

节杆菌 β - 呋喃果糖苷酶的纯化及性质研究

童群义, 朱桂兰

(江南大学食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘 要: 采用硫酸铵盐析、透析脱盐、Sephadex 6B 凝胶色谱等分离纯化技术, 从节杆菌培养液分离纯化了 β - 呋喃果糖苷酶, 纯化倍数为 18.29, 回收率为 44.81%, 经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后有一条明显的蛋白质谱带。相对分子量为 55800 左右, 该酶的最适 pH 为 6.5, 最适温度为 30℃, 在 pH6.0~8.0 之间和 45℃ 以下稳定, Ag^+ 和 Cu^{2+} 对该酶有较强烈的抑制作用, EDTA 和镁离子对酶活的影响较小。

关键词: 节杆菌; β - 呋喃果糖苷酶; 纯化; 性质

Purification and Properties of β - fructofuranosidase from *Arthrobacter* 10137

TONG Qun-yi, ZHU Gui-lan

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

Abstract: The crude β - fructofuranosidase preparation from *Arthrobacter* sp. 10137 was fractioned in a sequence of operation including ammonium sulfate fraction, dialysis and column chromatography with Sephadex 6B. Purification of about 18.29 fold was achieved with an overall yield of 44.81%. The pure enzyme showed a single protein band by SDS-PAGE. Its molecular weight was estimated to be about 55800 by SDS-PAGE. The optimum temperature and pH of the enzyme were 30℃ and 6.5 respectively. The enzyme was stable under 45℃ and in the range of pH 6.0~8.0. The Ag^+ and Cu^{2+} was strongly inhibited β - fructofuranosidase activity, while EDTA and Mg^{2+} had no significant effect on it.

Key words: *Arthrobacter* 10137; β - fructofuranosidase; purification; properties

中图分类号: Q55

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2004)12-0121-04

β - 呋喃果糖苷酶(EC 3.2.1.26) 又称蔗糖酶或转化酶,

收稿日期: 2004-03-21

作者简介: 童群义(1963-), 男, 副教授, 研究方向为碳水化合物生物技术。

可以催化水解 β - D- 果糖苷键。它们广泛分布于生物界中并且已有大量学者对酶反应的动力学进行了研究, 其中能转移果糖基的微生物主要有: 黑曲霉(*Aspergillus niger*)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)和酵母(yeast)等, 不

3.6 荸荠皮色素溶液在酸性条件下稳定, 碱性条件下不稳定。

3.7 荸荠皮色素耐热性较强, 但耐光性较差, 因此应注意色素避光。

由此可知, 荸荠皮色素适宜做酸性饮料及食品的着色剂, 还可用于医药保健品和化妆品的着色剂, 是一种用途广泛、易于大量提取的天然色素。

参考文献:

- [1] 曹晓峰, 等. 高粱红色素的提取及稳定性研究[J]. 食品科学, 2000, (11): 19-21.
- [2] 周红. 勾儿茶果色素的提取及理化性质研究[J]. 精细化工,

2000, (10): 596-598.

- [3] 孙玲, 等. 黑芝麻色素的提取条件和稳定性研究[J]. 中国粮油学报, 1998, (4): 53-58.
- [4] 高永辉, 等. 桃金娘色素的提取及稳定性研究[J]. 化学世界, 1999, (6): 303-305.
- [5] 许刚. 红花黄色素稳定性研究[J]. 食品工业科技, 2000, (1): 16-18.
- [6] 丁利君, 等. 一品红红色素的提取及其稳定性研究[J]. 食品工业科技, 1999, (6): 24-26.
- [7] 孙鹤. 绿色蔬菜中叶绿素稳定性研究[J]. 食品科学, 1997, (2): 9-13.
- [8] 周立国. 食用天然色素及其提取应用[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1993.

同来源的 β -呋喃果糖苷酶其性质不同。节杆菌 β -呋喃果糖苷酶具有广泛的受体特异性,产生的是胞外酶,能以蔗糖和乳糖为原料,将蔗糖上的果糖基优先地转移到乳糖上高效合成低聚乳糖。本文主要研究节杆菌 β -呋喃果糖苷酶的纯化及其酶学特性。

1 材料与方法

1.1 β -呋喃果糖苷酶粗酶液

按优化条件培养节杆菌使其产酶,将培养液在4000r/min下离心20min,收集上清液即为粗酶液。

1.2 实验材料

Sephacrose 6B Pharmacia公司产品 次高分子量标准蛋白 中国科学院上海生物化学研究所 其它试剂均为化学纯以上。

UV-1201紫外可见分光光度计 北京瑞利分析仪器有限公司; HL-2B型恒流泵 上海青浦浦西分析仪器厂; DBS-100型全自动电脑数据收集器 上海青浦浦西分析仪器厂; DYY-III 23A型电泳槽 北京市六一仪器厂; ECP300三恒多用电源仪 北京市六一仪器厂。

1.3 实验方法

1.3.1 β -呋喃果糖苷酶的纯化、分离方法

1.3.1.1 饱和硫酸铵溶液盐析

采用分步盐析法,第一步为40%硫酸铵饱和度,去除部分杂蛋白及菌丝残体;第二步在去除杂蛋白后的酶液中继续添加硫酸铵至80%饱和度,离心过滤收集的沉淀即为盐析粗酶。

1.3.1.2 透析

将盐析所得的粗酶加入预先处理好的透析袋中,放入磷酸缓冲溶液中,在4℃下透析,定时更换缓冲液。

1.3.1.3 Sepharose-6B凝胶色谱

将经过透析的酶液上凝胶色谱Sephacrose 6B(1.6×70cm)分离纯化,用pH6.8, 0.02mol/L的磷酸缓冲溶液洗脱,流速为0.25ml/min,分步收集洗脱液,每管收集5ml,于280nm处检测蛋白质的吸光值变化。

1.3.1.4 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

采用Laemmli^[5]体系,分离胶浓度为7.5%,浓缩胶浓度4%,进样量50 μ l左右,电泳缓冲液pH7.8,开始时用60mA,然后用85mA电流进行电泳,用考马斯亮蓝R-250染色,10%的冰醋酸和10%甲醇的脱色液进行脱色。

1.4 酶活力定义:每分钟转化生成 10^{-9} mol低聚乳糖量来表示。低聚乳糖的测定方法为:将等体积的酶液和糖液(含40%的蔗糖和乳糖, pH6.5)于37℃反应24h即生成低聚乳糖,采用薄层色谱法检测低聚乳糖的含

量,色谱条件为:展开剂为正丙醇:水=9:2,显色剂为苯胺-二苯胺-磷酸溶液,扫描波长为530nm。

1.5 酶反应液中蛋白质浓度的测定:采用紫外吸收法,用牛血清蛋白作为标准物于280nm处测定吸光值。

2 结果与讨论

2.1 β -呋喃果糖苷酶的纯化

粗酶液经硫酸铵盐析、透析脱盐和sephacrose-6B柱层析,经紫外检测显示出五个蛋白质吸收峰,酶活峰与第二个蛋白质峰重合,洗脱曲线如图1所示。纯化结果见表1。

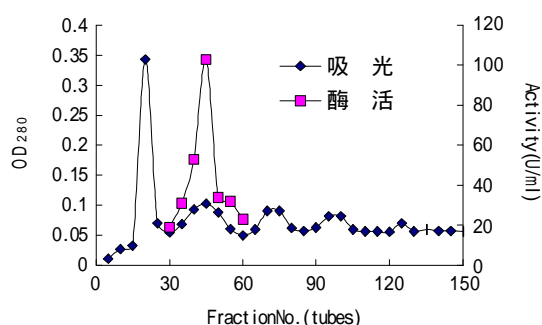


图1 β -呋喃果糖苷酶的Sephacrose 6B柱洗脱图谱
Fig.1 Chromatography of β -fructofuranosidase on Sepharose 6B

表1 节杆菌10137产 β -呋喃果糖苷酶的纯化
Table 1 Purification of β -fructofuranosidase from *Arthrobacter sp.*10137

纯化步骤	总蛋白 (mg)	总活力 (U)	比活 (U/mg)	提纯 倍数	回收率 (%)
菌体提取液	524.49	10065	19.19	1	100
硫酸铵分级	213.33	9382	43.98	2.29	93.21
Sephacrose-6B	12.85	4510	350.97	18.29	44.81

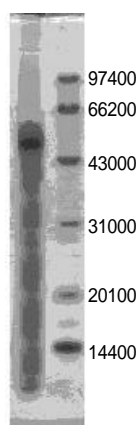
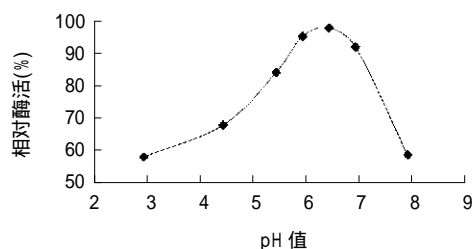
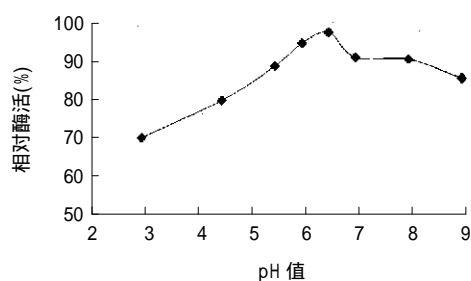
将分离纯化后的获得的酶液进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析,电泳图谱见图2,结果表明该组分为均一成分,分子量为55800。

2.2 β -呋喃果糖苷酶的性质

2.2.1 pH对酶的影响

配制不同pH的柠檬酸-磷酸缓冲溶液,取酶液使其分别在pH3~8的条件下进行酶促反应,测定酶活,结果见图3。由图3可知,该酶的最适pH为6.5。

将酶液与不同pH的缓冲液在一定条件下保温1h后,再按以上酶活测定法测其活力。以在最适反应pH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作图,图4是节杆菌 β -呋喃果糖苷酶的pH稳定性曲线。保温温度为35℃,保温时

图2 β -呋喃果糖苷酶的电泳图Fig.2 The electrophorogram of β -fructofuranosidase from *Arthrobacter* sp.10137图3 β -呋喃果糖苷酶最适 pH 曲线Fig.3 Effect of pH on β -fructofuranosidase activity图4 β -呋喃果糖苷酶 pH 稳定性曲线Fig.4 Effect of pH on β -fructofuranosidase stability

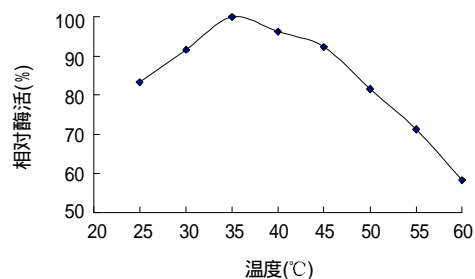
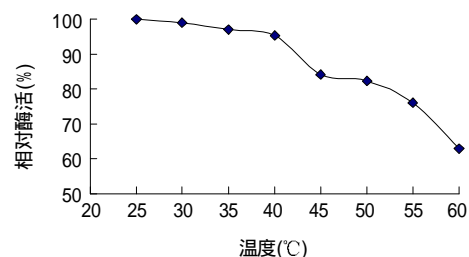
间为 1h。由图 4 可见该酶在 pH6.0~8.0 范围内是比较稳定的。

2.2.2 温度对酶的影响

以蔗糖和乳糖为底物,研究温度对 β -呋喃果糖苷酶的酶活的影响。结果见图 5,得该酶最适温度为 35℃ 左右。

另外还进行了 β -呋喃果糖苷酶的热稳定性研究,取适量酶分别于 20~60℃ 水浴保温,间隔 1h 取酶液测酶活,结果见图 6,结果表明,45℃ 保温时酶活能维持 80% 以上,60℃ 保温能维持 60% 以上。说明该酶的耐热性好。

2.2.3 金属离子和化学物质对酶活力的影响

图5 β -呋喃果糖苷酶的最适温度曲线Fig.5 Effect of temperature on β -fructofuranosidase activity图6 β -呋喃果糖苷酶的热稳定性曲线Fig.6 Effect of temperature on β -fructofuranosidase stability表2 金属离子和其它化学物质对 β -呋喃果糖苷酶的影响Table 2 Effect of metal ions and 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

金属离子和其它化学物质对 β -呋喃果糖苷酶的影响见表 2。从表 2 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 和镁离子对酶活的影响较小。

3 小结

通过硫酸铵分级沉淀、透析脱盐、Sephacrose 6B 凝胶色谱等分离纯化技术,节杆菌 10137 产的 β -呋喃果糖苷酶得到了分离纯化。提纯后比活提高了 18.29 倍,回收率为 44.81%。经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定该酶组分为单一谱带,分子量为 55800 左右。

迷你萨拉米香肠栅栏效应及其加工控制研究

王卫

(成都大学生物工程系, 四川 成都 610106)

摘 要: 对西式发酵肠进行改进, 加工出适应中式消费习惯的迷你萨拉米肠, 研究产品主要栅栏因子及其可能的交互效应。结果表明, 保证产品可贮性和风味特色的主要因子为 a_w , 辅助因子包括防腐剂或烟熏、pH 和有益菌群, 此外脱氧降低氧化还原值和热加工因子也可发挥一定作用, 这些栅栏因子在不同时间以一定顺序及不同强度交互影响。以此为依据, 提出了确保产品优质性和卫生安全性的加工关键控制点 (CCPs)。

关键词: 迷你发酵肠; 栅栏因子; 作用顺序; CCPs

Study on the Hurdle Effect of Chinese Style Mini-salami Sausage and Its Process Control

WANG Wei

(Department of Bioengineering, Chengdu University, Chengdu 610106, China)

Abstract: In this paper, the main hurdle factors and their possible interactive effects of the Chinese style mini-salami sausage, produced by modifying the western fermented sausage, were studied and the results showed that the major factor that guarantees the stability and the flavor of the product was a_w . The minor factors were Pres., pH and c.f., and the other factors that might have some effects were Eh and F, and that these hurdle factors interacted in a certain sequence with different intensity at different time. Thus the CCPs that ensure the quality and sanitary safety of the product were suggested.

Key words: Mini-salami; Hurdle factors; action sequence; critical control points

中图分类号 TS251

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2004)12-0124-04

发酵香肠风味独特, 营养丰富, 食用方便, 易于贮藏, 不仅是西式肉制品的主要类型, 深受欧美消费

收稿日期: 2003-07-16

作者简介: 王卫(1958-), 男, 教授, 硕士, 研究方向为食品加工与防腐保鲜。

者喜爱, 也逐步引起其他国家的广泛兴趣, 成为这些地区新产品开发的首选对象^[1]。发酵香肠的研究在我国已受到广泛关注, 目前已研究开发的主要为快速发酵型产品, 采用植物乳杆菌等乳酸菌型为主导的发酵剂, 甚至辅以葡萄糖醛酸内酯快速发酵酸化, 加工产品大多 pH 值较低 (pH 4.8~5.1), 质地较软^[2~7]。发酵香肠可容

对从节杆菌 10137 中得到的 β -呋喃果糖苷酶的性质进行了研究, 发现该酶作用的最适 pH 为 6.5, 最适温度为 35℃ 左右, 在 pH 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 和镁离子对酶活的影响较小。

参考文献:

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

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

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

[4] 岳振峰, 赵谋明, 彭志英. 功能性低聚糖研究进展[J]. 食品科学, 1999, 20(9): 21-25.

[5] Hirayama Masao, Sumi Naomi, Hidaka Hidemasa. Purification and Properties of a Fructooligosacchride-producing β -Fructofuranoside from *Aspergillus niger* ATCC20611[J]. Agric Biol Chem, 1989, 53(3): 667-673.