

文章编号:1673-1689(2009)05-0577-012

菊粉酶的酶学特性与分子生物学

陈晓明^{1,2,3}, 陈寒青^{1,2}, 陈天祥^{1,2},
金征宇^{*1,2}, 徐学明^{1,2}

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 3. 淮阴工学院 生命科学与化学工程学院, 江苏 淮阴 223001)

摘要: 菊粉酶是一类能水解菊粉生果糖和果聚糖的酶。目前, 已有许多关于各种霉菌、酵母和细菌生产菊粉酶的报道。但这些不同微生物来源的菊粉酶在生物物理、生物化学性质方面存在着相当大的差异。本文对菊粉酶的酶学性质、基因和基因工程的最新研究成果进行了综述。

关键词: 菊粉酶; 酶学特性; 分子生物学

中图分类号: Q 55

文献标识码: A

Enzymatic Properties and Molecular Biology of Inulinase

CHEN Xiao-Ming^{1,2,3}, CHEN Han-Qing^{1,2}, CHEN Tian-Xiang^{1,2},
JIN Zheng-Yu^{*1,2}, XU Xue-Ming^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. School of Life Science and Chemical Engineering, Huaiyin Institute of Technology, Huaiyin 223001, China)

Abstract: Inulinases is an important enzymes which involving in the production of fructose and fructooligosaccharides from inulin hydrolyzation. At present, there are many reports regarding inulinase production from various fungus, yeast and bacteria strains. These inulinases from different sources exhibited considerable variability in biophysical and biochemical characteristics. In this review, the recently advances in enzymatic properties and molecular biology of inulinase were summarized.

Key words: inulinase, enzymatic properties, molecular biology

菊粉是由 β -呋喃果糖以 β -2, 1-糖苷键相连, 并在其还原端接一个 α -吡喃葡萄糖基的果聚糖。菊粉呈直链结构, 聚合度(DP)为2~60, 相对分子质量在3 500~5 500之间。它主要存在于菊芋、菊

苣、蒲公英、牛蒡和朝鲜蓟等植物的根部或茎部, 是一种来源丰富的可再生资源^[1]。

菊粉酶(Inulinase)是能够水解 β -2, 1-D-果糖苷键的一类酶, 学名为 β -2, 1-D-果聚糖酶。它

收稿日期: 2008-10-13

基金项目: 国家 863 计划项目(2006AA10Z333); 中国博士后科学基金项目(20070420968); 江苏省博士后科研资助计划项目(0801007B)。

作者简介: 陈晓明(1969-), 女, 副教授, 粮食、油脂及植物蛋白工程博士研究生。Email: hychenxm@yahoo.com.cn

* 通讯作者: 金征宇(1960-), 男, 江苏扬州人, 工学博士, 教授, 博士生导师, 主要从事粮食、油脂与植物蛋白工程研究。Email: jinlab2008@yahoo.com

主要来源于菊科植物的组织和部分微生物。来源于植物的菊粉酶,其底物专一性较强,仅作用于菊粉;而由微生物产生的菊粉酶大部分都能水解含有 β -2,1 呋喃果糖苷键的糖,如菊糖、蔗糖和棉子糖,小部分仅能水解菊糖。菊粉酶按其水解果糖苷键的方式不同,可分为内切和外切两类。外切菊粉酶(EC 3.2.1.80)作用于菊粉链果糖末端的糖苷键,逐一水解释放出果糖,直至最后的葡萄糖,主要产物为果糖;内切菊粉酶(EC 3.2.1.7)仅作用于菊粉,随机断开菊粉链内部的糖苷键,水解产物主要是菊粉型的低聚三糖、四糖和五糖^[2]。因此可通过菊粉酶的催化作用,以菊粉为原料,生产高果糖浆、低聚果糖、乙醇、丙酮-丁醇或琥珀酸等产品^[3]。这些产品由于具有广阔的应用前景,促使国外很多学者从20世纪80年代就开始深入开展菊粉酶的研究。毫无疑问,微生物合成是生产大量的工业用酶的唯一方法,30年来许多学者致力于寻找生产菊粉酶的最好微生物,尤其是日本、韩国和欧洲在这方面积累了丰富的资料。我国关于菊粉酶的研究始于20世纪90年代,主要研究集中于菌株筛选和酶学性质方面。近十年来,本实验室也利用无花果曲霉产菊粉酶进行了研究。因此,针对微生物菊粉酶,综述了近年来国内外关于微生物菊粉酶生产、生物化学特性及分子生物学等方面的最新研究进展。

1 微生物菊粉酶的生产

通常是从富含菊粉的植物根部土壤中富集筛选合成菊粉酶的微生物,产菊粉酶的微生物包括丝状真菌、酵母和细菌。丝状真菌类有 *Aspergillus niger*、*A. aureus*、*A. awamori*、*A. ficuum*、*A. fischeri*、*A. flavus*、*A. nidulans*、*A. phoenicis*、*A. oryzae*、*Cladosporium* sp.、*Chrysosporium pannorum*、*Fusarium oxysporum*、*Penicillium* sp.、*P. purpurogenum*、*P. rugulosum*、*P. trzebinskii*、*Streptomyces* sp.、*S. rochei*、*Rhizopus delemar*、*Talaromyces* sp.;酵母类有 *Kluyveromyces fragilis*、*K. marxianus*、*K. lactis*、*Candida kefyr* 0616、*C. pseudotropicalis*、*C. macedoniensis*、*Debaryomyces cantarellii*、*D. phaffii*、*Saccharomyces fragilis*、*Pichia* sp.;细菌类有 *Athrobacter* sp.、*Pseudomonas* sp.、*Xanthomonas* sp.、*Clostridium acetobutylicum*、*Staphylococcus* sp.、*Bacillus* sp.、*Escherichia coli*、*Flavobacterium multivorum*^[4]。在这些微生物中,研究最多的是 *Aspergillus* sp.、*Penicillium* sp. 及 *Kluyveromyces* sp. 酵

母菌。

酶的产量和分布取决于微生物种类、菌株及发酵过程中使用的碳源。一般野生菌株的产酶能力低,通过紫外、⁶⁰Co 诱变,可提高突变菌株的产酶量。Viswanathan 等人通过对 *Aspergillus niger* *van Teighem* 进行紫外诱变,使菌体产酶活力提高了3倍^[4]。Nakamura 等人对 *A. niger* 进行⁶⁰Co 诱变,得到诱变菌酶活17.5 U/mL,比野生菌提高了4倍;I/S 为880,是野生菌的16倍^[5]。Bajon 等人用 EMS 对 *Pichia polymorpha* 进行诱变,以2-脱氧D-葡萄糖为筛子,采用变换含诱导物和阻遏物培养基的富集培养技术得到去阻遏突变株,产酶能力是原始菌株的35倍^[6]。关于菊粉酶产量,真菌中最好的是黑曲霉(75 U/mL);酵母中的突变菌株如 *K. marxianus* var. *marxianus* CBS 6556 的产量为3000 U/mL。细菌的菊粉酶产量虽然不能与丝状真菌和酵母菌相比,但它们的嗜热性是一个很大的优势,较高的发酵温度,允许培养基中含有较高浓度的菊粉^[7]。

葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、淀粉、菊粉等纯物质及富含菊糖的天然材料都已用于菊粉酶的生产。多数研究表明,菊糖和蔗糖是首选的碳源。如果微生物菌株只产菊粉酶,菊糖是最好的碳源;如果微生物所产的酶既有菊粉酶活性,又有转化酶活性,蔗糖是产酶的最好碳源^[3,8]。*K. marxianus* var. *bulgaricus* 产酶时,利用菊粉作为碳源的产酶量为170 u/g,而利用果糖、葡萄糖、蔗糖作为碳源则分别为95、60、35 u/g^[9]。与纯菊糖相比,天然植物中的菊粉提取物是一个更好的碳源,Sharm 等人比较了不同碳源对 *Streptomyces* sp. 产酶的影响,结果表明:利用大蒜提取物作为碳源,相比较于纯菊粉,其产酶量提高了60%^[10],这对工业化产酶降低原料成本是非常重要的。

大部分的霉菌产胞外酶,而酵母既产胞外酶又产胞内酶。Gupta 等人发现:*F. oxysporum* 胞外分泌的菊粉酶只占总菊粉酶活力的14%,其余的酶在细胞膜或细胞内^[11]。*K. marxianus* 菊粉酶分布在胞外、胞壁和胞内,3种类型酶之间的比例随着菌种、培养基中碳源和培养温度的不同而变化,供体菌 *K. marxianus* 的胞外、胞壁和胞内菊粉酶占总酶活的比例分别为39%、60%、1%,而其转基因宿主菌 *S. cerevisiae* 则为76%、22%、2%^[12];当培养基中碳源为菊粉时,胞外、胞壁和胞内菊粉酶之间占总酶比为65%、21%、14%,碳源为蔗糖时,则为48%、32%、20%;37℃培养,三者比例为61%、

21%、18%, 27℃时为 62%、10%、28%, 42℃时为 46%、33%、21%, 46℃时为 25%、42%、33%。显然, 随着培养温度的提高, 胞外酶的比例呈下降趋势, 而胞膜和胞内酶的比例则逐渐上升^[13]。

2 菊粉酶的酶学特性

菊粉酶能专一性水解 β -2,1-果聚糖, 这意味着它也可以水解蔗糖为果糖和葡萄糖。而水解蔗糖的还有较专一的蔗糖酶 (E. C. 3.2.1.26, β -D-fructo-furanoside-fructo-hydrolase)。菊粉酶与蔗糖酶同属于 β -呋喃果糖苷酶, 通常是一种酶表现出两种酶的活性, 只是酶活大小有差异。如何区分它们一直有争议。常用的方法是根据菊粉酶与转化酶的活力比来区分, 即: α = 菊粉酶活力/转化酶活力, 若 $\alpha > 10^{-2}$, 该酶是菊粉酶; 如果 $\alpha < 10^{-4}$, 则是蔗糖酶。菊粉酶具有转化酶活性是合理的, 因为在菊粉酶作用菊糖分子的最终, 有必要水解末端的葡萄糖和果糖残基。Pandey 等人报道了不同来源的菊粉酶的 α 值, 通常酵母菌来源的转化酶活性大于真菌来源的菊粉酶活性。Ettalibi 等人从 *A. ficuum* 中分离出蔗糖酶和菊粉酶, 由于这两种酶的活性对反应抑制剂、pH 值和温度的影响非常相似, 由此作者推断这两种酶拥有共同的催化中心, 但与菊糖或蔗糖结合的位点不同^[14-15]。

关于真菌、酵母、细菌生产的胞外菊粉酶纯化, 大多数研究都采用常规处理方法, 如离心和/或超滤、盐或溶剂沉淀、柱层析、电泳等。胞内菊粉酶则需要在分离步骤前进行破壁处理。表 1 和表 2 总结了内切菊粉酶和外切菊粉酶的一些特性。

菊粉酶相对分子质量大小取决于微生物种类和酶的作用方式。从表 1 和表 2 可以看出, 内切菊粉酶的相对分子质量范围是 30 000~139 000, 外切酶则为 40 000~256 000。二者之间相差一个数量级以上。许多研究认为菊粉酶是单亚基的糖蛋白。

Ettalibi 等人从 *A. ficuum* 菊粉酶中分离得到 5 个外切菊粉酶、3 个内切菊粉酶和 1 个蔗糖酶, 它们都是糖蛋白, 其含糖量为 22%~41%^[14]; 魏文玲等人从 *Kluyveromyces* sp. Y-85 发酵液中分离得到的 3 个菊粉酶, 其含糖量为 25%~35%^[16]。而 Uhm 等人从 *A. niger* 发酵液中分离的菊粉酶是由 4 个相对分子质量为 85 000 的亚基组成^[17]。Rouwenhorst 等人从 *K. marxianus* CBS 6556 的发酵液中分离的菊粉酶是二聚体, 从细胞膜上分离的菊粉酶是四聚体^[18]。

许多文献报道了温度和 pH 的变化对菊粉酶的活性和稳定性的影响。可以肯定的是, 其变化主要取决于产酶的微生物。由表 1 和表 2 可见, 霉菌菊粉酶的最适 pH 值在 4.5~7.0 之间, 酵母菊粉酶在 4.4~6.5 之间, 细菌菊粉酶在 4.8~7.0 之间。通常, 细菌和酵母菌的最适温度值比霉菌的高。Focher 等人进行了 *A. ficuum* 菊粉酶变性的研究, 他们测定了 Arrhenius 方程参数, 认为菊粉酶失活动力学是一级反应^[19]。Arand 等人研究了 *A. awamori* var. 2250 菊粉酶, 最适温度为 60℃, 但他指出, 失活从 45℃开始, 50℃保温 24 h 后, 残留酶活为 90%; 60~70℃, 酶活性仅保留 1~2 h^[20]。Vullo 等人研究了 *Bacillus subtilis* 430 A 菊粉酶, 在菊糖存在下, 45℃保温 7 h 后酶活损失达 20%, 55℃时活性迅速丢失^[21]。最适的温度及 pH 值条件不一定能用于工业生产, 因为许多其他因素, 如酶的稳定、反应物的污染、菊粉的溶解度和褐变的形成等因素均影响生产条件的最优化。较优的 pH 值是尽可能避免褐变的形成, 而酶解反应所需要的较高酶活力需要酶具备较高的最适温度和热稳定性, 因为这将有利于提高菊粉的溶解度和减少反应液的污染。在这些方面, 需要有一个稳定的高温酶是显而易见的, 但是, 极少有最适温度高于 60℃且稳定的菊粉酶的报道。

表 1 不同菌株来源的内切菊粉酶的性质

Tab. 1 Properties of endoinulinase produced by some microorganisms

菌种	相对分子质量/ (10 ³)	最适 pH (稳定区)	最适温度 (稳定区)	Km(I) (mmol/L)	比酶活/(U/mg)		抑制作用的金属离子	激活作用的金属离子	参考文献
					菊粉	蔗糖			
<i>A. niger</i> strain 12	66	5.3 (4.0-7.5)	45℃ (<40℃)	1.25	101	0.00	/	/	[22]
<i>A. niger</i> mutant 817									
P-IA	70	5.3 (5.0-7.0)	50℃ (<50℃)	0.48	352	0.00	/	/	
P-IB	68	5.3 (5.0-9.0)	50-55℃ (<50℃)	0.50	338	0.00	/	/	

续表 1

菌种	相对 分子质量/ (10 ³)	最适 pH (稳定区)	最适温度 (稳定区)	Km(I) (mmol/L)	比酶活/(U/mg)		抑制作用的 金属 离子	激活作用的 金属 离子	参考 文献
					菊粉	蔗糖			
<i>A. ficuum</i>									[23]
Endo-I	33.6	5.0 (4.0-8.0)	45 ℃ (<50 ℃)	14.75*	28.23	8.08	Ag ⁺ , Zn ²⁺ , Mn ²⁺ , Cu ²⁺	Mg ²⁺	
Endo-II	30.8	5.0 (4.0-8.0)	45 ℃ (<50 ℃)	25.62*	28.23	8.08	Ag ⁺ , Zn ²⁺ , Mn ²⁺ , Cu ²⁺	Mg ²⁺	
<i>A. ficuum</i>	64	4.8-5.2 (/)	/ (<60 ℃)	8.1	348	0.00	Ag ⁺ , Hg ²⁺ , Mn ²⁺	/	[14]
<i>Chrysosporium pannorum</i>	58	6.0-7.0 (4.5-8.5)	50 ℃ (<45 ℃)	/	106	0.00	/	/	[24]
<i>Chaetomium</i> sp. C34	66	6.0 (5.0-8.0)	50-55 ℃ (<50 ℃)	0.199	184.6	9.2	Cu ²⁺ , Mn ²⁺ , Zn ²⁺ , Fe ²⁺	/	[25]
<i>Penicillium</i> sp. Stain TN-88	68	5.2 (5.0-7.0)	50 ℃ (<40 ℃)	0.20	105	0.00	Ag ⁺ , Hg ²⁺ , Fe ²⁺	Mn ²⁺	[26]
<i>P. purpurogenum</i>	64	5.1 (5.0-7.5)	/ (<55 ℃)	0.21	82.8	0.02		/	[22]
<i>Xanthomonas oryzae</i>	139	7.5 (6.0-9.0)	50 ℃ (<45 ℃)	16.7*	1407	/	Hg ²⁺	/	[27]
<i>Arthrobacter</i> sp.	75	7.5 (/)	50 ℃ (/)	1.7	53	/	Cu ²⁺ , Hg ²⁺ , Fe ²⁺	/	[28]

注:“/”表示没有可用数据;“*”表示其单位为“g/L”

表 2 不同菌株来源的外切菊粉酶的性质

Tab. 2 Properties of exoinulinase produced by some microorganisms

菌种	相对 分子质量/ (10 ³)	最适 pH (稳定区)	最适温度 (稳定区)	Km(I) (mmol/L)	比酶活/(U/mg)		抑制作用的 金属 离子	激活作用的 金属 离子	参考 文献
					菊粉	蔗糖			
<i>K. fragilis</i> ATCC 12424	/	4.5 (/)	50—55 ℃ (<50 ℃)	13.6 #	/	/	Ag ⁺ , Hg ²⁺ , Cd ²⁺ , Cu ²⁺	/	[29]
<i>K. marxianus</i> ATCC 16045	59	/	/	/	/	879	/	/	[30]
<i>K. marxianus</i> CBS 6556									[18]
二聚体(胞外酶)	128	/	/	14.6 #	119	1875	/	/	
四聚体(与细胞膜结合)	256	/	/	14.7 #	55	856	/	/	
<i>K. marxianus</i> Y-85									[16]
EI(胞内酶)	42	4.6 (4.0-6.5)	52 ℃ (<50 ℃)	9.6	427.4	4969.7	Ag ⁺ , Hg ²⁺	Ni ³⁺	
EII(胞内酶)	65	4.5 (4.0-6.5)	52 ℃ (<50 ℃)	8.9	406.6	5212.8	Ag ⁺ , Hg ²⁺	Ni ³⁺	
Eexo(胞外酶)	57	4.5 (4.0-7.0)	55 ℃ (<50 ℃)	10.0	296.0	5486.1	Ag ⁺ , Hg ²⁺ , Fe ³⁺	Ni ³⁺ , Mg ²⁺	
<i>A. ficuum</i>									[31]
Exo-I	70	4.5 (4.0-8.0)	45 ℃ (<50 ℃)	43.12*	40.67	33	Ag ⁺ , Zn ²⁺ , Mn ²⁺ , Cu ²⁺	Mg ²⁺	
Exo-II	40	4.5 (4.0-8.0)	45 ℃ (<50 ℃)	31.48*	39.00	33.45	Ag ⁺ , Zn ²⁺ , Mn ²⁺ , Cu ²⁺	Mg ²⁺	
Exo-III	45.6	4.5 (4.0-8.0)	45 ℃ (<50 ℃)	25.29*	42.50	33.75	Ag ⁺ , Zn ²⁺ , Mn ²⁺ , Cu ²⁺	Mg ²⁺	

续表 2

菌种	相对 分子质量/ (10 ³)	最适 pH (稳定区)	最适温度 (稳定区)	Km(I) (mmol/L)	比酶活/(U/mg)		抑制作用的金属 离子	激活作用的金属 离子	参考 文献
					菊粉	蔗糖			
<i>A. ficuum</i>									[32]
Exo-I	76	4.7 (/)	60 ℃ (/)	15	/	/	/	/	
Exo-II	74	4.7 (/)	60 ℃(/)	11	/	/	/	/	
<i>A. niger</i> 12									[22]
P-I	70	4.0 (4.0-7.0)	55 ℃ (<50 ℃)	0.4	1.68	7.30	/	/	
P-II	59	5.0 (4.0-7.0)	55 ℃ (<50 ℃)	1.87	7.60	9.50	/	/	
<i>A. awamori</i> 2250	70	4.5 (3.0-5.0)	60 ℃ (<45 ℃)	0.003	75	/	/	/	[20]
<i>A. fumigatus</i>									
Isform-I	176.5	5.5 (4.0-9.5)	60 ℃ (<50 ℃)	0.25	171		Hg ²⁺ , Fe ²⁺	/	[33]
Isform-II	62	6.0 (4.0-7.0)	60 ℃ (<50 ℃)	1.25	551.72		Hg ²⁺ , Fe ²⁺ , Ag ⁺ , Zn ²⁺ , Co ²⁺	K ⁺ , Cu ²⁺	[34]
<i>Chrysosporium pannorum</i>									[35]
F2	84	5.0 (5.0-7.5)	55 ℃ (<50 ℃)	/	41.5	62.3	/	/	
F3	70	6.0 (5.0-8.5)	55 ℃ (<45 ℃)	/	10.50	36.2	/	/	
<i>Penicillium</i> sp. strain 1									[22]
P-I	86	4.5 (4.0-6.0)	45 ℃ (<40 ℃)	0.17	44.3	22.7	/	/	
P-II	64	5.0 (4.0-6.0)	50 ℃ (<40 ℃)	0.23	16.3	25.0	/	/	
P-III	66	4.0 (4.0-6.0)	45 ℃ (<40 ℃)	0.16	1.39	1.22	/	/	
<i>Penicillium</i> sp. strain TN-88	81	5.0 (4.0-7.0)	55 ℃ (<50 ℃)	9.0	743	93.8	Ag ⁺ , Hg ²⁺ , Fe ³⁺ , Cu ²⁺	Mn ²⁺ , Co ²⁺	[36]
<i>P. trzebinskii</i>	87	5.2 (4.0-9.0)	/ (<50 ℃)	0.04	103	61.7	/	/	[37]
<i>Streptomyces</i> sp.	45	5.2 (4.0-9.0)	55 ℃ (<50 ℃)	1.63	170	/	Ag ⁺ , Hg ²⁺	Co ²⁺	[38]
<i>Cryptococcus aureus</i> G7a	60	5.0 (/)	50 ℃ (/)	20.06*	15826	/	Mg ²⁺ , Hg ²⁺ , Ag ⁺	Ca ²⁺ , K ⁺ , Na ⁺ , Fe ²⁺ , Zn ²⁺	[39]
<i>Bacillus stearother-</i> <i>ophilus</i> KP1289	54	6.1 (4.5-8.6)	60 ℃ (30-75 ℃)	80	/	/	/	/	[40]

注:“/”表示没有可用数据;“*”表示其单位为“g/L”;“#”表示以蔗糖为底物。

来自不同微生物的菊粉酶的动力学特性也被文献报道。由于菊糖聚合度的差异,不可能在反应的进程中精确估计动力学参数,现有的有关菊粉酶动力学是依据米氏方程进行。Focher 等人进行了 *A. ficuum* 菊粉酶的动力学研究,他们发现 k_2 和 K_m 与温度相

关,建立了菊粉酶水解菊粉和蔗糖的米氏方程^[19]。其他作者也评价了一些不同菌株菊粉酶的动力学参数,但仅有一个温度,相关的米氏常数(K_m)值在表 1 和表 2 中。Azhari 等人指出有必要分开表达外切菊粉酶和内切菊粉酶的动力学参数,因为他们从 No-

vozym 230TM 中分离的内切菊粉酶水解糖苷键的 $K_m = 570 \text{ mmol/L}$ 、 $v_{\max} = 8.3 \text{ mmol/L/min}$ ，而同一来源的外切菊粉酶水解菊糖链末端的 $K_m = 60 \text{ mmol/L}$ 、 $v_{\max} = 3.3 \text{ mmol/L/min}$ ^[41]。

3 菊粉酶的分子生物学特性

微生物产生的菊粉降解酶系比较复杂，大多还同时产生蔗糖酶、呋喃果糖苷转移酶等，这些酶性质相近，分离纯化具有某特殊功能作用的酶比较困难。通过基因重组，将某一功能的菊粉酶的基因在

合适的宿主菌中表达，这样可产单一酶，并且使纯化比较容易，从而进一步分析酶学性质，同时通过大量表达可获得难以从自然界得到的菊粉酶，并应用于实际生产。相关研究始于 20 世纪 90 年代，Laloux 首次构建了菊粉酶基因文库，从 *Kluveryomyces marxianus* 中克隆出外切菊粉酶基因 INU1，ORF 长度为 1 668 bp，编码 555 个氨基酸，相对分子质量为 59 672，有 16 个氨基酸为信号肽，G+C% 为 47.2%，共有 13 个可能的糖基化位点^[12]。其它已被克隆和表达的菊粉酶基因见表 3。

表 3 已被克隆和表达的菊粉酶基因
Tab. 3 Cloning and expression of inulinase genes in recent years

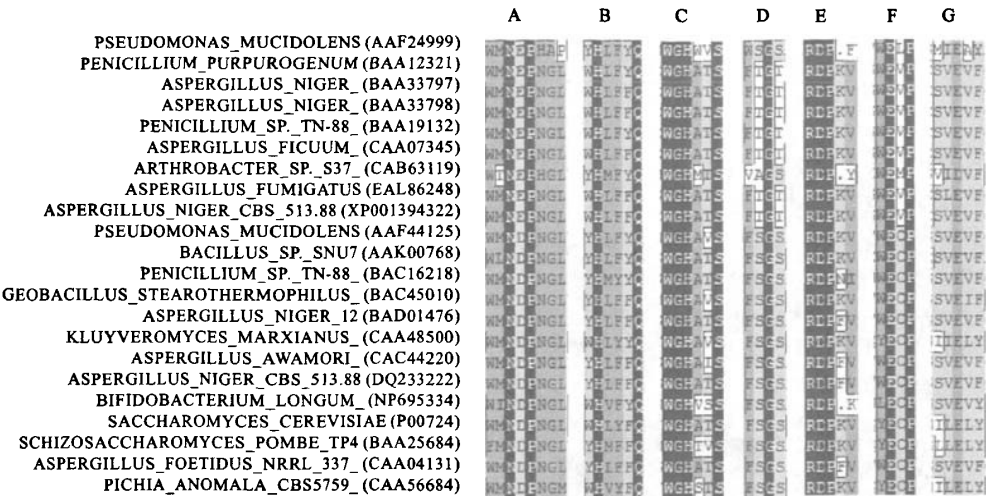
原始菌株	类型	载体	宿主菌	参考文献
<i>Aspergillus niger</i> N402	Exo-	pDEST17	<i>E. coli</i> TOP10	[42]
<i>Penicillium</i> sp. strain TN-88	Exo-	pUC18	<i>E. coli</i>	[36]
<i>Aspergillus niger</i> AF10	Exo-	pIC9K	<i>Pichia pastoris</i> GS115	[43]
<i>Kluyveromyces marxianus</i> KW02	Exo-	pIC9K	<i>Pichia pastoris</i> GS115	[44]
<i>Kluyveromyces cicerisporus</i> CBS4857	-	pBR322	<i>E. coli</i> DH5 α	[45]
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> KP1289	Exo-	pUC119	<i>E. coli</i> JM109	[46]
<i>Aspergillus niger</i> strain 12	Exo-	pPIC3.5	<i>Pichia pastoris</i> GS115	[47]
<i>Bacillus polymyxa</i>	Exo-	pET-28a	<i>E. coli</i>	[48]
<i>Aspergillus ficuum</i> ATCC 16882	Endo-	pRS414	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	[49]
<i>Penicillium</i> sp. strain TN-88	Endo-	pUC18	<i>E. coli</i> JM109	[50]
<i>Arthrobacter</i> sp. S37	Endo-	pUC18	<i>E. coli</i> MC1061	[51]
<i>Pseudomonas</i> sp	Endo-	pBR322	<i>E. coli</i> HB101	[52]
<i>Thermotoga maritime</i> MSB8	Exo-	pUN121	<i>E. coli</i> JM83	[53]
<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>marxianus</i> ATCC 12424	Exo-	YEp351	<i>E. coli</i> XL I-blue	[12]
<i>Kluyveromyces marxianus</i> Y109	Exo-	pPIC9 K	<i>Pichia pastoris</i> GS115	[54]
<i>Aspergillus niger</i> AF10	Exo-	pUC118	<i>E. coli</i> JM109	[55]
<i>Aspergillus niger</i> 9891	Exo-	pPIC9	<i>Pichia pastoris</i> GS115	[56]

菊粉内、外切酶与蔗糖酶同属于糖苷水解酶 (GH)32 家族 (<http://www.cazy.org>)。从蛋白质数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 中选出相关的真菌及细菌菊粉酶和转化酶 (表 4)，通过 ClustalW 分析其氨基酸序列，揭示了这些酶中至少存在 7 个保守基序，即：WMN (E/D) PNG [A]、WHLFFQ [B]、WGHATS [C]、F (T/S) G (T/S) [D]、RDPKV [E]、E (V/C) P [F] 和 SVEVF [G] (图 1)。A 基序中的天冬氨酸 (Asp) 或谷氨酸 (Glu) 残基与 F 基序中的谷氨酸 (Glu) 残基参与 β -呋喃果糖苷酶的活性中心^[57]。到目前为止，所有克隆的菊粉外切酶的 A 基序中都是 Asp 残基，但内切酶都是 Glu 残基。正如 *S. cerevisiae* 中的转化酶催化机制所报道的：F 基序中的 Glu 残基是催化反应

中的质子供体^[58]。F 基序在外切酶和内切酶之间出现差异。真菌内切酶 F 基序中以缬氨酸残基 (Val) 代替了真菌和细菌外切酶中的半胱氨酸残基 (Cys)，而细菌内切酶却是亮氨酸残基 (Leu) 或蛋氨酸残基 (Met)。E 基序 (RDP) 中的精氨酸、天冬氨酸残基保留在 GH32 家族的绝大多数酶中，它能形成氢键，可能与底物识别相关^[59]。真菌的内、外切酶在 D 基序中 (T/S) G (T/S) 出现差异，所有的外切酶都是 Phe-Ser-Gly-Ser (FSGS)，而真菌和细菌中的内切酶在此基序中不同，真菌中的内切酶是 Phe-Thr-Gly-Thr (FTGT)，而细菌内切酶只保留了 Gly。这些保守基序的精确功能还不清楚，需要通过定点突变等研究进一步确定其作用。大多数内、外切菊粉酶的 C-末端中部都有 G 基序 (SVEVF)，

它已被报道仅出现在能作用于菊粉和左旋果聚糖的酶中,不出现在只作用于蔗糖和棉子糖的水解酶中^[60]。因此,这个基序可能对酶结合高分子的果聚糖是十分重要的。目前为止,虽然有三分之二的真

菌的基因序列内有内含子^[61],但 *A. niger*、*A. ficuum*、和 *P. purpurogenum* 这些菌种的内切酶基因都不含有,仅 *A. awamori* 外切酶基因包含 1 个短的内含子^[59]。



(黑色:100%相同;深灰:≥75%相同;浅灰:≥50%相同;7个保守区分别用 A、B、C、D、E、F、G 表示)(所比对的蛋白质列于图 1 和表 4 中)

图 1 GH32 家族部分酶氨基酸序列比对的保守区

Fig. 1 Conserved domain alignment of family GH32 enzymes from some microorganism

表 4 用于序列比对的酶

Tab. 4 GH32 proteins used for multiple sequence alignment in Fig. 1 and Fig. 4

酶的活性	蛋白质数据 库登录号	微生物	酶的活性	蛋白质数据 库登录号	微生物
Endo-inulinase	DQ233221	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513. 88	Exo-inulinase	BAD01476	<i>Aspergillus niger</i> 12
Endo-inulinase	CAA07345	<i>Aspergillus ficuum</i> ATCC 16882	Exo-inulinase	CAC44220	<i>Aspergillus awamori</i> var. 2250
Endo-inulinase	BAA33797	<i>Aspergillus niger</i> 12	Exo-inulinase	BAC16218	<i>Penicillium</i> sp. TN-88
Endo-inulinase	BAA33798	<i>Aspergillus niger</i> 12	Exo-inulinase	DQ233222	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513. 88
Endo-inulinase	BAA12321	<i>Penicillium purpurogenum</i>	Exo-inulinase	AAF44125	<i>Pseudomonas mucidolens</i>
Endo-inulinase	BAB19132	<i>Penicillium</i> sp. TN-88	Exo-inulinase	AAK00768	<i>Bacillus</i> sp. <i>Snu7</i>
Endo-inulinase	AAF24999	<i>Pseudomonas mucidolens</i>	Exo-inulinase	NP695334	<i>Bi fidobacterium</i> <i>longum</i>
Endo-inulinase	CAB63119	<i>Arthrobacter</i> sp. S37	Exo-inulinase	BAC45010	<i>Geobacillus</i> <i>stearothermophilus</i>
Endo-inulinase	EAL86248	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Inulinase	CAA48500	<i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 12424
Endo-inulinase	XP001394322	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513. 88	Invertase	P00724	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Fructosyltransferase	CAA04131	<i>Aspergillus foetidus</i> NRRL 337	Invertase	CAA56684	<i>Pichia anomala</i> CBS5759
Invertase			BAA25684	<i>Schizosaccharomyces</i> <i>pombe</i> TP4	

根据相似的基因序列、共同的保守区域及三维分子结构特征,GH32 和 GH68 又同属于“GH-J”氏族 (<http://www.cazy.org>)。如图 2 所示^[59], GH32 的 N 端包括 5 个片状的 β 螺旋桨(β -propeller),每一个 β 螺旋桨又由几个反平行 β -片层组成,构成酶的活性中心。C 端有 1 个 β -三明治(β -sandwich)结构,包含着 G 基序(SVEVF),还不了解其功能。*A. awamori* 外切酶与甘油的结晶结构研究表明:甘油分子结合在 β 螺旋桨与 β -三明治之间的裂缝中,而 G 基序在裂缝表面,推测其可能与底物结合相关^[59]。定点突变将黑曲霉外切菊粉酶处在 G 基序中的丝氨酸残基(Ser469)变为结构和性质相似的苏氨酸残基(Thr 469),结果酶水解菊粉、蔗糖及棉子糖的活性下降;将其变为疏水的缬氨酸残基(V469),则酶完全失活^[42]。

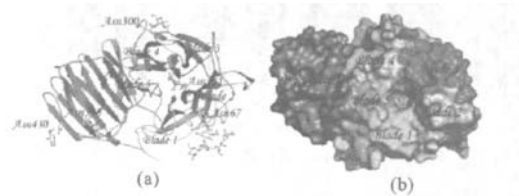


图 2 (a) *A. awamori* 外切菊粉酶的结构域;(b) *A. awamori* 外切菊粉酶分子表面

Fig. 2 (a) Representation of the secondary structure elements of exo-inulinase from *A. awamori* reported; (b) Representation of the surface of exo-inulinase from *A. awamori* reported

菊粉酶的催化机制与其他异头碳构型保持的糖苷水解酶一样,符合双替位机制。在催化过程中,有两个关键性氨基酸残基起作用,一般是酸性氨基酸 Asp 或 Glu,这两个氨基酸一个以去质子化的形式存在,在催化过程中作为亲核基团攻击底物的异头碳原子,形成共价中间体。另一个被完全质子化,在催化过程中起广义的酸碱催化,提供质子。为了维持这个氨基酸的质子化状态,通常还需要其他氨基酸残基通过氢键来稳定它。在催化过程中,首先由去质子化的氨基酸攻击异头碳原子形成共价中间体,导致糖苷键断裂。这时起酸碱催化的氨基酸先进行酸催化,提供质子稳定中间体,接着又执行碱催化,将水分子去质子化,最终完成水解过程。菊粉酶的催化过程见图 3^[59]。

菊粉酶是组成型酶,但多数研究表明,以菊粉作为碳源比其它碳源产生更多的菊粉酶,表现出一定的底物诱导性。Ohta 等人从 *A. niger* 中克隆出 2 个内切酶基因 *inuA* 和 *inuB*,这两个基因仅有 23 个核苷酸不同^[62],后通过 RNA 杂交技术仅发现 *inuB* 的 mRNA,这表明 *inuA* 可能是假基因或者仅在某种特殊条件下表达。此外,*inuB* 的转录因培养基中菊粉、果糖和葡萄糖的不同而发生在不同的起点上,这说明菊粉酶的合成过程被 C 源所调节,有复杂的调节机制。Yuan 等人的研究也证明了 C 源的调节作用,他们认为蔗糖诱导黑曲霉菊粉酶的合成,而非果糖^[63];在黑曲霉菊粉酶基因的表达调节过程中有个 Zn(II)2Cys6 转录因子起作用^[64]。

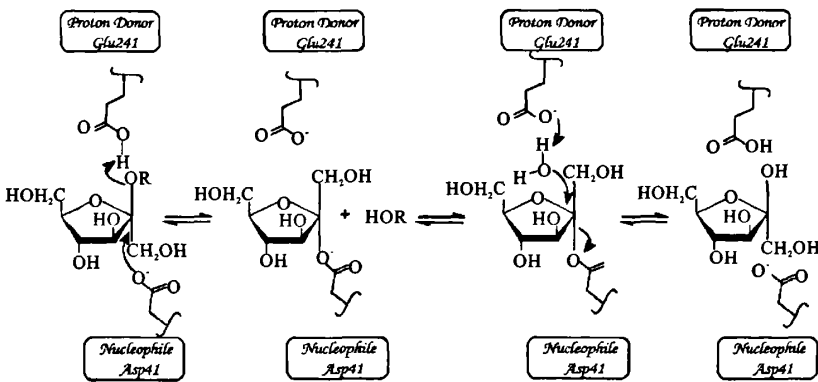


图 3 菊粉酶的催化机制

Fig. 3 Reaction mechanism of the inulinase reported

序列同源性比较是探讨菊粉酶功能和进化关系的有效方法。根据目前已经克隆的菊粉酶基因所推断的氨基酸序列建立进化关系,系统进化树如图 4。整个进化树明显地分为 5 类:(1)细菌外切菊粉酶;(2)细菌内切菊粉酶;(3)酵母蔗糖酶与菊粉

酶;(4)霉菌内切菊粉酶;(5)霉菌外切菊粉酶与果糖基转移酶。真菌以及细菌的内切酶与它们相应的外切酶序列不同,分别进化。从 *A. niger*、*A. ficum*、*P. purpurogenum* 和 *A. fumigatus* 克隆的内切菊粉酶的同源性为 62%~99%,与细菌内

切菊粉酶(*Arthrobacter* sp. 和 *P. mucidolens*)的同源性仅有 18% ~ 20%。系统进化分析说明 *A. fumigatus* 和 *A. niger*/*A. ficuum* 内切酶基因间进化有分歧,而后者与 *Penicillium* 内切酶有共同的起源。*Penicillium* sp. 和 *A. awamori* 的外切

酶有共同的起源,约有 58% 的氨基酸相同。但是,从 *K. marxianus* 细胞壁提取的菊粉酶的氨基酸有 67% 相似于 *S. cerevisiae* 中的转化酶 SUC2^[12],仅有 27% 和 29% 分别与 *Penicillium* sp. TN-88 和 *A. awamori* 外切酶基因相同。

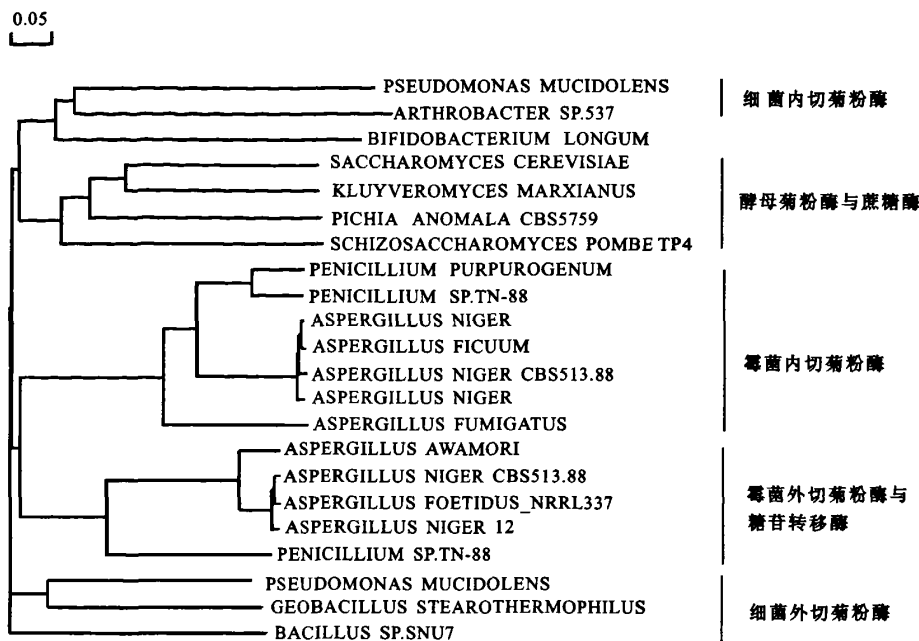


图 4 GH32 家族部分酶的系统进化树(所比对的蛋白质列于表 4 中)

Fig. 4 Unrooted tree showing phylogenetic relationship among deduced amino acid sequences of family GH32 enzymes from some microorganism. Proteins used are also shown in Table 4.

4 结 语

目前报道的菊粉酶生物物理和生物化学性质随着菌种、酶水解底物等不同存在较大的可变性,这可能是因为酶合成后的加工修饰和基因水平的差异。具有热稳定性的高效菊粉酶是水解菊粉生

产果糖和低聚果糖的关键。虽然由真菌类,即 *A. fumigatus*, *A. niger*, *S. acidophilum*, *A. ficuum* 和细菌 *T. maritime* 生产的菊粉酶具有较高的耐热性,但要将它们应用于工业生产,还需进行大量细致的研究工作。

参考文献(References):

- [1] Roberfroid M B. Inulin-type fructans: functional food ingredients[J]. *J Nutr*, 2007,137(11): 2493S-2502.
- [2] 王建华. 微生物菊粉酶基因结构、酶学性质与应用研究进展[J]. *天然产物研究与开发*, 2001,13(1):83-88.
WANG Jian-hua. Review on gene structure, enzymology, fermentation and application studies on microorganism inulinase [J]. *Natural product research and development*, 2001,13(1):83-88. (in Chinese)
- [3] Pandey A, Soccol C R, Selvakumar P, et al. Recent developments in microbial inulinases- its production, properties, and industrial applications[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1999, 81(1): 35-52.
- [4] Viswanathan P, Kulkarni P R. Enhancement of inulinase production by aspergillus-niger van teighem[J]. *Journal of Applied Bacteriology*, 1995, 78(4): 384-386.
- [5] Nakamura T, Nagatomo Y, Hamada S, et al. Occurrence of two forms of extracellular endoinulinase from *Aspergillus niger* mutant 817[J]. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1994, 78(2): 134-139.

- [6] 王静, 金征宇. 微生物菊粉酶的研究进展[J]. 生物技术, 2002, 12(2): 42-45.
WANG Jing, JIN Zheng-yu. Advances in studies on microbial inulinases[J]. **Biotechnology**, 2002, 12(2): 42-45.
- [7] Ricca, E, Calabro V, Curcio S, et al. The state of the art in the production of fructose from inulin enzymatic hydrolysis [J]. **Critical Reviews in Biotechnology**, 2007, 27: 129-145.
- [8] Vandamme E J, Derycke D G. Microbial inulinases: fermentation process, properties, and applications[J]. **Advances in applied microbiology**, 1983, 29: 139-176.
- [9] Kushi R T, Monti R, Contiero J. Production, purification and characterization of an extracellular inulinase from *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*[J]. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 2000, 25(2): 63-69.
- [10] Sharma A D, Kainth S, Gill P K. Inulinase production using garlic (*Allium sativum*) powder as a potential substrate in *Streptomyces* sp. [J]. **Journal of Food Engineering**, 2006, 77(3): 486-491.
- [11] Gupta A K, Singh D P, Kaur N, et al. Production, purification and immobilization of inulinase from *Kluyveromyces Fragilis*[J]. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 1994, 59(4): 377-385.
- [12] Laloux O, Cassart J, Delcour J, et al. Cloning and sequencing of the inulinase gene of *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 12424[J]. **FEBS Letters**, 1991, 289(1): 64-68.
- [13] Rouwenhorst R J, Visser L E, Vanderbaan A A, et al. Production, distribution, and kinetic-properties of inulinase in continuous cultures of *Kluyveromyces marxianus* CBS-6556[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 1988, 54(5): 1131-1137.
- [14] Ettalibi M, Baratti J C. Purification, properties and comparison of invertase, exoinulinases and endoinulinases of *Aspergillus ficuum*[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 1987, 26(1): 13-20.
- [15] Ettalibi M, Baratti J C. Molecular and kinetic properties of *Aspergillus ficuum* inulinases[J]. **Agric Biol Chem**, 1990, 54(1): 61-68.
- [16] 魏文铃, 余娴文, 戴亚, 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.
WEI Wen-ling, YU Xian-wen, DAI Ya, et al. Purification and properties of inulinase from *Kluyveromyces* sp Y-85[J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 1997, 37(6): 443-448.
- [17] Uhm T B, Jeon D Y, Myung B S, et al. Purification and properties of [beta]-fructofuranosidase from *Aspergillus niger* [J]. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, 1987, 926(2): 119-126.
- [18] Rouwenhorst R J, Hensing M, Verbakel J, et al. Structure and properties of the extracellular inulinase of *Kluyveromyces marxianus* CBS-6556[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 1990, 56(11): 3337-3345.
- [19] Carniti P, Beltrame P L, Guardione D. Hydrolysis of inulin - a kinetic-study of the reaction catalyzed by an inulinase from *Aspergillus ficuum*[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 1991, 37(6): 575-579.
- [20] Arand M, Golubev A M, Neto J R B, et al. Purification, characterization, gene cloning and preliminary X-ray data of the exo-inulinase from *Aspergillus awamori*[J]. **Biochemical Journal**, 2002, 362: 131-135.
- [21] Vullo D L, Coto C E, Sineriz F. Characteristics of an inulinase produced by *Bacillus subtilis* 430a, a strain isolated from the rhizosphere of *Vernonia herbacea* (Vell rusby) [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 1991, 57(8): 2392-2394.
- [22] Ohta K, Akimoto H, Moriyama S. Fungal Inulinase:enzymology, molecular biology and biotechnology[J]. **J Appl Glycosci**, 2004, 51: 247-254.
- [23] Wang J, Jin Z Y, Jiang B, et al. Production and separation of exo- and endoinulinase from *Aspergillus ficuum*[J]. **Process Biochemistry**, 2003, 39(1): 5-11.
- [24] Xiao R, Tanida M, Takao S. Purification and some properties of endoinulinase from *Chrysosporium pannorum*[J]. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 1989, 67(4): 244-248.
- [25] 张国青, 崔福绵, 杨秀清. 毛壳霉内切菊粉酶的纯化与性质[J]. 微生物学报. 2004, 44(6): 785-788.
ZHANG Guo-qing, CUI Fu-mian, YANG Xiu-qing. Purification and properties of endoinulinase from *Chaetomium* sp. [J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 2004, 44(6): 785-788. (in Chinese)
- [26] Nakamura T, Shitara A, Matsuda S, et al. Production, purification and properties of an endoinulinase of *Penicillium* sp. TN-88 that liberates inulotriose[J]. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 1997, 84(4): 313-318.
- [27] Cho Y J, Yun J W. Purification and characterization of an endoinulinase from *Xanthomonas oryzae* No. 5. [J]. **Process Biochemistry**, 2002, 37(11): 1325-1331.
- [28] Kang S I, Chang Y J, S J, et al. Purification and properties of an endo-inulinase from an *Arthrobacter* sp. [J]. **Bio-**

- technology Letters, 1998, 20(10): 983-986.
- [29] Workman W E, Day D F. Purification and properties of the [β]-fructofuranosidase from *Kluyveromyces fragilis*[J]. **FEBS Letters**, 1983, 160(1-2): 16-20.
- [30] Silva-Santisteban B O Y, Converti A, Mauger F. Intrinsic activity of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 and carbon and nitrogen balances[J]. **Food Technology and Biotechnology**, 2006, 44(4): 479-483.
- [31] 王静, 金征宇, 江波, 等. *Aspergillus ficuum* 菊粉酶的分离纯化及其酶解菊粉制备低聚果糖[J]. 食品与生物技术学报. 2006, 25(1): 5-9.
- WANG Jing, JIN Zheng-yu, Jiang Bo, et al. Purification of inulinases from *Aspergillus ficuum* and preparation of inulin oligosaccharides[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2006, 25(1): 5-9. (in Chinese)
- [32] Ettalibi M, Baratti JC. Molecular and kinetic properties of *Aspergillus ficuum* inulinases[J]. **Agric Biol Chem**, 1990, 54(1): 62-67.
- [33] Gill P K, Manhas R K, Singh J, et al. Purification and characterization of an exoinulinase from *Aspergillus fumigatus* [J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2004, 117(1): 19-32.
- [34] Gill P K, Manhas R K, Singh P. Purification and properties of a heat-stable exoinulinase isoform from *Aspergillus fumigatus*[J]. **Bioresource Technology**, 2006, 97(7): 894-902.
- [35] XIAO R, Tanida M, Takao S. Purification and characteristics of two exoinulinases from *Chrysosporium pannorum*[J]. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 1989, 67(5): 331-334.
- [36] Moriyama S, Akimoto H, Suetsugu N, et al. Purification and properties of an extracellular exoinulinase from *Penicillium* sp. strain TN-88 and sequence analysis of the encoding gene[J]. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, 2002, 66(9): 1887-1896.
- [37] Onodera S, Shiomi N. Purification and subsite affinities of exoinulinase from *Penicillium trzebinskii*[J]. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, 1992, 56(9): 1443-1447.
- [38] Sharma A D, Gill P K. Purification and characterization of heat-stable exo-inulinase from *Streptomyces* sp. [J]. **Journal of Food Engineering**, 2007, 79(4): 1172-1178.
- [39] Sheng J, Chi Z M, Gong F, et al. Purification and characterization of extracellular inulinase from a marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and inulin hydrolysis by the purified inulinase[J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2008, 144: 111-121.
- [40] Kato K, Araki T, Kitamura T, et al. Purification and properties of a thermostable inulinase (β -D-fructan fructohydrolase) from *Bacillus stearothermophilus* KP1289[J]. **Starch-Starke**, 1999, 51(7): 253-258.
- [41] Azhari R, Szlak A M, Ilan E, et al. Purification and characterization of endo-inulinase and exo-inulinase[J]. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 1989, 11(1): 105-117.
- [42] Goosen C, Van der Maarel M J, Dijkhuizen L. Exo-inulinase of *Aspergillus niger* N402: A hydrolytic enzyme with significant transfructosylating activity[J]. **Biocatalysis and Biotransformation**, 2008, 26(1-2): 49-58.
- [43] ZHANG L, WANG Y, Ohta Y, et al. Expression of the inulinase gene from *Aspergillus niger* in *pichia pastoris*[J]. **Process Biochemistry**, 2003, 38(8): 1209-1212.
- [44] Zhang L H, Zhao C, Zhu D, et al. Inhibition of glucose on an exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* expressed in *Pichia pastoris*[J]. **Process Biochemistry**, 2005, 40(5): 1541-1545.
- [45] WEN T Q, LIU F, HUO K, et al. Cloning and analysis of the inulinase gene from *Kluyveromyces cicerisporus* CBS4857 [J]. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 2003, 19(4): 423-426.
- [46] Tsujimoto Y, Watanabe A, Nakano K, et al. Gene cloning, expression, and crystallization of a thermostable exo-inulinase from *Geobacillus stearothermophilus* KP1289[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2003, 62(2): 180-185.
- [47] Moriyama S, Tanaka H, Uwataki M, et al. Molecular cloning and characterization of an exoinulinase gene from *Aspergillus niger* strain 12 and its expression in *Pichia pastoris*[J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2003, 96(4): 324-331.
- [48] Kwon H J, Jeon S J, You D J, et al. Cloning and characterization of an exoinulinase from *Bacillus polymyxa*[J]. **Biotechnology Letters**, 2003, 25(2): 155-159.
- [49] Kim H S, Lee D W, Ryu E J, et al. Expression of the INU2 gene for an endoinulinase of *Aspergillus ficuum* in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Biotechnology Letters**, 1999, 21(7): 621-623.
- [50] Akimoto H, Kiyota N, Kushima T, et al. Molecular cloning and sequence analysis of an endoinulinase gene from *Penicillium* sp strain TN-88[J]. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, 2000, 64(11): 2328-2335.

- [51] KANG S I, Kim S I. Molecular cloning and sequence analysis of an endo-inulinase gene from *Arthrobacter* sp. [J]. **Bio-technology Letters**, 1999, 21(7): 569–574.
- [52] YUN J W, Choi Y J, Song C H, et al. Microbial production of inulo-oligosaccharides by an endoinulinase from *Pseudomonas* sp. expressed in *Escherichia coli*[J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 1999, 87(3): 291–295.
- [53] Liebl W, Brem D, Gotschlich A. Analysis of the gene for β -fructosidase (invertase, inulinase) of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*, and characterisation of the enzyme expressed in *Escherichia coli*[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 1998, 50(1): 55–64.
- [54] 王婧, 张苓花, 王运吉. 克鲁维酵母菊粉酶基因在毕赤酵母中的表达[J]. 大连轻工业学院学报, 2003, 22(2): 135–138.
- WANG Qing, ZHANG Ling-hua, WANG Yun-ji. Expression of the inulinase gene from *Kluyveromyces marxianus* in *Pichia pastoris*[J]. **Journal of Dalian Institute of Light Industry**, 2003, 22(2): 135–138.
- [55] 张苓花, 王运吉, 叶淑红, 等. 菊粉酶酶源菌株筛选及其基因克隆[J]. 微生物学报, 2002, 42(3): 321–325.
- ZHANG Ling-hua, WANG Yun-ji, YE Shu-hong, et al. Screening strains producing inulinase and cloning of inulinase gene[J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 2002, 42(3): 321–325.
- [56] WANG J H, TENG D, YAO Y et al. Expression of *Aspergillus niger* 9891 Endoinulinase in *Pichia pastoris*[J]. **High Technology Letters**, 2004, 10(4): 2–56.
- [57] Singh P, Gill P K. Production of inulinases: Recent advances[J]. **Food Technology and Biotechnology**, 2006, 44(2): 151–162.
- [58] Reddy A, Maley F. Studies on identifying the catalytic role of Glu-204 in the active site of yeast invertase[J]. **J Biol Chem**, 1996, 271: 13953–13958.
- [59] Nagem R A P, Rojas A L, Golubev A M, et al. Crystal structure of exo-inulinase from *Aspergillus awamori*: The enzyme fold and structural determinants of substrate recognition[J]. **Journal of Molecular Biology**, 2004, 344(2): 471–480.
- [60] Burne R A, Penders J E C. Characterization of the *Streptococcus mutans* GS-5 *fruA* gene encoding exo- β -D-fructosidase [J]. **Infect Immun**, 1992, 60: 4621–4632.
- [61] Gurr S J, Unkles S E, Kinghorn J R. The structure and organization of nuclear genes of filamentous fungi, in: gene structure in eukaryotic microbes[M]. UK: IRL Press, Oxford, 1987: 93–139.
- [62] Ohta K, Akimoto H, Matsuda S, et al. Molecular cloning and sequence analysis of two endoinulinase genes from *Aspergillus niger*[J]. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, 1998, 62(9): 1731–1738.
- [63] Yuan X L, Goosen C, Kools H, et al. Database mining and transcriptional analysis of genes encoding inulin-modifying enzymes of *Aspergillus niger*[J]. **Microbiology**, 2006, 152(10): 3061–3073.
- [64] Yuan X L, Roubos J A, van den Hondel C A, et al. Identification of InuR, a new Zn(II)2Cys6 transcriptional activator involved in the regulation of inulinolytic genes in *Aspergillus niger*[J]. **Molecular Genetics and Genomics**, 2008, 279: 11–26.

(责任编辑: 杨萌)