第14卷 无锡轻工大学学报 Vol.14
第4期 JOURNAL OF WUXI UNIVERSITY OF LIGHT INDUSTRY 1995 No.4

低聚果糖合成酶
——果糖转移酶的部分酶学性质研究

江 波 王 璋

(食品科学与工程系)

摘要 研究从土壤中筛选得到的黑曲霉AS0023菌株所产的β-果糖转移酶的一些酶学性质。该酶的最适pH为5.0，最适温度为50℃，有较好的热稳定性和较宽的pH(3.5～10)适宜范围；并研究了12种化学物质对酶活的影响和底物的特异性。结果显示，钴离子对该酶有一定的激活作用；底物分子越大其反应速度越慢。该酶的米氏常数K_m = 47mmol，葡萄糖是酶反应的竞争性抑制剂，其K_i = 330mmol. 当50%(w/v)蔗糖与酶在pH5.0和50℃作用16h时，得到52%(产物/总糖)低聚果糖。

主题词 低聚糖；糖基转移酶；微生物/低聚果糖；β-果糖基转移酶；黑曲霉

中图分类号 TS201.23

0 前 言

低聚果糖，又称寡果糖或蔗果低聚糖，结构式为G－F－F_n，n = 1～3(G为葡萄糖，F为果糖)，它是由蔗糖和1～3个果糖基通过β－2,1键与蔗糖中的果糖基结合而成的蔗果三糖、蔗果四糖和蔗果五糖及其混合物。它是利用微生物或植物中具有果糖基转移活性的酶作用于蔗糖而得到的，反应过程可用以下反应式表示：

$$\text{G－F(蔗)} \xrightarrow{\text{酶}} \text{G(葡)} + \text{G－F(蔗)} + \text{G－F－F(蔗果三糖)}$$
$$+ \text{G－F－F－F(蔗果四糖)} + \text{G－F－F－F－F(蔗果五糖)}$$

1950年Bacon and Edelman[1]及Blanchard and Albon[2]在研究酵母转化酶(invertase)时，分别独立地发现了该转化酶除了具有水解作用外，还具有转移作用。蔗糖水解时产生了不等量的葡萄糖和果糖，除此外，还生成了一些低聚糖，这些低聚糖的结构后来得到了进一步确定，并被命名为蔗果三糖(kestose)族低聚糖。

由于发现低聚果糖具有优越的生理学特性[3]，可作为一种新颖的食品功能因子和健康食品的原料。1982年日本日高秀昌等[4～5]对采用含有果糖转移酶的微生物生产低聚果糖做

收稿日期：1995-03-13

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

了较为详细的研究,而后韩国学者 Jung 等[6~7]与 Jong 等[8]也对酶法制备低聚果糖作了研究。

能催化蔗糖产生低聚果糖的酶为β-D-果糖转移酶,又称β-D- 呋喃果糖苷酶[9](E.C. 3.2.1.26). 它们广泛分布于生物界。经研究发现[10],能转移果糖基的微生物有:米曲霉 Aspergillus oryzae(最多)、青霉属 Penicillium、黑曲霉 Aspergillus niger、屈芽短梗菌 Aureobasidium pullulans 和酵母等多种微生物。1966 年 Scott 等[11]利用菊芋(Jarusalem artichoke)中的一种酶系,称为蔗糖:蔗糖-1-果糖基转移酶(Sucrose:sucrose 1-fructosyltranferase)(SST),酶法合成异蔗果三糖。

我们对从土壤中筛选得到的黑曲霉 AS0023 菌产生的β-D-果糖转移酶进行了部分酶学性质的研究,并对其生产低聚果糖的工艺作了探索。

1　材料与方法

1.1　试剂

蔗果三糖及四糖　由日本明治公司惠赠,其它试剂均为化学纯以上级药品。

1.2　酶的培养条件及提取

菌种　从土壤中筛选得到黑曲霉 AS0023 菌。

培养基　蔗糖 17.5%(*w/v*),蛋白胨 0.33%,硝酸铵 0.30%,酵母膏 0.5%,七水硫酸镁 0.10%,磷酸二氢钾 0.10%.

用往复式摇瓶机进行发酵试验,振荡频率为 120 次/min,振幅 10cm,培养温度 30 C.

酶提取　湿菌体(10g)经－20 C 冷冻及 20 C 融化交替三次,在研钵中加入 30ml 0.1mol 磷酸-柠檬酸缓冲液(pH 5.5)用石英砂研磨,冰箱中保存 4h,抽滤得到 50ml 粗酶提取液。

1.3　果糖转移酶活力测定

底物(蔗糖)浓度为 10% (*w/v*),含 0.05mol pH 5.0 磷酸-柠檬酸缓冲液,配成总体积 50ml,置于直径 4.5cm 恒温夹套反应器中,40 C 100r/min 搅拌反应 1h. 酶活定义为每分钟生产 1μmol 蔗果三糖(1-kestose) 为一个活力单位。酶用量为 2U/g 蔗糖。测定酶活时蔗果三糖产物的浓度最好不超过总糖的 10%.

1.4　糖组分测定方法

HPLC　Waters 209 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 4.6×100mm 填料粒度 5μ

流动相　乙腈/水 75/25 (*v/v*) 流速 1ml/min

温度　28 C

进样量　10μl

标准样品三糖(1-kestose)和四糖(nystose)由日本明治制果公司惠赠

1.5　K_m 及 K_i 测定方法

配制含有 2%,4%,6%,8%浓度的蔗糖溶液 50ml,在 0.05MpH5.0 磷酸-柠檬酸缓冲液条件下,40 C 反应 30min,其中总酶量均为 16U. 分别测定其初速度;抑制剂葡萄糖的加入量为 2.0%.

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2 结果与讨论

2.1 pH 对酶活的影响

配制一系列不同 pH 的柠檬酸-磷酸缓冲液，取酶液使其在 pH3～7.5 的条件下进行酶促反应，于 40 C反应 1h 测定酶活，结果见图 1. 由图可知，该酶的最适 pH 为 5.0. 在 pH4.0～6.5 范围内均能表现较强的酶活，说明该酶具有较宽的 pH 适应范围。

将酶液与不同 pH 的缓冲液(pH3～8 磷酸-柠檬酸缓冲液，8.6～10.6 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液)[12]保温 1h 后，再按以上酶活测定法测其活力。以未保温处理的酶的活力为 100%，在最适条件下测定残余酶活，然后折合成剩余活力的百分数，以此对 pH 作图。图 2 是黑曲霉果糖转移酶的 pH 稳定性曲线。保温温度为 30 C，保温时间是 1h. 由图可见该酶在 pH4.6～10 范围内是比较稳定的。本研究的结果同 Hirayama 等人[13]报道的黑曲霉中该酶的最适 pH 和 pH 稳定性均相同。

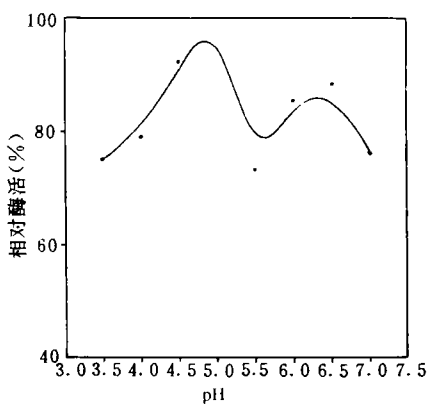


图 1 pH 对酶活的影响

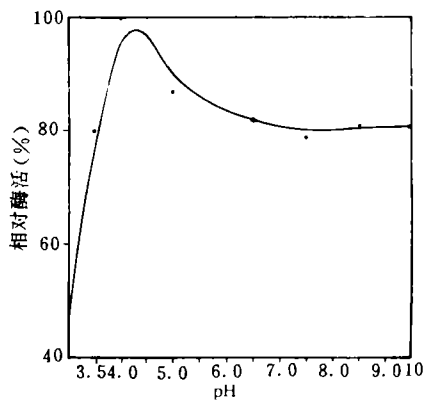


图 2 酶的 pH 稳定性

从图 1 可看到一个非常特殊的现象就是在酶活-pH 曲线上出现两个峰：一个最高峰在 pH5.0，另一个在 pH6.5 处，酶活约为最高峰的 85%. 起始我们认为可能是由于实验误差造成的，后经重复试验仍然得到同样的结果，这可能是由于该酶具有同功酶。曾用不同的缓冲液对果糖转移酶活性进行测定，采用醋酸缓冲液时酶活性有所下降，约为磷酸-柠檬酸缓冲液的 85%.

2.2 温度对酶活的影响

取酶液分别在 30，35，40，45，50，55，60，65，70 C水浴测酶活，得该酶最适温度为 45～50 C，分别在反应 1h 和 2h 测定了 2 组数据，结果由图 3 可见，该酶的适宜温度范围较大，从 40～55 C都能表现较高的酶活。图 3 呈不对称型，也即低于最适温度，曲线下降平缓；高于最适温度，曲线下降相对较陡。从图 3 可看出，反应时间对最适温度未有很大影响，均为 45～50 C，但在 55 C以上时，酶反应时间为 2h 时曲线下降较反应 1h 时为陡。另外还进行了 *β-D*-呋喃果糖苷酶的热稳定性研究。取适量酶加磷酸-柠檬酸缓冲液(pH5.0)分装于 6 个试管中，分别于 35，40，45，50，55 和 60 C水浴保温，间隔 1h 取酶液测酶活，结果如图 4 所示。该酶的耐热性较强，55 C保温 1h 酶残留 71%. 同 Hirayama 等[13]报道的相同，比盐见德夫[10]

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

报道的25%要高。

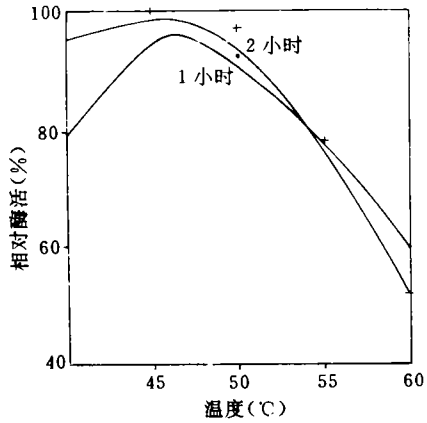


图3　温度对酶活的影响

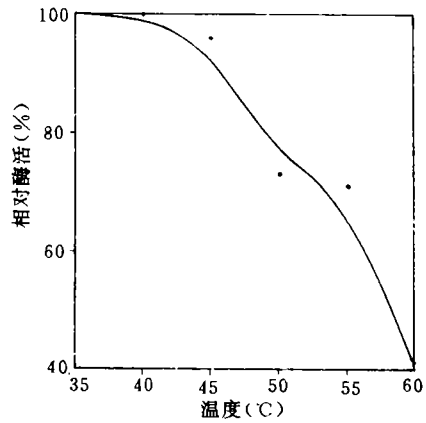


图4　果糖转移酶的热稳定性

2.3　化学物质对酶活的影响

表1　化学物质对酶活的影响

化学物质	$CaCl_2$	$FeSO_4$	$ZnSO_4$	$CuSO_4$	$CoCl_2$	$AlCl_3$	$BaCl_2$
相对酶活	90	92	100	102	112	88	103
化学物质	$MgSO_4$	Li_2SO_4	$MnSO_4$	$AgNO_3$	$HgCl_2$	EDTA	对照组
相对酶活	98	96	100	72	24	88	100

条件:蔗糖　10%. 0.1mol pH5.0 柠檬酸-磷酸缓冲液.酶量 10U/g 蔗糖。

化学物质浓度　氯化汞 0.1mmol,其余 1.0mmol.　温度 40℃,反应 1h.

从表1可以看出,汞离子对于该酶有较强烈的抑制作用,银离子也表现出一定的抑制作用,钴离子对该酶有一定的激活作用;EDTA 的加入对酶活影响不大。总体来说,除钴离子外其它金属离子和 EDTA 对酶活影响都不大。

2.4　底物特异性

用不同种类的底物,浓度为 20%,与酶在 pH5.0,40℃作用,然后分别测定产物含量,其自转移反应速度见表2.

表2　底物特异性

底物			相对速率
Sucrose	蔗糖	G-F	100
1 Kestose	1 蔗果三糖	G-F1 2F	42
Nystose	蔗果四糖	G-F1-2F1-2F	8
Raffinose	棉子糖	Gall-6G-F	5

上表结果表明,该酶对蔗糖的果糖基转移能力最强,随着分子量的增加,其酶活逐渐下降,这说明可能是立体效应形成的空间障碍使得酶转移能力下降。另外,该酶对葡萄糖和果糖无转移果糖基能力,只能催化 β-D-呋喃果糖苷,说明其为一种 β-呋喃果糖苷酶。

2.5　酶反应时间对产物的影响

研究酶促反应时间对产物形成的影响,了解反应时间对低聚果糖形成可得到两个信息:一是对生产过程中的时间控制;二是得到酶反应的初速度,以利于动力学常数的测定。结果如图5所示,在 0～2h 内,蔗果三糖、蔗果四糖反应进程曲线基本上呈直线状态,这说明在酶活测定法所规定的条件下,反应 0.5～1h 所得的数据是落在直线范围之内,因而可以把它作为酶反应的初速度。从反应进程曲线看,蔗果三糖在反应 10h 基本达到平衡;而蔗果四糖

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

和五糖仍缓慢增加，到20h基本达到平衡；而蔗糖浓度连续下降，葡萄糖含量不断增加；反应时间在25h以上时，整个反应可认为已达平衡。

2.6 酶的动力学常数和抑制常数的测定

本文采用双倒数作图法(Lineweaver-Burk)[12]测定该酶的动力学常数，以蔗糖为底物，按上法在40℃，pH5.0之磷酸-柠檬酸缓冲液中测定转移酶之活力，以反应初速度V的倒数$1/V$对底物浓度$[S]$的倒数$1/[S]$作图，从图6计算得到$K_m = 47mmol$. $V_m = 0.512mmol/min$. 由此可见，该酶与底物蔗糖的亲和力是比较大的，Hirayama等人[13]报道的K_m为290 mmol(蔗糖)。

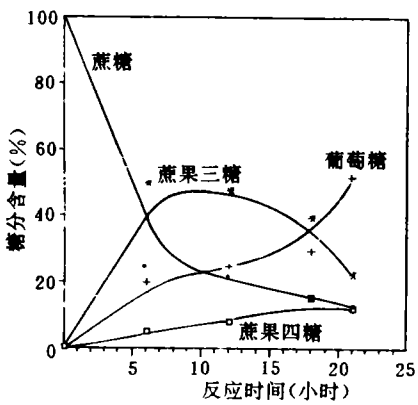


图5 低聚果糖反应进程图

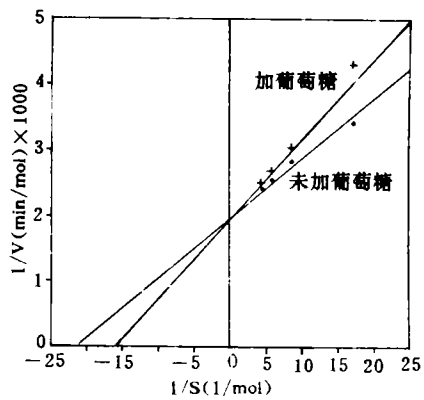


图6 双倒数法测定果糖转移酶的米氏常数

经动力学推导，对于竞争性抑制剂，可采用公式：

$$K'_m = K_m(1 + [I]/K_i)$$

其中K'_m是在存在有抑制剂浓度为$[I]$情况下的表观米氏常数，而K_m为抑制剂浓度为零的情况下的米氏常数。由$1/V$对$1/[S]$所作图上可求得K'_m和K_m，代入公式便可得到K_i值。

已有报道[7,14]，反应过程中产生的副产物葡萄糖对酶反应有抑制作用。为了研究酶促反应过程中可能存在的抑制物和抑制类型，将2%葡萄糖加入到底物蔗糖中进行反应，结果显示，酶促反应受到葡萄糖的竞争性抑制，竞争性抑制剂的存在会影响到酶和底物蔗糖的结合，结果显示，K'_m增加，而V值不变。在加入抑制剂时其$K'_m = 63mmol$，经代入公式计算出$K_i = 330mmol$.

严格地说，我们在测定的米氏常数K_m时酶反应体系中就含有一定量的抑制剂，因为葡萄糖是反应副产物，只是其含量较小，我们将它忽略了。

2.7 酶法生产低聚果糖

将100ml50%蔗糖溶液(pH5.0 含酶2U/g蔗糖)于50℃反应16h，得到产物含量如表3.

表3 低聚果糖成分

	葡萄糖	蔗糖	低聚果糖			
	G	GF	GF_2	GF_3	GF_4	GF_n
反应生成物	36	12	25	24	3	52

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

从表3可看出,低聚果糖得率为50%左右,除了未作用的部分蔗糖外,还存在着一定量的副产物葡萄糖,如何除去葡萄糖得到高纯度低聚果糖是下一步的工作重点。

最后,需要说明的是,有关能催化蔗糖合成低聚果糖的酶的名称还未一致,通常将微生物生产的酶称为β-D-呋喃果糖苷酶,而从植物中产生的酶称为1-果糖基转移酶(1-Fructosyltransferase,E.C. 2.4.1.99),又称SST(Sucrose:Sucrosetransferase)[11],现在,有把两种酶均称为果糖转移酶(Fructosyltransferase)的趋向。

参 考 文 献

1 Bacon J S D, Edelman J. J. Arch. Biochem,1950,28:467
2 Blanchard P H, Albon N. Arch. Biochem. 1950,29:220
3 日高秀昌,荣田利章. Bio Industry 1984,1(6):5～13
4 细谷宪. 第1回ネオシユガ-研究会报告. 明治制果. 东京:1982,10
5 细谷宪. 第2回ネオシユガ-研究会报告. 明治制果. 东京:1985,3
6 Jung K H, et al. Biotechnol. Lett. 1987,9,703
7 Jung K H, et al. Enzyme Microb. Technol. 1989, 11(8):491～4
8 Jong W Y, et al. Appl. Biochem. and Biotechnol. 1990,24/25,299
9 吴东儒. 糖类的生物化学. 高等教育出版社,1987.239
10 盐见德夫. 北海道大学农学部农艺化学科食品营养学讲座. 昭和 1957
11 Scott R W, et al. Biochem. J. 1966,100:23～24
12 张龙翔. 生化实验方法和技术. 人民教育出版社,1981
13 Hirayama M,Sumi N, Hidaka H. Agric. Biol. Chem. 1989,53(3):667～73
14 Hidaka,Hidemasa GB Patent 2 179 946

Some Properties of Fructosyltransferase from Asp. niger AS0023

Jiang Bo　Wang Zhang
(Dept. of Food Sci. and Eng.)

Abstract An Aspergillus niger strain AS0023 producing fructosyltransferase (FTS) was selected from soil. The optimum pH and temperature for producing FTS were 5.0 and 50℃, respectively. The advantage of the enzyme were high activity over wide range of pH from 3.5 to 10 and good thermostability. The effect of 12 chemical substances on FTS were tested, among which cobalt ion had a positive effect on the activity of FTS. The K_m value of the enzyme on sucrose was 47mmol. Glucose was a competive inhibiter and the K_i value was 330mmol. 52% FOS(FOS/total sugar) was produced after 50% sucrose solution was incubated with the enzyme at 50℃, pH5.0 for 16 hours.

Subject-words Oligosaccharides; Fructosyltransferase; Microorganisms / Fructooligosaccharides(FOS); β-Fructosyltransferase(FTS); Aspergillus niger

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net