

文章编号:1673-1689(2006)01-0005-05

# *Aspergillus ficuum* 菊粉酶的分离纯化及其酶解菊粉制备低聚果糖

王 静, 金征宇, 江 波, 徐学明

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

**摘 要:** 采用硫酸铵分级沉淀、透析脱盐、DEAE-Cellulose 离子交换色谱等分离纯化技术, 从 *Aspergillus ficuum* 菌株混合酶系中分离得到 4 种菊粉酶组分, 应用薄层层析法分离各组分水解菊粉的产物, 发现其中 3 种组分主要含外切菊粉酶, 一种主要含有内切菊粉酶。进一步对所得到的内切菊粉酶组分酶解菊粉制备低聚果糖进行了研究, 研究了底物浓度、加酶量、反应温度和反应 pH 对低聚果糖制备的影响, 确定其最适反应条件为: 底物浓度 50 g/L、加酶量 10 U/g 底物, 反应温度 45 °C, 反应 pH 6.0。在此条件下反应 72 h, 菊粉酶解率达 74%, 低聚果糖得率可达 50% 以上, 酶解产物以 DP2~DP4 为主。

**关键词:** *Aspergillus ficuum*; 菊粉酶; 外切菊粉酶; 内切菊粉酶; 低聚果糖

中图分类号: Q 55

文献标识码: A

## Purification of Inulinases from *Aspergillus ficuum* and Preparation of Inulooligosaccharides

WANG Jing, JIN Zheng-yu, JIANG Bo, XU Xue-ming

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

**Abstract:** The crude inulinase from *Aspergillus ficuum* was purified in a sequence of operations including ammonium sulfate fractionation, ion exchange chromatography on DEAE-Cellulose. Four highly purified enzymes were thus obtained. Three of them were identified as exoinulinase, and the rest one mainly contained endoinulinase. Preparation of inulooligosaccharides using the endoinulinase was studied. The optimal conditions for inulooligosaccharides preparation were established and shown as follows: 50 g/L inulin, enzyme concentration of 10 U/g substrate, 45 °C, and pH 6.0. The inulin-degrading degree was up to 74% and the inulo-oligosaccharides yield was over 50% after 72h of hydrolyzation. The major products were identified as DP2 to DP4.

**Key words:** *Aspergillus ficuum*; inulinase; exoinulinase; endoinulinase; inulooligosaccharide

菊粉是一种天然的果聚糖, 是植物菊芋中的一种贮存性多糖, 由 D-呋喃果糖以  $\beta$ -2,1 糖苷键相

连, 在其还原端接一个葡萄糖基, 呈直链结构, 一条菊粉链一般由 30 个果糖单位和 1 个  $\alpha$ -D-呋喃葡萄

收稿日期: 2005-03-20; 修回日期: 2005-04-29.

基金项目: 国家自然科学基金项目(20376029); 教育部科学技术研究重点项目(104258).

作者简介: 王静(1976-), 女, 河南新郑人, 副教授, 博士.

糖组成。

微生物菊粉酶(学名为 $\beta$ -2,1-D-果聚糖酶)可以催化植物中的菊粉水解为果糖或低聚果糖。根据其作用方式不同可以分为外切型菊粉酶(Exo-inulinase)和内切型菊粉酶(Endo-inulinase),外切型菊粉酶从菊粉分子的非还原末端依次切下果糖分子并最终将其水解成果糖和葡萄糖;内切型菊粉酶从菊粉分子内部随机切断糖苷键,得到GF<sub>2</sub>、GF<sub>3</sub>、GF<sub>4</sub>、F<sub>2</sub>、F<sub>3</sub>、F<sub>4</sub>、F<sub>5</sub>等低聚果糖。低聚果糖以其能够促进双歧杆菌的增殖、低致龋性、难消化性及类似膳食纤维等作用,现已成为一种具有独特生理活性的食物配料。

对 *Aspergillus ficuum* 所产菊粉酶混合酶系进行了分离,并利用分离得到的内切菊粉酶组分水解菊粉制备低聚果糖。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

菊粉, 优级, Orafiti 公司产品; DEAE-Cellulose-52 为 Sigma 公司产品; 其它化学试剂均为分析纯; 菌株: *Aspergillus ficuum* JNSP5-06, 作者所在实验室保藏。

### 1.2 粗酶液的制备

*Aspergillus ficuum* 菌株在菊粉质量分数为 2%, 酵母膏质量分数为 2%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g/dL, NaCl 0.5 g/dL, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.05 g/dL, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.01 g/dL, 初始 pH 值 6.5 的发酵条件下, 培养 5 d, 发酵液经过滤除去杂质和菌体, 滤液即为粗酶液。

### 1.3 菊粉酶分离纯化程序

#### 粗酶液

↓ 加 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 4 °C 静置过夜, 离心 (4 000 r/min, 10 min), 沉淀用少量 pH 5.0 的醋酸缓冲液溶解

#### 酶溶液

↓ 透析(至无 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 离子)

#### 浓缩液

↓ DEAE-Cellulose 离子交换柱, 0 ~ 0.4 mol/L NaCl 梯度洗脱, 合并活力峰

#### 活力峰

### 1.4 酶活力的测定

菊粉酶酶活力的测定参照 Pessoni 等人<sup>[1]</sup>的方法, 即酶液经适当稀释后取 1 mL 加入 4 mL 2% 菊糖(用 0.2 mol/L, pH 4.5 醋酸缓冲液配制), 50 °C 下反应 30 min, 再取 0.5 mL 反应液, 加入 1.5 mL 水

和 1.5 mL 3,5-二硝基水杨酸试剂, 沸水浴加热 5 min 后, 定容至 25 mL, 575 nm 下测定吸光度, 并计算反应生成的还原糖量。在相同条件下, 以加入在沸水浴中加热 5 min 失活的酶液作对照。在此条件下, 以每分钟转化生成 1 μmol 还原糖所需的酶量为一个酶活力单位, 以 I 表示。

以 4 mL 质量分数 2% 的蔗糖代替菊糖, 其它步骤同上。以每分钟转化生成 1 μmol 还原糖所需的酶量为一个酶活力单位, 以 U 表示。

### 1.5 薄层层析分析

采用硅胶 GF<sub>254</sub> (60 型), 以氯仿: 醋酸: 水 (V: V: V) (30: 35: 5) 作展开剂, 用体积分数 1% α-萘酚(含 10% 冰磷酸)染色<sup>[2]</sup>。

### 1.6 酶解液糖组分测定

高压液相色谱法: 美国 Waters 公司 600 型高效液相色谱仪, 配有 2410 型示差折光检测器; 740 数据处理机。色谱柱: Hypersil NH<sub>2</sub>, 填料粒度 5 μm, 尺寸: 4.6 mm × 250 mm; 柱温: 30 °C; 流动相: 75% 乙腈 (V: V); 体积流量 1 mL/min; 样品进样前用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤。

### 1.7 酶解率计算

酶解率 = 酶解液还原糖总量 / 原料菊粉总量

### 1.8 低聚果糖得率的计算

由高压液相色谱测得聚合度为 2~8 的糖的总量与原料菊粉的比值, 即为低聚糖的得率。

## 2 结果与讨论

### 2.1 酶组分的分离纯化

2.1.1 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 分级沉淀 采用不同浓度 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 沉淀粗酶液中的菊粉酶, 测定上清液中残留菊粉酶活力, 以未加 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液沉淀的酶液的酶活为 100%, 测定结果见表 1。

表 1 不同质量浓度硫酸铵沉淀后上清液中残留的菊粉酶活

Tab. 1 Inulinases activities remained in the liquid after (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> precipitation

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 质量浓度/(g/dL)	上清液中残留酶活/%
0	100
20	92
40	86
80	18
90	7

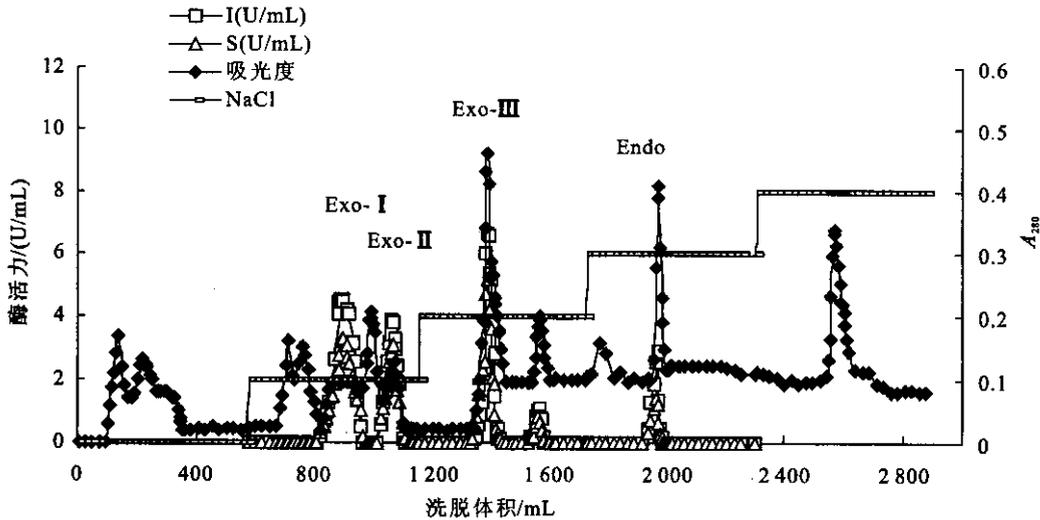
结果表明大部分菊粉酶在 20~90 g/dL 之间沉淀, 因此, 选用 20~90 g/dL 的 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 对粗酶

液进行分痕盐析。据此  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  分级沉淀采用以下步骤:首先在粗酶液中添加固体  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  至 20% 饱和度,在 4℃ 静置过夜,离心去除部分杂蛋白沉淀,在上清液中继续加入  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  至 90% 饱和度,4℃ 静置 6 h,离心弃去上清液,收集沉淀。

**2.1.2 透析脱盐** 将沉淀溶于 pH 5.0 的 0.1 mol/L 醋酸缓冲液中,再用 0.01 mol/L 醋酸缓冲液 (pH 值 5.8) 透析脱盐,得到菊粉酶液。

**2.1.3 DEAE-Cellulose 离子交换色谱** 据文献报道<sup>[4~6]</sup>,菊粉酶的等电点一般为 4~5,因此选用阴

离子交换柱 (2.6 cm×50 cm) 对菊粉酶进行分离。离子柱预先用 0.01 mol/L 的醋酸缓冲液 (pH 值 5.8) 平衡。将经  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  分级沉淀、透析脱盐得到的酶液加到已平衡过的离子交换柱,先用 2 倍柱床体积的缓冲液洗柱,将不被柱吸附的杂蛋白洗去,然后用含有 0~0.4 mol/L NaCl 的醋酸缓冲液进行阶段梯度洗脱,洗脱液体积流量为 0.6 mL/min。分别测定各收集管中溶液的紫外吸收及酶活,得到洗脱曲线如图 1 所示。



分离条件:柱:2.6 cm×50 cm;起始缓冲液:pH5.8 的 0.01 mol/L 醋酸缓冲液;体积流量:6 mL/min;用含 0 mol/L ~0.4 mol/L NaCl 的醋酸缓冲液进行阶段梯度洗脱。

图 1 菊粉酶的 DEAE-Cellulose 柱层析图

Fig. 1 Chromatography of inulinases from *A. ficuum* on DEAE-Cellulose

由洗脱曲线可见,①用起始缓冲液洗脱时,得到蛋白峰,而没有检测到酶活,说明洗脱出的是杂蛋白,菊粉酶全部被吸附到离子交换剂上。由此证明菊粉酶的等电点小于 5.8,所选择的离子交换剂和缓冲液 pH 适于分离菊粉酶。②用含 0.1 mol/L 和 0.2 mol/L NaCl 醋酸缓冲液洗脱时均得到两个酶活力峰,后者中有一个活力峰较弱,所占比例很小,因此在下面的研究中不再对其进行进一步分离纯化。③用 0.3 mol/L NaCl 醋酸缓冲液洗脱时得到一个酶活力峰。分别收集各活力峰,得到 4 个组分。由此可以看出, *Aspergillus ficuum* 菌株所产菊粉酶体系非常复杂。

将离子交换色谱分离纯化获得的菊粉酶组分采用薄层层析法分离各自水解菊粉的产物,发现前 3 种组分的水解产物主要是果糖,而后一种组分的水解产物中主要为低聚果糖,也有部分果糖。另外从洗脱曲线中各组分所测的 I/S 值也可以看出,后一种组分的 I/S 值要比前 3 种组分的 I/S 值大。因

此,可以认为前 3 种组分主要含外切菊粉酶,而后一种组分中主要含有内切菊粉酶。因此将这 4 种组分分别定义为 Exo-I, Exo-II, Exo-III, Endo。

离子交换色谱是比较有效的分离纯化菊粉酶的方法,在所报道的菊粉酶的纯化中都采用了离子交换色谱,如: Nakamura 等人<sup>[7]</sup>采用 DEAE-Cellulofine A-500 离子交换色谱将 *Penicillium* sp. TN-88 所产菊粉酶系中的外切酶和内切酶分离开, Et-talibi 等人<sup>[8]</sup>采用 DEAE-Sephacel 从 *Aspergillus ficuum* 菊粉酶系中分离得到 5 种外切酶和 3 种内切酶, Azhari 等人<sup>[2]</sup>从 *Aspergillus ficuum* 菊粉酶体系中分离得到一种外切酶和一种内切酶,此外, *Penicillium janczewskii* (2 种菊粉酶)<sup>[1]</sup>, *Bacillus stearothermophilus* KP1289 (2 种菊粉酶)<sup>[6]</sup>。

## 2.2 低聚果糖的制备

采用分离得到的内切菊粉酶组分 Endo 水解菊粉制备低聚果糖,研究了底物质量浓度、pH、加酶量对低聚果糖得率的影响。

### 2.2.1 底物质量浓度对 Endo 酶解菊粉的影响

底物浓度对酶促反应具有很大的影响,当底物浓度较低时,提高底物的浓度可以提高反应速度,但当底物浓度较高时,底物浓度进一步提高,反应速度的增加变得缓慢甚至不再增加。

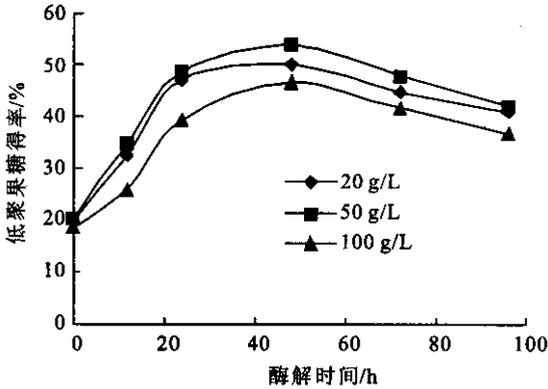


图2 不同底物浓度对低聚果糖得率的影响

Fig. 2 Effect of substrate concentration on the production yield of IOS with Endo

分别采用 20,50,100 g/L 的菊粉为反应起始质量浓度,研究底物质量浓度对 Endo 酶解菊粉的影响。反应条件为:加酶量 5U/g 菊粉,反应温度 45 ℃,反应 pH 值 5,反应时间 96 h。酶解不同时间下的产物做 HPLC 分析,根据各聚合度糖的生成量计算低聚果糖(DP2~DP8)的得率,结果如图 2 所示。由图 2 可以看出,底物质量浓度为 100 g/L 时,低聚果糖的得率较低。底物质量浓度为 50 g/L 时,酶解 48 h 后低聚果糖的最高得率可达 52%。虽然底物浓度采用 20 g/L 时,低聚果糖的得率也较高,但从生产的角度来考虑,底物浓度高对生产成本的降低有好处(可以降低产品浓缩的成本)。因此,采用酶组分 Endo 酶解菊粉制备低聚果糖应选用 50 g/L 的底物质量浓度为宜。

从图 2 还可以看出,随着酶解时间的延长,低聚果糖的得率先增大,后又有缓慢减小的趋势,这可能是由于所选用的酶源中仍含有少量的外切菊粉酶,随着低聚果糖质量浓度的增大,为外切菊粉酶提供了更多的底物,低聚果糖被酶解为果糖,使得酶解产物中低聚果糖不再增加,反而减少。

**2.2.2 pH 对 Endo 酶解菊粉的影响** 通过对酶的最适反应 pH 和 pH 稳定性的研究知道,内切菊粉酶的最适反应 pH 值为 5.0,外切菊粉酶的最适反应 pH 值为 4.5,二者在 pH 6.0 仍能维持 70% 以上的酶活,考虑到在偏酸性环境中越有利于果糖的生成,因此选用 pH 值 5,6,7 来研究其对 Endo 酶解菊粉的影响。数据

分别用 pH 值 5.0,6.0,7.0 的缓冲液配制质量浓度为 50 g/L 的底物菊粉,反应条件为:加酶量 5 U/g 菊粉,反应温度 45 ℃,不同反应时间下取样进行 HPLC 分析,计算反应产物中低聚果糖的生成量。结果见图 3。

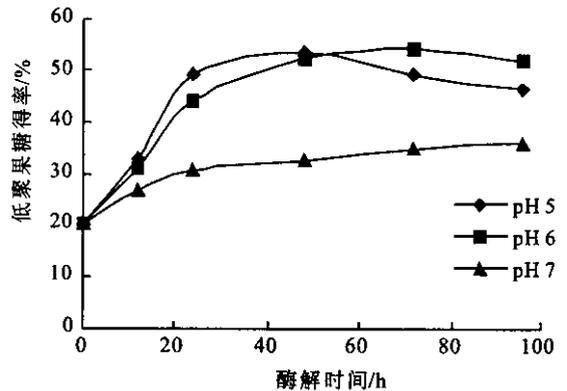


图3 不同 pH 条件下低聚果糖得率随酶解时间的变化

Fig. 3 Effect of pH on the production yield of IOS with Endo

从图 3 可以看出,反应初期,pH 值 5 条件下,菊粉酶解速度最快,48 h 低聚果糖得率达到最大,但反应后期又缓慢下降。pH 值 6 条件下低聚果糖不断增加,72 h 时低聚果糖得率可以达到 54%。因此选用 pH 值 6 有利于低聚果糖的生产。

**2.2.3 酶量对 Endo 酶解菊粉的影响** 为了确定最适酶剂量,选择 5 U/g 菊粉、10 U/g 菊粉、和 20 U/g 菊粉 3 种剂量进行反应,反应条件为底物质量浓度 50 g/L,反应温度 45 ℃,反应 pH 值 6.0,反应时间 96 h。不同反应时间下取样进行 HPLC 分析,计算反应产物中低聚果糖的生成量。结果见图 4。

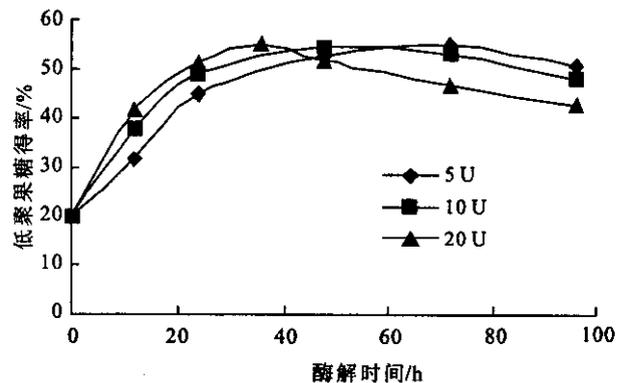


图4 酶量对低聚果糖得率的影响

Fig. 4 Effect of enzyme concentration on the production yield of IOS with Endo

从图 4 可以看出,不同的加酶量对低聚果糖的得率没有显著影响,只是影响达到最高得率的时间,加酶量越大,达到最高得率所需的时间越短,加酶量越小,达到最高得率所需的时间越长。5 U/g

菊粉的加酶量时,菊粉的酶解速度较小,72 h 后低聚果糖的得率达到最大。加酶量为 10 U/g 时,酶解 48 h 即可达到最高得率,加酶量 20U/g 时,达到最大得率的时间进一步缩短。尽管酶的剂量愈大,愈能缩短到达低聚果糖最高得率的时间,但低聚果糖的最终浓度随反应时间的进行而显著降低。从经济的解度考虑,选用 10 U/g 菊粉的加酶量适宜。

综合上述酶组分 Endo 酶解菊粉制备低聚果糖的动力学研究结果,用酶组分 Endo 来酶解菊粉制备低聚果糖的最适反应条件为:底物浓度 50 g/L、加酶量 10 U/g 底物,反应温度 45 °C,反应 pH 6.0。

#### 2.2.4 酶解时间对产物组成变化的影响 在酶组

分 Endo 酶解菊粉制备低聚果糖的最适反应条件下,研究不同酶解时间下产物的组成情况。即在不同反应时间下对酶解产物进行 HPLC 分析,计算不同时间下各聚合度低聚糖的生成量,比较酶解产物的组成,结果见图 5。

从图 5 可以看出,酶解初期,果糖和 DP2~DP8 的低聚果糖都不断增加,随着酶解时间的延长,较高聚合度的低聚果糖逐渐减少,到酶解后期,酶解产物中主要含有果糖及 DP2~DP4 的低聚果糖,酶解率达 74%,酶解产物中低聚果糖的质量分数达到 52%。

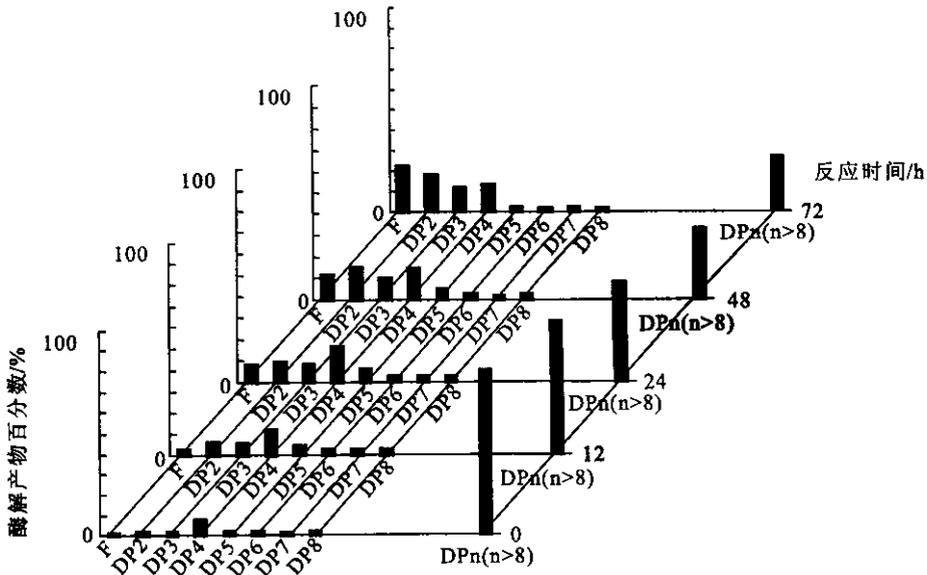


图 5 不同反应时间 *A. ficuum* Endo 酶解菊粉产物变化规律图

Fig. 5 Chromatographic follow-up (using quantitative HPLC and histogram representation) of inulin hydrolysis with Endo

### 3 结 论

通过硫酸铵分级沉淀、透析脱盐、DEAE-Cellulose 离子交换色谱等分离纯化技术,从 *Aspergillus ficuum* 菌株混合酶系中分离得到 4 种组分,其中 3 种主要含外切菊粉酶,一种主要含内切菊粉酶。

采用经 DEAE-Cellulose 离子交换层析分离得到的内切菊粉酶组分 Endo 酶解菊粉时,在底物质量浓度 50 g/L,加酶量 10 U/g 菊粉,温度 45 °C, pH 值 6.0 条件下,菊粉酶解率达 74%,低聚果糖得率可达 50% 以上,酶解产物以 DP2~DP4 为主。

### 参考文献:

- [1] Pessoni R A, Figueiredo-Ribeiro R C, Braga M R. Extracellular inulinases from *Penicillium janczewskii*, a fungus isolated from the rhizosphere of *Vernonia herbacea* (Asteraceae)[J]. *J Appl Microbiol*, 1999, 87: 141-147.
- [2] Azhari R, Szlak A M. Purification and characterization of endo- and exo-inulinase[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 1989, 11: 105-117.
- [3] Zuleta A, Sambucetti M E. Inulin determination for food labeling[J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49: 4570-4572.
- [4] Kalil S J, Maugeri-Filho F, Rodrigues M I. Ion exchange expanded bed chromatography for the purification of an extracellular inulinase from *Kluyveromyces marxianus*[J]. *Process Biochem*, 2005, 40: 581-586.

由分子结构的变化引起的。超声波引起大豆蛋白质其他功能性质的影响和超声改性机理还有待更

深一步的研究,以便使其更好地应用于大豆蛋白的改性及深加工生产。

## 参考文献:

- [1] Saio K, Muralidhara D. Food use of soybean 7S and 11S; Extraction and functional properties of their fractions[J]. **Food Sci Technol**, 1997,38(5):1139-1142.
- [2] Hultin HO, Sckhdev Manku, Philip G. Chemical, physical, and functional properties of soy proteins modified by a nonenzymatic system [J]. **Agric Food Chem**, 1997,45(8):310-320.
- [3] Behrend O, Ax K, Schubert H. Influence of continuous phase viscosity on emulsification by ultrasound[J]. **Ultrasonic Sonochemistry**, 2000,7(2):77-85.
- [4] 梁汉华,杨汝德,郭乾初. 超声处理大豆浆体对提高蛋白质和固形物萃取率的作用[J]. **食品工业科技**,1998 ,19(5) :4-8.
- [5] Wang L C. Ultrasonic extraction of a heat-labile 7S protein fraction from autoclaved, defatted soybean flakes[J]. **Food Sci**,1984,49:551-554.
- [6] 大连轻工学院,华南理工大学,郑州轻工业学院. 食品分析[M]. 北京:中国轻工业出版社,1997.73-224.
- [7] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京:科学出版社,2000. 5.
- [8] 孙哲浩. 蛋白质与多糖在水相介质中交互作用机理的研究[D]. 广州:华南理工大学,2001.
- [9] Wang L C. Soybean protein agglomeration; Promotion by ultrasonic treatment[J]. **Agric Food Chem**, 1981, 29(1): 177-180.
- [10] Wang L C, Wolf W. Soybean protein aggregation by sonication; Ultracentrifugal analysis[J]. **Food Sci**, 1983, 48: 1260-1264.

(责任编辑:杨 萌)

(上接第9页)

- [5] Kushi R T, Monti R, Contiero J. Production, purification and characterization of an extracellular inulinase from *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*[J]. **J Ind Microbiol Biotechnol**, 2000, 25:63-69.
- [6] Kato K, Araki T, Kitamura T. Purification and properties of a thermostable inulinase ( $\beta$ -D-fructan fructohydrolase) from *Bacillus stearothermophilus* KP1289[J]. **Starch**, 1999, 51:253-258.
- [7] Nakamura T, Shitara A, Matsuda S. Production, purification and properties of an endoinulinase of *Penicillium* sp. TN-88 that liberates inulotriose[J]. **J Ferment Bioeng**, 1997, 84:313-318.
- [8] Ettalibi, M. and Jacques, B. C. Purification, properties and comparison of invertase, exoinulinases and endoinulinases of *Aspergillus ficuum*[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 1987, 26:13-20.

(责任编辑:杨 萌)