Cu²⁺ 对该酶有较强烈的抑制作用 , Zn⁺ 也表现出一定的抑制作用 , EDTA 和 Mg²⁺ 对酶活也有一定影响.

参考文献 :

[1] Fujita K M , Hirayama H , Hashimoto , *et al.* Purification and some properties of β -fructofuranoside from *Arthrobacter* sp. K-1[J]. **Agric Biol Chem** , 1990 , 54(4) : 931 - 919.

[2] Fujita K M , Hirayama H , Hashimoto *et al.* . Transfructosylation catalyzed by β -fructofuranoside from *Arthrobacter* sp. K-1[J]. **Agric Biol Chem** , 1990 , 54(10) 2653 - 2661.

[3] 葛文光. 低聚乳果糖的生理功能及加工特性[J]. 食品科学 , 1998 , 19(6) : 16 - 20.

[4] Axel Pilgrim , Motoadi Kawase , Masayasu Ohashi , *et al.* Reaction kinetics and modeling of enzyme-catalyzed production of lactosucrose using β -fructofuranoside from *Arthrobacter* sp. K-1[J]. **Biosci Biotechnol Biochem** , 2001 , 65(4) : 758 - 765.

[5] Arakawa K , Aoyama Y , Ikeda H , *et al.* The development of lactosucrose production and its application in foods for Specified Health Use[J]. **J Appl Glycosci** , 2002 , 49(1) 63 - 72.

[6] 宫川 , 早苗. Oligosaccharides-present status and future in Japanese market[J]. **J Appl Glycosci** , 2003 , 50 50 - 54.

[7] 尤新. 我国低聚糖生产技术研究进展[J]. 食品工业科技 , 2002 23(4) 4 - 7.

(责任编辑 杨 萌)