

文章编号 :1009 - 038X( 2002 )04 - 0424 - 04

# *Aspergillus ficuum* 产果聚糖酶体系的分析

王 静 , 金征宇

(江南大学 食品学院 ,江苏 无锡 214036)

**摘 要 :**采用活性聚丙烯酰胺凝胶电泳法对 *Aspergillus ficuum* 产果聚糖酶体系进行了分离 ,获得 8 条谱带 ,进一步运用薄层色谱(TLC)和高效液相色谱(HPLC)法进行分析 ,发现 8 条谱带中有 3 条属于外切菊粉酶 ,2 条属于内切菊粉酶 ,证明了 *Aspergillus ficuum* 能同时产内切菊粉酶和外切菊粉酶 .

**关键词 :**果聚糖酶 ;外切菊粉酶 ;内切菊粉酶 ;活性聚丙烯酰胺凝胶电泳

中图分类号 :Q 556.2

文献标识码 :A

## Analysis of Fructanohydrolase System in *Aspergillus ficuum*

WANG Jing , JIN Zheng-yu

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

**Abstract :** *Aspergillus ficuum* fructanohydrolases were separated by native polyacrylamide gel electrophoresis. Eight protein bands were obtained. Proved using TLC and HPLC , three bands had exoinulinase activity and two bands had endoinulinase activity.

**Key words :** fructanohydrolase ; exoinulinase ; endoinulinase ; native PAGE

果聚糖酶(又称菊粉酶)是一种微生物酶.果聚糖酶按照作用方式不同可分为内切型菊粉酶和外切型菊粉酶.内切菊粉酶能随机断开菊粉链内部的糖苷键,水解产物主要为低聚果糖;外切菊粉酶作用于菊粉链的非还原性末端的糖苷键,逐一水解释放出果糖,主要产物为果糖.大多数微生物只产外切菊粉酶,只有少数青霉和曲霉能产内切菊粉酶,而且还伴随有外切菊粉酶.外切菊粉酶和内切菊粉酶在性质上非常相似,给二者的分离带来了困难.作者通过活性聚丙烯酰胺凝胶电泳的方法对 *Aspergillus ficuum* 产果聚糖酶体系进行了分离,并利用 TLC 和 HPLC 法对分离产物进行了鉴定,发现 *Aspergillus ficuum* 能同时产外切菊粉酶和内切菊

粉酶.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 菊粉 优级纯,Orafti 公司产品.

1.1.2 菌株 *Aspergillus ficuum* JNSP5-06,作者所在实验室保藏.

### 1.1.3 培养基

斜面保藏培养基:马铃薯琼脂培养基.

发酵培养基:菊粉 2 g/dL,酵母膏 2 g/dL, NH<sub>4</sub>H<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.

收稿日期 2002-03-14; 修订日期 2002-05-26.

作者简介:王静(1976-),女,河南新郑人,粮食、油脂与植物蛋白工程博士研究生.

万方数据

## 1.2 实验方法

**1.2.1 酶活力分析** 取 0.5 mL 反应液加入 1.5 mL 蒸馏水和 1.5 mL 3,5-二硝基水杨酸试剂,沸水浴加热 5 min,迅速冷却至室温,定容至 25 mL,在 575 nm 波长下测定吸光度<sup>[1]</sup>。通过比较吸光度来判断酶活力,吸光度越大,表示反应生成的还原糖越多,酶活力越大。

**1.2.2 活性电泳** 聚丙烯酰胺凝胶电泳采用 12 g/dL 分离胶(pH 8.9)和 4 g/dL 的浓缩胶(pH 6.7)。电极缓冲液采用 Tris-甘氨酸缓冲液(pH 8.3),进样量为 75  $\mu$ L,稳流电压 10 mA。分别采用考马斯亮蓝 G250 和考马斯亮蓝 R250 进行染色<sup>[2]</sup>。

**1.2.3 薄层层析法** 采用硅胶 GF254(60 型),以氯仿:醋酸:水(30:35:5)作展开剂,用 1%的  $\alpha$ -萘酚(含 10%冰磷酸)染色<sup>[3]</sup>。

### 1.2.4 高效液相色谱法(HPLC)

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 mm  $\times$  100 mm,填料粒度 5  $\mu$ m;

流动相:体积分数 70% 的乙腈,体积流量 1 mL/min;

温度 28  $^{\circ}$ C。

## 2 结果与讨论

**2.1 *Aspergillus ficuum* 产果聚糖酶体系活性聚丙烯酰胺凝胶电泳系统的优化**

### 2.1.1 缓冲液离子强度及 pH 值的选择

1) 分离胶缓冲液离子强度及 pH 值选择:分别选择 0.3,0.5,0.7 mol/L 的 3 种浓度的 Tris 分离胶缓冲液,在其它条件相同的情况下,逐次改变分离胶中的 Tris 浓度与 pH 值。pH 值依次为 8.5,8.7,8.9,9.1,9.3,9.5。结果表明,分离胶缓冲液离子强度为 0.7 mol/L,pH 值为 8.9 时,分离效果较好。

2) 电极缓冲液离子强度及 pH 值选择:分别选择了 Tris 浓度为 0.025 mol/L、甘氨酸浓度为 0.192 mol/L 及 Tris 浓度为 0.05 mol/L、甘氨酸浓度为 0.384 mol/L 两种缓冲液,在其它条件相同的情况下,逐次改变电极缓冲液中 Tris、甘氨酸浓度与 pH 值。pH 值依次为 8.0,8.1,8.2,8.3,8.4,8.6,9.0。结果发现,电极缓冲液中离子强度越大,低分子式量的谱带分离越好,但 pH 值变化时,对分离效果影响不明显。

### 2.1.2 分离胶质量浓度的选择

分离胶质量浓度是影响活性聚丙烯酰胺凝胶

电泳分离效果的主要因素之一。分别采用 6,8,10,12,14,16 g/dL 6 种质量浓度的凝胶(其它条件相同)。结果表明:凝胶质量浓度低时,高分子式量的谱带分离效果较好,低分子式量谱带易于扩散;凝胶质量浓度高时,高分子式量的谱带分离效果不好,低分子式量谱带分离相对较好。对于 *Aspergillus ficuum* 产果聚糖酶体系而言,12 g/dL 的分离胶质量浓度可以获得较好的分离效果。

综上所述,*Aspergillus ficuum* 产果聚糖酶体系的活性聚丙烯酰胺凝胶电泳系统的配方见表 1。

表 1 *Aspergillus ficuum* 产果聚糖酶体系的活性聚丙烯酰胺凝胶电泳系统配方

Tab.1 Native PAGE System for *Aspergillus ficuum* fructanohydrolase

组 分	分离胶(12 g/dL) 体积/mL	浓缩胶(4 g/dL) 体积/mL
分离胶贮液 30 g/dL Acr 0.8 g/dL Bis	6	
浓缩胶贮液 10 g/dL Acr 0.75 g/dL Bis		4
分离胶缓冲液 Tris/ HCl pH 8.9	3.75	
浓缩胶缓冲液 Tris/ HCl pH 6.7		2.5
N,N,N',N'-四甲基乙 二胺	0.005	0.02
重蒸水	5	3.4
10 g/dL 过硫酸铵	0.1	0.05

注:Acr 表示丙烯酰胺;Bis 表示 N,N'-亚甲基甲叉双丙烯酰胺。电极缓冲液为 0.05 mol/L 的 Tris 和 0.384 mol/L 甘氨酸,pH 8.3。

### 2.2 *Aspergillus ficuum* 产果聚糖酶体系电泳结果

*Aspergillus ficuum* 在 30  $^{\circ}$ C 下发酵 5 d,发酵液过滤后直接进行电泳,结果见图 1。由图 1 可见,从上到下有 8 条较清晰的蛋白质谱带。

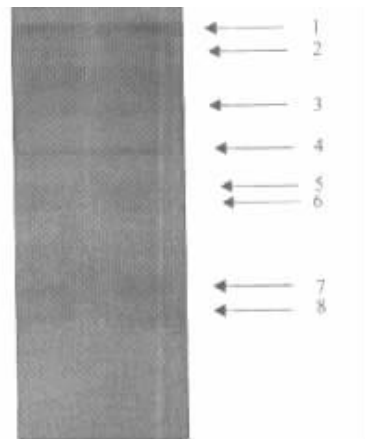


图 1 *Aspergillus ficuum* 发酵液电泳图谱

Fig.1 Native PAGE for *Aspergillus ficuum* fructanohydrolase

2.3 酶活力分析

将电泳后的胶板中各条谱带依次切下,放入试管中捣碎,分别以 2 g/dL 菊粉溶液(用 0.1 mol/L, pH 5.0 的醋酸钠缓冲液配制)和 2 g/dL 蔗糖溶液(用 0.1 mol/L, pH 5.0 的醋酸钠缓冲液配制)为底物进行反应,50 °C 水浴下分别反应 1, 3, 11 h 后取反应液,按方法 1.2.1 进行酶活分析,结果见表 2. 可见吸光度越大,酶活力越大.

表 2 各条谱带反应不同时间后的吸光度

Tab.2 Absorbance at 575 nm of Eight Bands reacting for various period

谱带编号	1 h 后的吸光度 A		3 h 后的吸光度 A		11 h 后的吸光度 A	
	菊粉	蔗糖	菊粉	蔗糖	菊粉	蔗糖
1	0.153	0.000	0.168	0.010	0.201	0.059
2	0.157	0.046	0.181	0.123	0.353	0.413
3	0.225	0.015	0.339	0.137	0.614	0.359
4	0.159	0.002	0.176	0.452	0.307	0.503
5	0.152	0.001	0.160	0.003	0.173	0.010
6	0.158	0.005	0.162	0.012	0.179	0.026
7	0.153	0.001	0.230	0.212	0.346	0.506
8	0.158	0.005	0.178	0.014	0.303	0.124

从表 2 可以看出,谱带 2, 3, 4, 7, 8 对菊粉和蔗糖均显示出酶活力,说明这 5 条谱带为果聚糖酶.

2.4 薄层层析分析

从图 2 看出,随着反应时间的延长,谱带 2 和 3 反应产物中果糖增加较明显,从而可以断定谱带 2 和 3 为外切菊粉酶,谱带 4 反应产物中果糖也有少许增加,初步断定该谱带为外切菊粉酶,谱带 7 和 8 反应产物中,低聚糖不断增多,而果糖没有明显增加,说明谱带 7 和 8 为内切菊粉酶.

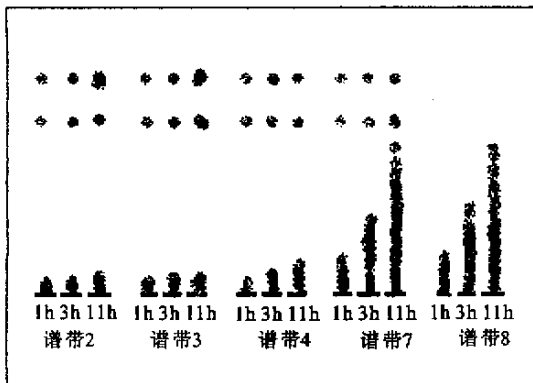


图 2 不同时间酶解产物硅胶薄层层析图谱

Fig.2 Thin layer chromatogram of inulin hydrolysate by the enzyme bands

2.5 高压液相色谱分析

将各谱带依次切下,放入试管中捣碎,加入 5 g/dL 菊粉溶液(用 0.1 mol/L, pH 5.0 的醋酸钠缓冲液配制),50 °C 水浴振荡反应 24 h 后,用高压液相色谱测定反应产物的组成,图 3 为对照(不加酶),色谱图见图 4~8.从高压液相色谱图中可以看出,与不加酶的相比,谱带 2, 3, 4 水解菊粉后的产物中果糖明显增多,而其它聚合度的糖增加不明显,谱带 7 和 8 水解菊粉后的产物中有聚合度为 2~7 的低聚糖.谱带 1, 5 和 6 对菊粉没有明显作用(图未显示).因此可以判断谱带 2, 3, 4 为外切菊粉酶,谱带 7 和 8 为内切菊粉酶.

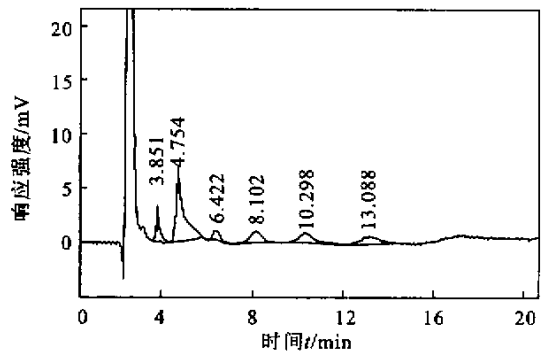


图 3 对照 HPLC 图

Fig.3 HPLC of inulin

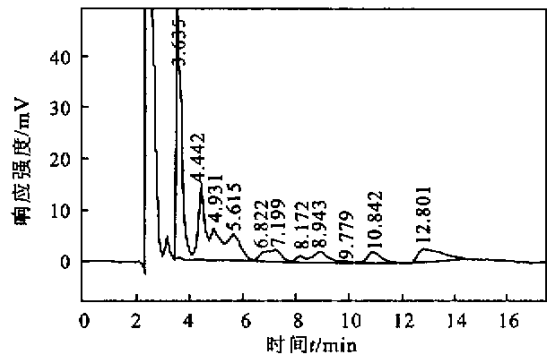


图 4 谱带 2 的水解产物 HPLC 图

Fig.4 HPLC of inulin hydrolysate by band 2

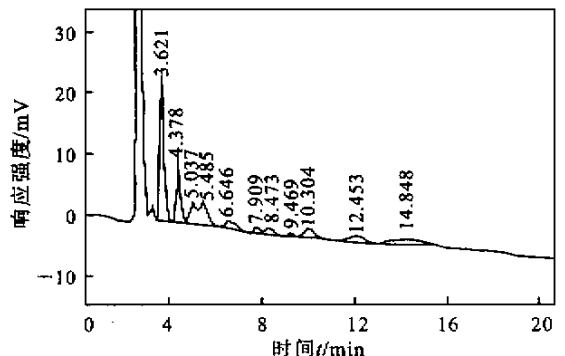


图 5 谱带 3 的水解产物 HPLC 图

Fig.5 HPLC of inulin hydrolysate by band 3

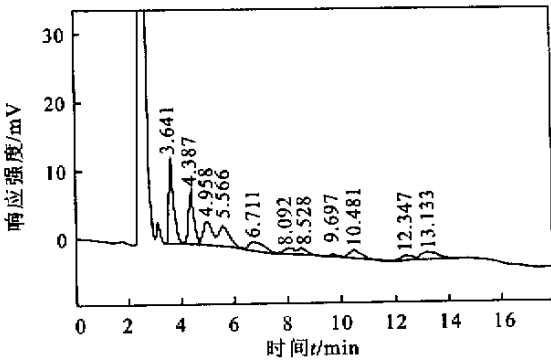


图 6 谱带 4 的水解产物 HPLC 图

Fig.6 HPLC of inulin hydrolysate by band 4

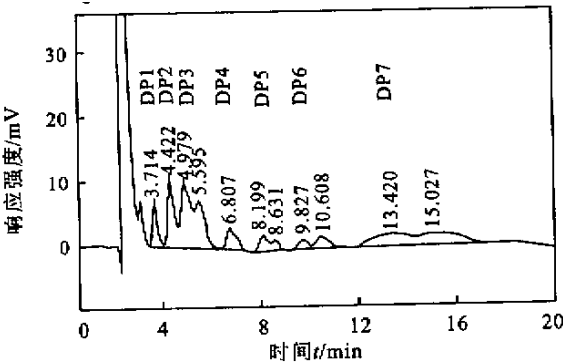


图 7 谱带 7 的水解产物 HPLC 图

Fig.7 HPLC of inulin hydrolysate by band 7

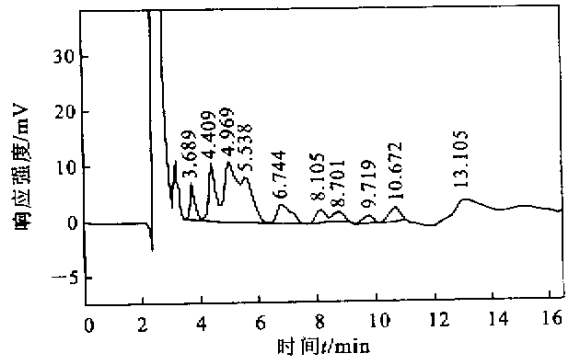


图 8 谱带 8 的水解产物 HPLC 图

Fig.8 HPLC of inulin hydrolysate by band 8

### 3 结 论

作者确定的活性聚丙烯酰胺凝胶电泳方法对 *Aspergillus ficuum* 产果聚糖酶体系具有良好的分辨率.证明了 *Aspergillus ficuum* 能同时产外切菊粉酶和内切菊粉酶.外切菊粉酶对菊芋的水解产物主要为果糖 ;*Aspergillus ficuum* 所产内切菊粉酶对菊芋的水解产物主要是聚合度为 2~7 的低聚糖.

### 参考文献 :

- [ 1 ] GUPTA A K , SINGH D P. Production ,purification and immobilization of inulinase from *Kluyveromyces fragilis*[ J ]. *J Chem Tech Biotechnol* ,1994 ,59 :377 - 385.
- [ 2 ] BAUMGARTNER S , PRAZNIK W. Purification of exo-and endoinulase from crude inulinase extract for the analysis of fructans [ J ]. *Int J Biol Macromol* ,1995 ,17( 5 ) 247 - 250.
- [ 3 ] RASA AZHARI ,ALDO M SZLAK. Purification and characterization of endo- and exo-inulinase[ J ]. *Biotechnol Appl Biochem* , 1989 ,11 :105 - 117.

( 责任编辑 李春丽 )