

菊粉酶特性的初步研究

牟艳英 宋国勇 李虹

(中国食品发酵工业研究院,北京,100027)

摘要 以菊粉为底物研究了 pH 值、温度、底物浓度、金属离子对菊粉酶活性的影响及酶活随反应时间的变化情况,并测定该菊粉酶的米氏常数和酶活。实验结果表明,该菊粉酶反应的最适 pH 值为 4.7,最适温度为 60℃, Ca^{2+} 和 Zn^{2+} 对菊粉酶有激活作用。该菊粉酶的米氏常数 K_m 为 0.35 mol/L, V_{\max} 为 0.52 mg/min。

关键词 菊粉, 菊粉酶, 酶活性质

菊粉(inulin)是一种碳水化合物^[1],它经酶水解能生成果糖和低聚果糖,目前,菊粉通过外切酶或内切酶的复合酶水解来生产超高果糖^[2,3],利用菊粉酶水解菊粉或菊芋汁生产果糖或果葡糖浆的研究已引起了人们的高度重视^[4]。菊粉酶(inulinase)是能够水解 β -2,1-*D*-果聚糖果糖苷键的一类水解酶,学名为 β -2,1-*D*-果聚糖酶,又叫 β -果聚糖酶,2,1-*D*-果聚糖水解酶^[3]。根据其对底物的作用方式不同,分为外切菊粉酶(exoinulinase, EC3.2.1.26)和内切菊粉酶(endoinulinase, EC3.2.1.7)。

1 材料与方法

1.1 实验材料

菊粉, Sigma 公司;菊粉酶,丹麦 Novo Nordisk Ferment Ltd. 生产,是由黑曲霉菌株发酵得到的外切菊粉酶和内切菊粉酶的混合酶;3,5-二硝基水杨酸, British Drug House Ltd.。

1.2 实验仪器

分析天平, AA-200, Denver Instrument Company;酸度离子计, pH211, HANNA Instrument;分光光度计, 721 型, 上海第三分析仪器厂;TDX-1 旋涡混合器, 北京方通达科技有限公司;电热恒温水浴锅, HH.S21-6 北京长安科学仪器厂;JS-506 型秒表, 深圳市君斯达实业有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 菊粉酶酶活的测定方法

以 0.9 mL, pH 4.7, 浓度为 14% 的菊粉溶液为底物,加 0.1 mL 稀释 2 500 倍的菊粉酶,60℃ 水浴反应 20 min,沸水浴 5 min 灭酶。测定反应体系中还原糖含量。定义酶活单位为:在上述反应条件下,每分钟产生 1 μmol 还原糖(以果糖计)所需的酶量为 1 个

酶活力单位(U)。

1.3.2 还原糖测定

采用 3,5-二硝基水杨酸比色法^[5],用果糖作为标准液,波长 540 nm 处测定 OD 值。

1.3.3 果糖标准曲线

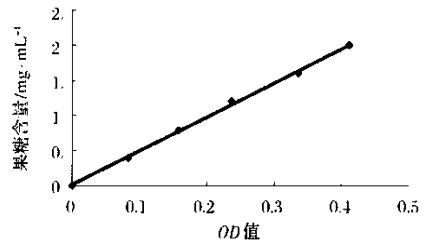


图1 果糖标准曲线

回归方程: $y = 4.8416x + 0.0145$ $R = 0.9993$

酶活力计算公式:

$$U = y \times \text{酶液稀释倍数} \times 1000 / [180 \times t(\text{min})]$$

1.3.4 缓冲液

采用磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液^[6]。

2 结果与讨论

2.1 pH 对菊粉酶活性的影响

以 2% 菊粉溶液为底物,加入稀释 1 000 倍的酶液,用磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液调 pH 值分别为 3, 4, 5, 6, 7, 8, 55℃ 下反应 15 min,测酶活。结果如图 2 所示。

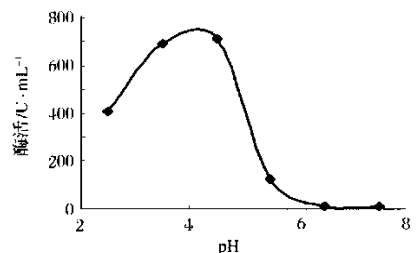


图2 pH对酶活力的影响曲线图

由图 2 可知,菊粉酶在 pH 4~5 有较高的活性,

第一作者:硕士研究生。

收稿日期:2005-06-05

在 pH8 时已基本失去活性,这说明该菊粉酶的反应, pH 值为 4~5,酶活性中心处于与底物较有利的结合状态,酶活力最高;碱性条件下菊粉酶容易失活,当 pH 值为 8 时酶活力接近 0,可能是酶蛋白已变性或酶分子的活性中心构象发生很大改变而导致其不能与底物很好结合;在 pH 值较低时菊粉酶可保持一定活力,这可能是由于底物的酸分解所导致,因为菊粉在 $\text{pH} < 4$ 时会发生分解,生成果糖和低聚糖。菊粉酶反应的最适 pH 在 4~5 之间。

将反应体系 pH 值分别调至 4.00, 4.25, 4.50, 4.75, 5.00, 测酶活, pH 值与酶活的趋势如图 3 所示。

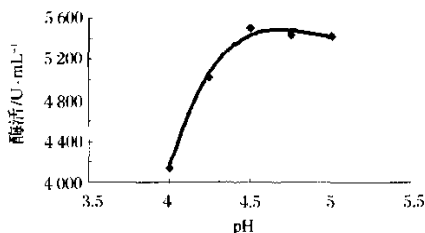


图 3 pH 对酶活力影响趋势图

由图 3 可知,在 pH4.5~5 时菊粉酶活性更高,且比较稳定;当 $\text{pH} < 4.5$ 时,酶活随 pH 降低而迅速降低。因此可确定该菊粉酶的最适 pH 值为 4.7 左右。

2.2 温度对菊粉酶活力的影响

2.2.1 反应温度对酶活的影响

以 2% 菊粉溶液为底物,加入稀释 1 000 倍的酶液,反应体系 pH 4.7,分别在 45、50、55、60、65℃ 下反应 15min,测酶活,结果如图 4 所示。

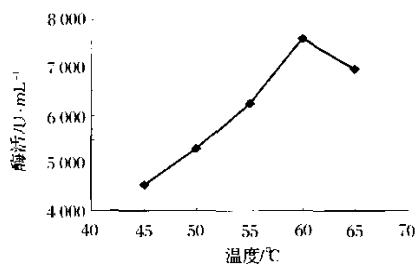


图 4 温度对酶活力的影响

从图 4 可知,菊粉酶的活力随温度升高而升高,在 60℃ 时酶活最高,65℃ 时酶活有所下降。因为对于菊粉酶来说,温度越高酶蛋白越易变性而导致活力损失就越多,但对于酶反应速度而言,温度越高,反应速度越快,60℃ 时酶活力和反应速度处于较好的平衡,以此做为该酶的最适反应温度。

2.2.2 温度对酶稳定性的影响

将酶液分别在 45, 50, 55, 60, 65℃ 的水浴中保温

处理一定时间,另有 2 个样分别在冰箱和室温下放置 30 min,再在 55℃ 下反应 15 min,测定酶活。另做对照,将酶从冰箱取出立即加入酶反应体系进行反应,测定酶活。结果如图 5 所示。

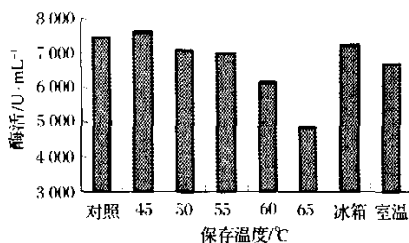


图 5 温度对酶活稳定性影响

由图 5 可知,菊粉酶在 45℃ 处理 0.5h,活性损失较少,酶活甚至比对照组和冰箱保存的酶还高。这是因为 45℃ 下保存 0.5h 的处理恰恰对酶起了活化作用。若将保存时间延长,酶活损失则会比在冰箱保存的酶大。此外,随着处理温度的升高,酶活不断下降,当处理温度达到 65℃ 时,酶稳定性大大降低,仅处理 0.5 h,酶活相对于对照损失了 35%,而在室温下保存的酶活则低于 50、55℃ 下的酶活,这是由于在相对较短的保存时间内,一方面该酶在 50、55℃ 活性有损失,另一方面该温度对酶有部分活化作用。菊粉酶在低温下活性较稳定,45℃ 保存 0.5h 对酶有活化作用。

2.3 底物浓度对酶活力的影响

将 pH 为 4.7,浓度分别为 2%、5%、8%、11%、14%、17% 的菊粉溶液,加入稀释 2 500 倍的酶液,在 60℃ 下反应 15min,测酶活。底物浓度对酶活影响趋势见图 6。

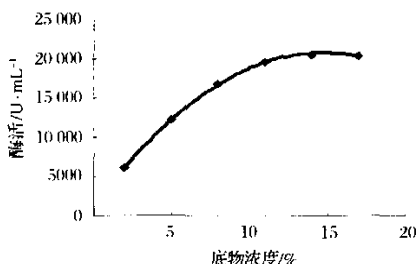


图 6 底物浓度对酶活力影响

如图 6 所示,菊粉酶活性随着底物浓度增加而增高,当底物浓度增加到 14% 时酶活基本趋于平缓。因为反应体系中底物浓度的增加使底物和酶分子碰撞的机会增加,酶容易和底物结合,而该反应的底物菊粉的溶解度是有限的,在 60℃ 下浓度达到 14% 基本处于饱和状态,浓度为 17% 的菊粉溶液澄清度较

差,悬浮的不溶物反而在一定程度上会影响酶和底物分子的结合。所以菊粉酶反应的最适底物浓度为14%。

2.4 金属离子对菊粉酶活性的影响

在反应体系中分别加入1 mmol/L的 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} ,反应15 min后测酶活。对照组不加金属离子,结果见图7。

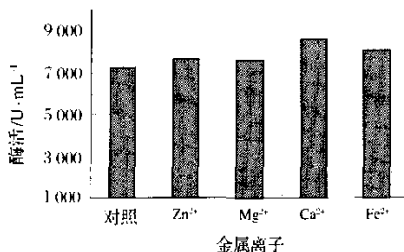


图7 金属离子对酶活性影响

由图7可知, Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 对菊粉酶都有激活作用,其中 Ca^{2+} 的激活作用最显著。而加入 Fe^{3+} 的反应体系有沉淀,溶液澄清度不好,因此所测的OD值大小不能正确反应溶液中还原糖含量多少,以此算出的酶活也不能反应真实值,暂不予考虑。

由于日常饮用水中已含有足够的 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} ,实际工业生产中直接使用合格自来水即可,而对于 Zn^{2+} ,其对酶的激活作用远不如 Ca^{2+} 显著,所以可以认为反应体系中无需加入任何金属离子。

2.5 反应时间对菊粉酶活性的影响

将pH4.7,2%的菊粉溶液,加入稀释1000倍的酶液,60℃下反应,分别测出0,5,10,15,20,25min时的产物浓度,并计算酶活。对产物还原糖含量和反应时间作图,酶水解进程曲线见图8。

从图8可知,在菊粉酶反应进行的25 min内,产物浓度和反应时间成正比关系,此时酶反应速度是恒定的,因此前25 min内所测的反应速度可以认为是酶的初反应速度。所以可以确定测该酶活性的最适反应时间为20 min。

2.6 菊粉酶的米氏常数的测定

米氏公式为: $V = V_{max}[S]/(K_m + [S])$,其中米氏常数 K_m 为反应速度是最大反应速度1/2时的底物浓度,单位为mol/L,表示酶同底物亲和力的大小。

采用双倒数法求出菊粉酶的米氏常数。将米氏方程两边取倒数并整理得到: $1/V = (K_m/V_{max})(1/[S]) + 1/V_{max}$,对 $1/V$ 和 $1/[S]$ 作图即得到一条直线,斜率为 K_m/V_{max} ,截距为 $1/V_{max}$,因此 $K_m = \text{斜率}/\text{截距}$; V_{max} 为 $1/\text{截距}$ 。

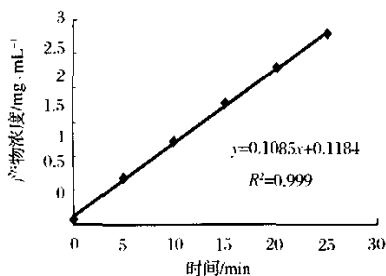


图8 酶反应进程曲线

配制pH4.7,浓度分别为2%、3%、4%、6%、8%、10%的菊粉溶液,加入稀释1000倍的酶液,60℃下反应10 min,测出产物浓度,计算反应速度,对各组 $1/V$ 和 $1/[S]$ 作回归分析并作图,得到如图9的直线。

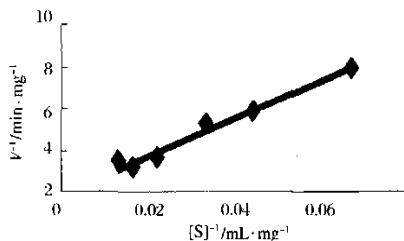


图9 米氏常数曲线

回归方程为 $y = 120.1x + 1.9066$, $R = 0.99$
米氏常数为: $K_m = 62.99 \text{ mg/mL}$,即0.35mol/L(分子质量为180计)

$V_{max} = 0.52 \text{ mg/min}$ (以产生果糖量计)

2.7 菊粉酶酶活的测定

以pH4.7,底物浓度为14%的菊粉溶液为底物,加入稀释2500倍的酶液,60℃水浴反应20 min,测得菊粉酶的活力为24000 U/mL。

3 结论

(1)菊粉酶在弱酸性条件下活力较高,最适反应pH为4.7。

(2)菊粉酶耐热性一般,保存温度越高酶活损失也越多,最适反应温度为60℃。

(3)底物浓度越高,所测酶活力也越高,其最适底物浓度为14%。

(4)金属离子 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 都对菊粉酶有激活作用,其中 Ca^{2+} 的激活作用最显著。

(5)菊粉酶反应前25 min速度较稳定,所测得反应速度可认为是酶初反应速度,可确定测酶活的最适反应时间为20 min。

(6)实验所测得该菊粉酶的米氏常数 K_m 为

0.35 mol/L, V_{\max} 为 0.52 mg/min。

(7) 在菊粉酶的最适反应条件: pH 4.7, 温度 60℃, 底物浓度 14%, 反应时间为 20 min 下, 所测得该酶的酶活力为 24 000 U/mL。

致谢

本篇论文的实验工作得到了中国食品发酵工业研究院酶淀粉工程研究中心全体同仁的大力帮助, 尤其是冯雷工程师和张露工程师, 特此表示衷心的感谢。

参考文献

1 Rocha J R. Design and characterisation of an enzyme system

for inulin hydrolysis[J]. Food Chemistry, 2005, 95(1): 77~82

2 Zittan L. Enzymatic hydrolysis of inulin: an alternative way to fructose production[J]. Starch, 1981, 33: 373~377

3 Ettalibi M, Baratti J C. Purification, properties and comparison of invertase, exoinulinases and endoinulinases of *Aspergillus ficuum* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1987, 26: 13~20

4 贾英民, 田洪涛, 赵学慧, 等. 发酵菊芋汁生产果糖糖浆研究[J]. 微生物学通报, 1998, 25(1): 13~16

5 大连轻工学院, 华南理工大学, 郑州轻工业学院, 等. 食品分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2002. 173

6 李建武, 萧能庚, 余瑞元, 等. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 大学出版社, 1997. 405

Primary Study on Properties of Inulinase

Mou Yanying Song Guoyong Li Hong

(China National Research Institute of Food and Fermentation Industries, Beijing, 100027, China)

ABSTRACT The inulinase activities were investigated with inulin as substrate in different pH, temperature, substrate concentration and metal ions, as well as the change of inulinase activities during reactions. The Michaelis constant and activities of the inulinase were also studied in this paper. Our results showed that the optimum pH of inulinase was 4.7, and the optimum temperature was 60℃, and that Ca^{2+} and Zn^{2+} could improved the activity of inulinase. Michaelis constants of inulinase were $K_m = 0.35 \text{ mol/L}$ and $V_{\max} = 0.52 \text{ mg/min}$.

Key words inulin, inulinase, enzymatic properties

信息窗

用于糖果、糕点的添加物新产品

用杏仁皮代替小麦粉: 美国加利福尼亚州杏仁面包公司最近采用杏仁皮替代小麦粉做原料, 制作托尔替阿(一种墨西哥人食用的不经发酵的玉米饼)和其他焙烤制品, 可以提高制品的蛋白质含量和减少碳水化合物及饱和脂肪酸的含量。例如, 使用杏仁粉加杏仁皮组成的原料, 焙烤制品中就可以减少使用小麦粉或燕麦粉 21%。研究表明, 杏仁皮是经过漂白处理的副产物, 很少被利用。杏仁皮含 52% 的植物纤维以及多种极具抗氧化力的多酚化合物。

用大豆粉代替小麦粉: 随着低碳水化合物的流行, 大豆受到厂商和研究机构的关注。最近, 凯利配料公司在市场上推出了可替代小麦粉的、味道良好且对健康有益的低碳水化合物制品——大豆粉。从健康上看, 这种产品既含有丰富的蛋白质和适量的碳水化合物, 又具有特殊的保健功能和良好的口感。由于去除了大豆粉的苦涩味, 同时未使用化学溶剂, 因此成为那些寻求天然有机制品的生产企业的理想产品。该产品蛋白质含量为 45%~65%, 分成脂肪含量多和少 2 个不同品种。膳食纤维含量为 55% 以上, 只需少量添加就可以起到对面包、脆皮松饼、各种通心粉以及快餐食品, 如比萨饼的营养强化作用。

此外, 一家叫做斯别特拉姆的食品公司也在市场上推出了由大豆提取物制成的新一代高纤维、低脂肪的大豆粉和“高蛋白大豆粉”2 种产品。

纤维强化用的新材料和制品: MGP 食品配料公司最近开发生产了一种强化纤维用的新材料制品“Fibersym”, 将它添加在面包中会产生非常好的口味, 可以起到增加纤维含量的作用。该产品具有低水分保持能力, 总膳食纤维含量达 70%~80%, 属于高功能性阻抗型变性淀粉之一。该产品是由小麦、土豆和高直链淀粉玉米等材料组成, 具有无可比拟的适口性和白色润滑的组织结构, 添加在面包和其他食品中可以得到广大消费者所希望的风味、外观和组织结构, 除可利用在面包、糕点生产中以外, 还可用于如谷物早餐、饼干、脆皮松饼、营养“棒”和快餐食品中。

此外, MGP 公司不久前还推出了一种由小麦制造的阻抗型变性淀粉“FuberSym70”。该产品有小麦的自然风味, 故添加利用在用小麦粉加工制作的食品中能天然一致地同原产品相符。

MGP 食品配料公司还生产了另一种由小麦原料制做的面包强化用膳食纤维材料, 阻抗型变性淀粉“Fibersym”。该产品总纤维含量 70%~80%, 有小麦风味和白色、柔滑的组织结构, 低水分保持性, 在焙烤制品和许多面制食品中可以部分或全面替代小麦粉。

Cargill Food and Pharma Specialties 公司最近也生产上市了用木薯原料加工制成的阻抗性变性淀粉产品“Acti Star^{RT}”。该产品总膳食纤维含量高, 可以 80% 取代小麦粉, 尤其对面包和谷物早餐之类的高碳水化合物制品, 有降低碳水化合物含量的作用。