

马克斯克鲁维酵母菊粉酶的分离纯化和酶学性质研究

纠敏, 汪伦记

(河南科技大学食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471003)

摘要: 马克斯克鲁维酵母产生的胞外菊粉酶经超滤浓缩、DEAE-Cellulose 阴离子交换色谱、SephadexG-100 凝胶色谱分离纯化, 得到两个菊粉酶组分 Exo I 和 Exo II, I/S 值分别为 0.0249 和 0.0253, 均属外切菊粉酶。Exo I 经聚丙烯酰胺凝胶鉴定为单一组分, 分子量为 85kD。Exo I 最适 pH 值为 4.0, 最适温度为 60℃, Mn^{2+} 和 Mg^{2+} 对酶活力有促进作用, 而 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 对酶活力有抑制作用, Exo I 水解菊粉溶液的产物为果糖和少量葡萄糖。

关键词: 马克斯克鲁维酵母; 菊粉酶; 纯化; 酶学性质

Purification and Enzymatic Properties of Inulinase from *Kluyveromyces marxianus*

JIU Min, WANG Lun-ji

(Food and Bioengineering Department, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

Abstract: Crude extracellular inulinase from *Kluyveromyces marxianus* was purified through sequential steps of ultrafiltration, DEAE-cellulose anion exchange chromatography and SephadexG-100 gel filtration to obtain two components, designated as Exo I and Exo II inulinase. The molecular weight of Exo I inulinase was 85 kD. The optimal reaction pH and temperature of Exo I were 4.0 and 60 °C, respectively. In addition, Mn^{2+} and Mg^{2+} could improve the activity of Exo I inulinase; in contrast, Cu^{2+} and Fe^{2+} exhibited a strong inhibition effect on Exo I inulinase activity. Enzymatic hydrolysates of inulin by Exo I inulinase were fructose and a small amount of glucose.

Key words: *Kluyveromyces marxianus*; inulinase; purification; enzymatic property

中图分类号: TQ925.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)03-0198-05

菊粉酶来源于菊科植物和微生物, 目前研究较多的微生物产菊粉酶有霉菌中的黑曲霉(*Aspergillus niger*)^[1]、青霉(*Penicillium sp.*)^[2], 酵母中的脆壁克鲁维酵母(*Kluyveromyces fragilis*)、马克斯克鲁维酵母(*K.marxianus*)^[3]等。来源于菊科植物组织的菊粉酶底物专一性很强, 只作用于菊粉; 微生物源菊粉酶底物专一性差, 除菊粉外, 还能水解蔗糖、棉子糖等。根据对底物作用方式, 菊粉酶主要有两种: 1) 外切菊粉酶(Exoinulinase, EC 3.2.1.80), 从非还原末端逐个切下单个果糖, 是从菊糖生产果糖很有用的酶, 可被用来制备高果糖浆^[4], 其水解的果糖可被发酵生成燃料酒精^[5-6]; 2) 内切菊粉酶(Endoinulinase, EC3.2.1.7), 从分子内部随机切断某个 β -2,1-糖苷键, 可用来水解菊粉制备低聚

果糖饲料。

菊粉酶在转化菊粉成果糖以及制备酒精、山梨糖醇等方面具有良好的应用前景。以前, 多采用液体发酵生产菊粉酶, 固体发酵产菊粉酶的研究不多^[7-8]。本实验在 *K. marxianus* 固态发酵产菊粉酶研究的基础上, 对其固态发酵产生的粗酶液, 采用离子交换色谱、凝胶过滤色谱和电泳技术对菊粉酶进行分离纯化和鉴定, 并对其酶学特性进行初步研究, 为进一步优化菊粉酶酶解菊粉制备果糖的条件提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*) 本实

收稿日期: 2009-04-28

基金项目: 河南科技大学博士科研启动基金资助项目

作者简介: 纠敏(1971—), 女, 讲师, 博士, 主要从事入侵生物学和分子生物学研究。

E-mail: jiumin0912@sohu.com

实验室保存。

酵母种子培养基: 酵母膏 10g/L、蛋白胨 20g/L、菊粉 10g/L, pH5.5。

固体发酵培养基(250mL 三角瓶): 20g 麸皮、菊粉 3.62%、玉米浆干粉 2.4%, 10mL 营养盐液, 湿度 60%, pH5.5。

基础营养盐液^[7](g/L): KH_2PO_4 70、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.06、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.16、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05、 CaCl_2 0.07。

菊粉(用作发酵底物) 北京威德生物科技有限公司; 菊粉(用作测酶活底物) Sigma 公司; 玉米浆干粉 靖江陈氏工贸发展有限公司; Sephadex G-100 Pharmacia 公司; DEAE-Cellulose(DE-52) Whatman 公司; 果糖 国药集团化学试剂有限公司; 分子量标准蛋白 碧云天生物技术有限公司; 麸皮、米糠购自当地市场; 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

7200 型紫外可见光光度计 尤尼柯(上海)仪器有限公司; UVD-680-1 紫外检测仪 上海金达生化仪器厂; DBS-100 电脑全自动部分收集器、HL-Z 电脑恒流泵 上海沪西分析仪器厂; BR4i 离心机 法国 Jouan 公司; 蛋白膜分离装置 天津膜天膜有限公司。

1.3 菊粉酶粗酶液制备

挑取斜面活化菌种一环接入装有 50mL 新鲜种子培养基的 250mL 三角瓶中, 30℃、150r/min 培养 24h, 按 4%(V/m)接种量接入固体发酵培养基中, 混和均匀, 28℃培养 72h 后, 将固体培养物转入一定体积的蒸馏水中, 摇床常温振荡 30min, 纱布过滤, 重复提取两次, 合并滤液, 5000r/min 离心 10min, 取上清液。

1.4 菊粉酶蛋白分离纯化步骤

1.4.1 粗酶液的超滤浓缩

采用 60000 中空纤维素膜对马克斯克鲁维酵母发酵得到的酶提取液进行超滤浓缩, 把超滤浓缩液装入透析袋用聚乙二醇 20000 进一步浓缩。

1.4.2 DEAE-Cellulose 阴离子交换柱

将浓缩的粗酶液, 加到预先用 pH7.0、0.02mol/L 磷酸缓冲液平衡的 DEAE-Cellulose 离子交换柱上(2.6cm × 30cm), 上样量 2mL, 用 0.05~0.5mol/L 的 NaCl(同样缓冲液配制)进行梯度洗脱, 流量 2mL/min; 在 280nm 波长处用 UVD-680-1 紫外检测仪监测紫外吸光度, DBS-100 电脑全自动部分收集器收集洗脱液, 每管收集 5mL, 测定各管酶活。收集酶活性部分, 聚乙二醇(PEG-20000)浓缩。

1.4.3 Sephadex G-100 凝胶过滤

所得浓缩液加到预先用 pH7.0、0.02mol/L 磷酸缓冲

液平衡的 Sephadex G-100 层析柱(1cm × 80cm), 上样量 3mL, 用同样的缓冲液洗脱, 流速 0.2mL/min, 在 280nm 波长处用 UVD-680-1 紫外检测仪监测紫外吸光度, DBS-100 电脑全自动部分收集器收集洗脱液, 每管收集 5mL, 收集含蛋白各管, 测酶活, PEG-20000 浓缩酶活性部分。

1.5 菊粉酶蛋白纯度和分子量测定^[9]

采用垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳和 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳进行酶蛋白纯度的鉴定和分子量测定, 分离胶浓度 10%, 浓缩胶浓度 4.5%。考马斯亮蓝 R250 染色。

1.6 酶活测定

外切菊粉酶活力测定: 0.5mL 酶液(若必要, 适当稀释)加入到 4.5mL 2% 的蔗糖溶液(pH4.8、0.2mol/L 醋酸缓冲液配制), 55℃反应 10min, 沸水灭活。DNS 法^[10]测还原糖含量。外切菊粉酶活力定义为^[8]: 以蔗糖为底物, 每分钟水解 1μmol 蔗糖所需的酶量为一个酶活力单位(U), 以 *S* 表示。

内切菊粉酶活力测定: 0.1mL 酶液(若必要, 适当稀释)加入到 1mL 2% 的菊糖溶液(pH4.8 的 0.2mol/L 醋酸缓冲液配制), 55℃反应 30min, 沸水灭活。DNS 法^[10]测还原糖含量。内切菊粉酶活力定义为^[7]: 以菊粉为底物, 每分钟转化生成 1μmol 还原糖所需的酶量为一个酶活力单位(U), 以 *I* 表示。

1.7 菊粉酶解产物分析

高效液相色谱(HPLC)分析酶解产物^[11]。色谱仪: 日本 JASCO LC-1500。色谱柱: Shim-pack CLC-NH₂(150mm × 4.6mm), 填料粒度 5μm; 流动相: 乙腈与水的体积比为 7:3, 临用前用微孔膜过滤并用超声波脱气处理。RID 差示折光检测器, 流速 1.0mL/min, 柱温为室温, 进样量 10μL。

2 结果与分析

2.1 菊粉外切酶的分离纯化

2.1.1 超滤浓缩酶液

据文献^[12]知, *K.marxianus* 菊粉酶分子量一般在 60000D 以上。用 60000 中空纤维素膜对酶提取液进行超滤浓缩, 对过滤液进行菊粉酶活力测定发现没有酶活, 表明 *K.marxianus* 菊粉酶分子量在 60000D 以上。把超滤浓缩液装入透析袋, 然后用聚乙二醇 20000 进一步浓缩。

2.1.2 离子交换层析色谱分离酶蛋白

据文献报道, 菊粉酶的等电点一般在 4.5 左右^[13], 因此用 DEAE-Cellulose(DE-52)阴离子交换树脂分离菊粉酶酶蛋白, 得到洗脱曲线和酶蛋白峰如图 1 所示。

由图 1 洗脱曲线可以看出: 1) 用起始缓冲液洗脱时, 穿过峰没有检测出酶活, 说明洗脱出的是没有被

吸附的杂蛋白, 菊粉酶全部被吸附到离子交换树脂上。由此证明菊粉酶的等电点小于 7.0, 所选择的离子交换剂和缓冲液 pH 值适于分离菊粉酶。2) 用含 0.1mol/L NaCl 磷酸缓冲液洗脱时得到一个酶蛋白峰(峰 I), 酶活测定具有菊粉酶活性, 收集该蛋白峰。3) 用 0.2~0.5mol/L NaCl 磷酸缓冲液阶段洗脱的蛋白峰, 均没有检测到酶活。DEAE-Cellulose 阴离子交换层析初步分离得到了所需菊粉酶。

第一次 DEAE-Cellulose 阴离子交换层析相当于对其

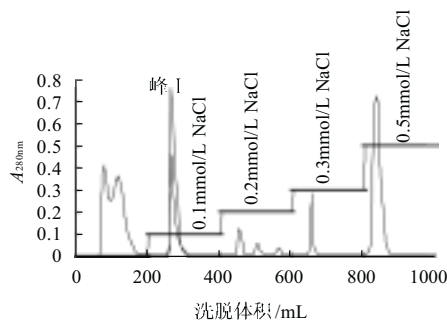


图1 马克斯克鲁维酵母菊粉酶 DEAE-Cellulose 第一次柱层析图
Fig.1 DEAE-cellulose column chromatogram of inulinases from *K. marxianus*

进行粗分, 将收集的酶蛋白峰进行透析脱盐浓缩, 再进行 DEAE-Cellulose 阴离子交换树脂分离。梯度洗脱后, 得到洗脱曲线和酶蛋白峰如图 2 所示。

由图 2 洗脱曲线可以看出: 1) 用起始缓冲液洗脱

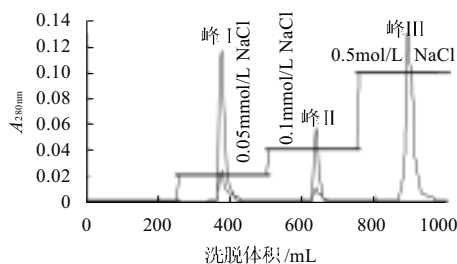


图2 马克斯克鲁维酵母菊粉酶 DEAE-Cellulose 第二次柱层析图
Fig.2 DEAE-cellulose column chromatogram of fraction I (i.e. peak No. I, as shown in Fig. 1) with inulinase activity

时, 没有蛋白峰出现, 说明菊粉外切酶全部被吸附到离子交换树脂上; 2) 用 DE-Cellulose 阴离子交换树脂第一次分离纯化菊粉外切酶时, 0.1mol/L NaCl 磷酸缓冲液把酶蛋白全部洗脱下来, 再用 DE-Cellulose 阴离子交换树脂进一步分离, 采用含 0.05mol/L 和 0.1mol/L NaCl 磷酸缓冲液进行洗脱, 从图 2 可知其分别洗脱出酶蛋白峰(峰 I 和峰 II), 经酶活测定具有菊粉酶活性, 分别收集蛋白峰; 3) 用 0.5mol/L NaCl 磷酸缓冲液洗脱出蛋白峰(峰 III), 没有检测到酶活。它的出现可能是 DE-Cellulose 阴离子交换树脂第一次分离时, 0.1mol/L NaCl 洗脱时

些没有被吸附的蛋白一起洗脱下来, 与酶蛋白混合在一起被收集起来。选择 0.5mol/L NaCl 磷酸缓冲液洗脱去除杂蛋白是因为低浓度的 NaCl 磷酸缓冲液无法完全去除杂蛋白, 造成下次使用时酶蛋白不能交换到 DEAE-Cellulose 上。

通过第二次 DEAE-Cellulose 阴离子交换树脂进一步对菊粉酶进行分离纯化。

2.1.3 Sephadex G-100 凝胶过滤

将得到的两个酶蛋白组分分别浓缩后, 进行 Sephadex G-100 凝胶层析分离, 第二次 DEAE-Cellulose 阴离子交换层析中用 0.05mol/L NaCl 和 0.1mol/L NaCl 缓冲液洗脱的两酶活力峰又各被分为两个蛋白峰。分别测定这些蛋白峰的酶活, 两个蛋白峰中均只有第一峰有酶活, 将其收集待用。为方便, 对分离得到的两种酶蛋白分别命名为菊粉酶 I 和 II; 经聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定为电泳纯。

2.2 K_m 值和 I/S 值的测定

菊粉内切酶和外切酶的区别常用 I/S 值^[14]的大小来作为一个酶学性质的指标, 其中 I 是以菊粉为底物时的酶活, S 是以蔗糖为底物的酶活。通常以 $I/S=1$ 为区分的界限, 小于 1 为外切型菊粉酶, 反之则为内切型^[12], 本实验分离到的两种菊粉酶 I/S 值分别为: 0.0249 和 0.0253(表 1), 按此标准, 均为外切型菊粉酶。

酶的 K_m 值是一个非常重要的动力学常数, 是酶的特征性常数之一。采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法求得 Exo I 和 Exo II 对蔗糖、菊糖的 K_m 值分别为 34.81、7.89mmol/L 和 30.37、6.91mmol/L(表 1); Exo I 和 Exo II 对菊糖的 K_m 值小于对蔗糖的 K_m 值, 可知 Exo I 和 Exo II 对菊糖的亲和力要大于对蔗糖的亲和力, 菊糖是 Exo I 和 Exo II 的最适底物。

2.3 *K.marxianus* 菊粉外切酶 I、II 酶解菊粉溶液产物

表 1 菊粉酶的 K_m 值和 I/S 值

Table 1 K_m and I/S ratio of Exo I and Exo II inulinase from *K. marxianus*

纯酶	K_m		菊粉酶酶活 / 蔗糖酶酶活 /		I/S
	菊糖 / (mmol/L)	蔗糖 / (mmol/L)	(U/mL)	(U/mL)	
Exo I	7.89	34.81	8.95	359.17	0.0249
Exo II	6.91	30.37	4.45	176.01	0.0253

的分析

对分离纯化的马克斯克鲁维酵母 Exo I、Exo II 进行酶解菊粉的产物 HPLC 分析, 酶解条件: 分别加 20U/g 马克斯克鲁维酵母菊粉外切酶 Exo I 和 Exo II 于 10% 的菊粉溶液中, 55℃ 保温酶解 8h, 用 HPLC 分析菊粉外切酶酶解菊粉的产物, 结果如图 3、4。

比较图 3 和 4 的结果可以看出, 马克斯克鲁维酵母 Exo I 酶解菊粉的产物主要是果糖, 还含有少量葡萄糖

和蔗糖; Exo II 酶解液果糖和葡萄糖含量很少, 而蔗糖含量增加, 还有大部分没有被酶解的菊粉, 其酶解菊粉的产物进一步说明 Exo I 和 Exo II 是一种外切型菊粉酶, Exo I 的菊粉酶活性远远高于 Exo II, Exo I 是主要的菊粉外切酶。因此, 下面主要对 Exo I 进行部分酶学性质的研究。

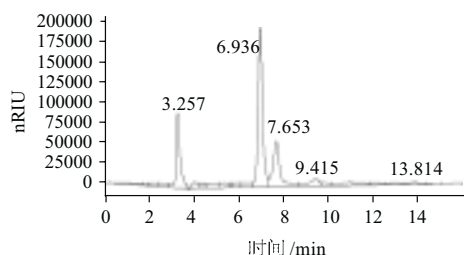


图3 菊粉外切酶 I 酶解 10% 菊粉产物 HPLC 色谱图

Fig.3 HPLC chromatogram of 10% inulin hydrolyzed by Exo I inulinase

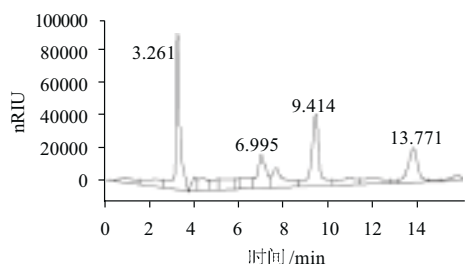
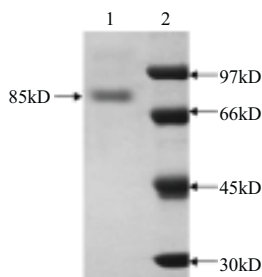


图4 菊粉外切酶 II 酶解 10% 菊粉产物 HPLC 色谱图

Fig.4 HPLC chromatogram of 10% inulin hydrolyzed by Exo II inulinase

2.4 SDS-PAGE 电泳测定菊粉酶分子量

采用 SDS-PAGE 测定菊粉外切酶 I 的分子量为 85kD (图 5)。由于菊粉酶产生菌种不同, 以及提纯方法的差别, 有关酶分子量测定的报道差别较大, Ettalibi 等^[15]报道, 从 *Aspergillus ficuum* 分离的 3 种内切菊粉酶分子量均为 64kD, 而 Uhm 等^[16]从 *Aspergillus niger* 分离到的 3 种菊粉酶分子量高达 300kD。



1. 纯化的菊粉酶; 2. Marker。

图5 SDS-PAGE 测定的菊粉酶分子量

Fig.5 Molecular weight of inulinase determined by SDS-PAGE

2.5 菊粉酶的部分酶学性质

2.5.1 温度对 Exo I 酶活力和稳定性的影响

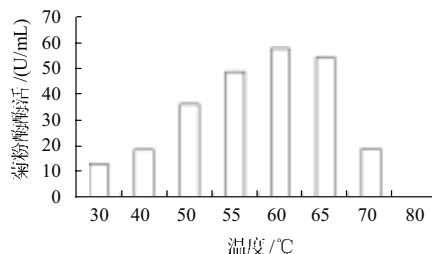


图6 温度对 Exo I 酶活的影响

Fig.6 Effect of temperature on Exo I inulinase activity

在不同温度(30~80℃)下测定酶活力。由图 6 可知, Exo I 在 55~65℃ 之间具有较高的酶活力, 最适温度为 60℃, 稍高于 Kochhar 等^[17]和 Rocha 等^[18]从黑曲霉分离的菊粉酶 55℃ 的最适酶活温度, 与 Zhang 等^[19]报道的菊粉酶相同, 但温度升高到 80℃ 酶活完全丧失。将酶液在最适酶活温度 60℃ 保温测定酶的热稳定性, 结果表明 Exo I 酶热稳定性较高, 60℃ 保温 1h 后, 酶活力损失 50%, 耐热性高于魏文玲等^[20]报道菊粉酶, 他们从克鲁维酵母 Y-85 分离的 3 种菊粉酶 60℃ 保温 10min 仅存 40% 左右活性。Exo I 较高的热稳定性有助于在生产中的应用, 在实际应用中, 在较高的温度下水解, 有利于提高底物菊粉的溶解度和酶解反应时控制杂菌污染。

2.5.2 pH 值对 Exo I 酶活力和稳定性的影响

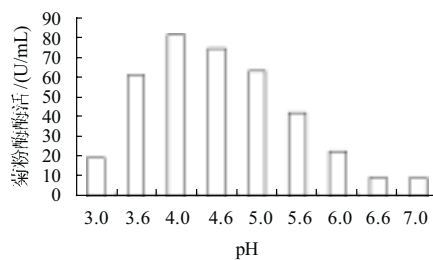


图7 pH 值对 Exo I 酶活的影响

Fig.7 Effect of pH value on Exo I activity

按酶活测定方法, 测定 Exo I 在不同 pH 值下(pH3.0~8.0 的 0.2mol/L 醋酸缓冲液)的酶活力。由图 7 可知, Exo I 的最适 pH 值为 4.0, Gill 等^[21]从 *Aspergillus fumigatus* 分离的菊粉酶最适 pH6.0, Derycke 等^[22]报道的菊粉酶最适 pH4.4, Kochhar 等^[23]报道的菊粉酶最适 pH5.5。Exo I 具有较低的最适 pH 值有利于其对菊粉的水解, 因为酶反应在较低 pH 值下进行, 可避免酶解菊粉时形成色素和副产物。选择将菊糖酶液与不同 pH 值(3.6~5.6)的缓冲液混合, 4℃ 放置, 测定酶活。结果表明 Exo I 的稳定性较好, 放置 30d 后, 酶活力保持在 80% 以上。

2.5.3 金属离子对 Exo I 酶活力的影响

在酶反应液中加入不同的金属离子, 使其终浓度为 2mmol/L, 按酶活测定方法测定酶活, 并以未加金属离子的酶活力为 100%, 计算加入不同金属离子后的残余酶活。

表 2 金属离子对 Exo I 酶活力的影响
Table 2 Effect of mental ions on Exo I inulinase activity

金属离子	MgSO ₄	EDTA	CaCl ₂	KCl	FeSO ₄	CuSO ₄
相对酶活 /%	106.01	79.31	101	100.90	53.97	26.69
金属离子	AlCl ₃	Li ₂ SO ₄	MnSO ₄	ZnSO ₄	Fe ₂ (SO ₄) ₃	BaCO ₃
相对酶活 /%	81.71	86.36	110.05	82.31	94.30	98.95

由表 2 可知, 金属离子 Mn²⁺ 和 Mg²⁺ 对 Exo I 酶活有不同程度的促进作用, 而金属离子 Cu²⁺ 和 Fe²⁺ 对 Exo I 酶活有较强的抑制作用。

3 结 论

3.1 用超滤、DEAE-Cellulose 阴离子交换色谱、SephadexG-100 凝胶色谱分离纯化马克斯克鲁维酵母发酵粗酶液的菊粉酶, 获得两种菊粉酶蛋白 Exo I 和 Exo II, 经聚丙烯酰胺电泳鉴定均为电泳纯, 菊粉酶蛋白 Exo I 对菊糖和蔗糖的 K_m 值分别为 7.89、34.81mmol/L, 菊粉酶蛋白 Exo II 对菊糖和蔗糖的 K_m 值分别为 6.91、30.37mmol/L; 两种菊粉酶的 I/S 值分别为 0.0249 和 0.0253, 均为外切型菊粉酶。对其酶解菊粉的产物分析表明, Exo I 酶解菊粉的产物主要是果糖, 还有少量蔗糖和葡萄糖。Exo II 酶解菊粉的能力很弱, 只有少量的果糖和葡萄糖生成。其酶解菊粉的产物进一步说明 Exo I 和 Exo II 是一种外切型菊粉酶, Exo I 的菊粉酶活性远远高于 Exo II, Exo I 是主要的菊粉外切酶。

3.2 SDS-PAGE 测定菊粉外切酶 I (Exo I) 的分子量为 85kD。

3.3 Exo I 最适酶活温度为 60℃, 具有较高的热稳定性, 60℃ 保温 1h, 酶活力损失 50%; 最适 pH 值为 4.0, 在 pH3.6~5.6 范围内保持稳定, 4℃ 放置 30d 酶活力保持 80% 以上; 对金属离子的研究表明, Mn²⁺ 和 Mg²⁺ 对 Exo I 酶活有不同程度的促进作用, 而金属离子 Cu²⁺ 和 Fe²⁺ 对 Exo I 酶活有较强的抑制作用。

参考文献:

- NAKAMURA T, NAGATOMO Y, HAMADA S, et al. Occurrence of two forms of extra-cellular endoinulinase from *Aspergillus niger* mutant 817[J]. J Ferment Bioeng, 1994, 78: 134-139.
- NAKAMURA T, SHITARA A, MATSUDA S, et al. Production, purification and properties of an endoinulinase of *Penicillium* sp TN88 that liberates inulotriose[J]. J Ferment Bioeng, 1997, 84: 313-318.
- CRUZ-GUERRERO A, GARCIA-PENA I, BARZANA E, et al. *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278: A wild inulinase hyper-producing strain[J]. J Ferment Bioeng, 1995, 80: 159-163.
- van DAMME E J, DERYCKE D G. Microbial inulinases: fermentation process, properties, and applications[J]. Adv Appl Microbiol, 1983, 29: 139-176.
- BOURGI J, GUIRAUD J P, GALZY P. Isolation of a *Kluyveromyces fragilis* derepressed mutant hyperproducer of inulinase for ethanol production from *Jerusalem artichoke*[J]. J Ferment Technol, 1986, 64(3): 239-243.
- ALLAIS J J, TORRES E F, BARATTI J. Continuous production of ethanol with *Zymomonas mobilis* growing on Jerusalem artichoke juice[J]. Biotechnol Bioeng, 1987, 29(6): 778-782.
- SELVAKUMAR P, PANDEY A. Solid state fermentation for the synthesis of inulinase from *Staphylococcus* sp. and *Kluyveromyces marxianus*[J]. Process Biochem, 1999, 34(8): 851-855.
- MAZUTTI M, BENDER J P, TREICHEL H, et al. Optimization of inulinase production by solid-state fermentation using sugarcane bagasse as substrate[J]. Enzym Microb Technol, 2006, 39(1): 56-59.
- 郭尧均. 蛋白质电泳试验技术[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- GB2583—2003 甲基纤维素(还原糖法)酶活力(CMCA-DNS)测定方法[S].
- 孙彦璞, 杨文远, 姜玲. 高效液相色谱法测定菊粉酶解产物[J]. 北京化工大学学报, 2003, 30(1): 109-111.
- 王建华. 微生物菊粉酶基因结构、酶学性质及应用研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2000, 13(1): 83-89.
- 王光远. 季也蒙毕亦氏酵母产菊粉外切酶的研究[D]. 济南: 山东大学, 2005.
- KAUR A, SHARMA D, HARCHAND R K. Production of a thermo-stable extracellular inulinase by *Aspergillus fumigatus*[J]. Microbiol, 1999, 39: 99-103.
- ETTALIBI M, BARATTI J C. Purification, properties and comparison of invertase, exoinulinases and endoinulinases of *Aspergillus ficum*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1987, 26(1): 13-20.
- UHM T B, JEON D Y, BYUN S M. Purification and properties of β -fructofuranosidase from *Aspergillus niger*[J]. Biochim Biophys Acta, 1987, 92(6): 119-126.
- KOCHHAR A, GUPTA A K, KAUR N. Purification and immobilization of inulinase from *Aspergillus candidus* for producing fructose[J]. J Sci Food and Agric, 1999, 79(4): 549-554.
- ROCHA J R, CATANA R, FERREIRA B S, et al. Design and characterisation of an enzyme system for inulin hydrolysis[J]. Food Chem, 2006, 95: 77-82.
- ZHANG Linghua, ZHAO Changxin, ZHU Daochen, et al. Purification and characterization of inulinase from *Aspergillus niger* AF10 expressed in *Pichia pastoris*[J]. Protein Expression and Purification, 2004, 35: 272-275.
- 魏文玲, 余娟文, 藏亚, 等. 克鲁维酵母 Y-85 菊粉酶的纯化和性质[J]. 微生物学报, 1997, 37(6): 443-448.
- GILL P K, MANHAS R K, SINGH P. Purification and properties of a heat-stable exoinulinase isoform from *Aspergillus fumigatus*[J]. Biore Technol, 2006, 97: 894-902.
- DERYCKE D G, VANDAMME E J. Production and properties of *Aspergillus niger* inulinase[J]. J Chem Tech Biotechnol, 1984, 34: 45-51.
- KOCHHAR A, KAUR N, GUPTA A K. Inulinase from *Aspergillus versicolor*: A potent enzyme for producing fructose from inulin[J]. J Sci Ind Res, 1997, 56(12): 721-726.