

文章编号 :1009 - 038X(2000)02 - 0133 - 05

黑曲霉 AS0023 果糖转移酶和转化酶的 酶学特性^①

Lamia L'Hocine , 王 璋 , 江 波
(无锡轻工大学食品学院 , 江苏无锡 214036)

摘要 :研究了从黑曲霉 AS0023 分离和纯化的果糖转移酶(FTS)和转化酶(INV)的酶学特性. FTS 专一催化果糖转移反应 ,INV 专一催化水解反应 ;FTS 和 INV 的最适 pH 和温度分别是 5.8 和 50 ℃ ,4.4 和 55 ℃ ;用 1 mmol/L 的 Hg^{2+} 处理 ,FTS 完全失活而 INV 仍维持 72 % 的活性 ;这两种酶的酶动力学常数明显不同 ,以蔗糖为底物时 ,FTS 和 INV 的 K_m 值分别为 44.38 mmol/L 和 35.67 mmol/L ;果糖是 FTS 和 INV 的竞争性抑制剂 ,其 K_i 值分别为 35.44 mmol/L 和 105 mmol/L ,而葡萄糖只是 FTS 的竞争性抑制剂.

关键词 :果糖转移酶 ;果糖转化酶 ;黑曲霉 ;低聚果糖

中图分类号 :Q556 文献标识码 :A

Enzymatic Properties of Purified Fructosyltransferase and Invertase from *Aspergillus niger* AS0023

Lamia L'Hocine , WANG Zhang , JIANG Bo
(School of Food Science and Technology , Wuxi University of Light Industry , Wuxi 214036)

Abstract : The enzymatic characteristics and kinetic properties of fructosyltransferase(FTS) and invertase(INV) purified from *Aspergillus niger* AS0023 were investigated. FTS catalyzed exclusively fructosyltransfer reaction and INV hydrolytic reaction. Their optimum pH and temperature were 5.8 and 50 ℃ , 4.4 and 55 ℃ respectively. FTS was completely abolished with 1 mmol/L of Hg^{2+} while INV maintained 72 % of its original activity. The two enzymes exhibited distinctly different kinetic constants confirming their different nature. The K_m value for sucrose was 44.38 mmol/L and 35.67 mmol/L for FTS and INV respectively. Fructose was found to be a competitive inhibitor of the two enzymes with K_i of 35.44 mmol/L for FTS and 105 mmol/L for INV. Glucose was a competitive inhibitor of FTS only.

Key words : fructosyltransferase ; invertase ; *Aspergillus niger* ; fructooligosaccharides

低聚果糖主要由蔗果三糖、蔗果四糖和蔗果五 糖组成 ,它是由 1~3 个果糖基通过 β -2 ,1 键与蔗

① 收稿日期 :1999 - 06 - 29 ;修订日期 :1999 - 11 - 24.

作者简介 :Lamia L'Hocine(1969 年 1 月生) ,女 ,阿尔及利亚人 ,食品科学博士研究生.
万方数据

糖中的果糖基结合而成,这些低聚糖由于它们优良的生物功能而备受关注^[1].低聚果糖天然存在于许多植物中^[2,3],目前以蔗糖为原料采用酶法生产低聚果糖已实现产业化.能生产低聚果糖的酶在许多真菌,如黑曲霉^[4,5]、米曲霉^[6]、*A. japonicus*^[7]和节杆菌^[8]中都被发现.关于这些酶,许多报道认为是 β -呋喃果糖糖苷酶(转化酶),这是一种水解酶(EC 3.2.1.26),当作用于高浓度的蔗糖溶液时,它表现出很高的果糖基转移活性.然而,从黑曲霉 AS0023 中分离和纯化的两种酶,果糖转移酶(EC 2.4.1.9)和转化酶(EC 3.2.1.26),在酶学性质上表现出很大差异.本文研究这两种酶的酶学性质,包括其动力学常数.

1 材料与方法

1.1 酶的制备

黑曲霉 AS0023 在 17 L 的中试反应罐中于 30 ℃ 培养 24 h.培养基的组成为(g/dL):蔗糖 17.5,蛋白胨 1,酵母膏 0.5,硫酸镁 0.1,磷酸二氢钾 0.1;pH 6.收集反应罐中的菌丝体,经缓冲液清洗,高速分散器(Janke & Kunkel Ultra-turrax T25 型)处理 3 min(24 000 r/min),离心,得到粗酶提取液.然后采用硫酸铵沉淀,透析,所得蛋白中的 FTS 和 INV 用 DEAE-Sephadex A-25、Sephacryl S-200 和 Con A-Sephacryl 4B 等步骤分离和纯化.

1.2 酶活力测定

在一定的 pH 和温度下,底物为质量浓度为 10% 的蔗糖,中速搅拌,反应 1 h 后,100 ℃ 加热 10 min 以中止酶反应.转果糖基酶活力(U_t)和水解酶活力(U_h)通过分别测定蔗果三糖和果糖的生成量确定.一个酶活力单位定义为:在上述条件下,每

分钟生成 1 $\mu\text{mol/L}$ 蔗果三糖或果糖为一个 U_t 或 U_h 酶活力单位.

1.3 分析方法

用高压液相色谱(HPLC)分析酶反应产物. HPLC:Waters 209 系列,配置 RI401 示差折光检测仪,色谱柱:Merck 公司 Linchrosorb 氨基柱;流动相:体积分数为 75% 的乙腈溶液,体积流量 1.5 mL/min.

1.4 酶动力学研究

两种酶的动力学研究均在其最适反应条件下进行,在不同蔗糖浓度下测反应初速度.对 FTS,底物浓度为 0.05~0.25 mol/L;对 INV,底物浓度为 0.015~0.05 mol/L.研究添加果糖或葡萄糖对酶反应的影响,抑制类型由 Lineweaver-Burk 方程双倒数作图法确定,表观 K_i 值通过在不同抑制剂浓度下由 Lineweaver-Burk 方程所得之斜率再进行二次作图计算.

1.5 试剂

所用化学试剂均为分析纯.

2 结 果

2.1 pH 对 FTS 和 INV 酶活力和酶稳定性的影响

测定了 pH 在 2~11 之间的两种酶的活力,如图 1a 所示. pH 为 5.8 时,FTS 的酶活力最高;而 INV 的最大酶活力在 pH 4.4 时, pH 大于 5 后酶活力迅速下降,超过 7 d 后几乎没有酶活力.酶溶液在各种不同 pH 缓冲溶液中于 25 ℃ 保温 2 h 后,测定 pH 对酶稳定性的影响,按上述测定方法测定剩余酶活力,如图 1b 所示,两种酶在 pH 4.5~11 之间是稳定的,在这个范围内,转移酶的稳定性比转化酶略高.

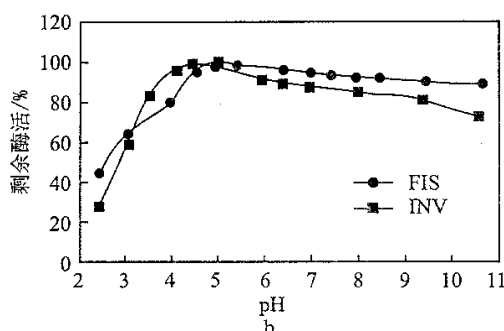
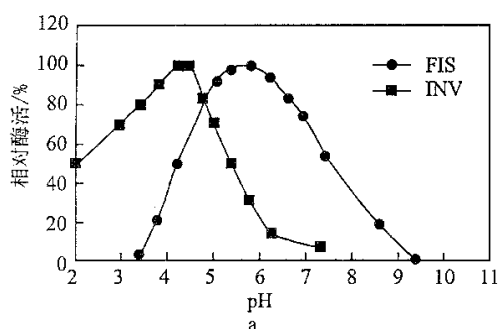


图 1 pH 对 FTS 和 INV 酶活力(a)和稳定性(b)的影响

Fig.1 Effect of the pH on the activity and stability of FTS and INV

2.2 温度对 FTS 和 INV 酶活力和酶稳定性的影响

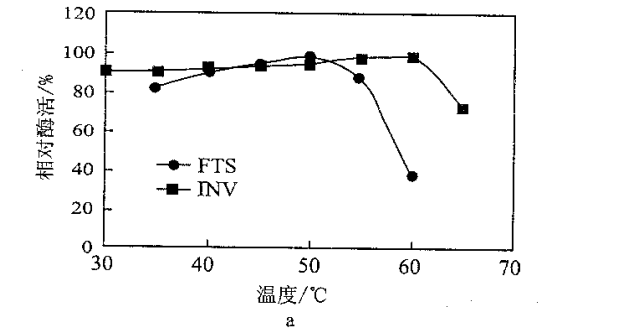
在最适 pH 条件下,分析 30~70 ℃ 之间酶的活力,如图 2a 所示. FTS 的最适温度为 50 ℃, INV 为

55 ℃. 图 2b 为温度对酶稳定性的影响. 30~70 ℃ 保温 2 h 后,分析剩余酶活,发现低于 50 ℃ 时,FTS 是稳定的.而 INV 在高于 65 ℃ 时,仍保留 80% 以

上的酶活.

2.3 化学物质对酶活力的影响

30 ℃ 保温 1 h,测定化学物质对 FTS 和 INV 酶活力的影响,如表 1 所示. HgCl₂ 和 AgNO₃ 完全抑制 FTS 活力,但在同样的浓度下,INV 仍保留 72 %



和 66% 的初始酶活力. INV 只受 FeSO₄、SrCl₂ 和 EDTA 轻微影响,尿素只抑制其 30% 的酶活,但这些物质对 FTS 未显示任何抑制效果. 苯胺是酵母和 *Neurospora* 转化酶^[9] 的强抑制剂,但对黑曲霉的 INV 只表现出轻微的抑制效果.

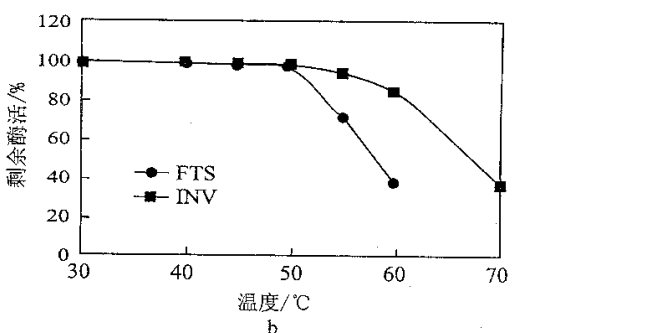


图 2 温度对 FTS 和 INV 酶活力(a)和稳定性(b)的影响

Fig.2 Effect of temperature on the activity and stability of FTS and INV

表 1 化学物质对 FTS 和 INV 活力的影响

Tab.1 Effect of metal ions and other chemicals on FTS and INV activity

化学物质	浓度/ (mmol/L)	相对活力/%	
		FTS	INV
对照(H ₂ O)		100	100
FeSO ₄	1	96	88
AlCl ₃	1	100	100
KCl	1	101	95
MgSO ₄	1	99	94
SrCl ₂	1	99	84
CuSO ₄	1	98	99
SnCl ₂	1	99	100
CuSO ₄	1	98	99
SnCl ₂	1	99	100
BaCl ₂	1	101	99
Pl(NO ₃) ₂	1	99	97
AgNO ₃	1	1	66
MnCl ₂	1	99	93
CaCl ₂	1	100	92
CoCl ₂	1	92	95
KI	0.4	100	90
HgCl ₂	0.1	1	76
HgCl ₂	1	0	72
SDS	1	100	94
SDS	10	42	59
EDTA	25	97	80
尿素	500	99	71
苯胺	1.5	105	92

2.4 酶动力学常数的测定

K_m 和 V_{max} 数据通过 Lineweaver-Burk 方程双倒数

作图法测定. 对 FTS, K_m 和 V_{max} 分别为 44. 38 mmol/L 和 1 030 μ mol/(mL·min),而 INV 的分别为 35. 67 mmol/L 和 398 μ mol/(mL·min). 不同浓度果糖和葡萄糖对 FTS 和 INV 的抑制效应如图 3 4 所示. 两种酶的酶反应均受果糖的竞争性抑制,用斜率对果糖浓度作图,得 FTS 和 INV 的 K_i 值分别为 35. 44 mmol/L 和 105 mmol/L. 葡萄糖是 FTS 的强烈抑制剂,其 K_i 为 12. 04 mmol/L,而本研究所用葡萄糖浓度对 INV 没有任何抑制效应.

3 讨 论

从黑曲霉 AS0023 分离和纯化的 FTS 和 INV 的催化特性可知,温度、pH、金属离子和其它抑制剂等对 FTS 和 INV 的酶活力具有不同的影响. 此外,测定动力学参数如 K_m 和 V_{max} 值有助于了解两种酶对蔗糖的亲 and 性. 与其它来源的酶比较,这两种酶的动力学常数(K_m 和 V_{max})的测定是困难的,主要是由于分离和纯化方法以及酶活力测定方法的差异造成的. 然而,从研究获得的 K_m 和 V_{max} 值表明,从黑曲霉 AS0023 中纯化的 FTS 对蔗糖的亲 and 力比从其它来源的要大,如 *Aureobasidium*^[10], *Ajppomicus*^[11] 和 *Aniger* ATCC20611^[12] 中的 FTS 的 K_m 值分别为 0. 96 ,0. 11 ,0. 29 mmol/L. 纯化的 INV 的 K_m 值与酵母 INV 的处在同样范围(25 ~ 44 mmol/L)^[2],但是比 *Azotobacter* INV 的 K_m (5 mmol/L)高^[9],比 *Zymomonas mobilis* INV 的 K_m (85. 6 mmol/L)低^[14].

Jung 和 Duan 等^[10,11] 也报道过葡萄糖对 FTS

的酶反应的抑制属竞争抑制类型,后者还报道了以蔗果三糖和蔗果四糖为底物时,葡萄糖对反应速率的抑制效应.然而,却并未报道本文所述的果糖对 FTS 酶反应的强烈抑制效应,这种效应部分解释了用 FTS 粗酶生产低聚果糖时反应速率下降的问题.果糖以几乎相同的方式抑制 INV 酶反应,尽管不如

抑制 FTS 时那么强烈.如同对 *Pycnoporus sanguineus* 中的转化酶^[15]的影响那样,未发现葡萄糖是黑曲霉 AS0023 中 INV 的抑制剂,但它却是酵母转化酶^[16]的非竞争性抑制剂.因此,可以推测两种酶在某些特性上尽管相似,但在催化作用的机制上还存在着一些差别.

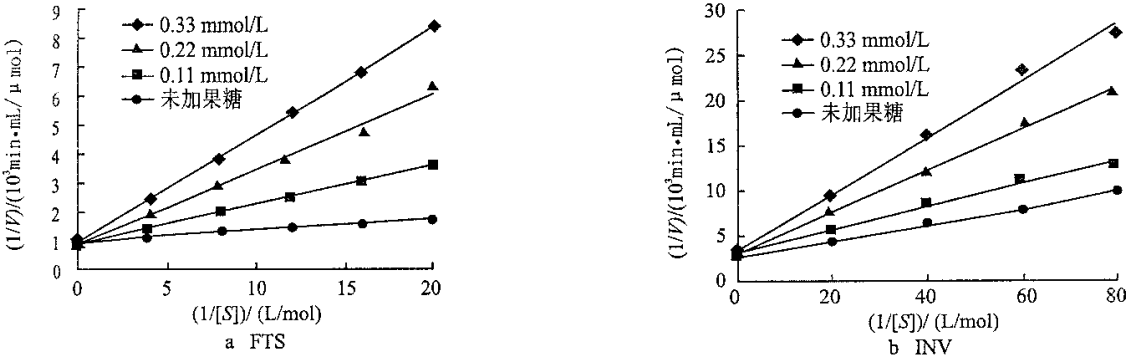


图 3 不同果糖浓度下酶反应的 $1/v - 1/s$ 图

Fig.3 Lineweaver-Burk plots of enzyme reaction rates using sucrose as substrate with and without fructose

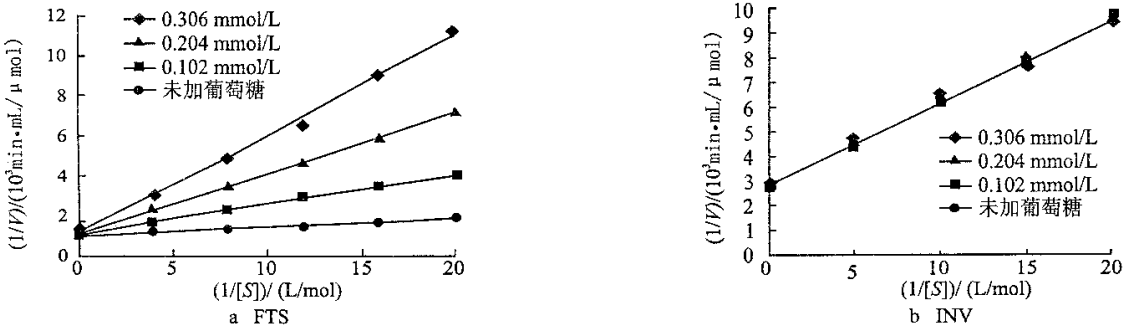


图 4 不同葡萄糖浓度下酶反应的 $1/v - 1/s$ 图

Fig.4 Lineweaver-Burk plots of enzyme reaction rates using sucrose as substrate with and without glucose

参考文献

[1] SPIEGEL J E , ROSE R , KARABELL V H , et al. Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients[J]. **Food Tech** , 1994(1) : 85 ~ 89

[2] SHIOMI N , IZAWA M. Purification and characterization of sucrose : sucrose 1-fructosyltransferase from the roots of *Asparagus* (*Asparagus officinalis* L.) [J]. **Agric Biol Chem** , 1980 44 : 603 ~ 614

[3] HENRY R J , DARBYSHIRE B. Sucrose fructosyltransferase and fructan : fructan fructosyltransferase from *Allium cepa* [J]. **Phytochemistry** , 1980 , 19 : 1017 ~ 1020

[4] UHM T B , JEON D Y , BYUN S M. Purification and properties of fructofuranosidase from *Aspergillus niger* [J]. **Biochem Biophys Acta** , 1987 , 926 : 119 ~ 126

[5] HIDAKA H , HIRAYAMA M , SUMI N. A fructooligosaccharides-producing enzyme β -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC 2061 [J]. **Agric Biol Chem** , 1988 52 : 1181 ~ 1187

[6] CHANG CT , LIN Y Y , TANG M S , et al. Purification and properties of β -fructofuranosidase from *Aspergillus oryzae* ATCC 7608 [J]. **Biochem Mol Biol International** , 1994 , 32 : 269 ~ 277

[7] CHEN W C , LIU C H. Production of β -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus* [J]. **Enz Microbiol Techno** , 1996 , 18 : 153

~160

[8]FUJITA K , HARA K , HASHIMOTO H ,et al. Transfructosylation catalysed by α -fructofuranosidase I from *Arthrobacter sp.* K-1[J]. **Agric Biol Chem** ,1990 , 54 :2655~2661.

[9]VEGA M G , CEJUDO F J , PANEQUE A. Purification and some properties of extracellular invertase from *Azotobacter chroococcum*[J]. **Enz Microbiol Technol** ,1991 , 13 :267~271

[10]JUNG K J , YUN J W , KYUNG R K , et al. Mathematical model forenzymatic production of fructooligosaccharides from sucrose[J]. **Enz Microbiol Technol** ,1989 , 11 :491~494

[11]DUAN K J , CHEN J S , SHEU D C. Kinetic studies mathematical model forenzymatic production of fructooligosaccharides from sucrose[J]. **Enz Microbiol Technol** ,1994 , 16 :334~339

[12]HIRAYAMA M , SUMI N , HIDAKA H. Purification properties of a fructooligosaccharides-producing β -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC20611[J]. **Agric Biol Chem** , 1989 , 53 :667~673

[13]GASCON S , NEUMANN N P , LAMPEN O J. Comparative study of the properties of the purified internal and external invertases from yeas[J]. **J Biol Chem** ,1968 , 243 :1573~1577

[14]MULLAN P , CHASE T J , EVELEIGH D E. Purification some properties of extracellular invertase B from *Zymomonas mobilis*[J]. **Appl Microbiol Biotechnol** , 1992 , 38 :341~346

[15]QUIROGA E N , VATTUONE M A , SAMPIETRO A R. Purification characterization of invertase from *Pycnoporus Sanguiueus*[J]. **Biochem Biophys Acta** ,1995 ,1251 :75~80

[16]COMBES D , MONSAN P. Sucrose hydrolysis by invertase. Characteriation of products substrate inhibition[J]. **Carbohydr Res** ,1983 , 117 :215~228

(责任编辑 :李春丽)